

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **047691**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

- | | |
|--|--|
| (45) Дата публикации и выдачи патента
2024.08.27 | (51) Int. Cl. <i>C07K 14/705</i> (2006.01)
<i>C07K 14/47</i> (2006.01)
<i>A61K 9/12</i> (2006.01)
<i>A61K 9/127</i> (2006.01)
<i>A61K 9/51</i> (2006.01)
<i>C12N 15/11</i> (2006.01)
<i>A61K 31/7105</i> (2006.01)
<i>A61K 31/7115</i> (2006.01)
<i>A61K 47/69</i> (2006.01)
<i>A61K 48/00</i> (2006.01)
<i>A61P 11/00</i> (2006.01) |
| (21) Номер заявки
202190410 | |
| (22) Дата подачи заявки
2014.03.14 | |

(54) **КОМПОЗИЦИИ мРНК CFTR И СВЯЗАННЫЕ С НИМИ СПОСОБЫ И ВАРИАНТЫ ПРИМЕНЕНИЯ**

- | | |
|--|---|
| (31) 61/783,663 | (56) WO-A2-2011012316
WO-A2-2007024708
База данных: NCBI Reference Sequence:
NP_000483.3, 03.03.2013, последовательность |
| (32) 2013.03.14 | |
| (33) US | |
| (43) 2022.03.31 | |
| (62) 201591477; 2014.03.14 | |
| (71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ТРАНСЛЕЙТ БИО, ИНК. (US);
ЭТРИС ГМБХ (DE) | |
| (72) Изобретатель:
Хартлейн Майкл, Гилд Брэйдон
Чарльз, Дероза Франк (US), Рудольф
Карстен, Планк Кристиан (DE), Смит
Лианн (US) | |
| (74) Представитель:
Нилова М.И. (RU) | |

-
- (57) Предложены материалы, препараты, способы получения и способы доставки мРНК CFTR для индукции экспрессии CFTR, в том числе в легких млекопитающих. Данное изобретение особенно полезно для лечения муковисцидоза.
-

B1

047691

**047691
B1**

Родственные заявки

В заявке на настоящий патент заявляется приоритет по предварительной заявке на патент США № 61/783663, поданной 14 марта 2013 г., полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

Уровень техники

Данное изобретение относится к композициям мРНК трансмембранного регулятора муковисцидоза (CFTR), вариантам их использования и способам их создания и применения.

Муковисцидоз - это ауточомное наследственное заболевание, возникающее вследствие мутации в гене CFTR, который кодирует хлорный ионный канал, который, как считается, участвует в регуляции множества других ионных каналов и транспортных систем эпителиальных клеток. Потеря функции CFTR приводит к хронической болезни легких, абберантному производству слизи и значительному уменьшению продолжительности жизни. См. в общем Rowe et al., *New Engl. J. Med.* 352, 1992-2001 (2005).

Несмотря на клонирование гена CFTR в 1989 году, эффективная терапия для замены CFTR с целью лечения муковисцидоза пока не разработана. В литературе задокументировано множество возникших сложностей при попытках индуцировать экспрессию CFTR в легких. Например, вирусные векторы, содержащие ДНК CFTR, запускали иммунный ответ и симптомы МВ сохранялись после введения. Conese et al., *J. Cyst. Fibres.* 10 Suppl 2, SI 14-28 (2011); Rosenecker et al., *Curr. Opin. Mol. Ther.* 8, 439-45 (2006). Невирусная доставка ДНК, включая ДНК CFTR, тоже вызывала запуск иммунного ответа. Alton et al., *Lancet* 353, 947-54 (1999); Rosenecker et al., *J Gene Med.* 5, 49-60 (2003). Более того, невирусные векторы ДНК столкнулись с дополнительной проблемой в том, что механизм комплекса ядерной поры обычно не пропускает ДНК внутрь ядра, где происходит транскрипция. Pearson, *Nature* 460, 164-69 (2009).

Другой источник трудностей в индукции экспрессии CFTR в легких - это собственно среда легких. Легочный ПАВ показало уменьшение эффективности трансфекции для катионно-липидных трансфекционных реагентов, таких как липофектамин (DOSPA:DOPE).

Ernst et al., *J. Gene Med.* 1, 331-40 (1999). Также, Rosenecker et al., 2003, см. выше, определили множество ингибиторных составляющих, присутствующих в поверхностной жидкости дыхательных путей. Была предложена мРНК-терапия как общий подход для индукции экспрессии терапевтического или заменяемого белка. Идея введения матричной РНК (мРНК) как средства продукции белка внутри хозяина была изложена ранее. (Yamamoto, A. et al. *Eur. J. Pharm.* 2009, 71, 484-489; Debus, H. et al. *J. Control Rel.* 2010, 148, 334-343). Тем не менее, в случае легких явные трудности были показаны для доставки мРНК с использованием определенных препаратов липоплекса. Например, сравнение *in vitro* и *in vivo* производимостей липоплекса, несущего мРНК или ДНК, установило, что хоть мРНК композиции дают более высокую экспрессию в культуре клеток, заметная экспрессия детектировалась только с композициями ДНК при введении интраназально в легкие мышей. Andries et al., *Mol. Pharmaceut.* 9, 2136-45 (2012).

Стоит также отметить, что CFTR - это относительно большой ген по сравнению с модельными или репортерными генами, такими как люцифераза светлячка (FFL). Можно сравнить длины кодирующей последовательности CFTR дикого типа (SEQ ID NO: 2) и кодирующей последовательности FFL (SEQ ID NO: 7). Разница в длине может влиять на стабильность при некоторых обстоятельствах, а значит и на то, будет ли, и в каких количествах, любая данная доза мРНК производить экспрессию белка. Более того, хотя *in vitro* синтез мРНК обычно предпочтительней, чем синтез в клетках из-за отсутствия нормальной клеточной мРНК и других компонентов клетки, являющихся нежелательными контаминантами, *in vitro* синтез мРНК с длинной кодирующей последовательностью, как мРНК CFTR, существенно сложнее осуществить, чем *in vitro* синтез мРНК со сравнительно короткой кодирующей последовательностью, как FFL.

РСТ патентная публикация WO2007/024708 и патентные публикации США US2010/0203627 и US2011/0035819 касаются терапевтического введения мРНК CFTR, но не предоставляют ни уменьшения продукции функционального CFTR в легких после введения мРНК CFTR, ни достаточных указаний для преодоления трудностей, связанных с индуцированием экспрессии CFTR в легких с использованием мРНК CFTR транскрибированной *in vitro*. Эти сложности связаны с осуществлением *in vitro* синтеза мРНК и с взаимодействиями композиций мРНК с легочно-специфичными субстанциями, которые, как было установлено исследователями, такими как Andreis et al (см. выше), делают композиции мРНК неэффективными, даже если соответствующие композиции ДНК показывали некоторый уровень экспрессии.

Поэтому существует необходимость в улучшенных материалах, препаратах, способах производства и способах доставки мРНК CFTR для индукции экспрессии CFTR, в том числе в легких млекопитающих, для лечения муковисцидоза.

Сущность изобретения

Данное изобретение основано, в частности, на разработке препаратов мРНК CFTR, и не природных мРНК CFTR, и методах их введения, которые могут вызвать экспрессию функционального CFTR *in vivo*. Композиции, способы и варианты использования, согласно настоящему изобретению, могут обеспечить экспрессию CFTR в легких больших млекопитающих с благоприятным профилем безопасности, подходящим для эффективного лечения муковисцидоза.

Таким образом, в одном аспекте, данное изобретение предусматривает метод получения CFTR *in vivo*, в частности в легких субъекта (например, млекопитающего), нуждающегося в доставке, путем доставки мРНК, кодирующую белок CFTR. В некоторых вариантах реализации изобретения мРНК, кодирующая белок CFTR, доставляется прямо в легкие субъекта. Используемый в данном документе термин "белок CFTR" подразумевает любой белок CFTR полной длины, его фрагмент или часть, которые могут быть использованы для замены активности встречающегося в природе белка и/или для уменьшения интенсивности, тяжести и/или частоты одного или больше симптомов, связанных с муковисцидозом. Например, подходящий белок CFTR в соответствии с данным изобретением может иметь аминокислотную последовательность, идентичную человеческому белку CFTR дикого типа (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах реализации изобретения подходящий белок CFTR в соответствии с данным изобретением может иметь аминокислотную последовательность на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, или 99% идентичную человеческому белку CFTR дикого типа (SEQ ID NO: 1).

В одном варианте реализации изобретение предусматривает метод индуцирования экспрессии CFTR в эпителиальных клетках легких млекопитающих, включающий контактирование эпителиальных клеток легких млекопитающих с композицией, где композиция является фармацевтической композицией, включающей *in vitro* транскрибированную мРНК; *in vitro* транскрибированная мРНК содержит кодирующую последовательность, которая кодирует SEQ ID NO: 1. В другом варианте реализации изобретения *in vitro* транскрибированная мРНК содержит кодирующую последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична SEQ ID NO: 1.

В одном варианте реализации изобретение предусматривает метод индукции экспрессии CFTR в целевой клетке млекопитающего, состоящий в контактировании клетки млекопитающего с композицией, содержащей *in vitro* транскрибированную мРНК, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1. В другом варианте реализации изобретения *in vitro* транскрибированная мРНК содержит кодирующую последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична SEQ ID NO: 1.

В другом варианте реализации изобретение предусматривает молекулу мРНК не природного происхождения, содержащую кодирующую последовательность, 5'-UTR и 3'-UTR, где кодирующая последовательность кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 и кодирующая последовательность по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 3. В другом варианте реализации изобретения кодирующая последовательность кодирует аминокислотную последовательность по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную SEQ ID NO: 1 и/или кодирующая последовательность на около 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% идентична SEQ ID NO: 3.

В другом варианте реализации изобретение предусматривает молекулу мРНК не природного происхождения, содержащую кодирующую последовательность, 5'-UTR и 3'-UTR, где кодирующая последовательность кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 и кодирующая последовательность содержит по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% оснований не дикого типа, приведенных в табл. 1, в позициях кодирующей последовательности, приведенных в табл. 1, относительно кодирующей последовательности дикого типа SEQ ID NO: 2.

В другом варианте реализации изобретение предусматривает молекулу мРНК не природного происхождения, содержащую кодирующую последовательность, 5'-UTR и 3'-UTR, где кодирующая последовательность кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 и кодирующая последовательность содержит по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% оснований не дикого типа, приведенных в таблице 2, в соответствующих позициях кодирующей последовательности, приведенных в табл. 2, относительно кодирующей последовательности дикого типа SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах реализации изобретение предусматривает молекулу мРНК не природного происхождения, содержащую кодирующую последовательность сигнального пептида. В конкретном варианте реализации изобретение предусматривает мРНК не природного происхождения, содержащую кодирующую последовательность лидирующей последовательности гормона роста. В конкретном варианте реализации изобретение предусматривает мРНК не природного происхождения, содержащую кодирующую последовательность SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах реализации изобретение предусматривает мРНК не природного происхождения, содержащую кодирующую последо-

вательность по меньшей мере 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% от SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 19.

В некоторых вариантах реализации изобретение предусматривает молекулу мРНК неприродного происхождения, содержащую последовательность SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 или SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах реализации изобретение предусматривает молекулу мРНК неприродного происхождения, содержащую последовательность по меньшей мере 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% от любой из SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, или SEQ ID NO: 17.

В другом варианте реализации изобретение предусматривает полинуклеотид, содержащий последовательность, комплементарную последовательности мРНК, соответствующей изобретению.

В другом варианте реализации изобретение предусматривает композицию, содержащую полинуклеотид соответствующий изобретению, РНК полимеразу и нуклеозидтрифосфаты.

В другом варианте реализации изобретение предусматривает фармацевтическую композицию, содержащую мРНК, соответствующую изобретению.

В другом варианте реализации изобретение предусматривает устройство для распыления или аэрозолизации, наполненный фармацевтической композицией, соответствующей изобретению.

В другом варианте реализации изобретение предусматривает культивируемую клетку, содержащую мРНК, соответствующую изобретению, и экспрессию функционального CFTR из мРНК.

В другом варианте реализации изобретение предусматривает вариант использования фармацевтической композиции, в соответствии с изобретением, для индукции экспрессии функционального CFTR.

В другом варианте реализации изобретение предусматривает метод индуцирования экспрессии CFTR в эпителиальных клетках легких млекопитающего, включающий контактирование эпителиальной клетки с композицией, где композиция - это фармацевтическая композиция, содержащая мРНК, соответствующую изобретению.

В другом варианте реализации изобретение предусматривает метод индуцирования экспрессии CFTR в целевой клетке млекопитающего, включающий контактирование целевой клетки с композицией, содержащей мРНК, соответствующей изобретению.

В другом варианте реализации изобретение предусматривает метод лечения муковисцидоза введением нуждающемуся в лечении субъекту мРНК, кодирующую белок CFTR, как описано в данном документе. В одном варианте реализации изобретения мРНК вводится в легкие субъекта. В одном варианте реализации изобретения мРНК вводится путем небулизации, распыления, внутриназального введения или аэрозолизации. В различных вариантах реализации изобретения введение мРНК приводит к экспрессии CFTR в легких пациента.

В конкретном варианте реализации данное изобретение предусматривает метод лечения муковисцидоза введением в легкие нуждающегося в лечении субъекта мРНК, содержащую кодирующую последовательность, которая кодирует SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах реализации данное изобретение предусматривает метод лечения муковисцидоза введением в легкие нуждающегося в лечении субъекта мРНК, содержащую кодирующую последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность, по меньшей мере на около 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, или 99% идентичную человеческому белку CFTR дикого типа (SEQ ID NO: 1). В другом конкретном варианте реализации данное изобретение предусматривает метод лечения муковисцидоза введением в легкие нуждающегося в лечении субъекта мРНК, содержащую кодирующую последовательность SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах реализации данное изобретение предусматривает метод лечения муковисцидоза введением в легкие нуждающегося в лечении субъекта мРНК, содержащую кодирующую последовательность, по меньшей мере на около 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, или 99% идентичную SEQ ID NO: 3.

В еще одном варианте реализации данное изобретение предусматривает метод получения мРНК, кодирующую белок CFTR, как описано в данном документе. В одном варианте реализации изобретение предусматривает метод получения мРНК CFTR *in vitro*, включающий контактирование выделенных полинуклеотидов с РНК полимеразой в присутствии нуклеозидтрифосфатов, где: выделенный полинуклеотид и РНК полимеразы содержатся не в клетке; выделенный полинуклеотид является матрицей для РНК полимеразы; выделенный полинуклеотид содержит промотор, функционально связанный с матричной последовательностью; матричная последовательность содержит последовательность, комплементарную последовательности SEQ ID NO: 1; и: (a) матричная последовательность содержит меньше скрытых промоторов чем комплементарная последовательность к SEQ ID NO: 2, (b) матричная последовательность содержит меньше прямых и/или не прямых повторов, чем SEQ ID NO: 2, (c) матричная последовательность содержит меньше участков, комплементарных невыгодным кодонам, чем SEQ ID NO: 2, или (d) содержание GC последовательности, комплементарной к кодирующей, меньше, чем содержание GC SEQ ID NO: 2.

В другом варианте реализации изобретение предусматривает метод получения мРНК CFTR *in vitro*, включающий контактирование изолированных полинуклеотидов с РНК полимеразой в присутствии нуклеозидтрифосфатов, где: выделенный полинуклеотид и РНК полимеразы содержатся не в клетке; выде-

ленный полинуклеотид является матрицей для РНК полимеразы; выделенный полинуклеотид содержит промотор, функционально связанный с матричной последовательностью; и РНК полимеразы синтезирует мРНК, содержащую последовательность, кодирующую SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах реализации этих вариантов использования и методов, *in vitro* транскрибированная мРНК является мРНК природного происхождения или мРНК дикого типа, кодирующая человеческий CFTR (SEQ ID NO: 2), модифицированная для добавления UTR не природного происхождения. В других вариантах реализации изобретения *in vitro* транскрибированная мРНК - это мРНК не природного происхождения, как описано выше.

Дополнительные объекты и преимущества изобретения будут разъяснены частью в последующем описании, и частью будут очевидны из описания или могут быть выяснены применением изобретения. Объекты и преимущества изобретения будут понятны и достигнуты с помощью элементов и комбинаций, в частности отмеченных в прилагающейся формуле изобретения.

Стоит понимать, что, как вышеприведенное общее описание, так и последующее детальное описание, приведены лишь для примера и объяснения, и не ограничивают изобретение, как было заявлено.

Прилагающиеся графические материалы, которые включены и составляют часть этой спецификации, иллюстрируют некоторые варианты реализации изобретения и, вместе с описанием, служат для объяснения принципов изобретения.

Краткое описание чертежей

Вышеуказанные аспекты и преимущества этого изобретения могут стать ясными из последующего детального описания со ссылками на прилагающиеся графические материалы.

Фиг. 1А. Детекция "С"-бэнда зрелого человеческого белка CFTR через 24 ч после трансфекции мРНК человеческого CFTR. Успешная продукция белка наблюдалась как для немодифицированной, так и для модифицированной (SNIM) мРНК (содержащей 25% 2-тиоуридина и 5-метилцитидина). Иммунопреципитация была проведена с использованием антитела R&D Systems MAB25031 и детекции с использованием Ab570.

Фиг. 1В. Вестерн-блот анализ легких CFTR-нокаутной мыши через 24 ч после обработки PEI/немодифицированными наночастицами мРНК CFTR. Мыши обрабатывались с помощью небулизации (джет-небулайзер Pari Boy) на протяжении около одного часа. Иммунопреципитация полученного человеческого белка CFTR была проведена в соответствии с предоставленными методами. "С"-бэнд, соответствующий зрелому белку, был детектирован у всех обработанных мышей, но отсутствовал у контрольных мышей.

Фиг. 2. Вольт-амперный график токов, вызванных 8-Br-cAMP, обработанных (4 мкг мРНК hCFTR) и необработанных HEK293T клеток. Высокий ток вызывался в клетках, трансфекцированных мРНК hCFTR по сравнению с необработанными клетками. Обработанные клетки, которые подвергались воздействию специфичного ингибитора белка CFTR, CFTRinh-172, показывают выраженное уменьшение (~89%) тока ионов Cl⁻.

Фиг. 3. Гистограмма токов, вызванных 8-Br-cAMP, обработанных (4 мкг мРНК hCFTR) и необработанных HEK293T клеток при создании +80 мВ мембранного потенциала. Высокий ток вызывался в клетках, трансфекцированных мРНК hCFTR по сравнению с необработанными клетками. Обработанные клетки, которые подвергались воздействию специфичного ингибитора белка CFTR, CFTRinh-172, показывают выраженное уменьшение (~89%) тока ионов Cl⁻.

Фиг. 4. Вольт-амперный график сравнения профилей клеток HEK 293 в нативных условиях и под воздействием форсколина и GlyH-101. Не наблюдалось никаких значительных изменений в токе ни в каком из сценариев.

Фигура 5. Вольт-амперный график токов, вызванных форсколином, обработанных (4 мкг мРНК hCFTR) и необработанных HEK293T клеток. Высокий ток вызывался в клетках, трансфекцированных мРНК hCFTR по сравнению с необработанными клетками. Обработанные клетки, которые поддавались воздействию специфичного ингибитора CFTR, GlyH-101, показывают выраженное уменьшение (~95%) тока ионов Cl⁻, как проиллюстрировано на ступенчатом графике (+100 мВ) на его правой стороне.

Фиг. 6. Гибридизация *in situ* мРНК человеческого CFTR в необработанных (PBS) (слева) и обработанных (справа) легких CFTR-нокаутной мыши. Мыши поддавались воздействию 30 мкг инкапсулированной в PEI наночастицах немодифицированной мРНК hCFTR путем внутритрахеального введения. Существенное положительное окрашивание наблюдается в обоих легких через 24 ч после введения.

Фиг. 7. Гибридизация *in situ* мРНК человеческого CFTR в обработанных легких CFTR-нокаутной мыши при разном увеличении (увеличение до 20х) Мыши поддавались воздействию 30 мкг инкапсулированной в PEI наночастицах немодифицированной мРНК hCFTR путем внутритрахеального введения.

Фиг. 8. Большое увеличение (40х) характерного участка легких, демонстрирующее гибридизацию *in situ* мРНК человеческого CFTR в обработанных (справа) легких CFTR-нокаутной мыши. мРНК человеческого CFTR была детектирована в апикальной цитоплазме целевых бронхиальных эпителиальных клеток через 24 ч после введения. Мыши поддавались воздействию 30 мкг инкапсулированной в PEI наночастицах немодифицированной мРНК hCFTR путем внутритрахеального введения.

Фиг. 9. Сравнение окрашивания при гибридизации *in situ* мРНК человеческого CFTR в обработан-

ных легких CFTR-нокаутной мыши через 6 ч (слева) и 24 ч (справа) после гибридизации. Мыши поддавались воздействию 30 мкг инкапсулированной в PEI наночастицах немодифицированной мРНК hCFTR путем интратрахеального введения. Интенсивное положительное окрашивание наблюдается через 6 ч в обоих легких в бронхиальных и альвеолярных участках, при этом существенное положительное окрашивание еще наблюдалось через 24 ч после введения.

Фиг. 10. Гибридизация *in situ* мРНК человеческого CFTR в необработанных (PBS) (сверху) и обработанных (снизу) легких CFTR-нокаутной мыши. Мыши поддавались воздействию 15 мкг немодифицированной мРНК hCFTR, инкапсулированной в C12-200 липидных наночастицах, путем интратрахеального введения. Существенное положительное окрашивание наблюдается по обоим легким через 6 ч после введения.

Фиг. 11. Большое увеличение (40x) характерного участка легких, демонстрирующее гибридизацию *in situ* мРНК человеческого CFTR в обработанных легких CFTR-нокаутной мыши. мРНК человеческого CFTR была детектирована в апикальной цитоплазме целевых бронхиальных участках (слева), а также во внутриклеточных альвеолярных участках (справа) через 6 ч после введения. Мыши поддавались воздействию 15 мкг немодифицированной мРНК hCFTR, инкапсулированной в C12-200 липидных наночастицах, путем интратрахеального введения.

Фиг. 12. Скрининг разных клеточных линий для экспрессии hCFTR. Иммуноблот CHO, и COS-7 (A), и ВНК, и РКС (B) клеток, трансфицированных конструктами, кодирующими hCFTR. Белковые лизаты были приготовлены через 24 ч после трансфекции и скринированы с использованием MA1-935 как первичного антитела. Стрелка указывает предполагаемый CFTR. См. обсуждение специфичности MA1-935 в примере 6.

Фиг. 13. Перекрестная реактивность разных антител на человеческий CFTR. (A) - мышинный анти-CFTR человека MA1-935 (Chemicon); (B) - мышинный анти-CFTR человека AB570 (Cystic Fibrosis Foundation); (C) - мышинный анти-CFTR человека AB596 (Cystic Fibrosis Foundation); (D) кроличий анти-CFTR человека G449 (Rockefeller University), стрелка указывает CFTR.

Фиг. 14. Иммунопреципитация человеческого CFTR с использованием трех различных антител (R29, R66/17 и R66/16) с последующей иммунодетекцией с использованием AB596. Полоса 1: клетки T84 (положительный контроль), полоса 2: необработанные ткани легких свиньи (300 мг), полоса 3: обработанные ткани легких свиньи (697 мг), полоса 4: обработанные ткани легких свиньи (163 мг).

Фиг. 15. Иммунопреципитация и вестерн блоттинг мыши через 24 ч после применения IT распыления 20 мкг SNIM мРНК hCFTR/10 мкг SNIM РНК FFL, каждая в препарате HGT5001 в примере 6. Клетки T84 служили положительным контролем, показывая С-бэнд зрелого гликозилированного белка и В-бэнд маннозилированного hCFTR. "супернатант" содержал фракцию клеточного экстракта без иммунопреципитированной фракции. "ИП" - иммунопреципитированная фракция.

Фиг. 16. Иммунопреципитация hCFTR из клеток T84 с использованием MAB25031 с последующей иммунодетекцией с использованием AB570 (A) и MAB1660 (B).

Фиг. 17. Иммунопреципитация CFTR из клеток NIH3T3 через 72 ч после трансфекции различными конструктами.

Фиг. 18. Иммунопреципитация CFTR из клеток NIH3T3 через 72 ч после трансфекции различными конструктами с использованием 500 мкг MAB1660 (левая и центральная панель) и увеличенное количество общего белка (8 мг) при использовании MAB25031 (правая панель).

Фиг. 19. Иммунопреципитация hCFTR, с использованием MAB25031 и последующей иммунодетекцией с использованием AB570, из проб свиных легких после доставки SNIMРНК hCFTR в препарате PEI в примере 6. Полоса 1: проба из люциферазо-отрицательной левой каудальной доли свиньи № 2, полоса 2: проба из люциферазо-положительной области легкого свиньи № 1.

Фиг. 20. Небулизация была проведена на анестезированных и провентелированных свиньях (слева). Небулайзер был линейно связан с вентиляционной системой (справа, см. белую стрелку).

Фиг. 21. Экспрессия люциферазы, измеренная в гомогенатах образцов свиной ткани из разных областей легких, после аэрозольного введения 1 мг SNIM РНК FFL в препарате PEI в примере 6 с меш-небулайзером EFlow. Образцы легких были культивированы *ex vivo* в течение ночи перед измерениями люциферазы (пг люциферазы/мг ткани легкого).

Фиг. 22. ВЛI экспрессии люциферазы в образцах характерных свиных тканей из разных областей легких после аэрозольного введения 1 мг SNIM РНК FFL в препарате PEI в примере 6. Образцы легких были культивированы *ex vivo* в течение ночи перед измерениями.

Фиг. 23. ВЛI экспрессии люциферазы в образцах характерных свиных тканей из разных областей легких после аэрозольного введения 1 мг SNIM РНК FFL в препарате PEI в примере 6 с использованием джет-небулайзера PARI BOY. Образцы легких были культивированы *ex vivo* в течение ночи перед измерениями.

Фиг. 24. ВЛI экспрессии люциферазы в образцах характерных свиных тканей из разных областей легких после аэрозольного введения 1 мг SNIM РНК FFL в препарате PEI в примере 6 с использованием меш-небулайзера Aegoneb. Образцы легких были культивированы *ex vivo* в течение ночи перед измерениями.

Фиг. 25. BLI экспрессии люциферазы в образцах характерных свиных тканей из разных областей легких после аэрозольного введения 1 мг SNIM РНК FFL в "препарате SHIRE № 3" (HGT5001:DOPE:Chol:DMGPEG2K (50:25:20:5) (молярное отношение) использованием меш-небулайзера Aeroneb. Образцы легких были культивированы *ex vivo* в течение ночи перед измерениями.

Фиг. 26. BLI экспрессии люциферазы в образцах свиных тканей из разных областей легких из одной необработанной контрольной свиньи. Другая необработанная контрольная свинья показывала такой же результат (не проиллюстрировано).

Фиг. 27. BLI экспрессии люциферазы в образцах легких из единожды обработанных свиной № 3 и № 6. Аэрозольное введение по 1 мг SNEVI РНК FFL и SNEVI РНК hCFTR в препарате PEI в примере 6 было проведено с использованием меш-небулайзера Aeroneb. Проиллюстрированы срезы целого легкого свиньи. Три верхних ряда: свинья № 3, три нижних ряда: свинья № 6.

Фигура 28. BLI экспрессии люциферазы в образцах легких из дважды обработанных свиной № 4 и № 8. Аэрозольное введение по 1 мг SNEVI РНК FFL и SNEVI РНК hCFTR в препарате PEI в примере 6 было проведено с использованием меш-небулайзера Aeroneb. Проиллюстрированы срезы целого легкого свиньи. Три верхних ряда: свинья № 4, три нижних ряда: свинья № 8.

Фиг. 29. BLI экспрессии люциферазы в образцах легких из трижды обработанных свиной № 1 и 2. Аэрозольное введение по 1 мг SNEVI РНК FFL и SNEVI РНК hCFTR в препарате PEI в примере 6 было проведено с использованием меш-небулайзера Aeroneb. Проиллюстрированы срезы целого легкого свиньи. Три верхних ряда: свинья № 1, три нижних ряда: свинья № 2.

Фиг. 30. Иммуногистохимия (ИНС) на тканях легкого трижды обработанной свиньи № 1. Аэрозольное введение по 1 мг SNEVI РНК FFL и SNEVI РНК hCFTR в препарате PEI в примере 6 было проведено с использованием меш-небулайзера Aeroneb. Экспрессия люциферазы видна в красновато-розовом цвете (анти-люциферазное pAb 1:300, G7451, Promega, Refine AP-Kit, хромоген: фуксин новый).

Фиг. 31. Высоко BLI-положительная ткань трижды обработанной свиньи № 1 была подана ИП/ВБ. Полоса 1: клетки T84 (положительный контроль), полоса 2: ткань легкого необработанной свиньи (300 мг), полоса 3: ткань легкого обработанной свиньи (697 мг), полоса 4: ткань легкого обработанной свиньи (163 мг). Зрелый сложно-гликозилированный hCFTR проявился в виде размытого так называемого С-бэнда. Богатый маннозой hCFTR проявился в виде более плотной так называемого В-бэнда. Экспрессия hCFTR наблюдалась в клетках T84 и свиной легочной ткани обработанной SNIM-РНК hCFTR свиньи № 1, в то время как экспрессия hCFTR не наблюдалась в необработанных свиньях.

Фиг. 32. Иммунопреципитация hCFTR, с использованием MAB25031 и последующей иммунодетекцией с использованием AB570, из проб свиных легких после доставки SNIM РНК hCFTR в препарате PEI в примере 6. Полоса 1: проба из люциферазо-отрицательной левой каудальной доли свиньи № 2, полоса 2: проба из люциферазо-положительной области легкого свиньи № 1.

Фиг. 33 А и В. *In vitro* трансфекция клеток HEK 293T SNIM РНК, с оптимизированными кодонами, меченого С-концевым His₁₀ (CO-CFTR-C-His₁₀) и не меченого (CO-CFTR) человеческого CFTR. После трансфекции был приготовлен лизат из целой клетки и проанализирован на экспрессию с помощью Вестерн блота с использованием (А) анти-CFTR антитела № 217 и (В) анти-His антитела 1187. Трансфецированные образцы сравнивались с лизатом не трансфецированных контрольных HEK 293T (полоска 3).

Фиг. 33 С. *In vitro* трансфекция клеток HEK293T SNIM РНК, с оптимизированными кодонами, кодирующей человеческий CFTR с лидирующей последовательностью гормона роста и (GH-CO-CFTR) или SNIM РНК, с оптимизированными кодонами, кодирующей человеческий CFTR, меченый С-концевым His₁₀ (CO-CFTR-C-His₁₀). После трансфекции был приготовлен лизат из целой клетки и проанализирован на экспрессию с помощью Вестерн блота с использованием анти-CFTR антитела № 217. Трансфецированные образцы сравнивались с лизатом не трансфецированных контрольных HEK 293T (полоска 3).

Фиг. 34. *In vivo* трансфекция CFTR нокаутных мышей SNIM РНК, с оптимизированными кодонами, инкапсулированной в препаратах как липидных (сКК-Е12), так и полимерных (PEI) наночастиц, кодирующей человеческий CFTR, меченый С-концевым His₁₀. Последующая доставка, с помощью распыления, каждого соответствующего препарата мРНК, лизат тканей правого и левого легкого был приготовлен и проанализирован на экспрессию CFTR с помощью Вестерн-блота с использованием анти-His антитела 1187. Лизаты тканей контрольных CFTR нокаутных легких и CFTR-His₁₀ HEK293 были использованы как отрицательный и положительный контроли, соответственно.

Фиг. 35. Биоломинисцентная детекция экспрессии FFL в образцах свиных легких, собранных после распыления водой для инъекции.

Фиг. 36. Биоломинисцентная детекция экспрессии FFL в образцах свиных легких, собранных после распыления 1 мг SNIM РНК FFL+1 мг SNIM РНК CO-CFTR в препарате разветвленного 25 кДа PEI.

Фиг. 37. Биоломинисцентная детекция экспрессии FFL в образцах свиных легких, собранных после распыления 1 мг SNIM РНК FFL+5 мг SNIM РНК CO-CFTR в препарате разветвленного 25 кДа PEI.

Фиг. 38. Биоломинисцентная детекция экспрессии FFL в образцах свиных легких, собранных после распыления 1 мг SNLM РНК FFL+10 мг SNLM РНК CO-CFTR в препарате разветвленного 25 кДа PEI.

Фиг. 39. Вычисление относительной экспрессии CFTR в разных группах. Интенсивности полос были нормализованы к полосе 150 кДа в белковом маркере.

Фиг. 40. Характерный пример "CFTR-положительных" бронхов, с по меньшей мере одной эпителиальной клеткой, найденной в слое эпителиальных клеток, показывающей ясный мембрано-локализованный сигнал CFTR при иммуногистохимической окраске CFTR с использованием анти-CFTR антител.

Фиг. 41. Иммуногистохимическая окраска CFTR в свиных легких после аэрозольной доставки контроля (WFI) или 5 мг SNLM РНК CO-CFTR.

Фиг. 42. Иллюстрирует "низкий" уровень экспрессии CFTR, проанализированной в свиных легких иммуногистохимической окраской с помощью анти-CFTR, после аэрозольной доставки 5 мг SNLM РНК CO-CFTR.

Фиг. 43. Иллюстрирует "средний" уровень экспрессии CFTR, проанализированной в свиных легких иммуногистохимической окраской с помощью анти-CFTR, после аэрозольной доставки 5 мг SNIM РНК CO-CFTR.

Фиг. 44. Иллюстрирует "высокий" уровень экспрессии CFTR, проанализированной в свиных легких иммуногистохимической окраской с помощью анти-CFTR, после аэрозольной доставки 5 мг SNIM РНК CO-CFTR.

Фиг. 45. Иммуногистохимическая окраска CFTR в свиных легких после аэрозольной доставки контроля (WFI) или 10 мг SNIM РНК CO-CFTR.

Фиг. 46. Вычисление относительного количества CFTR-положительных бронхов/бронхиол на животное. Анализ каждой группы (WFI; и 1, 5, 10 мг SNIM РНК человеческого CFTR) через 24 ч после аэрозольного введения. Экспрессия CFTR, нормализованная к интенсивности стандарта 150 кДа белка. (WFI=9.4±5.6%, 1MG=15.2±6.6%, 5MG=25.4±14.1%, 10MG=20.9±3.7%; WFI против 5MGp=0.0281, WFI против 10MGp=0.0174)

Фиг. 47. Иллюстрирует мультиплексную *in situ* детекцию нуклеиновых кислот (А) убиквитина С и (В) *dar В* в свиных легких после аэрозольной доставки воды для инъекции небулайзером.

Фиг. 48. Иллюстрирует мультиплексную *in situ* детекцию нуклеиновых кислот (А) убиквитина С и (В) *dar В* в свиных легких после аэрозольной доставки 1 мг SNIM РНК FFL+10 мг SNIM РНК CO-CFTR в препарате разветвленного 25 кДа PEL.

Фиг. 49. Иллюстрирует мультиплексную *in situ* детекцию нуклеиновых кислот в (А) правой верхней и (В) левой верхней частях у свиней после аэрозольной доставки воды для инъекции небулайзером.

Фиг. 50. Иллюстрирует мультиплексную *in situ* детекцию нуклеиновых кислот в (А) правой верхней и (В) левой верхней частях у свиней после аэрозольной доставки 1 мг SNIM РНК FFL+1 мг SNIM РНК CO-CFTR в препарате разветвленного 25 кДа PEL.

Фиг. 51. Иллюстрирует мультиплексную *in situ* детекцию нуклеиновых кислот в (А) правой верхней и (В) левой верхней частях у свиней после аэрозольной доставки 1 мг SNLM РНК FFL+5 мг SNLM РНК CO-CFTR в препарате разветвленного 25 кДа PEL.

Фиг. 52. Иллюстрирует мультиплексную *in situ* детекцию нуклеиновых кислот в (А) правой верхней и (В) левой верхней частях у свиней после аэрозольной доставки 1 мг SNIM РНК FFL+10 мг SNIM РНК CO-CFTR в препарате разветвленного 25 кДа PEL.

Фиг. 53. Иллюстрирует положительную детекцию активного белка люциферазы светлячка (FFL) у обработанных свиней с помощью люминисценции при воздействии мРНК FFL/CO-CFTR-C-His10, инкапсулированной в сКК-Е12 липидных наночастицах. Свиньи обрабатывались 1 мг мРНК FFL+9 мг мРНК CO-CFTR-C-His10, инкапсулированными в липидных наночастицах, с помощью распыления с использованием джет-небулайзера Рагі и умерщвлены через 24 ч после обработки. Люминисценция FFL была визуализирована с помощью биоиллюмометра IVIS.

Фиг. 54. Иллюстрирует типичные результаты экспрессии hCFTR в клетках НЕК, трансфицированных, с использованием комплексов для небулизации, свиньям 10, 11 и 12 (доза в 1 мг).

Фиг. 55. Иллюстрирует типичные результаты экспрессии hCFTR в клетках НЕК, трансфицированных, с использованием комплексов для небулизации, свиньям 13, 14 и 15 (доза в 5 мг) и в клетках НЕК, трансфицированных, с использованием комплексов для небулизации, свиньям 19, 20 и 21 (доза в 10 мг).

Фиг. 56. Иллюстрирует типичные результаты экспрессии hCFTR в клетках НЕК, трансфицированных, с использованием комплексов для небулизации, свиньям 16 (доза в 5 мг), 22 (доза в 10 мг) и 67 (доза в 1 мг).

Фиг. 57. Иллюстрирует типичные результаты экспрессии hCFTR в клетках НЕК, трансфицированных, с использованием комплексов для небулизации, свиньям 17, 18 (доза в 5 мг), 23, 24 (доза в 10 мг) и 68, 69 (доза в 1 мг).

Подробное описание изобретения

Определения.

Термин "полинуклеотид", используемый в данном документе, обычно относится к нуклеиновой кислоте (т.е. ДНК или РНК). Термины полинуклеотид, нуклеиновая кислота, ДНК, РНК и мРНК включают молекулы, содержащие: стандартные, или немодифицированные остатки; нестандартные, или модифицированные остатки; и смеси стандартных и нестандартных остатков.

Термин "мРНК", используемый в данном документе, обычно относится к модифицированной или немодифицированной РНК, включая как кодирующий, так и не кодирующие участки.

Фраза "кодирующий участок", мРНК, используемая в данном документе, обычно относится к участку, который при трансляции дает продукт экспрессии, такой как полипептид, белок или фермент.

"Нестандартное азотистое основание" - это основание, не относящееся к природным основаниям аденину (А), цитозину (С), гуанину (G), тимину (Т) или урацилу (U). Нестандартное азотистое основание - это аналог специфического азотистого основания (А, С, G, Т или U), если его свойства спаривания в двойной спирали нуклеиновой кислоты и место инкорпорации ДНК или РНК полимеразой в двойную спираль нуклеиновой кислоты (включая локальную РНК-ДНК спираль, которая образуется во время транскрипции ДНК матрицы РНК полимеразой) наиболее схожи с одним из пяти приведенных ранее оснований, с оговоркой, что аналоги Т обычно будут также и аналогами U и наоборот. Для целей определения процента идентичности первой последовательности относительно второй последовательности, аналог основания не является неправильной парой к природному основанию; например, псевдоуридин отвечает уридину, 5-метилцитидин отвечает цитидину и тому подобное.

Термин "нестандартный", использованный вместе с терминами, включающими, но не ограничивающимися, "нуклеозид", "основание", "нуклеотид" или "остаток" должен быть интерпретирован также, как и при использовании вместе с термином "азотистое основание".

"Содержание GC" - это часть или процент всех остатков азотистых оснований в последовательности нуклеиновой кислоты, которые относятся к остаткам гуанина, цитозина или их аналогов. Например, последовательность в 100 нк, содержащая точно 30 цитозинов, точно 30 гуанинов, точно один аналог цитозина и точно один аналог гуанина имеет содержание GC 62%.

"Неоптимальный кодон", используемый в данном документе, относится к кодону, который транслируется менее эффективно или медленней в клетке млекопитающего, чем другой кодон той же аминокислоты. Неоптимальные кодоны обычно включают кодоны с А или U в 3-ей, или "wobble" (неоднозначной) позиции кодона. Обсуждение неоптимальных кодонов см., например, в патентной публикации США 2009/0069256 А1.

"Молекула мРНК не природного происхождения" - это мРНК, которая не образуется в ходе нормальной транскрипции и сплайсинга в клетках дикого типа. мРНК может быть определена как не встречающаяся в природе по виду ее последовательности (например, по наборам кодонов и/или одной или больше UTR, которые не встречаются ни в какой мРНК CFTR природного происхождения) и/или если она включает нестандартные нуклеотидные остатки. Молекула мРНК не природного происхождения может быть синтезирована *in vitro*.

В каждой из таблиц 1 и 2 ниже, столбец NWT означает основание не дикого типа в позиции (Pos.) в кодирующей последовательности CFTR (см., например SEQ ID NO: 3), а столбец WT означает основание дикого типа в той же позиции (см., например SEQ ID NO: 2 или запись RefSeq для человеческого CFTR (№ доступа NM_000492.3, 10 февраля 2013 г., версия доступная с GenBank; отметим, что последовательность NM_000492.3 содержит не кодирующие последовательности, так что кодирующая последовательность расположена в позициях с 133 по 4575, так что, например, позиция 7 в таблице снизу соответствует позиции 139 последовательности NM_000492.3).

мРНК CFTR не природного происхождения.

В дополнение к предоставленным методам получения *in vivo* функционального CFTR с использованием мРНК CFTR природного происхождения или дикого типа (и составляющих, содержащихся в этой мРНК) изобретение также предусматривает мРНК не природного происхождения, которая кодирует белок CFTR (например, SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах реализации изобретения мРНК CFTR не природного происхождения очищена или изолирована.

В некоторых вариантах реализации изобретения мРНК CFTR не природного происхождения присутствует в клетке. В некоторых вариантах реализации изобретения клетка, содержащая мРНК CFTR не природного происхождения, не синтезировала мРНК CFTR не природного происхождения и/или не содержит ДНК, комплементарную к мРНК CFTR не природного происхождения и/или функциональный ген CFTR; клетка опционально может содержать неактивный ген CFTR, как например ген CFTR с нонсенс-, миссенс-мутациями, сдвигом рамки считывания или делециями, которые делают продукт экспрессии гена нефункциональным. В некоторых вариантах реализации изобретения клетка, содержащая мРНК CFTR не природного происхождения, содержала также функциональный белок CFTR, транслированный из мРНК CFTR не природного происхождения. Клетка может быть, например, эпителиальной клеткой легкого, клеткой печени или клеткой почки. В некоторых вариантах реализации изобретения "клетка" является культурой клеток.

Кодирующая последовательность CFTR.

В некоторых вариантах реализации изобретения мРНК CFTR, соответствующая изобретению, содержит кодирующую последовательность с меньшим числом участков, комплементарных скрытым промоторам, чем SEQ ID NO: 2 (то есть, кодирующая последовательность человеческого CFTR дикого типа), меньшим числом прямых и/или инвертированных повторов, чем SEQ ID NO: 2, меньшим числом неоптимальных кодонов, чем SEQ ID NO: 2, и/или содержание GC кодирующей последовательности меньше, чем содержание GC в SEQ ID NO: 2.

Скрытые промоторы, прямые и/или инвертированные повторы и/или неоптимальные кодоны могут быть распознаны при должном умении, используя обычные методы. Например, содержание прямых и/или инвертированных кодонов в последовательности может быть определено анализом последовательности (Liu et al., Journal of Theoretical Biology (2014) 344: 19-30). Содержание скрытых промоторов в последовательности также может быть определено анализом последовательности, например, присутствием последовательностей Шайна-Дальгарно внутри конструктора или подобных.

В некоторых вариантах реализации изобретения мРНК CFTR, соответствующая изобретению, транскрибируется *in vitro*, то есть мРНК была синтезирована в искусственной системе, не в биологической клетке (например, в бесклеточной *in vitro* транскрипционной системе). Обычно, транскрипция *in vitro* предполагает наличие ДНК-матрицы, содержащей промотор и последовательность, комплементарную к желаемой мРНК (которая может кольцевой или линейной), РНК полимеразы и нуклеозидтрифосфатов в подходящих условиях реакции (соли, буферы и температура). В реакционной смеси могут присутствовать ингибиторы РНКазы, восстанавливающие агенты и/или пирофосфатаза. В некоторых вариантах реализации изобретения РНК полимеразы является РНК полимеразой T7.

В некоторых вариантах реализации изобретения мРНК CFTR, соответствующая изобретению, содержит кодирующую последовательность, содержащую по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% оснований не дикого типа, приведенных в таблице 1 в соответствующих позициях кодирующей последовательности, приведенных в таблице 1, относительно последовательности дикого типа SEQ ID NO: 2.

Таблица 1

Основания не дикого типа, которые могут быть использованы в кодирующей последовательности мРНК, кодирующей CFTR

Pos.	NWT	WT
7	c	a
12	c	g
15	g	u
18	c	g
30	u	c
33	c	u
36	g	c
45	c	u
48	c	u
52	u	a
53	c	g
54	a	c
60	u	c
61	c	a
63	g	a
66	u	a
69	c	u
70	c	u
72	u	g
75	a	g
78	g	a
81	g	a
84	u	c
85	c	a
87	g	a
91	a	c

Pos.	NWT	WT
93	g	c
96	u	g
99	g	a
105	u	a
111	c	a
117	g	a
123	c	u
126	g	u
129	a	u
135	g	u
138	g	u
141	u	c
144	c	u
147	c	a
150	g	u
153	g	a
156	g	a
157	c	u
159	c	g
163	c	a
165	g	a
174	c	u
175	c	a
177	c	a
180	a	g
183	c	g

Pos.	NWT	WT
186	g	u
189	u	a
198	c	u
201	g	u
204	g	a
210	c	u
213	c	u
216	a	c
219	g	u
220	a	c
222	a	g
223	a	c
225	g	a
228	c	u
231	c	u
238	c	a
240	g	a
243	c	u
252	c	u
255	u	a
261	c	u
264	g	a
268	c	u
270	c	a
276	g	a
282	a	c

047691

291	c	a
294	a	g
297	c	u
300	g	c
303	g	a
304	u	c
309	u	a
310	c	a
312	c	a
315	u	c
318	c	a
321	c	u
324	g	c
327	c	u
333	c	g
342	a	g
345	a	g
351	g	c
352	a	u
353	g	c
354	c	u
363	c	u
366	c	u
369	c	a
372	g	c
375	c	a
378	a	c
379	c	u
381	g	a
384	u	c
385	u	c
387	g	u
390	u	c
393	c	u
396	c	u
399	c	g
402	a	g
408	u	g
409	u	c
411	g	c
412	u	c
414	g	a
417	u	c

423	a	c
426	c	u
429	c	u
435	c	u
444	c	u
447	u	a
457	c	a
462	c	a
474	c	u
480	c	u
483	c	u
486	a	g
492	a	u
493	c	u
495	g	a
498	a	g
501	c	g
504	g	a
505	u	a
506	c	g
507	g	c
510	g	u
513	g	u
514	u	c
516	g	a
522	g	a
525	u	a
526	u	a
527	c	g
528	c	u
531	c	u
534	u	a
537	g	a
538	u	c
540	g	u
543	g	u
544	u	a
545	c	g
546	c	u
549	g	c
553	a	u
554	g	c
555	u	c

558	u	c
564	c	g
573	c	u
579	g	a
585	g	u
588	g	a
589	c	u
609	u	c
612	c	u
615	g	u
624	c	g
627	c	a
630	u	c
631	u	c
633	g	c
639	c	g
642	u	a
645	u	c
652	c	u
657	g	a
663	a	g
672	u	c
678	c	a
681	g	u
684	a	u
687	u	c
693	u	a
696	g	c
697	u	c
699	g	u
702	a	c
703	u	c
705	g	u
720	u	a
724	c	a
726	g	a
741	u	c
742	c	a
744	c	a
747	c	u
756	g	u
759	u	g
762	a	g

047691

766	u	a
767	c	g
768	g	u
777	c	u
780	c	g
783	c	u
786	u	c
789	g	a
798	c	u
804	c	u
810	g	a
813	g	u
816	c	u
819	a	g
822	c	a
825	u	c
840	u	a
846	g	a
849	g	a
862	c	u
864	c	a
865	c	a
867	c	a
873	u	a
876	g	a
888	c	u
891	c	g
897	g	a
900	g	c
906	c	g
907	c	a
909	g	a
912	u	c
919	u	a
920	c	g
921	g	c
927	g	c
936	u	c
939	c	a
948	c	u
951	u	g
954	c	g
958	c	u

960	c	a
963	g	u
966	u	g
967	u	c
969	g	u
972	u	c
978	c	a
979	u	c
981	g	a
984	u	c
987	g	a
990	g	a
993	u	c
1002	c	g
1005	g	a
1008	u	a
1017	g	c
1020	u	c
1023	g	a
1035	a	u
1036	u	c
1047	a	g
1050	g	c
1053	a	u
1065	g	c
1071	c	u
1074	g	a
1077	g	a
1092	g	u
1101	g	a
1104	c	a
1113	c	a
1116	a	g
1119	c	u
1125	g	a
1137	g	a
1140	c	u
1146	c	a
1147	c	u
1152	g	a
1155	c	u
1158	u	c
1159	c	u

1161	u	a
1164	u	g
1170	g	a
1173	g	a
1179	a	g
1191	g	a
1194	g	a
1197	u	c
1200	u	c
1206	a	g
1212	u	a
1218	a	g
1222	c	u
1224	g	a
1239	g	a
1242	g	a
1245	u	c
1248	c	u
1254	c	u
1255	c	a
1257	c	a
1260	g	a
1263	c	u
1266	a	u
1272	g	u
1275	c	u
1278	u	c
1279	u	a
1280	c	g
1284	g	c
1287	u	c
1291	u	a
1292	c	g
1293	g	u
1296	c	u
1302	c	a
1305	g	u
1308	c	u
1311	a	u
1314	a	u
1317	c	u
1320	g	c
1321	u	c

047691

1326	g	a
1329	c	u
1332	c	u
1344	u	a
1347	g	a
1350	g	a
1357	c	u
1359	u	g
1360	c	u
1362	c	g
1368	a	u
1371	g	u
1375	a	u
1376	g	c
1383	u	a
1386	g	a
1389	a	c
1392	a	g
1396	a	u
1397	g	c
1398	c	a
1401	c	u
1402	u	c
1404	g	a
1419	g	a
1422	g	a
1425	u	g
1431	c	u
1432	a	u
1433	g	c
1434	c	a
1440	g	u
1443	g	a
1449	a	g
1453	u	a
1454	c	g
1455	c	u
1458	g	a
1459	c	a
1461	u	a
1464	c	u
1474	a	u
1475	g	c

1476	c	u
1485	a	c
1491	c	u
1497	c	u
1500	a	c
1512	g	a
1515	c	u
1521	u	c
1524	c	u
1527	a	u
1530	a	u
1542	g	a
1545	c	u
1546	c	a
1555	u	a
1556	c	g
1557	g	c
1563	u	c
1566	g	a
1569	g	a
1575	g	a
1576	u	c
1578	g	a
1590	u	c
1593	u	c
1599	c	u
1602	c	a
1608	g	a
1611	u	c
1614	c	u
1617	c	a
1620	c	u
1621	u	c
1623	g	u
1632	g	u
1635	u	a
1638	u	c
1642	u	c
1645	u	a
1646	c	g
1647	g	u
1653	g	u
1656	g	a

1662	g	a
1663	c	a
1665	g	a
1668	c	u
1669	a	u
1670	g	c
1671	c	u
1672	c	u
1674	c	a
1677	g	a
1683	g	a
1698	a	u
1708	c	u
1710	g	a
1711	c	u
1713	u	a
1716	u	c
1719	a	u
1722	g	u
1734	c	a
1737	c	u
1740	a	u
1743	g	a
1758	c	a
1761	c	u
1764	g	a
1765	u	a
1766	c	g
1767	g	c
1770	c	u
1773	g	c
1782	u	g
1791	u	c
1794	g	a
1797	g	u
1800	a	g
1803	c	u
1804	c	u
1809	g	c
1812	a	u
1815	a	u
1827	c	u
1828	c	u

047691

1830	u	a
1836	g	a
1839	g	u
1845	g	a
1848	c	a
1849	c	u
1851	g	a
1854	c	u
1855	c	u
1857	c	g
1860	c	u
1866	a	u
1867	u	a
1868	c	g
1869	g	c
1870	u	a
1871	c	g
1875	c	u
1881	c	u
1884	c	g
1887	u	a
1890	c	u
1896	g	a
1897	u	c
1899	g	c
1905	c	u
1906	u	c
1908	g	a
1914	g	a
1920	c	u
1921	u	a
1922	c	g
1923	a	c
1924	a	u
1925	g	c
1926	c	a
1938	g	a
1944	c	u
1947	a	u
1956	g	a
1959	c	u
1962	c	u
1965	g	a

1969	c	a
1971	g	a
1972	c	a
1974	g	a
1977	c	u
1980	g	a
1984	u	c
1986	g	a
1989	g	u
1992	a	g
1995	g	c
1996	c	u
1998	g	a
2004	a	u
2010	g	a
2011	c	u
2013	u	a
2016	g	a
2019	u	a
2025	c	u
2028	g	u
2031	a	c
2034	g	c
2040	c	a
2043	g	a
2049	g	a
2052	g	a
2055	g	a
2058	g	u
2064	g	a
2070	a	u
2076	a	g
2082	u	g
2085	g	a
2091	a	g
2097	c	u
2098	a	u
2099	g	c
2103	c	u
2104	u	c
2106	g	c
2112	u	a
2115	u	c

2121	a	u
2124	u	a
2127	c	a
2130	g	a
2133	c	u
2136	a	c
2139	c	u
2142	c	g
2145	g	a
2148	a	g
2154	a	c
2155	c	u
2157	g	a
2160	g	a
2169	a	c
2172	u	c
2184	g	u
2187	c	u
2190	a	g
2193	c	u
2194	c	u
2196	g	a
2200	c	a
2202	c	a
2208	u	g
2209	a	u
2210	g	c
2212	c	u
2214	c	a
2217	g	a
2220	g	a
2226	a	u
2232	a	g
2235	g	a
2241	c	g
2244	u	a
2247	u	g
2250	c	u
2253	g	c
2256	u	c
2257	u	a
2258	c	g
2259	g	c

047691

2265	u	c
2266	u	a
2267	c	g
2268	a	c
2271	c	u
2274	a	c
2277	u	c
2280	a	g
2289	g	a
2290	a	c
2292	g	a
2293	c	a
2295	a	g
2301	a	g
2304	c	u
2307	g	c
2310	c	g
2316	c	g
2322	g	a
2325	u	c
2328	g	a
2331	a	u
2337	g	a
2340	g	u
2343	a	g
2355	c	a
2358	a	g
2361	g	a
2364	g	a
2367	c	a
2370	a	c
2373	g	a
2374	a	c
2388	u	g
2391	a	c
2394	c	u
2400	g	a
2403	u	c
2415	c	g
2418	c	u
2421	c	a
2424	c	u
2425	a	u

2426	g	c
2427	c	a
2428	c	a
2430	u	a
2434	c	u
2436	u	a
2439	g	u
2448	c	u
2451	a	c
2452	c	u
2454	u	g
2457	g	a
2460	c	a
2463	c	u
2472	c	u
2475	u	c
2484	u	c
2487	g	a
2490	a	g
2496	u	c
2499	c	u
2508	c	u
2514	a	g
2515	u	a
2516	c	g
2517	a	c
2520	c	a
2526	g	a
2532	a	u
2535	g	a
2548	u	c
2550	g	u
2553	u	a
2556	c	u
2559	c	u
2562	g	u
2565	g	c
2572	u	a
2573	c	g
2577	g	a
2583	c	u
2586	c	g
2589	c	a

2592	c	u
2598	u	c
2599	c	u
2601	c	a
2604	g	a
2607	c	u
2613	c	g
2616	u	a
2622	c	g
2625	a	u
2628	g	u
2631	a	u
2632	c	u
2634	u	g
2637	g	u
2640	c	g
2643	c	g
2649	g	c
2655	u	a
2658	u	c
2661	g	u
2664	c	u
2665	u	c
2667	g	u
2679	c	g
2683	u	a
2684	c	g
2688	a	u
2691	c	u
2692	u	a
2693	c	g
2694	a	u
2700	c	u
2703	u	c
2704	u	a
2705	c	g
2712	c	a
2724	u	c
2725	u	a
2726	c	g
2727	u	c
2730	a	c
2733	c	u

047691

2742	c	u
2754	c	u
2760	a	g
2766	g	a
2776	c	u
2781	c	u
2784	g	u
2790	u	a
2797	c	a
2802	a	u
2805	c	a
2811	c	g
2814	u	g
2817	c	u
2820	g	u
2823	u	a
2829	u	a
2832	c	g
2835	c	g
2838	g	a
2842	c	u
2844	c	a
2850	u	c
2853	g	a
2857	c	u
2859	u	a
2863	a	u
2864	g	c
2865	c	u
2868	a	u
2871	g	u
2874	g	a
2877	u	a
2880	c	u
2886	c	a
2890	u	c
2892	g	c
2895	u	c
2899	c	u
2901	c	g
2904	g	a
2907	g	a
2910	a	u

2913	u	g
2917	u	c
2919	g	u
2923	c	a
2925	c	a
2931	a	c
2940	u	a
2964	c	u
2967	g	u
2970	g	c
2973	c	a
2976	c	u
2994	g	a
2995	c	u
2997	g	a
3000	c	u
3009	g	a
3015	u	a
3021	a	u
3027	u	a
3030	c	u
3031	c	u
3033	c	a
3036	g	a
3039	u	c
3045	u	c
3051	c	u
3054	g	a
3057	c	a
3060	u	g
3063	g	a
3069	c	a
3075	g	u
3081	c	u
3085	c	u
3088	c	a
3090	g	a
3093	c	a
3100	u	c
3102	g	c
3105	g	a
3108	g	c
3117	g	a

3120	u	c
3123	g	a
3132	g	a
3141	g	c
3145	u	a
3146	c	g
3147	g	u
3150	u	a
3153	c	u
3156	u	c
3159	g	u
3168	g	u
3171	c	a
3174	u	c
3177	g	a
3180	g	a
3184	u	c
3186	g	a
3192	g	a
3193	u	c
3195	g	u
3198	c	u
3204	u	c
3207	c	a
3208	a	c
3216	c	u
3228	a	u
3243	g	u
3250	c	u
3252	c	a
3258	g	u
3261	a	c
3264	u	c
3270	u	c
3276	u	c
3277	u	c
3280	a	u
3281	g	c
3282	u	a
3285	c	a
3288	c	g
3291	a	c
3297	u	c

047691

3300	g	a
3304	c	a
3306	c	a
3309	u	a
3312	g	a
3324	g	c
3333	u	c
3336	c	u
3339	g	u
3342	g	u
3345	u	c
3348	u	c
3351	c	u
3357	c	u
3360	g	a
3363	c	a
3366	g	a
3372	g	a
3375	c	a
3378	g	a
3382	c	a
3384	g	a
3387	c	u
3402	a	u
3403	c	u
3405	c	a
3414	c	u
3417	u	c
3423	c	u
3426	u	a
3438	a	u
3441	g	a
3445	a	u
3446	g	c
3448	u	a
3449	c	g
3450	g	c
3453	u	a
3466	c	u
3472	a	c
3474	g	a
3477	c	u
3480	u	g

3481	u	a
3482	c	g
3483	g	c
3484	a	c
3486	g	a
3501	c	u
3510	g	a
3513	g	a
3516	g	a
3519	a	u
3522	g	a
3525	c	u
3528	a	c
3531	a	g
3532	a	u
3533	g	c
3534	u	a
3537	g	c
3543	c	a
3546	u	c
3555	g	c
3559	u	c
3561	g	c
3562	a	u
3563	g	c
3564	u	g
3567	g	a
3570	a	u
3576	c	u
3579	c	u
3585	c	u
3586	a	u
3587	g	c
3588	u	a
3600	g	a
3615	u	c
3616	a	u
3617	g	c
3618	c	a
3624	u	c
3627	g	a
3633	c	u
3636	g	c

3639	g	a
3642	c	u
3645	g	c
3648	g	a
3660	c	a
3663	g	a
3666	a	u
3669	g	a
3672	c	u
3675	a	c
3678	c	a
3679	c	u
3681	u	a
3684	a	g
3690	c	u
3693	g	c
3697	a	u
3698	g	c
3699	c	a
3702	u	a
3705	c	u
3708	c	u
3711	u	c
3715	c	a
3717	u	g
3723	g	c
3724	u	c
3726	g	c
3727	c	u
3729	c	g
3732	g	a
3735	g	a
3738	c	u
3741	g	a
3747	a	g
3750	a	g
3751	u	a
3752	c	g
3753	g	u
3756	g	u
3760	c	u
3762	g	a
3765	g	a

3768	c	u
3771	c	u
3780	u	a
3786	u	c
3789	a	u
3792	g	a
3795	u	a
3798	g	a
3810	c	u
3813	c	u
3816	u	g
3819	g	u
3826	a	u
3827	g	c
3828	c	a
3831	c	a
3834	c	u
3840	g	a
3847	c	a
3855	g	c
3864	a	g
3867	c	a
3870	c	a
3873	a	g
3876	g	a
3879	c	a
3885	c	u
3889	a	u
3890	g	c
3891	c	u
3897	c	a
3900	c	u
3901	c	a
3906	g	a
3909	u	c
3910	c	u
3912	c	g
3918	u	c
3931	u	a
3932	c	g
3933	a	u
3942	g	a
3945	u	a
4304	c	g
4305	a	c
4306	u	c
4308	g	c
4317	g	a
4320	g	c
4323	u	c
4324	u	a
4325	c	g
4326	a	c
4329	a	c
4335	u	c
4344	a	g

3954	c	u
3957	g	a
3960	c	u
3969	c	g
3972	u	c
3973	c	a
3975	g	a
3976	a	u
3977	g	c
3981	a	g
3984	c	a
3987	g	a
3996	g	u
3999	a	g
4002	a	g
4005	c	u
4020	a	g
4029	a	c
4032	c	u
4038	g	a
4039	u	a
4040	c	g
4041	g	c
4047	g	c
4057	c	u
4059	c	g
4066	c	u
4071	g	u
4072	c	a
4077	c	u
4080	c	u
4084	u	a
4085	c	g
4089	a	g
4095	a	g
4098	u	c
4099	c	u
4101	u	g
4104	c	g
4105	u	c
4107	g	u
4116	u	c
4117	u	a
4347	u	c
4353	a	c
4357	a	c
4359	a	g
4362	u	c
4365	g	a
4366	u	a
4367	c	g
4368	g	c
4380	c	u
4383	a	g
4386	g	c
4392	c	u

4118	c	g
4119	g	u
4122	c	u
4126	c	u
4131	c	u
4134	g	a
4140	g	a
4143	u	c
4146	g	a
4149	c	a
4152	c	u
4158	g	a
4161	a	u
4164	u	a
4167	g	a
4170	g	a
4173	g	a
4179	c	u
4182	c	u
4188	g	a
4191	g	a
4203	g	a
4206	u	c
4207	c	a
4209	u	g
4212	c	a
4215	g	a
4218	c	a
4224	c	g
4233	g	a
4240	c	u
4242	u	g
4248	c	a
4257	u	c
4260	g	a
4263	c	g
4266	c	g
4275	c	u
4287	g	a
4293	u	g
4296	u	c
4302	a	g
4303	u	a
4395	g	u
4398	c	u
4399	u	c
4407	a	g
4413	u	a
4422	a	g
4425	u	g
4431	c	u
4434	g	a
4435	c	a
4437	u	g
4443	a	g

В некоторых вариантах реализации изобретения мРНК CFTR, соответствующая изобретению, содержит кодирующую последовательность, содержащую по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% оснований не дикого типа, приведенных в табл. 2 в соответствующих позициях кодирующей последовательности, приведен-

ных в табл. 2, относительно последовательности дикого типа SEQ ID NO: 2.

Таблица 2

Подгруппа оснований не дикого типа, которые могут быть использованы в кодирующей последовательности мРНК, кодирующей CFTR

Pos.	NWT	WT	Pos.	NWT	WT	Pos.	NWT	WT
7	c	a	216	a	c	429	c	u
15	g	u	225	g	a	435	c	u
18	c	g	238	c	a	444	c	u
33	c	u	240	g	a	447	u	a
45	c	u	252	c	u	457	c	a
54	a	c	255	u	a	462	c	a
60	u	c	270	c	a	492	a	u
61	c	a	282	a	c	498	a	g
63	g	a	291	c	a	501	c	g
66	u	a	294	a	g	504	g	a
72	u	g	304	u	c	507	g	c
81	g	a	309	u	a	510	g	u
84	u	c	310	c	a	514	u	c
85	c	a	312	c	a	525	u	a
87	g	a	315	u	c	526	u	a
93	g	c	318	c	a	527	c	g
96	u	g	324	g	c	531	c	u
126	g	u	327	c	u	534	u	a
129	a	u	333	c	g	538	u	c
135	g	u	342	a	g	544	u	a
138	g	u	345	a	g	545	c	g
141	u	c	351	g	c	555	u	c
147	c	a	369	c	a	558	u	c
150	g	u	372	g	c	564	c	g
159	c	g	375	c	a	573	c	u
163	c	a	378	a	c	588	g	a
165	g	a	384	u	c	615	g	u
175	c	a	385	u	c	624	c	g
177	c	a	390	u	c	631	u	c
180	a	g	396	c	u	642	u	a
183	c	g	399	c	g	645	u	c
186	g	u	409	u	c	663	a	g
189	u	a	412	u	c	672	u	c
201	g	u	417	u	c	684	a	u
213	c	u	423	a	c	697	u	c

702	a	c
703	u	c
720	u	a
724	c	a
726	g	a
741	u	c
742	c	a
744	c	a
756	g	u
759	u	g
762	a	g
768	g	u
777	c	u
780	c	g
786	u	c
789	g	a
798	c	u
813	g	u
816	c	u
819	a	g
825	u	c
840	u	a
864	c	a
865	c	a
867	c	a
873	u	a
891	c	g
897	g	a
900	g	c
906	c	g
907	c	a
909	g	a
912	u	c
921	g	c
927	g	c
939	c	a
948	c	u
951	u	g
954	c	g
960	c	a

963	g	u
966	u	g
967	u	c
972	u	c
979	u	c
984	u	c
990	g	a
993	u	c
1002	c	g
1008	u	a
1017	g	c
1020	u	c
1023	G	a
1035	a	u
1036	u	c
1047	a	g
1053	a	u
1065	g	c
1071	c	u
1092	g	u
1101	g	a
1116	a	g
1158	u	c
1161	u	a
1164	u	g
1170	g	a
1179	a	g
1194	g	a
1197	u	c
1200	u	c
1206	a	g
1212	u	a
1218	a	g
1245	u	c
1255	c	a
1257	c	a
1266	a	u
1275	c	u
1278	u	c
1279	u	a

1280	c	g
1293	g	u
1308	c	u
1311	a	u
1314	a	u
1317	c	u
1321	u	c
1350	g	a
1362	c	g
1368	a	u
1371	g	u
1383	u	a
1386	g	a
1389	a	c
1392	a	g
1401	c	u
1402	u	c
1425	u	g
1440	g	u
1449	A	g
1455	C	u
1458	G	a
1459	C	a
1461	U	a
1485	A	c
1497	C	u
1500	a	c
1521	u	c
1524	c	u
1527	a	u
1530	a	u
1557	g	c
1563	u	c
1569	g	a
1576	u	c
1590	u	c
1593	u	c
1599	c	u
1602	c	a
1611	u	c

1617	c	a
1620	c	u
1621	u	c
1635	u	a
1638	u	c
1642	u	c
1647	g	u
1653	g	u
1662	g	a
1674	c	a
1677	g	a
1683	g	a
1698	a	u
1713	u	a
1716	u	c
1719	a	u
1722	g	u
1734	c	a
1737	c	u
1740	a	u
1761	c	u
1765	u	a
1766	c	g
1767	g	c
1770	c	u
1782	u	g
1791	u	c
1797	g	u
1812	a	u
1815	a	u
1830	u	a
1839	g	u
1857	c	g
1860	c	u
1866	a	u
1869	g	c
1870	u	a
1871	c	g
1881	c	u
1887	u	a

1897	u	c
1906	u	c
1914	g	a
1923	a	c
1938	g	a
1947	a	u
1962	c	u
1965	g	a
1969	c	a
1971	g	a
1972	c	a
1974	g	a
1980	g	a
1984	u	c
1989	g	u
1992	a	g
1995	g	c
2010	g	a
2013	u	a
2019	u	a
2028	g	u
2031	a	c
2034	g	c
2040	c	a
2058	g	u
2076	a	g
2082	u	g
2104	u	c
2112	u	a
2115	u	c
2121	a	u
2124	u	a
2127	c	a
2136	a	c
2139	c	u
2142	c	g
2154	a	c
2169	a	c
2184	g	u
2187	c	u

2190	a	g
2200	c	a
2202	c	a
2208	u	g
2214	c	a
2220	g	a
2226	a	u
2232	a	g
2244	u	a
2247	u	g
2253	g	c
2256	u	c
2259	g	c
2265	u	c
2266	u	a
2267	c	g
2268	a	c
2271	c	u
2274	a	c
2277	u	c
2280	a	g
2289	g	a
2301	a	g
2304	c	u
2310	c	g
2316	c	g
2322	g	a
2325	u	c
2328	g	a
2331	a	u
2340	g	u
2343	a	g
2355	c	a
2358	a	g
2361	g	a
2364	g	a
2370	a	c
2373	g	a
2388	u	g
2391	a	c

2400	g	a
2403	u	c
2415	c	g
2428	c	a
2430	u	a
2436	u	a
2439	g	u
2448	c	u
2451	a	c
2454	u	g
2463	c	u
2484	u	c
2490	a	g
2514	a	g
2515	u	a
2516	c	g
2517	a	c
2526	g	a
2532	a	u
2535	g	a
2548	u	c
2553	u	a
2562	g	u
2572	u	a
2573	c	g
2583	c	u
2586	c	g
2589	c	a
2598	u	c
2601	c	a
2613	c	g
2622	c	g
2625	a	u
2628	g	u
2631	a	u
2634	u	g
2640	c	g
2643	c	g
2655	u	a
2658	u	c

2661	g	u
2665	u	c
2683	u	a
2684	c	g
2688	a	u
2694	a	u
2703	u	c
2704	u	a
2705	c	g
2712	c	a
2724	u	c
2725	u	a
2726	c	g
2727	u	c
2730	a	c
2742	c	u
2760	a	g
2781	c	u
2784	g	u
2802	a	u
2805	c	a
2811	c	g
2814	u	g
2820	g	u
2823	u	a
2829	u	a
2832	c	g
2844	c	a
2850	u	c
2859	u	a
2865	c	u
2868	a	u
2877	u	a
2890	u	c
2895	u	c
2901	c	g
2907	g	a
2910	a	u
2913	u	g
2917	u	c

2923	c	a
2925	c	a
2931	a	c
2970	g	c
2976	c	u
3000	c	u
3021	a	u
3030	c	u
3033	c	a
3039	u	c
3045	u	c
3051	c	u
3054	g	a
3060	u	g
3063	g	a
3069	c	a
3075	g	u
3088	c	a
3090	g	a
3108	g	c
3120	u	c
3141	g	c
3145	u	a
3146	c	g
3147	g	u
3150	u	a
3156	u	c
3159	g	u
3174	u	c
3184	u	c
3192	g	a
3193	u	c
3198	c	u
3228	a	u
3243	g	u
3252	c	a
3258	g	u
3261	a	c
3264	u	c
3270	u	c

3276	u	c
3277	u	c
3282	u	a
3288	c	g
3297	u	c
3304	c	a
3306	c	a
3336	c	u
3339	g	u
3345	u	c
3348	u	c
3366	g	a
3375	c	a
3382	c	a
3387	c	u
3402	a	u
3405	c	a
3417	u	c
3426	u	a
3438	a	u
3448	u	a
3449	c	g
3450	g	c
3474	g	a
3477	c	u
3480	u	g
3481	u	a
3482	c	g
3483	g	c
3486	g	a
3501	c	u
3510	g	a
3513	g	a
3519	a	u
3528	a	c
3531	a	g
3534	u	a
3537	g	c
3546	u	c
3555	g	c
4116	u	c
4119	g	u
4134	g	a
4140	g	a
4143	u	c
4158	g	a
4161	a	u
4164	u	a
4173	g	a
4179	c	u
4188	g	a
4206	u	c
4207	c	a
4209	u	g
4212	c	a
4224	c	g
4242	u	g
4248	c	a

3559	u	c
3564	u	g
3570	a	u
3579	c	u
3588	u	a
3615	u	c
3624	u	c
3633	c	u
3648	g	a
3660	c	a
3666	a	u
3669	g	a
3672	c	u
3675	a	c
3681	u	a
3684	a	g
3693	g	c
3702	u	a
3711	u	c
3717	u	g
3723	g	c
3724	u	c
3729	c	g
3732	g	a
3741	g	a
3747	a	g
3750	a	g
3751	u	a
3752	c	g
3753	g	u
3756	g	u
3765	g	a
3786	u	c
3795	u	a
3810	c	u
3813	c	u
3816	u	g
3819	g	u
3847	c	a
3855	g	c
4257	u	c
4263	c	g
4266	c	g
4293	u	g
4303	u	a
4304	c	g
4305	a	c
4306	u	c
4320	g	c
4323	u	c
4324	u	a
4325	c	g
4326	a	c
4329	a	c
4335	u	c
4344	a	g
4347	u	c
4353	a	c

3864	a	g
3873	a	g
3879	c	a
3889	a	u
3890	g	c
3891	c	u
3901	c	a
3912	c	g
3918	u	c
3933	a	u
3945	u	a
3954	c	u
3957	g	a
3960	c	u
3972	u	c
3981	a	g
3984	c	a
3996	g	u
3999	a	g
4002	a	g
4005	c	u
4020	a	g
4029	a	c
4032	c	u
4039	u	a
4040	c	g
4041	g	c
4047	g	c
4059	c	g
4071	g	u
4072	c	a
4077	c	u
4080	c	u
4084	u	a
4085	c	g
4089	a	g
4095	a	g
4098	u	c
4104	c	g
4105	u	c
4362	u	c
4365	g	a
4366	u	a
4367	c	g
4368	g	c
4383	a	g
4386	g	c
4392	c	u
4395	g	u
4399	u	c
4407	a	g
4413	u	a
4422	a	g
4425	u	g
4434	g	a
4435	c	a
4437	u	g

В некоторых вариантах реализации данное изобретение содержит мРНК CFTR не природного происхождения, содержащую кодирующую последовательность SEQ ID NO: 3. Дополнительные примеры мРНК CFTR не природного происхождения описаны в секции Краткое описание последовательностей, как например, SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, или 17. В некоторых вариантах реализации данное изобретение содержит мРНК CFTR не природного происхождения, содержащую кодирующую последовательность, по меньшей мере на 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную к

любой из SEQ ID NO: 3, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, или 17. В некоторых вариантах реализации изобретения мРНК CFTR не природного происхождения содержит 5'UTR, 3'UTR, кодирующую последовательность сигнального пептида или структуры кэпа или хвоста, как описано ниже.

Описанная выше мРНК CFTR, содержащая кодирующую последовательность, которая отличается от кодирующей последовательности CFTR дикого типа, может предоставить преимущества по отношению к эффективности и простоте приготовления. Например, реакция транскрипции *in vitro* с использованием полинуклеотида, содержащего матричную последовательность, комплементарную кодирующей последовательности CFTR, может давать больший выход РНК;

полинуклеотид, содержащий упомянутую матричную последовательность может быть более стабилен (то есть менее склонным к мутациям) в течение роста в клетке хозяина, что уменьшает объем очистки, необходимый для получения матрицы, подходящей для использования в реакции; также трансляция *in vivo* на мРНК, содержащей кодирующую последовательность, может быть выше.

Последовательность сигнального пептида.

В некоторых вариантах реализации изобретения мРНК CFTR включает нуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальный пептид. Термин "сигнальный пептид", использованный в данном документе, относится к пептиду, присутствующему в новосинтезированном белке, который способен направить белок на секреторный путь. В некоторых вариантах реализации изобретения сигнальный пептид отрезается после транслокации в эндоплазматический ретикулум после трансляции мРНК. Сигнальный пептид также относится к сигнальной последовательности, лидирующей последовательности или лидирующему пептиду. Обычно, сигнальный пептид - это короткий (например, длиной 5-30, 5-25, 5-20, 5-15, или 5-10 аминокислот) пептид. Сигнальный пептид может присутствовать на N-конце новосинтезированного белка. Не углубляясь в какую-либо отдельную теорию, присоединение кодирующей последовательности сигнального пептида к мРНК, кодирующей CFTR, может улучшить секрецию и/или продукцию белка CFTR *in vivo*.

Подходящий сигнальный пептид для данного изобретения может быть гетерогенной последовательностью, полученной из разных эукариотических и прокариотических белков, в частности секретруемых белков. В некоторых вариантах реализации изобретения подходящий сигнальный пептид является лейцин-богатой последовательностью, см. Yamamoto Y et al. (1989), *Biochemistry*, 28:2728-2732, которая включена посредством ссылки. Подходящий сигнальный пептид может быть получен из человеческого гормона роста (hGD), препробелка сывороточного альбумина, предшественника цепи Ig каппа, препробелка азуроцидина, предшественника цистатина-S, прекурсора трипсиногена-2, блокатора калиевого канала, альфа-конотоксина lp1.3, альфа-конотоксина, альфа-галактозидазы, целлюлазы, непентезин-1 аспаргат-протеиназы, кислотной хитиназы, K28 препротоксина, предшественника киллер токсина зиготина, и холерного токсина. Примеры последовательностей сигнальных пептидов описаны в Kobeg, et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 110: 1164-73, 2012, которая включена посредством ссылки.

В некоторых вариантах реализации изобретения мРНК, кодирующая CFTR, может включать последовательности, кодирующие сигнальный белок, полученную из человеческого гормона роста (hGH) или его фрагмента. Полная нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнальный пептид hGH показана ниже.

5' последовательность человеческого гормона роста (hGH) (SEQ ID NO: 18)

```
AUGGCCACUGGAUCAAGAACCUCACUGCUGCUCGCUUUUGGACUGC
UUUGCCUGCCCUGGUUGCAAGAAGGAUCGGCUUCCCCGACCAUCCC
ACUCUCC
```

Альтернативная 5' последовательность человеческого гормона роста (SEQ ID NO: 19)

```
AUGGCAACUGGAUCAAGAACCUCUCCUGCUGCAUUCGGCCUGCUCUGUCUCC
CAUGGCUCCAAGAAGGAAGCGGUUCCCCACUAUCCCCCUCUCG
```

В некоторых вариантах реализации изобретения мРНК в соответствии с данным изобретением может включать последовательности, кодирующие сигнальный пептид, имеющие по меньшей мере 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99%, или выше, идентичности с SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 19.

5'-UTR, 3'-UTR, Поли-А хвост, кэп и нестандартные нуклеотидные основания.

В некоторых вариантах реализации изобретения мРНК содержит последовательность в ее 5'-UTR, идентичную SEQ ID NO: 4 или по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 4.

В некоторых вариантах реализации изобретения мРНК содержит последовательность в ее 3'-UTR, идентичную SEQ ID NO 5 или по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 5.

В некоторых вариантах реализации изобретения мРНК содержит поли-А хвост. В некоторых вари-

антах реализации изобретения поли-А хвост имеет длину по меньшей мере 70, 100, 120, 150, 200, 250, 300, 400 или 500 остатков. В некоторых вариантах реализации изобретения поли-А хвост имеет длину от 70 до 100, от 100 до 120, от 120 до 150, от 150 до 200, от 200 до 300, от 300 до 400, от 400 до 500 остатков. Поли-А хвост может быть присоединен с использованием различных установленных методов. Например, длинные поли-А хвосты могут быть присоединены к синтетической или транскрибированной *in vitro* РНК, используя поли-А полимеразу (Yokoe, et al. Nature Biotechnology. 1996; 14: 1252-1256). Транскрипционный вектор также может кодировать длинные поли-А хвосты. Кроме того, поли-А хвосты могут быть присоединены путем транскрипции напрямую из продуктов ПНР. Поли А также может быть лигирован к 3' концу кодирующей РНК РНК-лигазой (см., например, Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2nd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1991)). В некоторых вариантах реализации изобретения поли-U или поли-C хвосты могут быть использованы вместо добавления поли-А хвоста. Например, мРНК, кодирующие CFTR, могут включать 3' poly(C) хвостовые структуры. Подходящий поли-C хвост на 3' конце мРНК обычно включает от 10 до 200 цитозиновых нуклеотидов (например, от 10 до 150 цитозиновых нуклеотидов, от 10 до 100 цитозиновых нуклеотидов, от 20 до 70 цитозиновых нуклеотидов, от 20 до 60 цитозиновых нуклеотидов или от 10 до 40 цитозино-вых нуклеотидов). поли-C хвост может быть добавлен к поли-А хвосту или может заменить поли-А хвост.

В некоторых вариантах реализации изобретения мРНК содержит 5'-кэп, например, кэп 1 структуру. мРНК кодирующие ферменты и процедуры см, например, в Fechter, P.; Brownlee, G.G. "Recognition of mRNA cap structures by viral and cellular proteins" J. Gen. Virology 2005, 86, 1239-1249; европейская патентная публикация 2 010 659 A2; патент США № 6,312,926. 5' кэп обычно добавляется так: вначале терминальная РНК фосфатаза удаляет одну из концевых фосфатных групп с 5' нуклеотида, оставляя две концевые фосфатные группы; потом гуанозинтрифосфат (GTP) присоединяется к концевым фосфатам гуанилил трансферазой, образуя 5'5'5 трифосфатную связь; и потом 7 атом азота гуанина метилируется метилтрансферазой. Примеры структур кэпа включают, но не ограничиваются, m7G(5')ppp(5'(A,G(5')ppp(5')A и G(5')ppp(5')G).

В некоторых вариантах реализации изобретения мРНК содержит один или более нестандартных нуклеотидных остатков. Нестандартные нуклеотидные остатки могут включать, например, 5-метилцитидин ("5mC"), псевдоуридин ("ψU") и/или 2-тиоуридин ("2sU"). См., например, патент США № 8278036 или WO2011012316 для обсуждения таких остатков и их инкорпорации в мРНК. В некоторых вариантах реализации изобретения мРНК может быть SNIM РНК. SNIM РНК, использованное в данном документе, является акронимом от "Stabilized Non-Immunogenic Messenger RNA", обозначающие мРНК, образованную транскрипцией *in vitro* (IVT), включая некоторый процент модифицированных нуклеотидов в реакции IVT, как описано в РСТ публикации WO 2011/012316. SNIM РНК, использованная в примерах, раскрытых в данном документе, была получена путем IVT, в которой 25% остатков U составлял 2-тиоуридин и 25% остатков C составлял 5-метилцитидин. Присутствие нестандартных нуклеотидных остатков может делать мРНК более стабильной и/или менее иммуногенной чем контрольная мРНК с той же последовательностью, но содержащей только стандартные нуклеотиды. В дополнительных вариантах реализации изобретения мРНК содержит один или более нестандартных нуклеотидных остатков, выбранных из изоцитозина, псевдоизоцитозина, 5-бром урацила, 5-пропинилурацила, 6-аминопурина, 2-аминопурина, инозина, диаминопурина и 2-хлор-6-аминопурина или комбинации этих модификаций и других модификаций азотистых оснований. Определенные варианты реализации изобретения могут еще включать дополнительные модификации фуранозного цикла или азотистых оснований. Дополнительные модификации могут включать, например, модификации или замещения сахара (например, одну или больше 2'-О-алкил модификаций, замкнутую нуклеиновую кислоту (LNA)). В некоторых вариантах реализации изобретения РНК может образовывать комплекс или гибридизироваться с дополнительными полинуклеотидами и/или пептидными полинуклеотидами (ПНК). В вариантах реализации изобретения, где модификация сахара является 2'-О-алкил модификацией, такие модификации могут включать, но не ограничиваться, 2'-дезоксидифтор модификацию, 2'-О-метил модификацию, 2'-О-метоксиэтил модификацию и 2'-дезоксидифтор модификацию. В определенных вариантах реализации изобретения любая из этих модификаций может присутствовать в 0-100% нуклеотидах - например, в более чем 0%, 1%, 10%, 25%, 50%, 75%, 85%, 90%, 95% или 100% составляющих нуклеотидов по отдельности или в комбинации.

Композиции, содержащие мРНК CFTR.

В определенных вариантах реализации изобретения молекулы мРНК изобретения могут быть введены как незащищенная или неупакованная мРНК. В некоторых вариантах реализации изобретения введение мРНК в композиции изобретения может быть улучшено добавлением подходящего носителя. В определенных вариантах реализации изобретения носитель выбирался на основе его способности улучшать трансфекцию целевой клетки одной или несколькими мРНК.

Термин "носитель", использованный в данном документе, включает любой из стандартных фармацевтических носителей, связывателей, наполнителей и тому подобных, которые обычно используются для введения биологически активных агентов, включая мРНК.

В определенных вариантах реализации изобретения носители, использованные в композициях изо-

бретения, могут содержать липосомальные везикулы или другие способы улучшать внесение мРНК в целевые клетки и/или ткани. Подходящие носители включают, но не ограничиваются, носители, основанные на полимерах, такие как полиэтиленмин (PEI) и мультидоменные полимеры, липидные наночастицы и липосомы, нанолипосомы, керамид-содержащие нанолипосомы, протеолипосомы, как натуральные, так и синтетически полученные экзосомы, натуральные, синтетические и полусинтетические ламеллярные тельца, наночастицы, наночастицы фосфосиликата кальция, наночастицы диоксида кремния, поли(D-аргинин), нанодендримеры, системы доставки, основанные на крахмале, мицеллы, эмульсии, золь-гели, ниосомы, плазмиды, вирусы, кальций-фосфатные нуклеотиды, аптамеры, пептилы, пептидные конъюгаты, целевые низкомолекулярные конъюгаты и другие векторные метки. Также предусматривается использование бионанокапсул или других образований белков вирусного капсида как подходящих носителей. (Hum. Gene Ther. 2008 Sep;19(9):887-95).

В некоторых вариантах реализации изобретения носитель содержит органический катион, как катионный липид или катионный органический полимер. В случае присутствия, катионный липид может быть компонентом липосомальных везикул, инкапсулирующих мРНК.

В определенных вариантах реализации изобретения носитель создается с использованием полимера как носителя, отдельно или в комбинации с другими носителями. Подходящие полимеры могут включать, например, полиакрилаты, полиалкилцианоакрилаты, полиактид, сополимеры полиактид-полигликолида, поликапролактоны, декстран, альбумин, желатин, альгинат, коллаген, хитозан, циклодекстрины, протамины, пегилированный протамин, PLL, пегилированный PLL и полиэтиленмин (PEI). Если присутствует PEI, это может быть разветвленный PEI с молекулярным весом от 10 до 40 кДа, например, разветвленный PEI в 25 кДа (Sigma № 408727). Дополнительные примеры полимеров, подходящих для данного изобретения, включают описанные в РСТ публикации WO2013182683, содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

Использование липосомных носителей для улучшения доставки полинуклеотидов в целевые клетки предусматривается данным изобретением. Липосомы (например, липосомные липидные наночастицы) обычно являются полезными в различных применениях в науке, промышленности и медицине, в частности из-за их использования как носителей диагностических или терапевтических веществ *in vivo* (basic, Trends Biotechnol., 16: 307-321, 1998; Drummond et al., Pharmacol. Rev., 51: 691-743, 1999) и обычно описываются как микроскопические везикулы, имеющие внутреннее водное пространство, отделенное от внешней среды мембраной из одного или больше двойных слоев. Двуслойные мембраны липосом обычно формируются амфифильными молекулами, такими, как липиды природного или синтетического происхождения, которые содержат разделенные в пространстве гидрофильные и гидрофобные домены (Lasic, Trends Biotechnol., 16: 307-321, 1998). Двуслойные мембраны липосом могут быть также сформированы амфифильными полимерами и сурфактантами (например, полимеросомы, ниосомы и тому подобные).

В определенных вариантах реализации изобретения мРНК образует комплекс с липидными наночастицами для улучшения доставки к целевой клетке. В определенных вариантах реализации изобретения композиции изобретения могут быть совмещены с мультикомпонентной смесью липидов, которая содержит один или больше катионных липидов, дополнительные липиды, как некаатионные липиды (также относятся к вспомогательным липидам), липиды на основе холестерина и/или пегилированные липиды для инкапсулирования мРНК.

Катионные липиды.

В некоторых вариантах реализации изобретения подходящий липидный носитель содержит катионный липид. Фраза "катионный липид", использованная в данном документе, относится к любому из многих липидов, которые имеют суммарный положительный заряд при выбранном pH, таком как физиологический pH. Некоторые катионные липиды, в частности, которые известны как титруемые или pH-титруемые катионные липиды, особенно эффективны для доставки мРНК. Некоторые катионные (например, титруемые) липиды были описаны в литературе, многие из которых доступны в продаже. Особенно подходящими катионными липидами для использования в композициях и методах изобретения включают те, которые описаны в международной патентной публикации WO 2010/053572 (в частности, C12-200 описан в параграфе [00225]) и WO 2012/170930, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах реализации изобретения использован катионный липид сКК-Е12 (описан в WO 2013/063468), рекомендации, которого включены в данный документ в полном объеме посредством ссылки. В некоторых вариантах реализации изобретения использован катионный липид N-[1-(2,3-диолеилокси)пропил]-N,N,N-триметиламмоний хлорид, или "DOTMA". (Feigner et al. (Proc. Nat'l Acad. Sci. 84, 7413 (1987); патент США № 4897355). DOTMA может быть использован отдельно или объединен с нейтральным липидом, диолеилфосфатидилэтаноламином, или "DOPE", или другими катионными или некаатионными липидами в липосомный трансфекционный реагент или липидную наночастицу, и эти липосомы могут быть использованы для улучшения доставки нуклеиновых кислот в целевые клетки. Другой подходящий катионный липид включает, например, 5-карбоксихидрокси-дециламидоцилспермин, или "DOGS," 2,3-диолеилокси-N-[2-(сперминкарбоксамидоэтил)-N,N-диметил-1-пропанамин, или "DOSPA" (Behr et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. 86, 6982 (1989); патент США № 5171678; патент США № 5334761), 1,2-диолеил-3-

диметиламмонийпропан, или "DODAP", 1,2-диолеил-3-триметиламмонийпропан, или "DOTAP". Рассматриваемые катионные липиды включают также: 1,2-дистеарилокси-N,N-диметил-3-аминопропан, или "DSDMA", 1,2-диолеилокси-N,N-диметил-3-аминопропан, или "DODMA", 1,2-дидиолеилокси-N,N-диметил-3-аминопропан, или "DLinDMA", 1,2-дидиолеилокси-N,N-диметил-3-аминопропан, или "DLenDMA", N-диолеил-N,N-диметиламмонийхлорид, или "DODAC", N,N-дистеарил-N,N-диметиламмоний бромид, или "DDAB", N-(1,2-димиристилоксипро-3-ил)-N,N-диметил-N-гидроксиэтиламмоний бромид, или "DMRIE", 3-диметиламино-2-(холест-5-ен-3-бета-оксибутан-4-окси)-1-(цис,цис-9,12-октадекадиенокси)пропан, или "CLinDMA", 2-[5'-(холест-5-ен-3-бета-окси)-3'-оксапентокси]-3-диметил-1-(цис,цис-9',1'-2'-октадекадиенокси)пропан, или "CpLinDMA", N,N-диметил-3,4-диолеилоксибензиламин, или "DMOBA", 1,2-N,N'-диолеилкарбамил-3-диметиламинопропан, или "DOcarbDAP", 2,3-дидиолеилокси-N,N-диметилпропиламин, или "DLinDAP", 1,2-N,N'-дидиолеилкарбамил-3-диметиламинопропан, или "DLincarbDAP", 1,2-дидиолеилоксикарбамил-3-диметиламинопропан, или "DLinCDAP", 2,2-дидиолеил-4-диметиламинометил-[1,3]-диоксолан, или "DLin-DMA", 2,2-дидиолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан, или "DLin-K-XTC2-DMA" и 2-(2,2-ди(9Z,12Z)-октадека-9,1,2-диен-1-ил)-1,3-диоксолан-4-ил)-N,N-диметилэтанамин (DLin-KC2-DMA) ((см. WO 2010/042877; Semple et al., Nature Biotech. 28: 172-176 (2010)), или их смеси. (Heyes, I, et al., J Controlled Release 107: 276-287 (2005); Morrissey, DV., et al., Nat. Biotechnol. 23(8): 1003-1007 (2005); PCT публикация WO2005/121348A1).

В некоторых вариантах реализации изобретения композиция и методы изобретения используют липидные наночастицы, содержащие ионизированный катионный липид, описанный в предварительной патентной заявке США 61/617,468, поданной 29 марта, 2013 г. (включена посредством ссылки), такой как, например, (15Z,18Z)-N,N-диметил-6-(9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-ил)тетракоза-15,18-диен-1-амин (HGT5000), (15Z,18Z)-N,N-диметил-6-((9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-ил)тетракоза-4,15,18-триен-1-амин (HGT5001) и (15Z,18Z)-N,N-диметил-6-((9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-ил)тетракоза-5,15,18-триен-1-амин (HGT5002).

В некоторых вариантах реализации изобретения один или больше катионных липидов, присутствующих в таких композициях, содержат по меньшей мере одно из следующего: имидазол, диалкиламино или гуанидиновый остаток. В предпочтительном варианте реализации изобретения один или более катионных липидов не содержат четвертичного амина.

Некатионные/вспомогательные липиды.

В некоторых вариантах реализации изобретения подходящая липидная наночастица содержит один или больше некатионных ("вспомогательных") липидов. Фраза "некатионный липид", использованная в данном документе, относится к любому нейтральному, цвиттерионному или анионному липиду. Фраза "анионный липид", использованная в данном документе, относится к любому из многих липидов, которые имеют суммарный отрицательный заряд при выбранном pH, таком как физиологический pH. В некоторых вариантах реализации изобретения некатионный липид является нейтральным липидом, который не несет суммарного заряда в условиях, при которых композиция приготовлена и/или вводится. Катионные липиды включают, но не ограничиваются, дистеароилфосфатидилхолин (DSPC), диолеилфосфатидилхолин (DOPC), дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC), диолеилфосфатидилглицерин (DOPG), дипальмитоилфосфатидилглицерин (DPPG), диолеилфосфатидилэтанолламин (DOPE), пальмитоилолеилфосфатидилхолин (POPC), пальмитоилолеилфосфатидилэтанолламин (POPE), диолеилфосфатидилэтанолламин-4-(N-малеимидометил)циклогексн-1-карбоксилат (DOPE-mal), дипальмитоилфосфатидилэтанолламин (DPPE), димеристоил (DMPE), дистеароилфосфатидилэтанолламин (DSPE), 16-О-мометил PE, 16-О-диметил PE, 18-1-транс PE, 1-стеароил-2-олеилфосфатидилэтанолламин (SOPE), или их смеси.

Липиды на основе холестерина.

В некоторых вариантах реализации изобретения подходящая липидная наночастица содержит один или более липидов на основе холестерина. Например, подходящие катионные липиды на основе холестерина включают холестерин, пегилированный холестерин, DC-Choi (N,N-диметил-N-этилкарбоксамидохолестерин), 1,4-ди(3-N-олеаминопропил)пиперазин (Gao, et al. Biochem. Biophys. Res. Comm. 179, 280 (1991); Wolf et al. BioTechniques 23, 139 (1997); патент США № 5744335) или ICE.

Пегилированные липиды.

В некоторых вариантах реализации изобретения подходящая липидная наночастица содержит один или более пегилированных липидов. Например, использование полиэтиленгликоля (PEG-CER), включая N-октаноил-сфингозин-1-[сукцинил(метоксиполиэтиленгликоль)-2000] (C8 PEG-2000 керамид) предусматривается данным изобретением в комбинации с одним или больше катионных и, в некоторых вариантах реализации, других липидов. В некоторых вариантах реализации изобретения подходящие пегилированные липиды содержат PEG-керамиды, имеющие более короткие алкильные цепи (например, C₁₄ или C₁₈). В некоторых вариантах реализации изобретения может быть использован пегилированный липид DSPE-PEG-малеимид лектин. Другие предусмотренные пегилированные липиды включают, но не ограничиваются, полиэтиленгликольную цепь длиной до 5 кДа, ковалентно связанную с липидом с алкильной(ыми) цепью(ями) длиной C₆-C₂₀. Не углубляясь в какую-либо отдельную теорию, предполагается, что добавление пегилированных липидов может предотвратить агрегацию и повысить период циркуляции, что

может улучшить доставку мРНК, инкапсулированную в липосомах, в целевую клетку.

В определенных вариантах реализации изобретения композиция содержит одну из следующих комбинаций липидов:

C12-200, DOPE, холестерин, DMG-PEG2K; DODAP, DOPE, холестерин, DMG-PEG2K; HGT5000, DOPE, холестерин, DMG-PEG2K; HGT5001, DOPE, холестерин, DMG-PEG2K; ХТС, DSPC, холестерин, PEG-DMG; MC3, DSPC, холестерин, PEG-DMG; ALNY-100, DSPC, холестерин, PEG-DSG; СКК-E12, DOPE, холестерин, PEGDMG2K.

В некоторых вариантах реализации изобретения соотношения липид:мРНК могут быть 5:1 (мг:мг), 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1 или больше, до 30:1 (мг:мг) или больше. Соотношения N/P могут быть от 1.1:1 до 10:1 или выше. Примеры соотношений липидов следующие: 40:30:20:10, 55:20:20:5, 50:25:20:5 (катионный липид:вспомогательный липид:холестерин:PEG липид).

В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции в соответствии с изобретением не содержат муколитического агента (например, N-ацетилцистеина, эрдостеиан, бромгексина, карбоцистеина, гвайфенезина или йодированного глицерина).

PEI композиция, содержащая мРНК CFTR не природного происхождения, предусматривает ся внутри устройства для введения в дыхательную систему субъекта. Устройством может являться, например, устройство для инстиляции, распыления или небуляции. Подходящие устройства включают, например, джет-небулайзер PARI Boy, небулайзер Aeroneb® Lab, MicroSprayer® или меш-небулайзер EFlow. Альтернативно, может быть использован сухой порошковый ингалятор или устройство для распыления, такой как портативный ингалятор.

Варианты применения и способы.

мРНК для вариантов применения и способов в соответствии с изобретением.

Среди прочего, данное изобретение представляет методы для продукции белка CFTR *in vivo*, в частности, в легких млекопитающих. В некоторых вариантах реализации изобретение предусматривает методы для индукции экспрессии CFTR в эпителиальных клетках легких млекопитающих, что включает контактирование эпителиальной клетки с фармацевтической композицией, содержащей *in vitro* транскрибированную мРНК, где *in vitro* транскрибированная мРНК содержит кодирующую последовательность, которая кодирует SEQ ID NO: 1 (аминокислотную последовательность человеческого CFTR дикого типа). Изобретение также предусматривает варианты использования фармацевтических композиций, содержащих *in vitro* транскрибированную мРНК, где *in vitro* транскрибированная мРНК содержит кодирующую последовательность, которая кодирует SEQ ID NO: 1, для индукции экспрессии CFTR в эпителиальных клетках легких млекопитающих.

Изобретение также предусматривает методы для индукции экспрессии.

CFTR в целевой клетке млекопитающего, что включает контактирование целевой клетке млекопитающего с композицией, содержащей *in vitro* транскрибированную мРНК, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1. Изобретение также предусматривает вариант использования композиции, содержащей *in vitro* транскрибированную мРНК, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, для индукции экспрессии CFTR в целевой клетке млекопитающего.

В некоторых вариантах реализации этих вариантов использования и способов, *in vitro* транскрибированная мРНК является мРНК природного происхождения или мРНК дикого типа, кодирующая человеческий CFTR (SEQ ID NO: 2). В других вариантах реализации изобретения *in vitro* транскрибированная мРНК - это мРНК не природного происхождения, как описано выше.

В некоторых вариантах использования *in vitro* транскрибированная мРНК содержит кодирующую последовательность, которая кодирует SEQ ID NO: 1, которая не менее чем на 65, 70, 75, 80, 85, 88, 90, 92 95 или 100% идентична SEQ ID NO: 2 (кодирующей последовательности мРНК человеческого CFTR дикого типа).

мРНК, содержащая кодирующую последовательность, которая кодирует SEQ ID NO: 1, которая по меньшей мере на 65, 70, 75, 80, 85, 88, 90, 92 95 или 100% идентична SEQ ID NO: 2, может иметь большее содержание скрытых промоторов, прямых и инвертированных повторов, и/или содержание GC, чем описанная выше мРНК. Было замечено, что векторы, содержащие SEQ ID NO: 2 часто подвергаются мутациям инсерции/делеции/перестановкам в клетках хозяина при типичных условиях роста, что приводит к гетерогенной популяции векторов, которые не могут быть использованы напрямую для транскрипции *in vitro*. Было установлено, что выращивание клеток хозяина в условиях, таких как пониженная температура, ослабленное освещение и/или уменьшение деления клеток, такое как CoryCutter®, уменьшало, но не устраняло появление мутаций. Соответственно, было бы желательно для *in vitro* реакций транскрипции мРНК, содержащей кодирующую последовательность, по меньшей мере на 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичную SEQ ID NO: 2, использовать матрицу, полученную выращиванием вектора, как описано выше, собирая и линеаризируя вектор, и очищая желаемые молекулы для реакции транскрипции. Стадия очищения может быть, например, вытеснительной хроматографией или слабым анионным обменом.

In vitro транскрибированная мРНК для вариантов использования и методов, соответствующих изо-

бретению, может содержать 5'-UTR, 3'-UTR, поли-А, поли-У и/или поли-С хвосты, кэп и/или нестандартные нуклеотиды, как описано в разделе выше, касающемся этих особенностей.

Фармацевтические композиции для вариантов применения и способов.

Фармацевтические композиции для применения в соответствии с изобретением могут содержать мРНК для вариантов применения и способов, соответствующих изобретению, как описано в предыдущей секции, и дополнительные составляющие, как описано в секции выше, касающейся композиций, содержащих мРНК CFTR. Так что, предусмотрено использование и/или введение фармацевтических композиций, содержащих любой из носителей, описанных выше.

В некоторых предпочтительных вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции содержат РЕИ, такой как разветвленный РЕИ, имеющий молекулярная масса от 10 до 40 кДа, например, 25 кДа.

В других предпочтительных вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции содержат катионный липид, пегилированный липид и дополнительный липид (такой как нейтральный липид). Катионный липид, пегилированный липид и/или дополнительный липид могут быть выбраны из приведенных в секции выше, касающейся композиций, содержащих мРНК CFTR.

Пути введения для индукции экспрессии в легких.

В некоторых вариантах реализации способов и вариантов применения для индукции экспрессии CFTR в легких млекопитающих, фармацевтическая композиция, как описано выше, вводится путем, выбранным из внутритрахеальной инстиляции, небулизации или распыления. Устройство для введения композиции может быть выбрано из устройств, приведенных в секции выше, касающейся устройств, наполненных фармацевтической композицией.

В предпочтительных вариантах реализации изобретения композиция вводится путем небулизации или распыления. Некоторые липидные препараты могут иметь свойство агрегировать при попытке небулизации, но обычно возможно разрешить проблему агрегации путем изменения препарата, например, заменой катионного липида.

Лечение муковисцидоза.

Среди прочего, данное изобретение может быть использовано для лечения муковисцидоза. В некоторых вариантах реализации данное изобретение предусматривает метод лечения муковисцидоза введением субъекту, нуждающемуся в лечении, мРНК, кодирующую белок CFTR, как описано в данном документе, или фармацевтическую композицию, содержащую мРНК. мРНК или фармацевтическая композиция, содержащая мРНК, может быть введена напрямую в легкие субъекта. Различные пути введения могут быть использованы для доставки в легкие. В некоторых вариантах реализации изобретения мРНК или композиция, содержащая мРНК, описанная в данном документе, вводится путем ингаляции, небулизации или распыления. В разных вариантах реализации изобретения введение мРНК приводит к экспрессии CFTR в легких субъекта (например, в эпителиальных клетках легких).

В конкретном варианте реализации данное изобретение предусматривает метод лечения муковисцидоза введением в легкие нуждающегося в лечении субъекта мРНК, содержащую кодирующую последовательность, которая кодирует SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах реализации данное изобретение предусматривает метод лечения муковисцидоза введением в легкие нуждающегося в лечении субъекта мРНК, содержащую кодирующую последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную SEQ ID NO: 1.

В другом отдельном варианте реализации данное изобретение предусматривает метод лечения муковисцидоза введением в легкие нуждающегося в лечении субъекта мРНК, содержащую кодирующую последовательность SEQ ID NO: 3.

В других вариантах реализации данное изобретение предусматривает метод лечения муковисцидоза введением в легкие нуждающегося в лечении субъекта мРНК, содержащую кодирующую последовательность, по меньшей мере на 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 99% идентичную SEQ ID NO: 3. Дополнительные примеры мРНК CFTR не природного происхождения, которые могут быть использованы для лечения муковисцидоза, описаны в секции краткого описания последовательностей, как, например, SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, or 17. В некоторых вариантах реализации изобретения мРНК CFTR не природного происхождения, которые могут быть использованы для лечения муковисцидоза, по меньшей мере на 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичны к любой из SEQ ID NO: 3, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, или 17.

Примеры

Последующие специфичные примеры должны рассматриваться как чисто иллюстративные и не каким образом не ограничивающие оставшееся описание. Без дальнейших уточнений, предполагается, что специалист в данной области техники на основе приведенного в данном документе описания сможет в полной мере использовать данное изобретение.

Если не указано иное, мРНК CFTR и РНК SNIM, которые использовались в показанных тут примерах, состояли из 5' UTR с последовательностью SEQ ID NO: 4, кодируемых последовательностей (CDS) с последовательностью SEQ ID NO: 3, и 3' UTR с последовательностью SEQ ID NO: 5. мРНК FFL и РНК SNIM, которые использовались в показанных тут примерах, состояли из 5' UTR, кодируемых последова-

тельностей (CDS) и 3' UTR с последовательностями SEQ ID NOS: 6, 7, и 8, соответственно.

Пример 1. Синтезированная *in vitro* мРНК, кодирующая CFTR.

Синтез информационной РНК. мРНК человеческого трансмембранного регулятора муковисцидоза (CFTR) и люциферазы светлячка (FFL) были синтезированы *in vitro* путем транскрипции из плазмидной матрицы ДНК, кодирующей ген, с последующей вставкой 5' кэп структуры (Cap 1) (Fechter, P.; Brownlee, G.G. "Recognition of mRNA cap structures by viral and cellular proteins" J. Gen. Virology 2005, 86, 1239-1249 и 3'поли(А) хвоста длиной около 200 нуклеотидов, как было определено с помощью гель-электрофореза. 5' и 3' нетранслируемые области присутствовали в каждом мРНК продукте.

Типичные не встречающиеся в природных условиях мРНК CFTR, включая SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, или SEQ ID NO: 17 описанные в Кратком Описании раздела Последовательности.

Пример 2. Экспрессия CFTR и его активность в клетках HEK.

Этот пример показывает, что из доставленной в клетки синтетической мРНК человеческого CFTR экспрессировался полностью функциональный белок CFTR.

Клетки и трансфекция CFTR. Человеческие эмбриональные клетки почек HEK293Т были выращены в DMEM (Invitrogen Cat № 11965-092) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ L-глутамин, 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. За день до трансфекции клетки высевали в 6-луночные плашки при конfluence 50-60% и инкубировали при нормальных условиях культивирования тканей (36°C во влажной атмосфере с 5% CO₂ и 95% воздуха). 60 мкл липофектамина 2000 (Invitrogen Cat № 11668019) разбавляли в 900 мкл среды OptiMem со сниженным содержанием сыворотки (Invitrogen Cat № 31985-062) и осторожно перемешивали с помощью вортекса. 24 мкг мРНК CFTR (4 мкг на лунку) разбавляли в 900 мкл среды OptiMem. К разбавленному липофектамину немедленно добавляли мРНК и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут. Культуральную среду HEK293Т аккуратно удаляли путем аспирации и заменяли на 1 мл среды OptiMem со сниженным содержанием сыворотки. В каждую лунку добавляли по 300 мкл комплекса мРНК/липофектамин, после чего клетки пребывали в нормальных для культивирования клеток условиях в течение 24 ч, предшествующих повторному посеву путем механического отделения от покрытых поли-L-лизином покровных стекол (BD Biosciences, BD Bioscoat), таким образом клетки могли быть легко перемещены в регистрирующую камеру для электрофизиологической записи. Клетки инкубировали в стандартных для культивирования тканей условиях в течение как минимум последующих 24 ч и были использованы в эксперименте в течение 48 ч после последнего пассажа.

Электрофизиологические исследования. Локальную фиксацию потенциала клеточной мембраны с конфигурацией "whole cell" проводили при комнатной температуре при помощи усилителя Axopatch 200В с использованием электродов с сопротивлением 5-8 МОм. Данные были оцифрованы (50 кГц) и отфильтрованы (5 кГц), соответственно. Для минимизации погрешности напряжения была осуществлена компенсация добавочного сопротивления (70-80%). Измерения фиксации потенциала проводились со следующим пипеточным раствором: 140 мМ NMDG-Cl₁; 5 мМ EGTA; 1 мМ MgCl₂; 10 мМ HEPES; pH 7.2; 310 мОсм/л. Омывающий раствор содержал: 140 мМ NaCl, 3 мМ KCl, 2 мМ MgCl₂, 2 мМ CaCl₂ и 10 мМ HEPES; pH 7.3, доведенный до 315 мОсм/л D-глюкозой. Измерения фиксации потенциала начинались через 3-5 минут после установления конфигурации whole-cell.

На измеряемые клетки HEK293Т был направлен фиксированный потенциал в -60 мВ или 0 мВ и последовательность из положительных и отрицательных шагов потенциала (от -80 мВ до +80 мВ или от -100 до +100 мВ с шагом 20 мВ) с целью вызвать CFTR-индуцированные "whole-cell" хлорные (Cl⁻) токи. Мембранно-проницаемый аналог cAMP, 8-Br-cAMP (500 мкМ, Sigma Aldrich) был добавлен на 4 мин в измеряемые клетки для повышения токов CFTR. 'Эталонный' блокатор CFTR, CFTRinh-172 (10 мкМ, Sigma) добавлялся в конце каждого измерения для блокирования CFTR-индуцированного тока Cl⁻. Контрольные измерения были проведены на нетрансфицированных клетках HEK293Т.

Тестируемые вещества.

Тестируемые вещества применялись с использованием быстрой перфузионной системы DAD-16VC (ALA Scientific Instruments, США) с пипеткой, размещенной приблизительно в 200 мкм от измеряемой клетки. 8-Br-cAMP был приготовлен со стоковой концентрацией 500 мМ в ddH₂O. CFTRinh-172 был приготовлен со стоковой концентрацией 10 мМ в DMSO. Все вещества сохранялись при -20°C и перед самым использованием быстро размораживались и разводились к нужной конечной концентрации.

Анализ.

Все анализы проводились с использованием программ Clampfit (MDS Analytical Technologies) и Excel (Microsoft). Все значения являются амплитудами вызванного максимального пикового тока. Статистические различия в данных были установлены с помощью t-критерия Стьюдента, для зависимых или независимых выборок, и считались значимыми при P<0,05.

In vitro продукция человеческого белка CFTR. Продукция человеческого белка CFTR с помощью мРНК hCFTR производилась путем трансфекции мРНК человеческого CFTR в описанные в данном документе клетки HEK293Т. Обработанные и необработанные клетки были отобраны и подвергнуты мето-

дам иммунопреципитации через 24 ч после трансфекции. Детекция человеческого белка CFTR методом Вестерн блота демонстрирует, что из синтетической матричной РНК был образован полноценный сложно гликозилированный белок CFTR (обозначен как "С"-бэнд) (фиг. 1 А).

In vitro активность человеческого белка CFTR. Для определения активности белка CFTR, полученного из синтетической мРНК человеческого белка CFTR после трансфекции, были проведены анализы локальной фиксации потенциала с конфигурацией "whole cell" в клетках НЕК 293 и НЕК 293Т. Как обработанные, так и контрольные клетки (необработанные и ложно трансфецированные) подвергались воздействию активатора (8-Br-cAMP, форсколин) и ингибитора (CFTRinh-172, GlyH-101) с целью определить разницу в токе (транспорт ионов хлора).

НЕК293Т были трансфецированы 4 мкг мРНК hCFTR и проанализированы через 24 ч после трансфекции. Были проведены фиксации потенциала с "whole cell" конфигурацией для измерения тока, который является транспортом ионов хлора, при воздействии установленного потенциала. Вольт-амперный график изменения потенциала с -80 мВ до +80 мВ (изображен на фиг. 2) демонстрирует существенные различия в токе при сравнении необработанных и обработанных мРНК hCFTR клеток. Это повышение тока после добавления 8-Br-cAMP, известного активатора белка CFTR, позволяет предположить, что человеческий белок CFTR присутствует в этих клетках. При обработке этих ранее трансфецированных клеток известным специфичным ингибитором CFTR, CFTRinh-172, соответствующий ток опускался до уровня, близкого к контрольному (~89% уменьшения). Такое понижение после воздействия этого ингибитора подтверждает присутствие белка CFTR. Эти результаты вместе демонстрируют, что синтетическая мРНК hCFTR может образовывать активный белок CFTR.

Кроме этого были проведены анализы активности CFTR с конфигурацией "whole cell" в клетках НЕК293 используя автоматизированную систему (IonWorks). Как описано выше, как обработанные, так и контрольные клетки (необработанные и ложно трансфецированные) подвергались воздействию субстратов активатора и ингибитора с целью определить разницу в токе (транспорт ионов хлора). В этих исследованиях форсколин был использован как активатор белка CFTR и часть клеток, трансфецированных мРНК hCFTR, далее были подданы воздействию специфичного ингибитора CFTR, GlyH-101. Считается, что GlyH-101 действует как блокатор поры CFTR, влияя на часть белка, расположенной на внешней стороне мембраны. Стоит отметить, что такой механизм действия отличается от такового у CFTRinh-172, для которого было проиллюстрировано функционирование с внутриклеточной стороны белка CFTR.

Фиг. 4 представляет вольт-амперный график родительских клеточных линий НЕК293, обработанных форсколином и GlyH-101. Не было замечено никаких значительных изменений в токе, что позволяет предполагать, что конкретно эти специфичные активаторы/ингибиторы CFTR не оказывают никакого влияния на эндогенные белки, присутствующие в клеточной линии.

Вольт-амперный график изменения потенциала с -100 мВ до +100 мВ (изображен на фиг. 5) демонстрирует существенные различия в токе при сравнении необработанных НЕК293 клеток и обработанных мРНК hCFTR клеток. Это повышение тока после добавления форсколина, известного активатора белка CFTR, позволяет предположить, что человеческий белок CFTR присутствует в этих клетках. При обработке этих ранее трансфецированных клеток известным специфичным ингибитором CFTR, GlyH-101, соответствующий ток опускался до уровня, близкого к контрольному (~95% уменьшения). Такое понижение после воздействия этого ингибитора подтверждает присутствие белка CFTR.

В итоге, эти данные относительно ингибирования, являющиеся результатом двух различных механизмов, подтверждают наличие полностью функционального белка CFTR, образованного из синтетической матричной РНК человеческого CFTR.

Пример 3. *In vivo* экспрессия CFTR.

Этот пример демонстрирует, что белок CFTR эффективно экспрессируется *in vivo* из мРНК, кодирующей CFTR, доставленной введением в легкие.

Протокол создания препарата 1. Аликвоты по 50 мг/мл растворов C12-200, DOPE, холестерина и DMG-PEG2K в этаноле были смешаны и разбавлены этанолом до конечного объема 3 мл. Отдельно был приготовлен водный буферный раствор мРНК CFTR (10 мМ цитрата/150 мМ NaCl, pH 4.5) из 1 мг/мл стока. Липидный раствор был быстро введен в водный раствор мРНК и взболтан с образованием конечной суспензии в 20% этаноле. Образованная суспензия наночастиц была отфильтрована, диафильтрована с помощью 1x PBS (pH 7.4), после чего водой, сконцентрирована и хранилась при 2-8°C. Конечная концентрация = 1.09 мг/мл мРНК CFTR (инкапсулированная). Z_{ave} = 80.2 нм ($Dv_{(50)}$ = 55.5 нм; $Dv_{(90)}$ = 99.6 нм).

Протокол создания препарата 2. Аликвоты по 2.0 мг/мл водного раствора PEI (разветвленного, 25 кДа) были смешаны с водным раствором мРНК CFTR (1.0 мг/мл). Полученную сложную смесь перемешивали пипеткой несколько раз, после чего оставляли на 20 мин перед инъекцией. Конечная концентрация = 0.60 мг/мл мРНК CFTR (инкапсулированная). Z_{ave} = 75.9 нм ($Dv_{(50)}$ = 57.3 нм; $Dv_{(90)}$ = 92.1 нм).

Анализ белков FFL и CFTR, образованных через внутритрахеальное введение мРНК-содержащих наночастиц. Все исследования проводились с использованием самок BALB/C мышей или CFTR-нокаутных мышей.

Образцы FFL вводились прямой инстилляцией (MicroSprayer®) или небулизацией (PARI Воу или

Aeroneb) соответствующей дозы инкапсулированной мРНК FFL. мРНК CFTR вводилась с использованием джет-небулайзера PARI Boy. Мыши убивались и перфузировались раствором соли после истечения времени на экспрессию.

Внутритрахеальное введение мРНК FFL. Тестируемые материалы FFL вводились единичным внутри-трахеальным аэрозольным введением с помощью Microsprayer™ (50 мкл/животное), при этом животные были анестезированы внутривентральной инъекцией смеси кетамина 50-100 мг/кг и ксилазина 5-15 мг/кг.

Введение мРНК-FFL небулизацией (распылением).

Тестируемые материалы.

FFL вводились единичной аэрозольной ингаляцией с помощью небулизатора Aeroneb® Lab (номинальный объем дозы был до 8 мл/группу), Тестируемый материал доставлялся в клетку, содержащую всю группу животных (n=4) и связанную с потоком кислорода и системой мусоросбора.

Введение мРНК CFTR. мРНК CFTR готовилась способом, описанном ниже в примере 6. Четыре CFTR-нокаутные мыши помещались в аэрозольную камеру и подвергались воздействию в общем 2 мг немодифицированной мРНК CFTR с оптимизированными кодонами (содержащую кодирующую последовательность SEQ ID NO: 3) посредством небулизации (джет-небулайзер Pan Boy) на протяжении около одного часа. Мыши были убиты через 24 ч после обработки.

Умерщвление. Животные умерщвлялись удушением CO₂ за соответствующие периоды времени после введения дозы ($\pm 5\%$), за чем следовала торакотомия и обескровливание. Вся кровь (максимально возможный для получения объем) собиралась путем разрыва и отделения сердца.

Перфузия. После обескровливания, все животные подвергались перфузии сердца соляным раствором. Вкратце, внутрикардиальная перфузия всего тела производилась введением в просвет левого желудочка иглы 23/21 размера, присоединенной к шприцу объемом 10 мл, содержащему раствор соли. Правое предсердие рассекалось для предоставления дренажного стока для перфузии. На поршень применялось мягкое и устойчивое давление для перфузирования животного после размещения иглы в сердце. Адекватный поток промывочного раствора достигался в случае, если вытекающий поток перфузата был чистым (не было видимой крови), что означало, что промывочный раствор наполнил тело и процедура завершена.

Сбор тканей. После перфузии у всех животных были собраны печень и легкие (правое и левое). В выбранных группах приблизительно половина печени и оба (левое и правое) легких были раздроблены в жидком азоте и хранились при номинальной температуре -70°C. В выбранных группах приблизительно половина печени размещалась в одной гистологической кассете на животное. Дополнительно, легкие были наполнены 10% NBF через пипетку, помещенную в трахею. Трахея была перевязана лигатурой, и интактные легкие (правое и левое) и трахея были помещены в одну гистологическую кассету на животное. Все гистологические кассеты хранились при комнатных условиях в 10% NBF в течение 24 ч и переносились в 70% этанол.

Экспрессия FFL в мышцах, обработанных FFL. При анализе образцов ткани была детектирована экспрессия FFL в мышцах, обработанных FFL.

Экспрессия CFTR в CFTR-нокаутных мышцах. Экспрессия CFTR была детектирована иммунопреципитацией-Вестерн-блот-анализом мышечных легких, обработанных мРНК CFTR. "С"-бэнд, соответствующий зрелому белку, был детектирован во всех обработанных мышцах но отсутствовал в контрольных мышцах. Были использованы антитела MAB25031 (R&D Systems) для иммунопреципитации и SAB4501942 (Sigma) для детекции в Вестерн-блот-анализе.

Этот пример демонстрирует, что белок CFTR может эффективно экспрессироваться *in vivo* из мРНК, доставленной введением в легкие. Более того, факт того, что мРНК CFTR была удачно доставлена в легкие CFTR-нокаутных мышцей, что привело к эффективной продукции белка в легких, означает, что *in vivo* продукция белка на основе мРНК CFTR может быть использована для лечения недостатка белка CFTR.

Пример 4. Доставка мРНК CFTR в легкие с использованием полимерных наночастиц.

Доставка матричной РНК человеческого CFTR в мышечные легкие может быть осуществлена путем ингаляции или небулизации. С использованием методов гибридизации *in situ* возможна детекция мРНК CFTR после внутритрахеального введения мышам наночастиц, наполненных мРНК человеческого CFTR. Введение может быть осуществлено с использованием наночастиц на основе липидов (например, C12-200) или же полимерных наночастиц (например, полиэтиленамина, PEI).

Введение мРНК CFTR с использованием полимерных наноносителей. CFTR-нокаутные мыши обрабатывались наночастицами, основанными на полиэтиленимине, наполненными мРНК CFTR, путем внутритрахеального введения (30 мкг инкапсулированной мРНК). Обработанные мыши умерщвлялись через шесть и через 24 ч после введения, и легкие были собраны и зафиксированы в 10% нейтральном забуференном формалине (NBF). Гибридизация *in situ* была использована для детекции экзогенной мРНК человеческого CFTR (фиг. 6). Через 24 ч после введения наблюдалось существенное окрашивание с широким распределением в обоих мышечных легких обработанных CFTR-нокаутных мышцей, в то время как

в контрольных мышцах, обработанных PBS, не наблюдалось никакой окраски.

Анализ обработанных легких при больших увеличениях (до 20х увеличения) показал существенное положительное внутриклеточное окрашивание обоих легких в бронхиальных и альвеолярных участках (фиг. 7). При дальнейшем увеличении (40х) наблюдалось положительное окрашивание в цитоплазме целевых апикальных клеток бронхов (фиг. 8). Так что, можно предположить, что матричная РНК API была удачно доставлена в целевые апикальные клетки бронхов. Кроме того, в то время как можно видеть существенное окрашивание при 6 ч после введения, значительное положительное окрашивание еще наблюдалось через 24 ч после введения (фиг. 9).

Существенное положительное окрашивание наблюдалось через 24 ч после введения по обоим легким в бронхиальных и альвеолярных участках.

Пример 5. Доставка мРНК CFTR в легкие с использованием наночастиц на основе липидов.

Введение мРНК CFTR с использованием наночастиц на основе липидов.

Как упомянуто выше, успешная доставка мРНК человеческого CFTR в легкие может быть осуществлена через реагенты для доставки на основе липидных наночастиц. В данном документе описываются примеры катионных липидных наночастиц, наполненных мРНК hCFTR, использующих C12-200 в качестве катионного липидного компонента.

Успешная детекция мРНК человеческого CFTR в легких CFTR-нокаутных мышей была осуществлена с помощью гибридизации *in situ*. Нокаутные мыши обрабатывались 15 мкг мРНК hCFTR, инкапсулированной в липидных наночастицах на основе C12-200, и умерщвлялись через 6 ч после введения. Положительная детекция мРНК hCFTR наблюдалась в бронхиальных и альвеолярных участках обоих легких, а отличии от контрольных мышей, обработанных PBS (фиг. 10).

При дальнейшем увеличении (40х) наблюдалась положительная детекция мРНК CFTR в апикальной цитоплазме эпителиальных клеток бронхов, также как и во внутриклеточных концевых альвеолярных участках (фиг. 11).

В общем, успешная доставка синтетической матричной РНК человеческого CFTR может быть достигнута с помощью систем доставки на основе как полимерных (PEI), так липидных (C12-200) наночастиц. Эти системы позволяют накапливать субстанции препарата внутри целевых клеток мышей. Более того, существенные количества мРНК hCFTR присутствовали в этих целевых клетках через 24 ч после введения.

Пример 6. Подтверждение экспрессии человеческого CFTR с помощью специфичных антител.

Подтверждение, на основе антител, детекции человеческого белка CFTR в клетках мышей, свиней и культивированных клетках. Были проведены эксперименты с целью идентифицировать антитело, специфичное к белку hCFTR, которое не реагирует с мышинным и свиным аналогом и которое доступно в достаточной мере для дальнейших экспериментов. Вкратце, тестирование различных анти-hCFTR антител из академических и коммерческих источников привело к идентификации комбинации анти-hCFTR антител, которые способны детектировать человеческий белок CFTR после иммунопреципитации и Вестерн-блоттинга (ИП/ВБ), при этом не проявляя перекрестной реактивности с мышинным или свиным CFTR. Так что, на основе результатов ИП/ВБ были идентифицированы подходящие антитела для детекции белка hCFTR, не имеющие перекрестной реактивности с мышинным или свиным CFTR.

Клетки трансфецировались мРНК hCFTR и белковый лизат готовился с использованием ProteoExtract Transmembrane Kit (Merck) через 24 ч после трансфекции, трансмембранная фракция скринировалась на наличие hCFTR вестерн-блоттингом используя мышинное антитело к человеческому CFTR (MAI-935). Как положительный контроль использовались лизаты из клеток 16HBE. Фиг. 12А иллюстрирует данные из клеток CHO и COS-7.

Клетки почек новорожденных хомячков (ВНК), описанные в литературе как CFTR-негативные, трансфецировали подобно клеткам CHO и COS-7, после чего белковые лизаты анализировались при помощи вестерн-блот гибридной. В отличие от данных ранее опубликованных отчетов, четкий позитивный сигнал наличия CFTR был обнаружен при помощи моноклональных анти-CFTR антител мыши (фиг. 12В). Для проверки специфичности антител, используемых в вестерн-блот анализе, клетки почек свиньи из нокаутной по CFTR-нокаутной свиньи (PKC), любезно предоставленные Проф. Eckhardt Wol (Ludwig Maximilians University, Мюнхен), были использованы в экспериментах по трансфекции, после чего белковые лизаты проверялись на наличие экспрессии CFTR. Как видно из рисунка 12В, в клетках PKC не было обнаружено никаких сигналов CFTR. Тем не менее, трансфекция также не приводила появлению к каким-либо сигналам, свидетельствующих о наличии hCFTR. Применяя люциферазу для контроля эффективности трансфекции, было обнаружено, что экспрессия люциферазы в клетках PKC была в несколько раз ниже, чем в клетках CHO или COS-7. В связи с тем, что значимых отличий в интенсивностях окраски бэндов hCFTR после трансфекции во всех проанализированных клеточных линиях обнаружено не было, был проведен более чувствительный и специфичный к hCFTR обширный скрининг других антител hCFTR.

Скрининг антител при помощи Вестерн-блот гибридной. Белковые лизаты были получены с клеточной линии клеток бронхиального эпителия человека (BEAS-2B), линии эмбриональных клеток почки человека (HEK), мышинных и свиных легких при помощи ProteoExtract Transmembrane Kit (Merck),

после чего трансмембранная фракция была использована для иммуноблоттинга с применением различных первичных антител (MA1-935 от Thermo Scientific Pierce Antibodies, Rockford, IL, USA, AB596 от Cystic Fibrosis Consortium, University of Pennsylvania, PA, USA, и AB570 от Cystic Fibrosis Consortium, University of Pennsylvania, PA, USA). Данные обобщены на фиг. 13.

В то время как MA1-935 показали наличие CFTR во всех трех образцах, AB596 выявили человеческий и мышинный, но не свиной CFTR, а антитела G449 специфично определили только человеческий CFTR. В случае с AB570 не совсем понятно, действительно ли являлись обнаруженные в мышинных и свиных образцах бэнды с немного низкой молекулярной массой CFTR или были неспецифичными продуктами. В последующих экспериментах (данные не показаны), было установлено, что MA1-935 распознавали бэнд, который не являлся CFTR. Таким образом, в целом, результаты полученные с использованием MA1-935 рассматривались как подтверждающие полученные с использованием других антител результаты, но эксперименты, в которых единственными анти-CFTR антителами, которые применялись, были MA1-935, не считались убедительными.

Имунопреципитация hCFTR (IP-hCFTR) из образцов тканей. Учитывая, что все подвергшиеся анализу антитела приводили к образованию нескольких неспецифических бэндов и ни один из них не произвел паттерн бэндов, характерный для hCFTR (С-бэнд, представляющий полностью гликозилированный белок и В-бэнд, представляющий основную маннозилированную форму), иммунопреципитация (ИП) hCFTR и последующий анализ при помощи Вестерн-блоттинга был применен для повышения чувствительности и специфичности анализа, приводя тем самым к увеличению соотношения сигнал-шум.

Первые иммунопреципитационные эксперименты проводились в сотрудничестве с проф. Burkhard Tummler (Medizinsche Hochschule Hannover) с использованием протоколов и антител, опубликованных van Barneveld et al. 2012, *Immunochemical analysis of Mutant CFTR in Lung explants*, *Cell Physiol. Biochem.* 30, 587-595 (2012)). Клетки карциномы толстой кишки человека (Т84), которые гиперэкспрессировали hCFTR, использовались как позитивный контроль в ИП экспериментах.

Имунопреципитация hCFTR с использованием трех различных антител (R29, R66/17 и R66/16), с последующей иммунодетекцией при помощи AB596, показывала специфичную детекцию белка hCFTR в белковых лизатах из легких свиней, обработанных аэрозолем SNIM РНК hCFTR, как описано ниже в примере 8 (фиг. 14).

Препарат HGT5001. Эксперименты с участием аэрозоля, использующие SNIM РНК hCFTR в препарате HGT5001:DOPE; холестерин; PEGDMO2K (относительные количества 50:25:20:5 (мг:мг:мг:мг)) ("Препарат HGT5001"), проводились в мышах и белковых лизатах из изолированных легких, и через 24 ч после доставки мРНК также были проанализированы с помощью ИП используя те же антитела и условия, что и для лизатов из свиней. Тем не менее, в мышинных образцах не было детектировано характеристического паттерна бэндинга зрелого CFTR (фиг. 15).

Имунопреципитация hCFTR (ИП-hCFTR) из *in vitro* трансфицированных клеток. Предварительные результаты ИП с использованием материалов тканей из свиней свидетельствовали о технической возможности детекции hCFTR после доставки транскрипта *in vivo*. Тем не менее, так как ни одно из антител, использованных в иммунопреципитации CFTR (R29, R66/17 и R66/16) не доступно для покупки, были исследованы другие коммерчески доступные антитела на предмет их эффективности в реакциях ИП. Были протестированы два антитела из R&D systems (MAB25031 и MAB1660).

Белковые лизаты готовились из клеток Т84 и 500 мкг общего белка использовалось в реакции ИП с использованием разных концентраций антитела MAB25031. После этого, количество иммунопреципитированного белка hCFTR детектировалось иммуноблоттингом с использованием AB570 (Cystic Fibrosis Foundation). В этих условиях AB596 создавало намного более высокий фон, поэтому далее не тестировалось. Как проиллюстрировано на фиг. 16А, при увеличении концентрации ИП антитела с 2 мкг/мл до 4 мкг/мл не наблюдалось дальнейшего повышения количества преципитированного белка CFTR. Были детектированы как полностью гликолизированная, так и коровая формы (С- и В-бэнд, соответственно). Те же иммунопреципитаты также были скринированы с использованием MAB1660 как первичного антитела в Вестерн блоте. Тем не менее, с этим антителом был виден только С-бэнд (фиг. 16В).

После успешной детекции эндогенного hCFTR из иммунопреципитатов Т84 с использованием антитела MAB25031 были проведены эксперименты в клетках NIH3T3 с целью детектировать белок hCFTR после трансфекции. Клетки NIH3T3 были трансфицированы SNIM РНК hCFTR. Белковые лизаты были приготовлены через 72 ч после трансфекции и количества белка оценивались методом ВСА. Человеческий белок CFTR иммунопреципитировался из 500 мкг общего белкового лизата с использованием 2 мкг/мл антитела MAB25031 с последующим иммуноблоттингом с использованием AB570 (фиг. 17). Тем не менее, не было детектировано CFTR. Клетки, трансфицированные мРНК, кодирующей LacZ, были проанализированы как контрольные образцы эффекта трансфекции как такового на количество белка CFTR.

Повышение количества общего белка, использованного в иммунопреципитации, с 500 мкг до 8 мг не приводило к образованию детектируемого hCFTR после иммунодетекции AB570. Другое специфичное к hCFTR антитело, MAB1660 (R&D Systems), также было скринировано в иммунопреципитации (фиг. 18). Тем не менее, это антитело не преципитировало CFTR так же эффективно, как MAB25031. По-

этому, все дальнейшие иммунопреципитации были выполнены с MAB25031.

Отсутствие детекции hCFTR в образцах, трансфицированных мРНК, не обязательно означает отсутствие функциональности мРНК, так как кинетические эксперименты с использованием люциферазы как маркерного гена показали, что максимальная экспрессия с мРНК наблюдалась через 24 ч после трансфекции. Отсутствие детекции hCFTR вызвано скорее недостаточной концентрацией hCFTR в исследуемых образцах или отсутствием специфичности применяемых антител.

Препарат PEI. Установленные условия были проверены на предмет их приемлемости для детектирования hCFTR после доставки SNIM РНК hCFTR в свиней (см. пример 7) в препарате наночастиц с разветвленным PEI в 25 кДа ("Препарат PEI"), приготовленным следующим образом. Требуемое количество SNIM РНК непосредственно перед применением было разбавлено в воде для инъекции (Braun, Melsungen) к общему объему 4 мл и быстро добавлено с использованием пипетки к 4 мл водного раствора разветвленного 25 кДа PEI при соотношении N/P 10. Раствор перемешивался с использованием пипетки десять раз и поочередно небулизировался как две отдельные фракции по 4.0 мл в легкие свиней с использованием указанного небулайзера. Как положительный и отрицательный контроли рассматривались, соответственно, образец из областей легких свиньи № 1, которые экспрессировали люциферазу, и другой образец из каудальной доли свиньи № 2, где не детектировалась активность люциферазы, тем самым показывая отсутствие доставки мРНК и/или экспрессии. Белковые лизаты, приготовленные из этих образцов, иммунопреципитировались с использованием MAB25031 (R&D Systems) и белок hCFTR детектировался с использованием AB570. Как проиллюстрировано на фиг. 19, экспрессия люциферазы коррелировала с экспрессией hCFTR. Образец из левой каудальной доли свиньи № 2, где не детектировалась активность люциферазы, был также отрицательным по hCFTR (полоса 1), в то время как hCFTR детектировался в образцах из свиньи № 1, которые были положительными по люциферазе (полоса 2).

Пример 7. Аэрозольная доставка мРНК.

Установление аэрозольной доставки мРНК в легкие свиней. Аэрозольное введение SNLM РНК люциферазы светлячка (FFL) в легкие свиней было произведено с помощью последовательной процедуры эксперимента. На первой стадии препараты SNLM РНК FFL были небулизированы в анестезированных свиней при контролируемой вентиляции. На второй стадии легкие были немедленно вырезаны после завершения аэрозольного введения и фрагменты легких инкубировались в культуральной среде в течение ночи перед тем, как в них производилось *ex vivo* измерение люциферазы с помощью BLI.

Свиньи породы немецкий ландрас были получены в Техническом университете Мюнхена, Вайенштефан, Германия. Вес свиней составлял от 35 до 90 кг. Каждая обработка выполнялась на одной свинье. В сумме были обработаны пять свиней. Первая свинья (весом 90 кг) обрабатывалась SNLM РНК FFL в препарате PEI из примера 6, используя меш-небулайзер EFlow и измерение активности люциферазы в гомогенатах легких. Вторая свинья (весом 60 кг) обрабатывалась SNLM РНК FFL в препарате PEI из примера 6, используя джет-небулайзер PARL BOY и измерение активности люциферазы в фрагментах легких с помощью BLI. Третья свинья (весом 60 кг) обрабатывалась SNLM РНК FFL в препарате PEI из примера 6, используя джет-небулайзер PARL BOY и измерение активности люциферазы в фрагментах легких с помощью BLI. Четвертая свинья (весом 60 кг) обрабатывалась SNLM РНК FFL/мРНК hCFTR в препарате PEI из примера 6, используя меш-небулайзер Aeroneb и измерение активности люциферазы в фрагментах легких с помощью BLI. Пятая свинья (весом 35 кг) обрабатывалась SNLM РНК FFL/ в препарате HGT5001 из примера 6, используя меш-небулайзер Aeroneb и измерение активности люциферазы в фрагментах легких с помощью BLI.

Седация свиней осуществлялась путем их премедикации азапероном в дозе 2 мг/кг массы тела, кетаминном в дозе 15 мг/кг массы тела, атропином в дозе 0,1 мг/кг веса тела с последующей капельной внутривенной инфузией в латеральную ушную вену. По мере необходимости осуществлялось анестезирование свиней путем внутривенного введения пропофола в дозе 3-5 мг/кг веса тела. Анастезия поддерживалась изофураном (2-3%) и введением ударной дозы 1% пропофола в дозе от 4 до 8 мг/кг массы тела для усиления анестезии в случае необходимости. Длительность анестезии равнялась около 1-3 ч. Свиньи были убиты инъекцией ударной дозы пентобарбитала (100 мг/кг массы тела) и хлорида калия в латеральную ушную вену. Легкие вырезались и собирались фрагменты тканей из разных участков легких, с последующей инкубацией в культуральной среде в течение ночи. Для измерения активности люциферазы образцы ткани либо гомогенизировались и анализировались при помощи трубчатого фотометра, или же инкубировались в среде, содержащей субстрат D-люциферин и *ex vivo* подвергались люциферазной BLI.

Детали и результаты для свиньи № 1. Постановка эксперимента проиллюстрирована на фиг. 20. Для аэрозольного введения меш-небулайзер EFlow был линейно связан с вентиляционной трубкой респиратора. Аэрозольное введение занимало около 60 мин и было дольше, чем ожидалось из контрольных экспериментов с открытыми системами. Это, по-видимому, было обусловлено увеличением обратного давления в течение небулизации, о чем свидетельствует аэрозольный отток в резервуаре меш-небулайзера. Были приготовлены восемь миллилитров препарата PEI из примера 6, содержащего 1 мг SNIM РНК FFL в воде для инъекции, как описано в WP5, которые были небулизированы двумя отдельными порциями по 4 мл каждая. Измерение активности люциферазы проводили в гомогенатах образцов тканей легких, вырезанных из различных частей легких, после инкубации в культуральной среде в течение ночи. Значения

экспрессии были нанесены в соответствии с происхождением фрагментов легких (фиг. 21).

Результаты показали экспрессию люциферазы в тканях свиных легких.

Экспрессия люциферазы была наивысшей в центральных частях легких и затухала к более дальним частям легких. Паттерн экспрессии коррелировал с ожидаемым паттерном расположения вдыхаемых SNIM РНК FFL в PEI наночастицах, в соответствии с выбранными параметрами вентиляции. Уровни экспрессии люциферазы были в тех же пределах, что и наблюдаемые в экспериментах с мышами в WP5 с использованием того же препарата PEI из примера 6.

Детали и результаты для свиньи № 2. Аэрозольное введение SNIM РНК.

FFL в препарате PEI из примера 6 было проведено в свинье № 2, а также в свинье № 1, но активность люциферазы измерялась методом измерения биолюминесценции (BLI). Этот эксперимент был проведен для измерения люциферазы с помощью BLI в культивированных фрагментах легких. Активность люциферазы отчетливо наблюдалась в отдельных фрагментах тканей разных участков легких обработанной свиньи (фиг. 22). Эксперимент подтвердил результаты, полученные из свиньи № 1.

Детали и результаты для свиньи № 3. Аэрозольное введение в свиней № 1 и № 2 с использованием меш-небулайзера EFlow выявило некоторые технические сложности и неадекватное время небулизации. Поэтому, свинья № 3 обрабатывалась джет-небулайзером PARI BOY, связанным с вентиляционными трубками через Т-коннектор. Аэрозольное введение длилось дольше (около 80 мин), чем с меш-небулайзером EFlow и аэрозольное введение было неудовлетворительным. Очень слабая активность люциферазы наблюдалась в срезах легких из разных участков легких обработанной свиньи (фиг. 23).

Детали и результаты для свиньи № 4. Результаты предыдущих исследований показали, что меш-небулайзер лучше подходит для аэрозольного введения в легкие свиньи в выбранной установке, чем джет-небулайзер. По этой причине, другой меш-небулайзер был протестирован для этой цели, который удовлетворительно небулизировал препарат PEI из примера 6 при тестировании в открытой системе. Свинья № 4 обрабатывалась меш-небулайзером Aeroneb, линейно соединенным с трубкой респиратора. В этом эксперименте 1 мг мРНК hCFTR доставлялся совместно с 1 мг SNIM РНК FFL в препарате PEI из примера 6. Это было сделано для проверки стабильности и совместимости с небулизацией объединенных препаратов SNIM РНК FFL/мРНК hCFTR-PEI наночастиц относительно повторения дозировки для проведения в примере 8. Препарат оказался стабильным и не показывал несовместимости с небулизацией. Активность люциферазы отчетливо наблюдалась в отдельных фрагментах тканей разных участков легких обработанной свиньи (фиг. 24).

Эксперимент подтвердил результаты, полученные из свиньи № 1 и свиньи № 2, хотя были получены более высокие значения экспрессии. Эксперимент показал, что меш-небулайзер Aeroneb оказался наиболее подходящим для доставки в легкие свиней препарата PEI из примера 6. Более того, эксперимент показал, что SNIM РНК FFL сохраняла активность при совместной доставке с мРНК hCFTR.

Детали и результаты для свиньи № 5. Свинья № 3 обрабатывалась 1 мг SNIM РНК FFL в препарате HGT5001 из примера 6 путем распыления меш-небулайзером Aeroneb. Препарат может быть распылен без технических сложностей. Активность люциферазы отчетливо наблюдалась в отдельных фрагментах тканей разных участков легких обработанной свиньи (фиг. 25).

Эксперимент показал, что SNIM РНК FFL в препарате HGT5001 из примера 6 проявляет активность в тканях легких свиней, хотя уровни экспрессии были в около 15-20 раз меньше, чем у свиней, обработанных препаратом PEI из примера 6.

Заключение. Были получены успешные результаты с использованием меш-небулайзера Aeroneb с препаратом PEI из примера 6. Четыре свиньи обрабатывались препаратом PEI из примера 6 с целью определить оптимальную установку эксперимента для аэрозольной доставки. Результаты показали, что экспрессия люциферазы может быть детектирована в гомогенатах легких свиней методом BLI. Экспрессия люциферазы была наивысшей в центральных частях легких и была еле заметна в дальних частях легких. Было установлено, что наилучшие результаты, вместе с наиболее коротким временем доставки, показывал меш-небулайзер Aeroneb. В соответствии с этими экспериментами, другая свинья была обработана SNIM РНК FFL, инкапсулированной в препарате HGT5001 из примера 6. Хотя экспрессия люциферазы отчетливо наблюдалась в некоторых частях легких свиней, уровни экспрессии были меньше, чем для SNIM РНК FFL в препарате PEI из примера 6. Результаты этой части работы явно демонстрируют, что доставка SNIM РНК в легкие свиней, как преคลินิกую модель большого животного, была возможна с использованием разных препаратов, таких как препарат на основе полимеров (например, PEI) и препарат на основе липидов (например, HGT5001). Результаты этого примера предоставляют доказательство концепции доставки SNIM РНК, используя небулайзеры, применяющиеся в клинической практике, в легкие больших животных, что близко имитирует ситуацию с человеческими пациентами.

Пример 8. In vivo доставка мРНК (еженедельная доза).

Было произведено испытание для установления целесообразности еженедельного аэрозольного применения у свиней. Целесообразность была определена проведением трех аэрозольных обработок модифицированной мРНК с интервалами в одну неделю, при которых не вызывались заболевания легких (отсутствие побочных эффектов, выше чем 2 степени). Дополнительными целями было установить: 1) степень недомогания животных, 2) побочные эффекты лабораторных и клинических осмотров свиней и

3) замеры образованных белков (люциферазы и hCFTR).

Было проведено повторяющееся аэрозольное введение SNIM PHK в препарате PEI в легкие свиней. Группы по двое свиней обрабатывались SNIM PHK FFL/SNIM PHK hCFTR в препарате PEI из примера 6, один, два или три раза с короткими интервалами. Контролем служили две необработанные свиньи. Через 24 ч после обработки легкие были вырезаны и ex vivo активность люциферазы измерялась в изолированных легких методом BLI. Экспрессия белка hCFTR анализировалась с использованием ИП/WB. Для детекции экспрессии люциферазы на клеточном уровне применялась иммуногистохимия (ИНС). Токсикология изучалась измерением воспалительных цитокинов в содержаниях сыворотки и крови. На образцах легких применялась гистопатология. Протокол исследования "пилотного проекта: Повторяемое применение модифицированной мРНК для установления животной модели для аэрозольной терапии муковисцидоза у свиней" был утвержден местными властями перед началом экспериментов (лицензия для экспериментов над животными № 0-045-12).

Дизайн эксперимента. Свиньи, немецкий ландрас, самки возрастом около 6 недель (в среднем массой ~25 кг) на момент небулизации, были куплены в техническом Университете Мюнхена, Вайенштефан, Германия. Свиньи были распределены случайным образом и обрабатывались в соответствии со схемой ниже (табл. 3). Группы обработки, в каждой по 2 свиньи, были следующие.

Группа 0. Контрольная группа без обработки.

Группа I. Аэрозольное введение 1 мг SNIM PHK FFL и 1 мг SNIM PHK hCFTR в препарате PEI, из примера 6, в первый день.

Группа II. Аэрозольное введение 2 мг SNIM PHK hCFTR в препарате PEI, из примера 6, в первый день, и 1 мг SNIM PHK FFL и 1 мг SNIM PHK hCFTR в препарате PEI, из примера 6, в день 8.

Group III. Аэрозольное введение 2 мг SNIM PHK hCFTR (6379-186) в препарате PEI, из примера 6, в день 1 и день 8, аэрозольное введение 1 мг SNIM PHK FFL и 1 мг SNIM PHK hCFTR в препарате PEI, из примера 6, в день 15.

Схема обработки и оценки каждой группы показана в табл. 3. Кроме показанных вмешательств, также каждый день проводился медицинский осмотр свиней.

Таблица 3

Схема разных групп обработки

(Использованные аббревиации:	
•	AA аэрозольное применение
•	Bw тест крови D день
•	Euth. Умерщвление животного)
Группа 0 (необработанные животные):	
1 ^я Euth.	
Bw ↓ d1	
Группа 1 (1 аэрозольное применение; срок существования 1d):	
1 ^я 1 ^я Bw Bw AA Euth.	
↓ ↓ d1, d2	
Группа 2 (2 аэрозольных применения; срок существования 8d):	
1 ^я 1 ^я 2 ^я 2 ^я Bw Bw Bw Bw AA AA Euth	
↓ ↓ ↓ ↓ d1, d2, d3, d4, d5, d6, d7, d8, d9	
Группа 3 (3 аэрозольных применения; срок существования 15d):	
1 ^я 1 ^я 2 ^я 2 ^я 3 ^я 3 ^я Bw Bw Bw Bw Bw Bw AA AA AA Euth	
↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ d1, d2, d3, d4, d5, d6, d7, d8, d9, d10, d11, d12, d13, d14, d15, d16	

Процедура эксперимента. Седация свиней осуществлялась путем их премедикации азапероном в дозе 15 мг/кг массы тела, кетаминном в дозе 15 мг/кг массы тела, атропином в дозе 0,1 мг/кг веса тела с последующей капельной внутривенной инфузией в латеральную ушную вену. По мере необходимости осуществлялось анестезирование свиней путем внутривенного введения пропофола в дозе 3-5 мг/кг веса тела. По мере надобности, анестезия поддерживалась непрерывной внутривенной инфузией 1% пропофола. Параметры вентиляции подбирались исходя их концентрации углекислого газа в выдыхаемом воз-

духе и при необходимости регулировалось. Анестезия, респираторные и сердечно-сосудистые параметры постоянно контролировались при помощи пульсоксиметрии, капнографии, ректального датчика температуры и контроля рефлекторного статуса. Животным вводили сбалансированный раствор электролитов в дозе 10 мл/кг/ч. Длительность анестезии равнялась около 80-120 мин. При изменении показателей спонтанного до соответствующего уровня, свиньи экстубировались. Свиньи умерщвлялись инъекцией ударной дозы пентобарбитала (100 мг/кг массы тела) в латеральную ушную вену, последующую седации. Легкие вырезались и разрезались на препараты образцов тканей толщиной около 1 см, которые были собраны из разных участков легких, после чего инкубировались в культуральной среде. Для измерения люциферазной активности образцы ткани инкубировались в культуральной среде, содержащей субстрат D-Люциферин и подвергались *ex vivo* BLI люциферазы.

Экспрессия люциферазы в обрабатываемых группах, определенная с помощью BLI.

В группе 0 (контрольная группа, не подвергалась обработке), люциферазная активность не обнаружена в срезах легких (фиг. 26).

В группе I (аэрозольное введение 1 мг SNIM PHK FFL и 1 мг SNIM PHK hCFTR в препарате PEI из примера 6) отчетливо детектировалась активность люциферазы во фрагментах легких один раз обработанных свиней № 3 и № 6 (фиг. 27). Экспрессия люциферазы была наивысшей в центральных частях легких.

В группе II (аэрозольное введение 2 мг SNIM PHK hCFTR в препарате PEI, из примера 6, в первый день, и 1 мг SNIM PHK FFL и 1 мг SNIM PHK hCFTR в препарате PEI, из примера 6, на 8 день), отчетливо детектировалась активность люциферазы во фрагментах легких дважды обработанных свиней № 4 и № 8 (фиг. 28). Экспрессия люциферазы была наивысшей в центральных частях легких. Стоит упомянуть, что образцы хранились дополнительные 10 ч в культуральной среде перед измерением из-за пропадания электричества в день измерений и соответствующих технических проблем с системой BLI.

В группе III (аэрозольное введение 2 мг SNIM PHK hCFTR в препарате PEI, из примера 6, в день 1 и день 8, аэрозольное введение 1 мг SNIM PHK FFL и 1 мг SNIM PHK hCFTR в препарате PEI, из примера 6, в день 15), отчетливо детектировалась активность люциферазы во фрагментах легких трижды обработанных свиней № 1 и № 2 (фиг. 29). Экспрессия люциферазы была наивысшей в центральных частях легких.

Свойства наночастиц SNIM PHK-PEI. Размеры частиц и дзета-потенциал измерялись для препаратов PEI SNIM PHK перед небулизацией (табл. X1). Наночастицы SNIM PHK-PEI могут быть воспроизводимо образованы с размером 25-37 нм и дзета-потенциалом 30-49 мВ.

Таблица X1

Измерения размера частиц и дзета-потенциала

Свинья №	Обработка №	Радиус ± С.О.(нм)	Дзета- потенциал ± С.О.(мВ)
1	1	26.7±0.3	36.9±5.9
	2	33.3±0.6	42.5±5.5
	3	31.6±0.4	41.3±3.4
2	1	24.7±0.5	32.9±3.3
	2	34.9±0.2	41.5±1.4
	3	32.5±0.4	29.1±1.1
3	1	35.2±0.8	42.9±1.9
4	1	36.9±1.1	45.4±0.6
6	1	27.5±0.1	30.5±6.6
	2	33.0±0.8	49.1±3.0
8	1	25.5±0.1	44.0±2.1
	2	33.3±0.3	45.9±9.5

Экспрессия люциферазы в обрабатываемых группах, определенная с помощью ИГХ. ИГХ FFL проводили на срезах образцов тканей легких (Sophistolab AG, Эглиссау, Швейцария), которые были BLI-положительными и сравнивались с тканями легких контрольных свиней и с люцифераза-позитивными опухолевыми тканями мыши как положительным контролем. Как и следовало ожидать, сильный сигнал был обнаружен в люцифераза-позитивных опухолевых тканях мыши, в то время как в легочной ткани контрольной свиньи не обнаружено специфичного окрашивания. Явно детектируемый паттерн окрашивания мог наблюдаться в тканях легких свиньи № 1, которая обрабатывалась трижды. Наиболее выраженной экспрессия FFL была в эпителии бронхов больших и малых дыхательных путей (фиг. 30).

Детекция белка hCFTR в тканях легких свиней, обрабатываемых при помощи ИП/ВБ. Высоко-BLI-положительная ткань трижды обработанной свиньи была поддана ИП/ВБ в соответствии с протоколом, описанным van Barneveld A et al., Cell Physiol Biochem. 30, 587-95 (2012) (фиг. 31). Зрелый сложнотриглицеридный hCFTR проявился в виде размытого так называемого С-бэнда. Обогащенный мано-

зой hCFTR формировал более плотный так называемый В-бэнд. Сильная экспрессия hCFTR была обнаружена в клетках позитивного контроля Т84 и легочных тканях свиньи № 1, обработанные SNIM РНК hCFTR в препарате PEI в примере 6. Экспрессия белка hCFTR не наблюдалась в необработанных свиньях. Сравнение с экспрессией белка hCFTR в тканях легких человека из опубликованной работы, использующей идентичный протокол (van Barneveld A et al., выше) позволяет предположить, что экспрессия hCFTR в свиных тканях легких, после их аэрозольной обработки SNIM РНК hCFTR, была близка к такой в здоровых легких человека.

Этот результат был в дальнейшем подтвержден использованием набора антител для детекции белка hCFTR с помощью ИП/ВБ в обработанных свиных легких (см. пример 6). Как положительный и отрицательный контроли рассматривались, соответственно, образец из областей легких свиньи № 1, которые экспрессировали люциферазу, и другой образец из каудальной доли свиньи № 2, где не детектировалась активность люциферазы, тем самым показывая отсутствие доставки мРНК и/или экспрессии. Белковые лизаты, приготовленные из этих образцов, иммунопреципитировались с использованием MAB25031 (R&D Systems) и белок hCFTR детектировался с использованием AB570. Как проиллюстрировано на фиг. 32, экспрессия люциферазы коррелировала с экспрессией hCFTR. Образец из левой каудальной доли свиньи № 2, где не детектировалась активность люциферазы, был также отрицательным по hCFTR (полоса 1), в то время как hCFTR детектировался в образцах из свиньи № 1, которые были положительными по люциферазе (полоса 2).

Токсикология. Предварительное оценивание образцов легких. Было проведено гистологическое оценивание образцов легких из трех животных после умерщвления. После введения в парафин, срезы образцов легких красились гематоксилином-эозином для морфологического исследования. Результаты были согласованными среди образцов из трех свиней, две из которых (свинья № 1 и свинья № 2) получали три аэрозольных введения, а третья (свинья № 7) являлась необработанным контролем, в которую не проводилось аэрозольного введения.

Токсикология: недомогание. Только свиньи № 2 и № 1 показали легкие признаки недомогания на 2-4 день после обработки. Так что, три аэрозольных обработки в течение трех недель вызвали только легкое недомогание.

Токсикология: побочные эффекты. Вид и частота побочных эффектов (ПЭ) анализировались лабораторными параметрами (кровь, MBS и БАЛ) и медицинским осмотром свиней (было вторичной целью этих исследований).

Образцы сыворотки и всей крови собирались в моменты времени, определенные протоколом исследования. Были выбраны двенадцать показательных параметров (гемоглобин, гематокрит, артериальное давление, АЛТ, АСТ, КК, билирубин, креатинин, глюкоза, калий, тромбоциты и белые клетки крови), которые являются индикаторами органо-специфичных патологий (крови, спинного мозга, печени, мышц и почек), и результаты, полученные из VetMedLab, Людвигсбург, Германия, были классифицированы в соответствии с VCOG, версия 2011.

Результаты показали, что у свиней не наблюдалось сильных ПЭ (ПЭ степеней 3, 4 или 5 квалифицируются как сильные). Ухудшения лабораторных параметров после аэрозольной обработки SNIM РНК в препарате PEI из примера 6 не было. Малые изменения в некоторых параметрах (например, КК или ферменты печени) более вероятно могли возникнуть вследствие экспериментальной процедуры как таковой (например, внутримышечных инъекций и анестезии). Также не было заметно никаких отрицательных эффектов при повторном применении - даже после третьего применения свиньи группы 3 не показывали ПЭ, выше чем ПЭ 2 степени. Даже ПЭ 1 и 2 степени были редки и не показывали корреляции с аэрозольной обработкой SNIM РНК в препарате PEI из примера 6.

Кроме повторяемых проб крови, два других параметра также рассматривались для оценки патологических процессов в легких: i) жидкость бронхоальвеолярного лаважа (BALF) - полученная после умерщвления и ii) микробиологические пробы (MBS) (мазок из трахеи, взятый во время анестезии). BALF была взята с каждой свиньи при аутопсии и хранилась при -80°C для дальнейших обследований. Трахейные мазки брались перед каждой аэрозольной обработкой и обследовались микробиологически. Эти обследования показали широкий спектр патогенов, включая *Bordetella bronchiospectica* (обычный патоген дыхательного пути свиней) и *Escherichia coli*. Свиньи были один раз обработаны внутримышечной инъекцией тулатромицина (1 мл 10% Draxxin®).

Медицинское обследование. В дополнение к лабораторным параметрам, было проведено медицинское обследование свиней в периоды наблюдения между аэрозольными обработками (подробности см. 1.1.2 в приложениях 1 и 2 протокола исследований). Так как не определено никаких систем документирования, оценок и присваивания происхождения ПЭ, для интервенций или чего-то другого, была использована система общего токсикологического критерия (СТС), установленная для собак и кошек (опубликована VCOG в 2011). Для оценки лабораторных параметров были использованы видоспецифичные ВГМ (верхняя граница нормы) и НГН (нижняя граница нормы). Клинические оценивания были сделаны по таким шести категориям ПЭ:

- (1) аллергические/иммунологические эффекты;

- (2) легочные/дыхательные;
- (3) конституционные клинические признаки;
- (4) дерматологические/кожные;
- (5) желудочно-кишечные; и
- (6) легочные/дыхательные.

Результаты показали, что у свиней не наблюдалось сильных ПЭ (не было степеней 3, 4 или 5). Ухудшения параметров, полученных при медицинском обследовании, после аэрозольной обработки SNLM РНК в препарате PEI из примера не было. Две свиньи из группы 3 показали степень ПЭ 1 и 2 по трем дыхательным параметрам (бронхоспазм/хрипы, отек гортани и диспноэ), но эти слабые или средние показатели ограничивались одним или двумя днями. Так как эти явления проявились только после первого применения анестезии/интубации/аэрозольной обработки в этих двух свиньях, но не после второго и третьего применения в этих же свиньях или любых других, то маловероятно, что эти показатели были вызваны исследуемыми веществами.

Вывод. Результаты этого примера показывают, что препарат PEI со SNLM РНК, кодирующей FFL и hCFTR, может быть успешно доставлен в легкие свиней повторяемой аэрозолизацией, при этом не теряя активности после каждого цикла обработки и не проявляя побочных эффектов. Экспрессия люциферазы была наивысшей в центральных частях легких и была еле заметна в дальних частях легких. Паттерн экспрессии коррелировал с ожидаемым паттерном расположения препарата PEI из примера 6, в соответствии с выбранными параметрами вентиляции. Иммуногистохимия выбранных образцов легких из обработанных свиней показывает экспрессию люциферазы в основном в бронхиальном эпителии больших и малых дыхательных путей. ИП/ВБ отчетливо демонстрируют проявление С-бэнда зрелого сложного гликозилированного человеческого CFTR в легких обработанных свиней, который отсутствовал в легких необработанных свиней и люциферазо-отрицательных фрагментах легких. Экспрессия hCFTR в тканях легких свиней после аэрозольной обработки SNLM РНК hCFTR была сравнима с экспрессией hCFTR в легких здорового человека, если сравнивать ее с опубликованной работой, использующей идентичный протокол детекции hCFTR. Побочные эффекты 1 и 2 степени были редки и не показывали корреляции с аэрозольной обработкой SNLM РНК в препарате PEI. Так что, экспрессия белка hCFTR была успешно показана в легких свиней, обработанных SNLM мРНК hCFTR.

Пример 9. мРНК, кодирующая CFTR, содержащая сигнальный пептид.

Этот пример демонстрирует, что белок CFTR может быть эффективно экспрессирован из мРНК, кодирующей CFTR, содержащей последовательность сигнального пептида.

Синтез информационной РНК. Для эксперимента были синтезированы, с помощью *in vitro* транскрипции из плазмидной ДНК матрицы, используя стандартные методы, SNLM РНК кодон оптимизированного трансмембранного регулятора муковисцидоза, меченого С-концевым (О-CFTR-C-His₁₀)(SEQ ID NO: 15) кодон оптимизированного человеческого CFTR, имеющего сигнальную лидирующую последовательность (GH-CO-CFTR)(SEQ ID NO: 16) и кодон оптимизированного человеческого CFTR (CO-CFTR)(SEQ ID NO: 17). Клетки и трансфекция CFTR. Человеческие эмбриональные клетки почек HEK293T были выращены в DMEM (Invitrogen Cat № 11965-092) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ L-глутамина, 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. За день до трансфекции клетки высевали в 6-луночные плашки при конфлюэнтности 50-60% и инкубировали при нормальных условиях культивирования тканей (36°C во влажной атмосфере с 5% CO₂ и 95% воздуха). При подготовке к трансфекции, 60 мкл липофектамина 2000 (Invitrogen Cat № 11668019) разбавляли в 900 мкл среды OptiMem со сниженным содержанием сыворотки (Invitrogen Cat № 31985-062) и осторожно перемешивали с помощью вортекса. Для эксперимента 4 мкг CO-CFTR, GH-CO-CFTR или CO-CFTR-C-His₁₀ SNLM РНК разбавлялись в 900 мкл среды OptiMem. К разбавленному Липофектамину® немедленно добавляли мРНК и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин. Культуральную среду аккуратно удаляли путем аспирации и заменяли на 1 мл среды OptiMem со сниженным содержанием сыворотки и 300 мкл каждого соответствующего комплекса мРНК/Lipofectamine®. Клетки инкубировали в стандартных условиях для культивирования тканей.

Вестерн-блот анализ. Через около 48 ч после трансфекции клетки были убраны из соответствующих плашек и лизированы. Лизат всей клетки был подвергнут разделению с помощью SDS-PAGE и исследован вестерн блотом. Как проиллюстрировано на фиг. 33, сильная экспрессия человеческого белка CFTR детектировалась, антителами анти-CFTR (А и В) или анти-His (С), после трансфекции мРНК О-CFTR, GH-CO-CFTR и человеческого CO-CFTR-C-His₁₀ (фиг. 33).

Пример 10. *In vivo* доставка мРНК CO-CFTR-C-His₁₀ в CFTR-нокаутных мышей.

Анализ продукции человеческого CFTR, образующегося при внутретахеальном введении наночастиц, наполненных мРНК. Все исследования проводились с использованием CFTR-нокаутных мышей. Препарат мРНК CFTR или контрольный реагент доставки вводились с использованием джет-небулайзера PARI Boy. Мыши убивались и перфузировались раствором соли после истечения заранее установленного времени на экспрессию белка из мРНК.

Синтез информационной РНК. Для эксперимента были синтезированы, с помощью *in vitro* транс-

крипции из плазмидной ДНК матрицы, SNIM РНК кодон оптимизированного трансмембранного регулятора муковисцидоза, меченого С-концевым His₁₀ и SNIM РНК кодон оптимизированной FFL.

Препарат PEI. В подходе, доставка и экспрессия мРНК CO-CFTR-C-His₁₀ в легких CFTR-нокаутных мышей осуществлялась с использованием препаратов наночастиц, как полимерных, так и липидных. Полимерные препараты наночастиц с разветвленным 25 кДа PEI готовились следующим образом. Требуемое количество SNIM РНК непосредственно перед применением было разбавлено в воде для инъекции (Braun, Melsungen) к общему объему 4 мл и быстро добавлено с использованием пипетки к 4 мл водного раствора разветвленного 25 кДа PEI при соотношении N/P 10. Раствор перемешивался с использованием пипетки десять раз и поочередно небулизировался как две отдельные фракции по 4.0 мл в легкие мышей с использованием указанного небулайзера.

Препарат сКК-Е12. Для экспериментов с участием наночастиц на основе липидов был создан липидный препарат с использованием SNIM РНК CO-CFTR-C-His₁₀, составом сКК-Е12:DOPE:холестерин:PEGDMO2K (относительные количества 50:25:20:5 (мг:мг:мг:мг)). Раствор небулизировался в легкие мыши используя указанный небулайзер.

Введение небулизацией (распылением) мРНК человеческого CO-CFTR-C-His₁₀. Тестируемые материалы CFTR вводились единичной аэрозольной ингаляцией с помощью джет-небулайзера PARI Boy (номинальный объем дозы был до 8 мл/группу), Тестируемый материал доставлялся в клетку, содержащую всю группу животных (n=4) и связанную с потоком кислорода и системой мусоросбора.

Введение мРНК человеческого CO-CFTR-C-His₁₀. мРНК CFTR готовилась способом, описанным выше. Четыре CFTR-нокаутные мыши помещались в аэрозольную камеру и подвергались воздействию в общем 2 мг немодифицированной мРНК CFTR с оптимизированными кодонами (содержащую кодирующую последовательность SEQ ID NO: 3) посредством небулизации (джет-небулайзер Pan Boy) на протяжении около одного часа. Мыши были убиты через 24 ч после обработки.

Умерщвление. Животные умерщвлялись удушением CO₂ за соответствующие периоды времени после введения дозы ($\pm 5\%$), за чем следовала торакотомия и обескровливание. Вся кровь (максимально возможный для получения объем) собиралась разрывом и отделением сердца.

Перфузия. После обескровливания все животные подвергались перфузии сердца соляным раствором. Вкратце, внутрикардиальная перфузия всего тела производилась введением в просвет левого желудочка иглы 23/21 размера, присоединенной к шприцу объемом 10 мл, содержащему раствор соли. Правое предсердие рассекалось для предоставления дренажного стока для перфузии. На поршень применялось мягкое и устойчивое давление для перфузирования животного после размещения иглы в сердце. Адекватный поток промывочного раствора достигался в случае, если вытекающий поток перфузата был чистым (не было видимой крови), что означало, что промывочный раствор наполнил тело и процедура завершена.

Сбор тканей. После перфузии у всех животных были собраны печень и легкие (правое и левое). Оба (левое и правое) легких были раздроблены в жидком азоте и хранились при номинальной температуре -70°C .

Экспрессия человеческого CFTR из мРНК CO-CFTR-C-His₁₀ в CFTR-нокаутных мышцах. Экспрессия CFTR была детектирована вестерн блот анализом лизата тканей, собранных из мышечных легких, обработанных мРНК CFTR. "С"-бэнд, соответствующий зрелому белку, был детектирован в левом и правом легких во всех обработанных мышцах, как для препаратов, основанных на липидах, так и для препаратов, основанных на полимерах (фиг. 34). Появление "С"-бэнда было подтверждено сравнением с лизатом, собранным из клеток НЕК293Т, положительных по человеческому CO-CFTR-C-His₁₀, как описано в примере 9. В отличие от этого, в лизатах из необработанных мышей дикого типа не наблюдалось видимого сигнала (фиг. 34). В целом, эти данные позволяют предположить, что как полимерный, так и липидный препараты (такие как препарат сКК-Е12, приведенный выше) являются эффективными для доставки мРНК CFTR в легкие, например, путем ингаляции, и при доставке кодон оптимизированная мРНК CFTR может эффективно экспрессировать человеческий белок CFTR.

Пример 11. In vivo изучение эскалации доз.

Эскалация дозы аэрозольной доставки мРНК, инкапсулированной в PEI, в легкие свиней. Аэрозольное введение в легкие свиней комбинации SNTM РНК люциферазы светяка (FFL) кодон оптимизированной SNIM РНК CFTR (CO-CFTR) при различных концентрациях было проведено с помощью последовательной процедуры эксперимента. На первой стадии препараты SNIM РНК FFL/CO-CFTR были небулизированы в анестезированных свиней при контролируемой вентиляции. На второй стадии, свиньи умерщвлялись инъекцией ударной дозы пентобарбитала (100 мг/кг массы тела) и хлорида калия в латеральную ушную вену после седации, через 24 ч после завершения аэрозольного введения. Легкие вырезались и разрезались на фрагменты тканей толщиной около 1 см. Для измерения активности люциферазы фрагменты тканей инкубировали в омывающей среде, содержащей субстрат D-люциферин и проводили ex vivo BLI люциферазы. После BLI, образцы из люциферазо-положительных и люциферазо-отрицательных участков были взяты на гистопатологию, иммуногистохимию и гибридизацию in situ. Оставшиеся фрагменты были резко заморожены в жидком азоте после чего хранились при -80°C до анализов ИП/ВБ и

Elisa.

Синтез информационной РНК. В примере были синтезированы, с помощью *in vitro* транскрипции из плазмидной ДНК матрицы с использованием стандартных методов, SNLM РНК кодон оптимизированного трансмембранного регулятора муковисцидоза (CO-CFTR) и SNLM РНК кодон оптимизированной FFL.

Дизайн эксперимента. Свиньи породы немецкий ландрас были получены в Техническом университете Мюнхена, Вайенштефан, Германия. Вес свиней составлял от 35 до 90 кг. Исследования были организованы с использованием свиней, соответствующих как по возрасту, так и по весу, для контроля изменчивости. Единственная группа из 6 свиней (3 самца и 3 самки) была установлена для 4-направленного изучения. Первая группа обрабатывалась только водой для инъекций (WFI), которая вводилась с использованием меш-небулайзера Aeroneb. Вторая группа обрабатывалась раствором 1 мг SNLM РНК FFL и 1 мг SNLM РНК кодон оптимизированного человеческого CFTR (CO-CFTR) в препарате PEL, описанном ниже, с использованием меш-небулайзера Aeroneb. Третья группа получала 1 мг SNLM РНК FFL и 5 мг SNLM РНК кодон оптимизированного человеческого CFTR (CO-CFTR) в препарате PEL, описанном ниже. Четвертая группа обрабатывалась 1 мг SNLM РНК FFL и 10 мг SNLM РНК кодон оптимизированного человеческого CFTR (CO-CFTR) в препарате PEL, описанном ниже. Схема обработки и оценивания каждой группы показана ниже в табл. 4.

Таблица 4
Дизайн эксперимента для изучения эскалации доз

Группа	Свиньи (№ и пол)	Обработка	Препарат
1	6 (3 самца + 3 самки)	N/A	WFI
2	6 (3 самца + 3 самки)	1 мг FFL + 1 мг CO-CFTR	Разветленный 25 кДа PEI + WFI
3	6 (3 самца + 3 самки)	1 мг FFL + 5 мг CO-CFTR	Разветленный 25 кДа PEI + WFI
4	6 (3 самца + 3 самки)	1 мг FFL + 10 мг CO-CFTR	Разветленный 25 кДа PEI + WFI

Препарат мРНК-PEL. Пример стандартизированной процедуры создания препарата, описанный ниже, проводился непосредственно перед обработкой животных.

Материалы.

Насос шприцевой (оборудывание для смешивания):

Производитель: KD Scientific
Тип: KDS-210-CE

Шприц:

Производитель: B. Braun
Тип: Omnifix, 20 мл или 30 мл / Luer Lock Solo
Ссылка: 4617207V

Трубки:

Производитель: B. Braun
Тип: Safeflow Extension Set
Ссылка: 4097154

Шприц:

Производитель: B. Braun
Тип: Sterican, 20G x 1 1/2 ′
Ссылка: 4657519

Смесительный клапан:

Производитель: B. Braun
Тип: Discifix C 3SC
Ссылка: 16494C

Вода для инъекций:

Производитель: B. Braun
Тип: Вода
Ссылка: 82423E

Пример метода для подготовки полиплексов, содержащих 1 мг SNIM РНК.

hCFTR и 1 мг SNIM РНК FFL с N/P 10 в объеме 8 мл: 3 мл воды для инъекций и 3 мл стокового раствора РНК (с: 1 мг/мл в воде; 1.5 мл мРНК FFL+1.5 мл мРНК CFTR) наполнялись в 15 мл пробирки falcon. Во второй пробирке falcon были смешаны 5.61 мл воды для инъекций с 0.39 мл стокового раствора разветвленного PEI (с: 10 мг/мл в воде). Два шприца на 20 мл были установлены в устройстве для перемешивания. Каждый из них был связан с иглой через трубку. Один шприц был наполнен раствором РНК, а другой раствором PEI, используя функцию отвода поршня шприца. (Установки: диаметр: 20.1 мм, по-

ток: 5 мл/мин, объем: 5.9 мл). Иглы изымались и трубки подключались к смесительному клапану. Было важно соединить содержащий раствор РНК шприц с наклонной позицией клапана. Была подсоединена игла для контроля диаметра выходного отверстия. Перемешивание было проведено с использованием функции вливания поршня шприца (Установки: диаметр: 20.1 мм, поток: 40 мл/мин, объем: 5.8 мл). Для достижения воспроизводимого индекса полидисперсности образцы фракционировались в основном во время перемешивания. Первые несколько мкл перед тем, как поток становился стабильным (100-200 мкл), и последние несколько мкл, содержали пузырьки воздуха и собирались в отдельную пробирку. Раствор инкубировался 30 мин при комнатной температуре для образования полиплекса и после этого хранился на льду. Для разных доз параметры были изменены и адаптированы, как показано в табл. 5.

Таблица 5

Примеры объемов и установок для разных объемов смеси

Группа	Компонент мРНК			Компонент PEI		
	V (SNIM РНК RNA FFL 1 мг/мл) (мл)	V (SNIM РНК RNA hCFTR 1 мг/мл) (мл)	Вода (мл)	V (сток bgPEI; 10 мг/мл) (мл)	Вода (мл)	Распыленный объем (мл)
2	1.5	1.5	3	0,39	5.61	8
3	1.17	5.83	7	0,91	13.09	24
4	1.09	10.91	12	1,56	22.44	44

Группа	V(отвода)(мл)	V(вливания)(мл)
2	5,9	5,8
3	13,9	13,8
4	23,9	23,8

V (отвода) и V (вливания) обозначают настройку насосного шприца для удаления и отправки, соответственно, компонентов мРНК и PEI.

Трансфекция клеток НЕК для проверки функциональности небулизированных комплексов. После небулизации была использована аликвота комплексов (80 мкл) для трансфекции клеток НЕК. За день до трансфекции 1×10^6 были посажены на 6-луночные плашки. В день трансфекции среда была удалена из клеток, клетки промывались один раз PBS, после чего в каждую лунку было добавлено 80 мкл комплексов вместе с 920 мкл бессывороточной среды MEM. Три повтора были приготовлены для каждого комплекса. Клетки инкубировали с комплексами в стандартных условиях для культивирования клеток в течение 4 ч. В конце инкубации среда, содержащая комплекс, удалялась и добавлялся 1 мл MEM среды, содержащей сыворотку, на лунку. Плашки инкубировали в стандартных условиях для культивирования клеток. Через 24 ч после трансфекции готовились белковые лизаты, используя те же протоколы и буферы, использованные для тканей животных, кроме стадии гомогенизации. Клетки из трех лунок были использованы для анализа. Экспрессия человеческого CFTR детектировалась с использованием иммунопреципитации с антителом R24.1 (R&D Systems) и вестерн блотом в комбинации с антителами 217, 432 и 596 (все получены из Cystic Fibrosis Consortium, Университет Пенсильвании, PA, США). hCFTR может быть детектирован для всех комплексов, небулизированных свиным (см. рисунки 54-57).

Аэрозольное применение. Аэрозоль (44 мл WFI; препарат PEI с модифицированной мРНК в WFI: 8, 24 и 44 мл) небулизировался и вдыхался анестезированной свиньей через меш-небулизатор Aegoneb®. Седация свиней осуществлялась путем их премедикации азапероном в дозе 2 мг/кг массы тела, кетамин в дозе 15 мг/кг массы тела, атропином в дозе 0,1 мг/кг веса тела с последующей капельной внутривенной инфузией в латеральную ушную вену. По мере необходимости осуществлялось анестезирование свиней путем внутривенного введения пропофола в дозе 3-5 мг/кг веса тела. Анестезия поддерживалась изофураном (2-3%) и введением ударной дозы 1% пропофола в дозе от 4 до 8 мг/кг массы тела для усиления анестезии в случае необходимости. Длительность анестезии равнялась примерно 1-3 ч. Свины были убиты инъекцией ударной дозы пентобарбитала (100 мг/кг массы тела) и хлорида калия в латеральную ушную вену через 24 ч после завершения распыления. Легкие вырезались и собирались фрагменты тканей из разных участков легких. Полученные образцы были использованы для разных методов оценивания, таких как биолюминисценция, гистопатология, ИП/вестерн блот и Elisa.

Анализ биолюминисценции. Для измерения активности люциферазы образцы ткани либо гомогенизировались и анализировались при помощи трубчатого фотометра, или же инкубировались в среде, содержащей субстрат D-люциферин и подвергались люциферазной BLI ex vivo. Данные показывают сильный сигнал биолюминисценции, который наблюдался для каждой группы 2-4 (1 мг, 5, мг и 10 мг, соответственно), если сравнивать с контрольными образцами тканей легких из группы 1 (WFI контроль реагента доставки) (фиг. 35-38).

Анализ экспрессии CFTR вестерн блотом и иммуногистохимией. FFL-положительные образцы тканей вырезались (минимум 10 образцов для каждой свиньи внутри группы) и анализировались иммунопреципитацией/вестерн блотом (ИП-ВБ). Вкратце, белковые лизаты из легких свиней готовились следующим образом: Для анализа было использовано 300-400 мг тканей легких. Ткань гомогенизировалась в щелочном буфере (20мМ Tris, 150 мМ NaCl, pH 8,0), содержащем ингибиторы протеазы с использованием LysingMatrixA (MPBiomedicals, Ref:6910-500) и Homogeniser "FastPrep24" (MP Biomedicals). Полная смесь переносилась в новый 2 мл охлажденный закрывающийся эппендорф и добавлялись 25 мкл йод-

ацетамида (Sigma: I6125) и мкл Omni cleave (1:5 разведенный в буфере Omni cleave) (Epicenter: OC7810K). После этого образцы инкубировались 5 минут на льду, после чего добавлялось 26 мкл 10% раствора SDS. Далее образцы инкубировались 60 минут при 4°C на шейкере. После инкубации в образцы добавлялось 260 мкл лизисного буфера (850 мкл щелочного буфера +10% TritonX-100+5% дезоксихолата натрия) и они инкубировались при 4°C на шейкере 90 мин. В конце белковые лизаты центрифугировались при 13000 об/мин при 4°C в течение 10-20 мин и супернатант переносился в новый эппендорф. Концентрация белка измерялась с использованием BCA Protein Assay (Pierce). Образцы были разделены на аликвоты, содержащие 10 мг общего белка и конечный объем был доведен щелочным буфером до 1 мл на образец. Основываясь на данных, представленных на фигуре 6, иммунопреципитация CFTR была проведена с использованием антитела R24.1, затем следовал вестерн-блот иммунодетекция CFTR, с использованием тройной комбинации из трех разных антител, полученных из Cystic Fibrosis Consortium, Университет Пенсильвании, PA, США (антитела 217, 432, 596). Для контроля внутригрупповой вариативности среди разных животных и вариативности экспрессии CFTR были установлены маркерные бэнды стандартного белкового размера в 150 кДа и интенсивности бэндов разных групп нормализовались к этим маркерам. Как проиллюстрировано на фиг. 39, только 16% проанализированного образца тканей из контрольной свиньи из группы 1 показало экспрессию CFTR, выше чем базовая. В отличие от этого, в группах 3 и 4, которые представляют группы, обрабатываемые 5 и 10 мг, соответственно, больше 30% образцов тканей легких показывали экспрессию CFTR, выше чем базовая (Figure 39). Более того, наблюдаемое повышение экспрессии CFTR в группах 3 и 4 было почти в два раза больше, чем в контроле.

Иммуногистохимический анализ CFTR проводился подсчетом CFTR-положительных бронхов и бронхиол. Бронхи и бронхиолы считались положительными, если по меньшей мере одна эпителиальная клетка в слое эпителиальных клеток показывала заметный мембрано-локализованный сигнал CFTR. Характерное изображение "положительного" образца приведено на фиг. 40. Условия иммуногистохимии CFTR были оптимизированы путем оценки специфичности доступных антител к CFTR, используя отдельные антитела или комбинации до трех антител. Явные CFTR-специфичные сигналы наблюдались после инкубации с антителом 596. Данные показывают, что CFTR-положительные эпителиальные клетки детектировались в срезах тканей легких во всех четырех группах, что демонстрирует детекцию человеческого и свиного CFTR с помощью процедуры иммуногистохимии (фиг. 41 и 45). В то время, как наблюдаемые уровни экспрессии CFTR в группе 3 были низкими (фиг. 42), средними (фиг. 43) и высокими (фиг. 44), общие данные показывают, что обработка 5 мг кодон оптимизированного человеческого SNIM РНК CFTR приводила к большим количествам CFTR-положительных клеток и большей суммарной интенсивности, по сравнению с контролем доставки. Данные также демонстрирует дальнейшее повышение экспрессии CFTR после обработки 10 мин, тем самым показывая явный дозозависимый эффект (фигура 45). Вычисление абсолютного и относительного количества CFTR-положительных бронхов/ бронхиол еще больше подтверждает эти результаты, показывая значительно более высокие значения у животных, обработанных 5 или 10 мг человеческого SNIM РНК CFTR по сравнению с контролем доставки (фигура 46). Указывание общего оценивания уровней экспрессии CFTR следовало за обработкой человеческим CFTR SNIM РНК.

Анализ экспрессии CFTR с помощью гибридизации *in situ* (ISH). FFL-положительные образцы тканей вырезались (минимум 10 образцов для каждой свиньи внутри группы) и анализировались гибридизацией *in situ* с использованием зондовой технологии RNAscope® (Advanced Cell Diagnostic) "ZZ". Пробы создавались на основе кодон оптимизированной последовательности кодон оптимизированного человеческого CFTR SNIM РНК (SEQ ID NO: 17). Коротко говоря, метод RNAscope® - это анализ гибридизации *in situ*, созданный для визуализирования отдельных молекул РНК на клетку в фиксированных в формалине, введенных в парафин (FFPE) тканях, помещенных на пластинки. Каждый включенный образец ткани был прежде обработан, в соответствии с протоколом изготовителей, и инкубирован с РНК зондом, специфичным к мишени в человеческом CFTR. Было показано, что зонд к hCFTR связывается с CFTR, перекрестно реагируя с человеческим, мышинным, крысиным, свиным и обезьяньим белками. При связывании зонд гибридизируется к каскаду молекул, амплифицирующих сигнал, через ряд из 6 последовательных раундов амплификации. Потом образец обрабатывался HRP-меченым зондом, специфичным к кассете, амплифицирующей сигнал, и анализировался цветной визуализацией с использованием 3,3'-диаминобензидина (DAB). Как положительный контроль использовался зонд, специфичный к убиквитину-С (фиг. 47А и 48А), в то время как отрицательным контролем был *gapB* (фиг. 47В и 48В). Положительный сигнал CFTR был сравним с необработанными и обработанными контролем доставки свиными тканями легких (фиг. 49 А и В). Окрашенные образцы визуализировались стандартным световым микроскопом. Данные демонстрирует, что обработка 1 мг кодон оптимизированной SNIM РНК CFTR приводила к значительному повышению экспрессии CFTR в тканях правого (А) и левого (В) легких в группе 2, при сравнении с контролем доставки (фиг. 49, 50 А и В). Более того, наблюдалось дальнейшее повышение экспрессии CFTR для групп, обработанных 5 и 10 мг, что показано сильным повышением окрашивания, наблюдаемым в образцах правого и левого легких в проанализированных группах 3 и 4 (фиг. 51 и 52).

А и В). В целом, эти данные твердо подтверждают эффективную доставку мРНК путем ингаляции и экспрессию человеческого CFTR в обоих долях легких и их различных тканях.

Заключение. Этот пример показал, что мРНК как люциферазы, так и CFTR могут быть эффективно доставлены *in vivo* в ткани легких. Экспрессия люциферазы наблюдалась в образцах разных тканей, собранных из разных участков из правой и левой долей легких. Это предполагает, что небулизация является эффективным подходом для введения мРНК и проявляет довольно равномерное распределение. Более того, в дополнение к люциферазе, мРНК CFTR была также эффективно доставлена в легкие, что привело к повышению экспрессии этого белка. Экспрессия и активность белка были подтверждены ИП-ВБ, иммуногистохимией и гибридизацией *in situ*. Каждый подход отчетливо демонстрировал дозозависимое повышение в доставке мРНК и экспрессии и/или активности в тканях легких. В целом, эксперименты освещают общую практическую и целесообразность доставки мРНК CFTR в легкие людей и показывают эффективность *in vivo* продукции CFTR для терапевтических целей.

Пример 12. *In vivo* экспрессия в легких.

Этот пример показывает успешную экспрессию *in vivo* в легких после доставки наночастиц, несущих мРНК. Все исследования проводились с использованием свиней породы немецкий ландрас, полученных в Техническом Университете Мюнхена, Вайенштефан, Германия. Масса свиней составляла от 35 до 90 кг. Препарат мРНК FFL/CO-CFTR-C-His10 или контрольный реагент доставки вводился с использованием джет-небулайзера Rap. Мыши убивались и перфузировались раствором соли после истечения заранее установленного времени на экспрессию белка из мРНК.

Синтез информационной РНК. В примере были синтезированы, с помощью *in vitro* транскрипции из плазмидной ДНК матрицы, SNIM РНК кодон оптимизированной люциферазы светлячка (CO-FFL).

Препарат сКК-E12. Для экспериментов с участием наночастиц, на основе липидов, был создан липидный препарат с использованием 1 мг FFL+SNIM РНК CO-CFTR-C-His10, составом сКК-E12:DOPE:холестерин:PEGDMO2K (относительные количества 40:30:25:5 (мг:мг:мг:мг)). Раствор небулизировался в легкие свиньи с помощью указанного небулайзера.

Аэрозольное применение. Аэрозоль (препарат раствора соли или CO-FFL сКК-E12) небулизировался и вдыхался анестезированными свиньями. Седация свиней осуществлялась путем их премедикации азапероном в дозе 2 мг/кг массы тела, кетамин в дозе 15 мг/кг массы тела, атропином в дозе 0,1 мг/кг веса тела с последующей капельной внутривенной инфузией в латеральную ушную вену. По мере необходимости осуществлялось анестезирование свиней путем внутривенного введения пропофола в дозе 3-5 мг/кг веса тела. Анестезия поддерживалась изофураном (2-3%) и введением ударной дозы 1% пропофола в дозе от 4 до 8 мг/кг массы тела для усиления анестезии в случае необходимости. Длительность анестезии равнялась примерно 1-3 ч. Свиньи были убиты инъекцией ударной дозы пентобарбитала (100 мг/кг массы тела) и хлорида калия в латеральную ушную вену. Легкие вырезались и собирались фрагменты тканей из разных участков легких, с последующей инкубацией в культуральной среде в течение ночи. Полученные образцы были использованы для детекции биолюминисценции.

Анализ биолюминисценции. Для измерения активности люциферазы образцы ткани либо гомогенизировались и анализировались при помощи трубчатого фотометра, или же инкубировались в среде, содержащей субстрат D-люциферин и подвергались люциферазной BLI *ex vivo*. Наблюдался сильный сигнал биолюминисценции для каждой свиньи, обработанной мРНК FFL/CO-CFTR-C-His10 (А) если сравнивать с контрольными (В) образцами тканей легких из контрольных свиней (контроль соляного реагента доставки) (фиг. 53 А и В).

Эти данные показывают, что мРНК FFL/CFTR была успешно доставлена в легкие аэрозольным введением и экспрессировалась там.

Краткое описание последовательностей

- SEQ ID NO 1. Аминокислотная последовательность CFTR дикого типа.
- SEQ ID NO 2. Кодированная последовательность мРНК CFTR дикого типа.
- SEQ ID NO 3. Кодированная последовательность мРНК CFTR не природного происхождения № 1.
- SEQ ID NO 4. мРНК CFTR 5'-UTR.
- SEQ ID NO 5. мРНК CFTR 5'-UTR № 1.
- SEQ ID NO 6. FFL 5' UTR.
- SEQ ID NO 7. Кодированная последовательность FFL.
- SEQ ID NO 8. FFL 3' UTR.
- SEQ ID NO 9. Кодированная последовательность мРНК CFTR не природного происхождения № 2.
- SEQ ID NO 10. Кодированная последовательность мРНК CFTR не природного происхождения № 3.
- SEQ ID NO 11. Кодированная последовательность мРНК CFTR не природного происхождения № 4.
- SEQ ID NO 12. Кодированная последовательность мРНК CFTR не природного происхождения № 5.
- SEQ ID NO 13. Кодированная последовательность мРНК CFTR не природного происхождения № 6.
- SEQ ID NO 14. Кодированная последовательность мРНК CFTR не природного происхождения № 7.
- SEQ ID NO 15. Кодированная последовательность мРНК кодон оптимизированного человеческого CFTR, слитого с С-концевым His₁₀.
- SEQ ID NO 16. Кодированная последовательность мРНК кодон оптимизированного человеческого

CFTR с лидирующей последовательностью гормона роста.

SEQ ID NO 17. Кодон оптимизированная мПНК человеческого CFTR.

SEQ ID NO 18. Лидирующая последовательность мПНК № 1.

SEQ ID NO 19. Лидирующая последовательность мПНК № 2.

SEQ ID NO 20. мПНК CFTR 5'-UTR № 2.

SEQ ID NO:1

MQRSPLEKASVVSCLFFSWTRPILRKGYRQRELSDIYQIPSV
 SADNLSEKLEREWDRRELASKKNPKLINALRRCCFFWRFMFYGFYLYLGEVTKAVQPLLL
 GRIIASYDPDNKEERSIAIYLGIGLCLLFIVRTLLLHPAIFGLHHIGMQMRIA MFSLI
 YKKTLLKSSRVLDKISIGQLVSLLSNNLNKFDDEGLALAHFVWIAPLQVALLMGLIWEL
 LQASAFCLGLFIVLALFQAGLGRMMMKYRDQRAGKISERLVTSEMIENIQSVKAYC
 WEEAMEKMIENLRQTELKLRKAAVRYFNSSAFFSFGFFVFLSVLPYALIKGILR
 KIFTTISFCIVLRMAVTRQFPWAVQVWYDSLGAINKIQDFLQKQYKTYLNTTTTEV
 VMENVTAFWEEGFGEKFEKAKQNNNNRKTSGDDSLFFSNFSLGTPVLKDNFKIER
 GQLLAVAGSTGAGKTSLLMVIMGELEPSEGKIKHSGRISFCSQFSWIMPGTIKENIIF
 GVSYDEYRYSVIKACQLEEDISKFAEKDNIVLGEQGITLGGQRARISLARAVYKDA
 DLYLLDSPFGYLDVLTKEKIFESCCKLMANKTRILVTSKMEHLKADKILILHEGSS
 YFYGTSEQLNLPDFSSKLMGCDSFDQFSAERRNSILTETLHRFSLEGDAPVSWTET
 KKQSFKQTGEFGEKRNKNSILNPINSIRKFSIVQKTPLMNGIEEDSDEPLERRLSLVP
 DSEQGEAILPRISVISTGPTLQARRRQSVLNLMTHSVNGQNIHRKTTASTRKYSLAP
 QANLTEDIYSRRLSQETGLEISEEINEEDLKECFDDMESIPAVTTWNTYLYRITVH
 KSLIFVLIWCLVIFLAEVAASLVVLLGNTPQDKGNSTHSRNNYSYAVIITSTSSYY
 VFYIYVGVADTLLAMGFFRGLPLVHTLITVSKILHHKMLHSLVQAPMSTLNTLKAGGI
 LNRFKDIAILDDLLPLTIFDFIQLLLIVIGAIIVAVLQPYIFVATVPVIVAFIMLR
 AYFLQTSQQLKQLESEGRSPIFTHLVTSKGLWTLRAFGRPYFETLFHKALNLHTAN
 WFLYLSLTLRWFQMRIEMIFVIFIAVTFISILTTEGEGEGRVGIILTLAMNIMSTLQWA
 VNSSIDVDSLMSVSRVFKFIDMPTEGKPTKSTKPYKNGQLSKVMIENSHVKKDDIW
 PSGGQMTVKDLTAKYTEGGNAILENISFISPGQRVGLLGRGTGSGKSTLLSAFLRLN
 TEGEIQIDGVSWDSITLQQWRKAFGVIPQKVIFSGTFRKNLDPYEQWSDQEIWKVAD
 EVGLRSVIEQFPGKLDVFLVDGGCVLSHGKQLMCLARSVLSKAKILLDEPSAHLDP
 VTYQIIRRTLKQAFADCTVILCEHRIEAMLECQFLVIEENKVRQYDSIQKLLNERSL
 FRQAISPSDRVKLFPHRNSSCKSKPQIAALKEETEEVQDTRL (SEQ ID NO:1)

SEQ ID NO: 2

AUGCAGAGGUCGCCUCUGGAAAAGGCCAGCGUUGUCUCCAAACUUUUUUUCAGCUGGAC
 CAGACCAUUUUUGAGGAAAGGAUACAGACAGCGCCUGGAAUUGUCAGACAUUACCAAA
 UCCUUCUGUUGAUUCUGCUGACAAUCUAUCUGAAAAAUUGGAAAGAGAAUGGGAUAGA

GAGCUGGCUCAAAGAAAAUCCUAAACUCAUUAUAGCCCUUCGCGAUGUUUUUCUG
 GAGAUUUUAGUUCUAUGGAAUCUUUUUAUUAUUUAGGGGAAGUCACCAAAGCAGUACAGC
 CUCUCUUGAGGGAAGAAUCAUAGCUCCUUAUGACCCGGAUACAAGGAGGAACGCUCU
 AUCGCGAUUUUAUCUAGGCAUAGGCUUAUGCCUUCUCUUUAUUUGAGGACACUGCCU
 ACACCCAGCCAUUUUUGGCCUUAUCACAUUGGAAUGCAGAUAGAGAAUAGCUAUGUUUA
 GUUUGAUUUUAAGAAGACUUUAAGCUGUCAAGCCGUGUUCUAGAUAUUUAAGUAU
 GGACAACUUGUAGUCUCCUUAACAACCCUGAACAAUUUGAUGAAGGACUUGCAU
 GGCACAUUUCGUGUGGAUCGCUCUUGCAAGUGGCACUCCUCAUGGGGCUAAUCUGGG
 AGUUGUACAGGCGUCUGCCUUCUGUGGACUUGGUUUCUGAUAGUCCUUGCCUUUUU
 CAGGCUGGGCUAGGGAGAAUGAUGAUGAAGUACAGAGAUACAGAGCUGGGAAAGUCAG
 UGAAAGACUUGUGAUUACCUCAGAAUGAUUGAAAAUUAUCCAAUCUGUUAAGGCAUACU
 GCUGGGAAGAAGCAAUGGAAAAAUGAUUGAAAAUUUAGACAAACAGAACUGAAACUG
 ACUCGGAAGGCAGCCUUAUGUGAGAUACUUAUAGCUCAGCCUUCUUCUUCAGGGU
 CUUUGUGGUGUUUUUUCUGUGCUUCCCUAUGCACUAAUCAAAGGAAUCAUCCUCCGGA
 AAUUAUUCACCACCAUCUCAUUCUGCAUUGUUCUGCGCAUGGCGGUCACUCGGCAAUUUC
 CCUGGGCUGUACAAACAUGGUAUGACUCUCUUGGAGCAAUAAAACAAAAUACAGGAUUUC
 UUAACAAAAGCAAGAAUUAAGACAUUGGAAUUAACUUAACGACUACAGAAUGAGUGAU
 GGAGAAUGUAACAGCCUUCUGGGAGGAGGGAAUUUGGGGAAUUUUUGAGAAAGCAAAC
 AAAACAAUACAAGAAAAACUUCUAAUGGUGAUGACAGCCUUCUUCAGUAAUUUC
 UCACUUCUUGGUACUCUUCUGAAAGAUUUUUUUCAAAGAUAGAAAGAGGACAGUU
 GUUUGGCGUUGCUGGAUCCACUGGAGCAGGCAAGACUUCACUUCUAAUGAUGAUUUGG
 GAGAAUGGAGCCUUCAGAGGGUAAAAUUUAAAGCACAGUGGAAGAAUUUCAUUCUUCU
 CAGUUUUCCUGGAUUUUGCCUGGCACCAUUAAAAGAAAAUUAUCUUCUUGGUGUUCCUA
 UGAUGAAUUAAGAUACAGAAGCGUCAUCAAGCAUGCCAACUAGAAGAGGACAUCCCA
 AGUUUGCAGAGAAAGACAUAUAGUUCUUGGAGAAGGUGGAAUCACACUGAGUGGAGGU
 CAACGAGCAAGAAUUUCUUUAGCAAGAGCAGUAUACAAAGAUUGCUGAUUUUGAUUUUAU
 AGACUCUCUUUUUGGAUACCUAGAUGUUUUAAACAGAAAAAGAAUUAUUUGAAAGCUGUG
 UCUGUAAACUGAUGGCUAACAAAACUAGGAUUUUGGUCACUUCUAAAAUGGAACAUUA
 AAGAAAGCUGACAAAAUUAUUUUUUGAAUGAAGGUAGCAGCUAUUUUUUUGGGACAUU
 UUCAGAACUCCAAAUCUACAGCCAGACUUUAGCUCAAAACUCAUGGGAUGUGAUUCU
 UCGACCAUUUAGUGCAGAAAGAAAAUUCUAAUCCUAAACUGAGACCUUACACCGUUC
 UCAUUAGAAGGAGAUUGCUCUCCUGGACAGAAAACAAAAAAACAUCUUUUUAAACA
 GACUGGAGAGUUUGGGGAAAAAAGGAAGAAUUCUUAUUCUCAAUCCAAUCAACUCUAUAC
 GAAAAUUUCCAUUGUGCAAAGACUCCUUAACAAUGAAUGGCAUCGAAGAGGGAUUCU
 GAUGAGCCUUUAGAGAGAAGGCUGUCCUUAAGUACCAGAUUCUGAGCAGGGAGAGGCGAU
 ACUGCCUCGCAUCAGCGUGAUCAGCACUGGCCCCACGCUUCAGGCACGAAGGAGGCAGUC
 UGUCCUGAACCGAUGACACACUCAGUUAACCAAGGUCAGAACAUUCACCGAAAGACAAC
 AGCAUCCACACGAAAAGUGUCACUGGCCCCUCAGGCAAACUUGACUGAACUGGAUUAU
 AUUCAAGAAGGUUAUCUCAAGAAACUGGCUUGGAAUUAAGUGAAGAAUUAACGAAGAA
 GACUUAAGGAGUGCCUUUUUGAUGAUUUGGAGAGCAUACCAGCAGUGACUACAUGGAA
 CACAUACCUUCGAUUAUUACUGUCCACAAGAGCUUAAUUUUUUGUGCUAAUUUGGUGCU
 UAGUAAUUUUUCUGGCAGAGGUGGCUGCUUCUUGGUUGUGCUGUGGCUCUUGGAAAC
 ACUCCUCUUAAGACAAAAGGAAUAGUACUCAUAGUAGAAAUAACAGCUAUGCAGUGAU
 UAUCACCAGCACCAGUUCGUAUUUUGUGUUUUAUUAUUACGUGGGAGUAGCCGACACU
 UGCUUGCUAUGGGAUUCUUCAGAGGUCUACCACUGGUGCAUACUCUAAUCACAGUGUCG
 AAAAAUUUACACCACAAAAGUUACAUCUGUUCUUAAGCACCUAUGUCAACCCUCAAC
 ACGUUGAAAGCAGGUGGGAUUCUUAUAGAUUCUCCAAAGAUUAGCAAUUUUGGAUGA
 CCUUCUGCCUCUUAACAUUUUGACUUAUCCAGUUGUUAUUAAUUGUGAUUGGAGCUA
 UAGCAGUUGUCGAGUUUUAACCCUACAUCUUUGUUGCAACAGUGCCAGUGAUAGUG
 GCUUUUAUUAGUUGAGAGCAUUAUUCCUCCAAACCUACACAGCAACUCAACAACUGGA
 AUCUGAAGGCAGGAGUCCAAUUUUCACUCAUCUUGUUAACAAGCUUAAAAGGACUAUGGA
 CACUUCGUGCCUUCGACGGCAGCCUUAUCUUUGAAACUCUGUUCACAAAGCUCUGAAU
 UACAUACUGCCAAUCUGGUUCUUGUACCGUCAACACUGCGUGGUUCCAAUUGAGAAU
 GAAUGAUUUUUGUCAUCUUCUUAUUGCUGUUAACCUUCAUUUCCAUUUUAACAACAGG

AGAAGGAGAAGGAAGAGUUGGUUUUUAUCCUGACUUUAGCCAUGAAUUAUCAUGAGUACAU
 UGCAGUGGGCUGUAAAACUCCAGCAUAGAUGGGAUAGCUUGAUGCGAUCUGUGAGCCGA
 GUCUUUAAGUUCAUUGACAUGCCAACAGAAAGGUAACCUACCAAGUCAACCAAACCAUA
 CAAGAAUGGCCAACUCUCGAAAGUUUAUGAUUUAUGAGAAUUCACACGUGAAGAAAGAUG
 ACAUCUGGGCCUCAGGGGGCCAAAUGACUGUCAAAAGAUCUCACAGCAAAAUAACACAGAA
 GGUGGAAAUGCCAUUUUAGAGAACAUUUCCUUCUCAAUAAAGUCCUGGCCAGAGGGUGGG
 CCUCUUGGGAAGAACUGGAUCAGGGAAGAGUACUUUGUUUAUCAGCUUUUUUGAGACUAC
 UGAACACUGAAGGAGAAAUCCAGAUCGAUGGUGUCUUGGGAUUCAAUAAUUUGCAA
 CAGUGGAGGAAAAGCCUUUGGAGUGAUACCACAGAAAGUAUUUUAUUUUUUCUGGAACAUU
 UAGAAAAAACUUGGAUCCCUAUGAACAGUGGAGUGAUCAAAGAAAUAUGGAAAAGUUGCAG
 AUGAGGUUGGGCUCAGAUUCUGUGAUAGAACAGUUUCCUGGGAAGCUUGACUUUGUCCUU
 GUGGAUGGGGGCUGUGUCCUAAAGCCAUGGCCACAAGCAGUUGAUGUGCUUUGGCUAGAUC
 UGUUCUCAGUAAAGCGAAGAUCUUGCUGCUUGAUGAACCCAGUGCUCAUUUUGGAUCCAG
 UAACAUACCAAUAAUUAGAAGAACUCUAAAAACAAGCAUUUGCUGAUUGCACAGUAAUU
 CUCUGUGAACACAGGAUAGAAGCAAUGCUGGAAUGCCAACAAUUUUUGGCUAUGAAGA
 GAACAAAGUGCGGCAGUACGAUUCCAUCCAGAAACUGCUGAACGAGAGGAGCCUCUCC
 GGCAAGCCAUCAGCCCCUCCGACAGGGUGAAGCUCUUUCCCCACCGGAACUCAAGCAAGU
 GCAAGUCUAAGCCCCAGAUUGCUGCUGAAAGAGGAGACAGAAGAAGAGGUGCAAGAU
 ACAAGGCCUUUAG (SEQ ID NO:2)

SEQ ID NO:3

AUGCAGCGUCCCCGUCGAAAAGGCCAGUGUCGUGUCCAAACUCUUCUUCUCAUGGACU
 CGGCCUAUCCUUAGAAAAGGGGUAUCGGCAGAGGCUUGAGUUGUCUGACAUCUACCAGAU
 CCCUCGCUAGAUUCGGCGGAUAACCUUCUCGGAGAAGCUCGAACGGGAAUGGGACCGCGA
 ACUCGCGUCUAAAGAAAAACCCGAAGCUCAUCAACGCACUGAGAAGGUGCUUCUUCUGGGC
 GUUCAUGUUCUACGGUAUCUUCUUGUAUCUCGGGGAGGUCACAAAAGCAGUCCAACCCC
 UGUUGUUGGGUCGCAUUUUCGCCUCGUAACGACCCCGAUAAACAAGAAGAACGGAGCAUC
 GCGAUCAACCUCGGGAUCGGACUGUGUUUGCUUUUCAUCGUCAGAACACUUUUUGUUGCA
 UCCAGCAAUCUUCGGCCUCCAUCACAUCGGUAUGCAGAUUGCAGAACGCUAUGUUUAGCUU
 GAUCUACAAAAAGACACUGAAAACUCUCGUCGCGGGUGUUGGAUAAAGAUUUUCAUCGGUC
 AGUUGGUGUCCUGCUUAGUAAUAAACCUCAACAAAUUCGAUGAGGGACUGGGCGUGGCA
 CAUUUCGUGGGAUUGCCCCGUGUUGCAAGUCGCCUUUUGAUGGGCCUUAAUUUGGGAGCU
 GUUGCAGGCAUCUGCCUUUUGUGGCCUGGGAUUUCUGAUUGUGUUGGCAUUGUUUCAGG
 CUGGGCUUGGGCGGAUGAUGAUGAAGUAUCGCGACCAGAGAGCGGGUAAAAUCUCGGAA
 AGACUCGUAUCACUUCGGAAAUGAUCGAAAAACAUCAGUCGGUCAAGCCUAAUUGCUG
 GGAAGAAGCUAUGGAGAAGAUGAUUGAAAACCUCCGCAACUCAGCUGAAACUGACCC
 GCAAGGCGGCUAUGUCCGGUAUUUCAAUUCGUCAGCGUUCUUCUUUCCGGGUUCUUC
 GUUGUCUUUCUCUCGGUUUUGCCUUAUGCCUUGAUUAAAGGGGAUUUUCUCCGCAAGAU
 UUUCACCAGAUUCGUCUCGCAUUGUAUUGCGCAUUGGAGUGACACGGCAUUUCCGU
 GGGCCGUGCAGACAUGGUAUGACUCGCUUGGAGCGAUCAACAAAAUCCAAGACUUCUUG
 CAAAAGCAAGAGUACAAGACCCUGGAGUACAUCUUACUACUACGGAGGUAGUAAUGGA
 GAAUGUGACGGCUUUUUGGGAAGAGGGUUUUGGAGAACUGUUUGAGAAAAGCAAAGCAGA
 AUAACAACAACCGCAAGACCUCAAAUGGGGACGAUUCUUGUUUUUCUGAACUUCUCC
 UGCUCGGAACACCCGUGUUGAAGGACAUCAAUUUCAAGAUUGAGAGGGGACAGCUUCUC
 GCGUAGCGGGAAGCACUGGUGCGGGAACAAUAGCCUCUUGAUGGUGAUUUAUGGGGA
 GCUUGAGCCAGCGAGGGGAAGAUUAAACACUCCGGGCGUAUCUCAUUCUGUAGCCAGU
 UUUCAUGGAUCAUGCCGGAACCAUUAAAAGAGAACAUCUUUUCGGAGUAUCCUAUGAU
 GAGUACCGAUACAGAUCCGUAUUAAGGCGUGCCAGUUGGAAGAGGACAUUUCUAAGUU
 CGCCGAGAAGGAUAAACUUGUCUUGGGAGAAAGGGGUUUACAUCUUGUCGGGAGGGCAGC
 GAGCGCGAUACGCCUCGCGAGAGCGGUUAUACAAGAUGCAGAUUUGUAUCUGCUUGAU
 UCACCGUUUGGAUACCUCCGACGUAUUGACAGAAAAAGAAUUCUUCGAGUCGUCGUGUG
 UAAACUUUUGGCUAAUAAAGACGAGAAUCCUGGUGACAUCAAAAAUGGAACACCUUAAAG
 AGGCGACAAGAUCUGAUCCUCCACGAAGGAUCGUCCUACUUUUACGGCACUUUCUCAG

AGUUGCAAACUUGCAGCCGGACUUCUCAAGCAAACUCAUGGGGUGUGACUCAUUCGCAC
CAGUUCAGCGCGGAACGGCGGAACUCGAUCUUGACGGAAACGCUGCACCGAUUCUCGCUU
GAGGGUGAUGCCCCGGUUAUCGUGGACCGAGACAAAGAAGCAGUCGUUUAAGCAGACAGG
AGAAUUUGGUGAGAAAAGAAAAGAACAGUAUCUUGAAUCCUUAUUAACUCAAUUCGCAGG
UCUCAUUCGUCCAGAAAACUCCACUGCAGAUGAAUGGAAUUGAAGAGGAUUCGGACGAA
CCCCUGGAGCGCAGGCUUAGCCUCUGCCGGAUUCAGAGCAAGGGGAGGCCAUUCUUC
CGGAUUUCGGUGAUUUCAACCGGACCUACACUUCAGGCGAGGGCGAAGGCAAUCCGUGCUC
AACCUCAUGACGCAUUCGGUAAAACCGGGGCAAAAACAUUCACCGCAAAAACGACGGCCUCA
ACGAGAAAAGUGUCACUUGCACCCCAGGCGAAUUUGACUGAACAUCGACAUCUACAGCCGU
AGGCUUUCGCAAGAAACCGGACUUGAGAUACGCGAAGAAAUCAUUGAAGAAGAUUUGAA
AGAGUGUUUCUUGAUGACAUGGAAUCAAUCCAGCGGUGACAACGUGGAACACAUAUCU
UGCGUUAUCAUCAGGUGCACAAGUCCUUGAUUUUCGUCCUCAUCUGGUGUCUCGUGAUC
UUUCUCGUGAGGUCGACGCGUACUUGUGGUCUCUGGCUGCUUGGUAUACGCCCUUG
CAAGACAAAGGCAUUCUACACACUCAAGAAAACAAUUCUUAUGCCGUGAUUAUCACUUC
UACAAGCUCGUUUACGUGUUUACAUUCACGUAGGAGUGGCCGACACUCUGCUCGCGA
UGGGUUUCUUCGAGGACUCCACUCGUUCACACGCUUAUCACUGUCUCCAAGAUUCUCC
ACCAUAGAUGCUUCAUAGCGUACUGCAGGCUCCAUUGUCCACCUUGAAUACGCUCAAGG
CGGGAGGUAUUUUGAAUCGCUUCUCAAAGAAUUAUGCAAUUUUGGAUGACCUUCUGCCC
CUGACGAUCUUCGACUUAUCCAGUUGUUGCUGAUCGUGAUUGGGGCUAUUGCAGUAGU
CGCUGUCCUCCAGCCUUAUUAUUUGUCGCGACCGUUCGUGAUCGUGGCGUUUAUCAU
GCUGCGGGCCUUAUUUCUUGCAGACGUCACAGCAGCUUAAGCAACUGGAGUCUGAAGGGA
GGUCGCCUUAUCUUACGCAUCUUGUGACCAGUUUGAAGGGAUUGUGGACGUUUGCGCGC
UUUGGCAGGCAGCCUACUUGAAACACUGUCCACAAAAGCGCUGAAUCUCCAUAACGGCA
AAUUGGUUUUUGAUUUUGAGUACCCUCCGAUGGUUUCAGAUUCGCAUUGAGAUGAUUU
UGUGAUCUUCUUUAUCGCGGUGACUUUAUCUCCAUCUUGACCACGGGAGAGGGCGAGG
GACGGGUCGGUAUUUAUCUGACACUCGCCAUGAACAUUAUGAGCACUUUGCAGUGGGCA
GUGAACAGCUCGAUUGAUGUGGAUAGCCUGAUGAGGUCGCUUUCGAGGGUCUUUAAGU
CAUCGACAUCCGACGGAGGGAAAAGCCACAAAAAGUACGAAACCUAUAAGAAUGGGC
AAUUGAGUAAGGUAUGAUCAUUCGAGAACAGUCACGUGAAGAAGGAUGACAUCUGGCCU
AGCGGGGUCAGAUAGCCGUGAAGGACUGACGGCAAAAUAACCCGAGGGAGGGAAACGC
AAUCCUUGAAAACAUUCUUCGUAUCAGCAUUAAGCCCGGUCAGCGUGUGGGGUUCUCGGGA
GGACCGGUCAGGAAAUCGACGUGUCGCGCCUUCUUGAGACUUCUGAAUACAGAG
GGUGAGAUCCAGAUUCGACGGCGUUUCGUGGGAUAGCAUACCUUGCAGCAGUGGGCGAA
AGCGUUUGGAGUAAUCCCCAAAAGGUCUUUAUCUUUAGCGGAACCUUCCGAAAGAAUC
UCGAUCCUUAUGAACAGUGGUCAGAUCAAGAGAUUUGGAAAAGUCGCGGACGAGGUUGGC
CUUCGGAGUGUAUCGAGCAGUUUCCGGGAAAACUCGACUUCUUGUCCUUGUAGAUGGGG
AUGCGUCCUGUCGAUUGGCGACAAGCAGCUCAUGUGCCUGGCGCGAUCCGUCCUCUCAA
AGCGAAAACUUCUUCUUGGAUGAACCUUCGGCCAUUCUGGACCCGGUAACGUAUCAGA
UCAUCAGAAGGACACUUAAGCAGGCGUUUGCCGACUGCACGGUGAUUCUCUGUGAGCAU
CGUAUCGAGGCCAUGCUCGAAUUCGACGAAUUUCUUGUCAUCGAAGAGAAUAAAGGUCCG
CCAGUACGACUCCAUCCAGAAGCUGCUUAAUGAGAGAUCAUUGUUCGGCAGGCGAUUU
CACCAUCCGAUAGGGUGAAACUUUUCCACACAGAAAUCGUCGAAGUGCAAGUCCAAA
CCGCAUUCGCGCCUUGAAAGAAGAGACUGAAGAAGAAGUUAAGACACGCGUCUUUA
A (SEQ ID NO:3)

SEQ ID NO: 4
GGACAGAUCCGUGGAGACGCCAUCCACGCUGUUUGACCUCUAGAAGACACCGGGAC
CGAUCCAGCCUCCGCGGCCGGGAACGGUGCAUUGGAACGCGGAUUCGCCGUGCCAAGAGU
GACUACCCGUCCUUGACACG (SEQ ID NO:4)

SEQ ID NO: 5

CGGGUGGCAUCCUGUGACCCUCCAGUGCCUCUCCUGGCCUGGAAGUUGCCACUCC
AGUGCCACCAGCCUUGUCCUAAUAAAAUUAAGUUGCAUC (SEQ ID NO:5)

SEQ ID NO: 6
GGGAUCCUACC (SEQ ID NO:6)

SEQ ID NO: 7
AUGGAAGAUGCCAAAAACAUAAGAAGGGCCAGCGCCAUUCUACCCACUCGAAGACGG
GACCGCCGGCAGCAGCUGCACAAGCCAUGAAGCGCUACGCCUGGUGCCCGGCACCAU
CGCCUUUACCGACGCACAUUCGAGGUGGACAUUACCUACGCCGAGUACUUCGAGAUAG
CGUUCGGCUGGCAGAAAGCUAUGAAGCGCUAUGGGCUGAAUACAAACCAUCGGAUCGUGG
UGUGCAGCGAGAAUAGCUUGCAGUUCUUAUGCCCGUGUUGGGUGCCCUUUAUCGGU
GUGGCUGUGGCCCCAGCUAACGACAUCUACAACGAGCGCGAGCUGCUGAACAGCAUGGGC
AUCAGCCAGCCACCGUCUAUUCGUGAGCAAGAAAGGGCUGCAAAAGAUCUCAACGUG
CAAAAGAAGCUACCGAUCAUACAAAAGAUCAUCAUGGAUAGCAAGACCGACUACCA
GGGCUUCCAAAGCAUGUACACCUUCGUGACUUCUCCAUUUGCCACCCGGCUUCAACGAGUA
CGACUUCGUGCCCGAGAGCUUCGACCGGGACAAAACCAUCGCCUGAUCAUGAACAGUAG
UGGACAGUACCGGAUUGCCCAAGGGCGUAGCCCUACCGCACCGCACCGCUUGUGCCGAU
CAGUCAUGCCCGCAGCCCAUCUUCGGCAACCAGAUCAUCCCCGACACCGCUAUCCUCAG
CGUGGUGCCAUUUCACCACGGCUUCGGCAUGUUCACCAAGCUGGGCUACUUGAUUCGCGG
CUUUCGGGUCGUGCUAUGUACCGCUUCGAGGAGGAGCUAUUCUUGCGCAGCUUGCAAG
ACUAUAAGAUCAAUCUGCCUGCUGGUGCCACACUUAUUAGCUUCUUCGCUAAGAGCA
CUCUCAUCGACAAGUACGACCUAAGCAACUUGCACGAGAUCCGACGCGGGCGGGCGCCG
UCAGCAAGGAGGUAGGUGAGGCGGUGGCAAACGCUUCCACCUACCAGGCAUCCGCCAGG
GCUACGGCCUGACAGAAAACAACAGCGCCAUUCUGAUCACCCCGAAGGGGACGACAAGC
CUGGCGCAGUAGGCAAGGUGGUGCCCUUCUUCGAGGCUAAGGUGGUGGACUUGGACACC
GGUAAAGACACUGGGUGUGAACAGCGCGGCGAGCUGUGCGUCCGUGGCCCAUGAUCAU
GAGCGGCUACGUUAAACAACCCCGAGGCUACAAACGCUUCAUCGACAAGGACGGCUGGCU
GCACAGCGGGCAGAUUCGCUACUGGGACGAGGACGAGCACUUCUUAUCGUGGACCGGCU
GAAGAGCCUGAUCAAAUACAAGGGCUACCAGGUAGCCCCAGCCGAACUGGAGAGCAUCCU
GCUGCAACACCCCAACUUCGACCGGGGUCGCGGCCUGCCGACGACGAUGCCGG
CGAGCUGCCCGCCGAGUCGUCGUGGAAACCGGUAAAACCAUGACCGAGAAAGGAGAU
CGUGGACUUAUGUGGCCAGCCAGGUUACAACCGCCAAGAAGCUGCGCGGUGGUGUUGUGU
UCGUGGACGAGGUGCCUAAAGGACUGACCGGCAAGUUGGACGCCCCGAAGAUCCGCGAG
AUUCUCAUUAAGGCCAAGAAGGGCGGCAAGAUCGCCGUGUA (SEQ ID NO:7)

SEQ ID NO: 8
UUUGAAUU (SEQ ID NO:8)

SEQ ID NO: 9
AUGCAGAGAAGCCCCUGGAAAAGGCCAGCGUGGUGUCCAAGCUGUUCUUCAGCUGGACC
AGACCCAUCCUGAGAAAAGGGCUACAGACAGAGACUGGAACUGAGCGACAUCUACCAGAU
CCCCAGCGUGGACAGCGCCGACAACCUAGCGGAGAAGCUGGAAAGAGAGUGGGACAGAG
AGCUGGCUAGCAAGAAGAACCCCAAGCUGAUCAACGCCUGAGGCGGUGCUUCUUCUGGC
GGUUUAUGUUCUACGGCAUCUUCUGUACCUUGGGCGAAGUGACAAAGGCCGUGCAGCCCC
UGCUCUGGGCAGAAUCAUUGCCAGCUACGACCCGACAACAAAGAGGAAAAGAUUCAUCG
CCAUCUACCUUGGCAUCGGCCUGUGCCUGCUUUAUCGUGCGGACACUGCUGCUGCACC
CCGCCAUUCUGGCCUGCACCACAUCGGCAUGCAGAUAGAAUCGCCAUGUUCAGCCUGA
UCUACAAGAAAACCCUGAAGCUGAGCAGCAGGGGUGCUGGACAAGAUCAGCAUCGGACAG
CUGGUGUCCUGGAGCAACAACCUGAACAAGUUCGACGAGGGACUGGCCUUGGCUCAC

UUCGUGUGGAUCGCUCCACUGCAGGUCGCCCUGCUGAUGGGCCUGAUCUGGGAGCUGCUG
 CAGGCCAGCGCUUUUCUGCGGCCUGGGCUUUUCUGAUUGUGCUGGCCCUUUUCAGGCUGGC
 CUGGGCAGGAUGAUGAUGAAGUACAGGGACCAGAGAGCCGGCAAGAUACAGCGAGAGACU
 GGUCAUCACCGAGAUAGAUUCGAGAACAUCAGAGCGUGAAGGCCUACUGCUGGGGAAG
 AGGCCAUGGAAAAGAUAGAUCAAAAACUGAGACAGACCGAGCUGAAGCUGACCAGAAAAG
 GCCGCCUACGUGCGGUACUUAACAGCAGCGCCUUCUUCUUCUCCGGCUUCUUCGUGGUG
 UCCUGUCCGUGCUGCCCUACGCCUGAUAAGGGCAUCAUCCUGAGGAAAGAUUCUACCC
 ACCAUUUUCUUCGCAUCGUGCUGAGAAUGGCCGUGACCAGACAGUUCUCCUGGGCCGUG
 CAGACUUGGUACGACAGCCUGGGCGCCAUAACAAGAUCCAGGACUUCUCCUGCAGAAGCAG
 GAGUACAAGACCCUCGAGUACAACCUGACCACCACCGAGGUGGUCAUGGAAAACGUGACC
 GCCUUCUGGGAGGAAGGCUUCGCGCAGCUGUUCGAGAAGGCCAAGCAGAACAACAACAA
 CAGAAAAGACCAGCAACGGCGACGACUCCUGUUCUUCUCCAACUUCUCCUGCUGGGCAC
 CCCCUGUGCAAGGACAUAACUUAAGAUUCGAGAGAGGCCAGCUGCUCGCGGCGCCG
 CUCUACAGGGCUGGCAAGACCUCUCUGCUGAUGGUCAUCAUGGGCGAGCUGGAAACCCAG
 CGAGGGCAAGAUCAAGCACAGCGGCAGAAUCAGCUUCUGCAGCCAGUUCAGCUGGAUCA
 UGCCGGCACCAUCAAAAGAGAACAUAUCUUCGGCGUGUCCUACGACGAGUACAGAUACA
 GAAGCGUGAUAAGGCCUGCCAGCUGGAAGAGGACAUCAGCAAGUUCGCCGAGAAGGAC
 AACAUCCGUGCUGGGCGAGGGCGGCAUCACCCUGUCUGGGCGCCAGAGAGCCAGAAUCAGC
 CUGGCCAGAGCCGUGUACAAGGACGCCGACCUGUACCUGCUGGACAGCCCUUCGGCUAC
 CUGGACGUGCUGACCGAGAAAGAGAUUCGAGAGCUGCGUGUGCAAGCUGAUGGCCAA
 CAAGACCAGAAUCCUGGUCACCAGCAAGAUGGAACACCUGAAGAAGGCCGACAAGAUCCU
 GAUCCUGCAGGAGGGCAGCAGCUACUUCUACGGCACAUUCAGCGAGCUGCAGAACCUGCA
 GCCCGACUUCAGCAGCAAACUGAUGGGCUGCGACAGCUUCGACCAUUCAGCGCCGAGAG
 AAGAAACAGCAUCCUGACCGAGACACUGCACAGAUUCAGCCUGGAAGGCCGACGCCCCGU
 GUCUUGGACCGAGACAAAGAAGCAGAGCUUCAAGCAGACCCGGCGAGUUCGGCGAGAAGA
 GAAAGAUCUCCAUCUGAACCCCAUAACAGCAUCCGGAAGUUCAGCAUCGUGCAGAAAA
 CCCCCUGCAGAUAAACGGCAUCGAAGAGGACAGCGACGAGCCUUGGAAAGACGGCUAC
 GCCUGGUGCCUGACAGCGAGCAGGGCGAGGCCAUCCUGCCUAGAAUCAGCGUGAUCAGCA
 CCGGCCACCCUGCAGGCUAGAAGGCCGAGAGCGUGCUGAACCUGAUGACCCACAGCG
 UGAACCAGGGCCAGAAAUCCACCAGCAAGACCACCGCCAGCACCAGAAAGGUGUCCUGG
 CUCCUCAGGCCAACCCUGACCGAGCUGGACAUCUACAGCAGAAGGCUGAGCCAGGAAACCG
 GCCUGGAAAUACGCGAGGAAAUCAACGAAGAGGACCUGAAAGAGUGCUUCUUCGACGAC
 AUGGAAUCCAUCUCCCGCCGUGACCACCUGGAACACCUACCUGCGGUACAUCACCGUGCAC
 AAGAGCCUGAUCUUCGUGCUGAUCUGGUGCCUGGUCAUCUUCUCCUGGCCGAGGUGGCCCGC
 AGCCUGGUGGUGCUGUGGCCUCCUGGGAAACACCCUCUGCAGGACAAGGGCAACAGCACC
 CACAGCAGAAACAACAGCUACGCCGUGAUAUCACCUCCACCAGCUCUACUACGUGUUC
 UACAUUCUACGUGGGCGUGGCCGACACCCUGCUGGCUAUGGGCUUCUUCAGAGGCCUGCCC
 CUGGUGCACACCCUGAUAACCGUGUCCAAGAUCUCCGACCAUAAGAUGCUGCACAGCGUG
 CUGCAGGCUCCAUAGACACCUGAACACACUGAAGGCUGGCCGCAUCCUGAACAGGUUC
 AGCAAGGAUAUCGCCAUCCUGGACGACCUGCUGCCUCUGACCAUCUUCGACUUCAUCCAG
 CUGCUGCUGAUCGUGAUCGGCGCUAUCGCCGUGGUGGCCGUGCUGCAGCCUACAUCUUC
 GUGGCCACCGUGCCCUGAUCGUGGCCUUCAUUAUGCUGAGAGCCUACUUCUGCAGACC
 AGCCAGCAGCUGAAGCAGCUGGAAAGCGAGGGCAGAAGCCCCAUUCUACCCACCUCUGUG
 ACCAGCCUGAAGGGCCUGUGGACCCUGAGAGCCUUCGGCAGACAGCCUACUUCGAGACA
 CUGUCCACAAGGCCUGAACCCUGCACACCGCCAACUGGUUUCUGUACCUGUCCACCCUG
 AGAUGGUUCCAGAUAGAGGAUCGAGAUGAUCUUCGUCAUCUUCUUAUCGCCCUGACCUU
 CAUCUCUAUCCUGACCACCGGCGAGGGCGAGGGAAGAGUGGGAAUCAUCCUGACCUCGGC
 CAUGAACAUCAUGAGCACACUGCAGUGGGCCGUGAACAGCAGCAUCGACGUGGACAGCCU
 GAUGAGAAGCGUGUCCAGAGUGUUAAGUUAUCGACAUGCCUACCGAGGGCAAGCCCA
 CCAAGAGCACCAAGCCUACAAGAACGGCCAGCUGAGCAAAGUGAUGAUAUCGAGAACA
 GCCACGUCAAGAAGGACGACAUCUGGCCAGCGGCGGACAGAUGACCUGAAGGACCUGA
 CCGCCAAGUACACAGAGGGCGGCAACGCUAUCCUGGAAAACAUCAGCUUCAGCAUCAGCC
 CAGGCCAGAGAGUGGGCCUGCUGGGGAGAACAGGCAGCGGCAAGUCUACCCUGCUGUCCG
 CUUCCUGAGACUGCUGAACACCGAGGGCGAGAUCGAGUCCAGUCCGUGUCCUGGGACU

CCAUCACCCUGCAGCAGUGGGCGCAAGGCCUUCGGCGUGAUCCCCAGAAGGUGUUCAUCU
 UCAGCGGCACCUUCAGAAAAGAACCCUGGACCCCUACGAGCAGUGGUCGACCAGGAAAUCU
 GGAAGGUCGCGGAUGAAGUGGGCCUGAGAUCGUGAUCGAGCAGUUCGCCGCAAGCUG
 GACUUCGUGCUGGUGGACGGCGGUGCUGAGCCACGGCCACAAGCAGCUGAUGUG
 UCUGGCCCGCUCGUGCUGAGCAAGGCCUAAGAUUCUGCUGCUGGACGAGCCUAGCGCCCA
 CCUGGACCCUGUGACCUACCAGAUAUCAGAAGGACCCUGAAGCAGGCCUUCGCCGACUG
 CACCGUGAUCCUGUGCGAGCACAGAAUCGAGGCCAUGCUGGAAUGCCAGCAGUUCUGGU
 CAUCGAAGAGAACAAAGUGCGGCAGUACGACAGCAUCCAGAAGCUGCUGAACGAGAGAA
 GCCUGUUCAGACAGGCCAUCAGCCCCAGCGACAGAGUGAAGCUGUUCCCCCACCGCAACA
 GCAGCAAGUGCAAGAGCAAGCCCCAGAUCGCCGCCUGAAAAGAAGAGACUGAGGAAGAG
 GUGCAGGACACCAGACUGUGA (SEQ ID NO:9)

SEQ ID NO:10

AUGCAGCGUCCCCGCUCGAAAAGGCCAGUGUCGUGUCCAAACUCUUCUCAUGGACU
 CGGCCUAUCCUUAGAAAAGGGUUAUCGGCAGAGGCUUGAGUUGUCUGACAUCUACCAGAU
 CCCUCGCUAGAUUCGGCGGAUAACCUCUCGGAGAAGCUCGAACGGGAAUGGGACCGCGA
 ACUCGCGUCUAAGAAAAACCCGAAGCUCAUCAACGCACUGAGAAGGUGCUUCUUCUGGCG
 GUUCAUGUUCUACGGUAUCUUCUUGUAUCUCGGGGAGGUCACAAAAGCAGUCCAACCCC
 UGUUGUUGGGUCGAUUAUCGCCUCGUACGACCCCGAUACAAAGAAGAACGGAGCAUC
 GCGAUCUACCUCGGGAUCGGACUGUGUUUGCUUUUCAUCGUCAGAACACUUUUGUUGCA
 UCCAGCAAUCUUCGGCCUCCAUCACAUCGGUAUGCAGAUUGCAGAAUCGCUAUGUUUAGCUU
 GAUCUACAAAAAGACACUGAAAACUCUCGUCGCGGGUGUUGGAUAAGAUUUCCAUCGGUC
 AGUUGGUGUCCUGCUUAGUAAUAACCUCAACAAAUUCGAUGAGGGACUGGCGCUGGCA
 CAUUCGUGUGGAUUGCCCCGUGCAAGUCGCACUGCUUAUGGGACUGAUUUGGGAACU
 GUUGCAGGCCAGCGCCUUUGCGGCCUGGGAUUUCUAUUGGUCUUGCACUUUCCAAGC
 AGGGCUCGGCAGAAUGAUGAUGAAGUACAGGGACCAGAGAGCCGAAAGAUCUCAGAAC
 GGCUCGUGAUUACUUCAGAAAUGAUCGAGAACAUAUCAUCGGUGAAAGCGUACUGCUGG
 GAAGAGGCGAUGGAAAAGAUGAUCGAAAACCUAGACAGACCCGAGUUGAAGCUGACCCG
 GAAGGCCGCGUACGUCAGAUACUUAACAGCAGCGCUUUCUUCUUCGCGGCUUCUUCGU
 CGUGUUCUGUCGGUGCUGCCGUUAGCCCUCAUUAAGGGAAUUAUCUUGCGGAAGAUCU
 UACUACUAUCUCAUUUUGCAUCGUCUUCGGAUUGCGGUCACUCGGCAGUUCGCCGUGGG
 CCGUGCAGACCUGGUACGACAGCCUCGGGGCCAUCAACAAGAUCCAAGACUUUCUCCAAA
 AGCAAGAGUACAAAACCCUCGAAUACAACCUCACCACUACUGAAGUGGUCUUGGAAAAC
 GUGACCGCCUUUUGGGAAGAAAGGCUUCGGGAGAACUGUUCGAGAAGGCGAAGCAAAACAA
 CAAUAAUCGCAAGACUAGCAACGGGGAUGACUCACUGUUCUUCAGCAAUUUCUCACUGC
 UCGGCACCCCGGUGCUUAAGGACAUCAACUUAAGAUUGAACGCGGACAGCUCUUGGCGG
 UGGCCGGAUCCACCGGAGCAGGAAAGACUAGCCUGCUGAUGGUGAUCAUGGGUGAGCUG
 GAACCGUCCGAAGGCAAAAUCAAGCACUCCGGCAGAAUCAGCUUCUGCUCGAGUUUUCG
 UGGAUCAUGCCAGGAACCAUCAAGAGAAUCAUCUUCUUGGAGUCUCAUACGAUGAGUA
 CCGCUACAGAAGCGUGAUUAAGGCCUGCCAGCUUGAAGAGGACAUCCAAAGUUCGCGG
 AAAAGGACAACAUCGUGCUGGGUGAGGGAGGGAUACAGUUGUCGGGCGGUCAGAGAGCC
 CGCAUUUCGUGGCACGGGUGUGUACAAGGAUGCGGAUCUUUACCUUCUGGACUCGCCA
 UUCGGUUACCUAGCUGCUGACCGAAAAAGAAAUCUUCGAGAGCUGCGUGUGUAAGCU
 GAUGGCUAAUAAAGACUAGAAUCCUCGUGACGUCCAAAUGGAACAUCUUAAGAAGGCGG
 AUAAGAUUCUCAUUCUUCACGAGGGGUCGAGCUACUUCUACGGGACUUUUAAGCAGCUG
 CAGAAUUUGCAGCCGGACUUCAGCUCAAAGCUCAUGGGCUGCGACUCGUUCGAUCAGUUC
 AGCGCCGAACGGCGCAAUUCGAUCUUGACGGAAACCCUGCACAGAUUCUCGUGGAGGGA
 GAUGCACCUUGUCUGUGGACCGAAACCAAGAAGCAGUCCUUAAGCAGACGGGAGAGUU
 CGGAGAAAAGCGGAAGAACUCAAUCCUCAACCCAUAACUCCAUCGCAAAUUCUCAAU
 CGUGCAGAAAACUCCACUGCAGAUAGAACGGUAUCGAAGAGGAUUCGGACGAGCCAUUG
 AGCGGAGACUGUCGUGGUGCAGAUUCAGAACAGGGGGAGGCAAUCCUGCCGCGCAUU
 UCCGUGAUCAGCACUGGGCCGACCCUCCAAGCUAGACGCAGGCAAUCAGUGCUGAAUCUC
 AUGACCCACUCCGUCAACCAGGGACAGAAUAUCCACCGCAAGACCACCGCUGCAGUAGA

AAGGUGUCAUUGGCACCGCAAGCAAAUUUGACUGAACUUGACAUCUACUCACGGCGCCUC
 UCCCAAGAAACCGGAUUGGAAAUCUCCGAAGAGAUUAACGAAGAAGAUUUGAAAGAGUG
 UUUCGCGGACUGCCCCUGGUCCACACUCUCAUCACGGUGAGCAAGAUCUCAUAAG
 ACAUCACCGUGCACAAGAGCCUGAUCUUCGUCCUCAUCUGGUGCCUGGUGAUCUUUCUG
 CCGAAGUCGCCGCUUCGUGGUCGUGCUGGUGGUCUCGGUAAUACCCCGCUCCAAGACA
 AAGGCAAUCCACUCACUCGCGCAACAACAGCUACGUCUGAUUAUCACGUAACCCUCGU
 CGUACUAUGUGUUCUACAUCUACGUGGGAGUCGCGGACACUCUGCUCGCUAUGGGCUUC
 UUUCGCGGACUGCCCCUGGUCCACACUCUCAUCACGGUGAGCAAGAUCUCAUAAG
 AUGCUCCAUUCGUGCUGCAGGCCCGAUGAGCACUCUCAACACUCUGAAGGGGGUGGA
 AUCUUGAACAGAUUUUCCAAAGACAUCGCGAUUCUGGACGAUCUGCUCCACUCACUAUC
 UUCGACUUCAUCCAACUGCUGCUGAUCGUAUCGGAGCUAUCGCCGUGGUGGUCUGCCUC
 CAGCCGUAUAUCUUCGUGGCCACUGUGCCGGUGAUUGUCGUUUCAUCAUGUUGCGCGCG
 UACUUCUUGCAAACCCUCGAGCAACUCAAGCAACUGGAGUCCGAGGGCCGGAGCCCAAUC
 UUUACCAUCUGGUGACUUCACUGAAAGGUCUGUGGACCCUCCGCGCCUUUGGUCGCCAG
 CCUUCUUCGAAACUCUCUUUCACAAAGCACUGAAUCUCCACACUGCAAACUGGUUCUUG
 UACCUGUCCACCCUGCGGUGGUUCCAAUUGCGGAUCGAGAUGAUUCUUGUCAUCUUCUUC
 AUCGCGGUGACUUUUUUCUCCAUCUCCACCCGCGAGGGAGAGGGGAGAGUGGGAAU
 CAUCCUGACGUCGGCGAUGAAUAUCAUGUCCACUUUGCAGUGGGCCGUAUUCGAGCA
 UCGACGUGGAUUCGUGAUGCGCAGCGUGUCGCGCGUGUUCAGUUCUUCGUAUUGCCC
 ACCGAAGGUAAAACCCACCAAGAGCACGAAGCCUUAACAAGAACGGGCAGCUCUCAAAGGUG
 AUGAUUAUCGAGAACUCCAUUGUGAAGAAGGACGACAUCUGGCCAUCCGGAGGACAGAU
 GACCGUGAAGGACCCUGACCCGCAAUAACACGGAGGGCGGAAUUGCAAUCCGAAACA
 UCUCGUUCUCAUCUGCCUGGCCAAAGGGUGGGACUUUUGGGACGCACUGGAUCCGGAA
 AGAGCACCCUGCUUAGCGCCUUCUUGAGGCUCUUGAACACCGAGGGCGAAAUCAGAUUG
 AUGGCGUGUCGUGGGAUUCGAUCACCCUGCAGCAGUGGAGAAAGGCCUUCGGGGUGAUC
 CCGCAAAAAGUGUUCUUCUCCGGAACGUUUCGGA AAAACCUUGACCAUACGAACAA
 UGGUCGGAUCAAGAGAUUUGGAAGGUCGCGGACGAAGUGGGGUCGCGUCCGUGAUCGA
 GCAGUUUCGGGAAAACUGGACUUCGUCUUGGUCGACGGCGGAUGCGUCCUGUCCACGG
 ACAUAAGCAGCUGAUGUGCCUGGCCGACGCGUCCUUUCAAAGCUAAGAUCUGCUGCU
 GGAUGAACCUUCAGCACACCUCGACCCGGUCACCUACCAGAUCAUCAGACGGACCCUGAA
 ACAGGCCUUUGCGGAUUGUACUGUGAUCUUGUGUGAACCCGCAUUGAAGCCAUGCUGG
 AGUGCCAGCAGUUCUGGUAUCGAAGAGAACAAGUGCGGCAGUACGAUUCUCAA
 AAACUGCUCAAUGAGCGGUCCCUGUUCAGACAGGCAAUUAGCCCCGAGCGACAGGGUCA
 AUUGUUCCCCCAUAGAAAUCGUCGAAAUGUAAAGUCAAAAGCCUCAGAUUCGCGCACUGA
 AAGAAGAAACUGAAGAAGAGGUGCAAGACACCAGACUGUGA (SEQ ID NO:10)

SEQ ID NO:11

AUGCAGAGAAGCCCACUGGAAAAGGGCUGCGGUGUGUCAAAAGCUGUUCUUAGCUGGAC
 CAGACCUAUCUUGCGGAAGGGGAUACCCGCAACGCCUGGAGCUGUCGGACAUCUACCAGAU
 UCCGUCAGUGGAUUCAGCAGACAAUCUCUCCGAAAAGCUGGAACGCGAAUGGGACAGAG
 AGUUGGCGUCAAAAGAAGAACCACAAAGUUGAUCAAUGCCUGCGCCGUCGUUCUUCUGGC
 GGUUCAUGUUCUACGGAAUCUUCUGUACCUCCGGCGAAGUCACCAAGGCUGUGCAACCGC
 UUCUGCUGGGACGCAUCAUCGCCUCAUACGACCCGGACAACAAGGAAGAAGCUCCAUCG
 CAAUCUACCUCGGGAUCGGCCUCUGCCUGCUGUUUAUCGUGCGGACGCUGCUGCUCAUC
 CAGCCAUUUCGGACUGCACCAUUGGCAUGCAAUUGCGGAUCGCAUUGUUCAGCCUGA
 UCUCAAAAAGACCCUGAAGUUGAGCUCACGGGUGUUGGAUAAGAUUUCGAUCGGACAG
 CUGGUGUCGUCUGCUCCAACAACCUCACAAGUUUGACGAAGGCCUGGCACUGGCCAC
 UUCGUGUGGAUUGCCCCGUGCAAGUCGCCUUUUGAUGGGCCUUUUUUGGGAGCUGUU
 GCAGGCAUCUGCCUUUUGUGGCCUGGGAUUUCUGAUUGUGUUGGCAUUGUUUCAGGCUG
 GGCUUGGGCGGAUGAUGAUGAAGUAUCGCGACAGAGAGCGGGUAAAAUCUCGGAAAGA
 CUCGUAUCACUUCGGAUUGAUCGAAAACAUCAGUCGGUCAAAAGCCUAUUGCUGGGA
 AGAAGCUAUGGAGAAGAUUGAAAACCUCCGCAACACUGAGCUGAAACUGACCCGCA
 AGGCGGCGUAUGUCCGGUAUUUCAAUUCGUCAGCGUUCUUCUUUCCGGGUUCUUCGUU

GUCUUUCUCUCGGUUUUGCCUUAUGCCUUGAUUAAGGGGAUUAUCCUCCGCAAGAUUU
 CACCACGAUUUCGUUCUGCAUUGUAUUGCGCAUGGCAGUGACACGGCAAUUUCCGUGGG
 CCGUGCAGACAUGGUAUGACUCGCUUGGAGCGAUCAACAAAAUCCAAGACUUCUUGCAA
 AAGCAAGAUACAAGACCCUGGAGUACAAUCUUACUACUACGGAGGUAGUAAUGGAGAA
 UGUGACGGCUUUUUGGGAGGAAGGAUUCGGCGAAUUGUUCGAAAAAGGCUAAGCAGAACA
 ACAACAAUCGAAAAACCUCCAUGGGGACGAUUCGUCUUCUUCGAAUUUCUCCUGC
 UGGGAACGCCGUGCUUAAAAGACAUAACUUAAGAUCGAACGGGGCCAGCUGCUCGCGG
 UCGCGGGCAGCACUGGAGCGGGAAAGACUCCUUCGCUCAUGGUCAUCAUGGGAGAGCUG
 GAGCCUCUGGAGGGCAAAAUCAAGCACUCGGGGAGGAUCUCAUUUUGCAGCCAGUUCUC
 GUGGAUCAUGCCCGUACUAUCAAAAGAAAACAUAUCUUUGGAGUCAGCUAUGACGAGU
 ACCGCUACCGGUCGUGUAUCAAGGCCUGCCAGCUGGAAGAAGAUUAUCUCAAGUUCGCG
 AAAAGGACAACAUAUGUCUGGGAGAAGGUGGAAUCACUCUCUGGGAGGCCAGCGCGCA
 CGGAUCACUCGCAAGGGCCGUGUACAAGGAUGCCGAUUUGUACCGUUGGAAUUCGCC
 GUUCGGUUUAUCUUGAUGUCCUCACUGAGAAAGAGAUUUUUGAGUCGUGCGUCUGAAGC
 UGAUGGCCAACAACCCGCAUCCUGGUGACCUCGAAGAUGGAGCACUUGAAGAAGGCC
 GACAAAUCUUUAUCCUCCAUGAGGGUAGCUCAUAUCUUCUACGGCACCUUUUCGGAACUG
 CAGAAUCUGCAGCCGACUUCUCAUAAAACUGAUGGGAUGUGACUCGUUCGAUCAGUU
 CUCGGCGGAGCGCGGGAACUCGAUCCUCACCGAAAACUCUCCACCGGUUCAGCCUCGAGGG
 AGAUGCCCAGUCAGCUGGACCGAAACUAAGAAGCAGUCCUCAAACAGACCCGGAGAGU
 UCGGAGAAAAACGCAAGAACUCCAUCCUCAAUCCAUAACAGCAUCCGCAAGUUCAGCA
 UCGUGCAGAAAAUCCACUUCAGAUAAACGGAAUCGAAGAGGAUAGCGACGAGCCGCUU
 GAGGAGAUUUGUCACUGGUGCCGGACAGCGAGCAAGGGGAAGCGAUUCUGCCGCGAU
 CUCCGUGAUCUCGACUUGGCCUACCCUCCAAGCUCGACAGCCAGAGCGUGCUGAAUCU
 CAUGACCCACUCAGUCAACCAGGGACAAAACAUCAUAGAAAGACCACCGCUUCAACCCG
 GAAAGUGUCACUUGCACCCGAGGCAAAACUGACCGAACUCGACAUUCACAGCAGACGGCU
 CUCACAAGAAACUGGAUUGGAGAUACGCGAAGAGAUCAACGAAGAAGAUUCUAAAGAAU
 GCUUCUUCGACGAUAUGGAGUCCAUCCAGCAGUCACUACGUGGAAUACCUACCUCCGCU
 ACAUCACUGUGCACAAGAGCCUGAUUUUCGUGUUGAUCUGGUGCCUGGUAUCUUCUUG
 GCCGAGGUGGCCGCGAGCCUCGUGGUCCUCUGGCUCGUCGGCAAUACGCCGUCGCAAGAU
 AAGGGAAAUUCCACGCAUAGCAGAAACAACUCAUACGCAGUGAUCUACUAGCACUUC
 AUCGUACUACGUGUUCUACAUCUACGUGGGGGUGGCCGAUACUCUGUUGGCAUUGGGAU
 UCUUUAGAGGGCUGCCUCUGGUGCAUACUCUGAUCACUGUGUCCAAGAUCUCCACACA
 AGAUGCUCACUCCGUGCUUCAGGCCCUAUGUCAACUCUCAACACCCUCAAGGCCGGAG
 GUAUUCUUAUUCGUUUUCCAAGGACAUCGCCAUUCUCGAUGACUUGCUUCCUGACUA
 UCUUCGACUUUAUCCAGUUGCUGCUGAUUGUGAUCGGCGCUAUUUGCCGUCGUCGAGUG
 CUGCAACCGUACAUUUUGGGCUACCGUCCAGUCAUUGUGGCCUUCAUCAUGCUCAGG
 GCAUACUUCUCCAGACCAGCCAGCAGCUCAAGCAGCUCGAAUCCGAAGGCAGAUUCGCCG
 AUCUUCACCCACCUUGCUCUUCGCUCAAGGGCCUCUGGACCCUGCGCGCCUUCGGUCGC
 CAGCCGUUUUCGAAACCCUGUUCUUAAGACACUGAACCUCCAUAUCGCGAACUGGUUU
 CUCUACCUUCAACCCUGAGGUGGUUCCAGAUGAGAAUCGAGAUGAUCUUUGUGAUCUU
 CUUUUAUCGUGUGACGUUCAUCUCCAUUCACUACUACCGGGAGGGAGAGGGCAGAGUGG
 GGAAUAUCCUCACGCUUGGCAUGAAUAUCAUGAGCACGUCGAGUGGGCCGCUAAUAGC
 AGCAUCGACGUGGACUCCUGAUGCGGUCCGUGUCGAGAGUGUUUAAGUUCAUUGCAU
 GCUACUGAAGGGAAACCGACCAAGUCGACCAAGCCGUAACAAGAAUGGGCAGCUGAGCA
 AGGUGAUGAUUAUUGAGAACUCCAUGUGAAGAAGGACGACAUCUGGCCAGCGGAGGC
 CAGAUACCGUGAAGGACUUGACCGCUAAGUACACUGAGGGUGGAAAUGCCAUUCUUGA
 GAAUAUCAGCUUCUGAUCUCGCCGGACAACCGUGGGAAUUGCUCGGGGCACUGGCA
 CGGAAAUCACCCUGCUUAGCGCUUUUCUGAGGCUGCUGAACACUGAAGGUGAAAUC
 AAUUCGAUGGAGUGUCGUGGGUAAGCAUACCCUUAACAGUGGGCGAAGGCCUUCGGC
 GUGAUCCUCAAAAAGGUCUUUAUCUUCUGGGGACGUUCCGGAAAAAUCUCGACCCUAC
 GAACAGUGGUCAGACCAAGAGAUUUGGAAAGUCGCAAGAUAGGUCGGACUGCGUCAGU
 GAUCGAACAGUUUCGGGUAAAACUUGACUUCGUGCUCGUCGAUGGAGGUUGCGUCCUGU
 CCCACGGACAUAAGCAGCUGAUGUGUCUGGCGCGCUCGGUCCUCUCAAAGCGAAGAUC
 UGCUCUCGAUGAACCGUCCGCCACCUUGAUCAGUACCUAUCAGAUCAUUCGGAGAA

CUUUGAAGCAAGCCUUCGCUGACUGCACCGUCAUCCUCUGCGAACACCGGAUCGAGGGCAA
UGCUGGAGUGCCAAACAGUUUCUGGUAUCGAAGAAAAACAAAGUGCGCCAGUAUGACUCG
AUCCAAAAACUUCUGAACGAGCGCUCUCCUUCUCCGGCAGGCAAUCAGCCAUCCGACCGC
GUGAAGUUGUUUACCGCAUCUUUCUGUAUCUCGGAGAAGUGACCAAAGCCGUGCAGCCGC
UUGAAAGAAGAAACCGAAGAAGAAGUCCAAGACACUAGGUUGUAG (SEQ ID NO:11)

SEQ ID NO:12

AUGCAGCGGUCCCCUCUGGAGAAGGUUCCGUGGUCAGCAAGCUGUUCUUCUCGUGGACC
AGACCUAUCCUCCGCAAGGGAUACCGCCAGCGCCUGGAGCUGUCAGUAUUCUACCAGAUC
CCAAGCGUGGACUCAGCCGACAAUCUGAGCGAAAAGCUGGAACGGGAGUGGGACCGGGA
GCUCGCCUCCAAGAAGAAUCCGAAGUUGAUCAAUGCGCUGCGCAGAUGCUUCUUCUGGCG
GUUUUUGUUUUACCGCAUCUUUCUGUAUCUCGGAGAAGUGACCAAAGCCGUGCAGCCGC
UGCUCUUGGGUAGGAUCAUUGCUUCGUACGACCCGGACAACAAAGAAGAACGCUCCAUC
GCCAUCUACCUCGGAAUCGGUCUGUGCCUGCUCUUUAUCGUGCGCACUCUCCUGCUGCAU
CCGGCGAUUCUUCGGACUGCACCACAUCGGCAUGCAAUGCGGAUCGCAAUGUUCACACUG
AUCUACAAAAAGACUCUGAAGCUCAGCUCAGCUCAGAGUCUGGAUAAGAUCUGCAUCGGGCA
ACUCGUCAGCCUCGUCGAAACAAUCUGAAUAAGUUCGACGAAGGGUUGGCCUCGCACA
UUUCGUGUGGAUCGCACCGCUGCAAGUGGCGCUCUGAUGGGACUCAUUUGGGAACUGC
UCCAAGCCAGCGGCUUUUGCGGACUCGGAUUCUGAUCGUGCUCGCCUGUCCAAGCCG
GACUGGGGCGCAUGAUGAUGAAGUACCGCAUCAGCGGGCAGGAAAGAUUCUCCGAGCGG
UUGGUAUCACUUCGAAUUGAUCGAGAAUUAUCAGUCCGUGAAGGCCUACUGCUGGGA
AGAAGCUAUGGAAAAGAUUUGAAAACUUGCGGCAAAACUGAGCUGAAAUUGACUCGCA
AAGCGCAUACGUCCGUAUCUCAAUAGCAGCGCCUUCUUCUUUUCGGGCUUUUUCGUGG
UGUUUCGAGCGUGCUGCCUACGCUCUGAUAAGGGAAUCAUCCUCCGAAAACUUCUA
CCACCAUUUCGUUCUGUAUCGUGUUGCGCAUGGCCGUGACUCGCCAGUUCUCCUUGGGCGG
UGCAGACCUUGGUACGACAGCUUGGGGGCAAUCAUAAGAUUCAAGACUUCUUGCAAAG
CAGGAGUACAAGACUCUGGAGUACAACCUGACCACUGAAGUCGUGAUGGAGAACGU
GACCGCUUUUUGGGAAGAGGGUUUUGGAGAUCUGUUUGAGAAAGCAAAGCAGAAUAACA
ACAACCGCAAGACCUCAAUUGGGGACGAUUCUCCUGUUUUUCUGAACUUCUCCUGCUCG
GAACACCCGUGUUGAAGGACAUAUUUCAAAGAUUGAGAGGGGACAGCUUCUCGCGGUA
GCGGGAAGCACUGGUGCGGGAAAAACUAGCCUCUUGAUGGUGAUUAUGGGGGAGCUUGA
GCCCAGCGAGGGGAAGAUUAAAACUCCGGGCGUAUCUCAUUCUGUAGCCAGUUUUCAU
GGAUCAUGCCCGGAACCAUUAAGAGAAUCAUUAUUUCGGAGUAUCCUAUGAUGAGUAC
CGAUACAGAUCCGUAUUAAGGCGUGCCAGUUGGAAGAGGACAUUUCUAAAGUUCGCCGA
GAAGGAUACAUCGUCUUGGGAGAAGGGGUAUUAUUAUUGUCGGGAGGGCAGCGAGCGC
GGAUACGCCUCGCGAGAGCGGUUAUCAAAGAUAGCAGAUUUUGUAUCUGCUUGAUUACCG
UUUGGAUACCUCGACGUAUUGACAGAAAAAGAAAUCUUCGAGUCGUGCGUGUGUAAACU
UAUGGCUAAUAAAGACGAGAAUCCUGGUGACUCCAAAUGGAGCAUCUCAAGAAGGCGG
ACAAGAUCUGAUUCUGCAUGAGGGAUCAAGCUAUUUUCUACGGAAAUUUUUCGAGCUG
CAGAACCUCAGCCGGAUUUAGCUCCAAGCUGAUGGGUUGCGACUCAUUCGACCAAUUC
UCGGCUGAGCGCGGAACUCAAUCCUGACCGAAACCCUGCAUCGCUCUCCUUGAGGGA
GAUGCCCCGUGUCGUGGACUGAGACUAAAAAGCAGUCGUUUAAGCAAACUGGGCAAU
CGGCGAAAAGCGGAAGAAUAGCAUCCUCAACCCAAUCAACAGCAUUCGGAAGUUCAGCA
UCGUCCAAAAGACCCCGCUCAGAUAGAACGGCAUUGAAGAGGACUCAGACGAGCCAUUGG
AAAGACGCCUCGUCACUGGUCCAGAUUCGAGCAGGGUGAAGCAAUUCUGCCUCGGAUC
UCGGUACUUCGACUGGCCCCACUCUCCAAGCUCGGCGGAGACAGAGCGUGCUAAACUUG
AUGACCCACUCCGUAACAGGGUCAGAACAUCACCAGCAAACACCGCCUCCACCAGG
AAGGUGUCACUGGCCCCUAAGCAAUCUGACUGAGUUGGAUAUCUACUCCAGAAAGGUC
AGCCAGGAAAACCGGACUGGAAAUCUCGGAAGAGAUCAAACGAAGAGGAUCUCAAGAGUG
UUUCUUCGACGACAUGGAAUCAAUCCUCCUGCUGACUACUUGGAACACCUAUCUCCGCUA
CAUUACCGUGACAAGUCACUCAUCUUCGUCCUGAUCUGGUGCCUCGUGAUCUUCUCCGCG
CGAGGUCGACGAUCGUCUGGUCGUGCUGUGGUCUCGGCAACACCCACUCCAAGACAA
AGGCAACAGCACCAUUCUCCGCAACAACUCCUACGCGGUGAUAUCACUUAACUUCGUC

CUACUACGUCUUUACAUCUACGUGGGCGUGGGCGACACGCUCUCCUGGCUAUGGGGUUCU
 UUCGCGGGCUGCCUCUUGUCCACACGCUCAUCACUGUGUCAAAAGAUUCCACCACAAAA
 UGCUGCACCCGUGUCUCCAGGCCCUAUGUCGACUUUGAACACGCUUAAGGCCGGAGGCA
 UCCUUAACAGAUUCUCGAAAGAUUACGCGAUUUGGACGAUCUUCUGCCGUGACUAUC
 UUUGACUUCAUCCAACUCCUGCUGAUCGUAUCGGUGCCAUCGCAGUGGUCGCGGUGCUC
 CAACCGUACAUUUUCGUGGGCAGUCUGCCGGUGAUCGUGGCGUUCAUCAUGCUGCGGGC
 UUACUUUCUUCAGACCUCACAGCAGCUGAAGCAACUCGAAUCGGAGGGUAGAUCACCAA
 UCUUUACCCACCUCGUCACCUCGUGAAGGGACUCUGGACCCUGCGCGCAUUUGGACGGC
 AACCGUACUUCGAGACUCUCUCCAUAAGGCCCUAUCUGCAUACGGCGAAUUGGUUUU
 UUUACCUCUCGACGCUCGCCUGGUUCCAGAUGCAGUUGAGAUGAUUUUUCGUAUCUUU
 UUCAUCGCGGUGACCUUCAUCUCCAUCUCCACCGGUGAGGGAGAGGGCAGAGUCGGA
 AUUAUCCUCACUCUGGCAUGAACAUCUAGUCCACUCUGCAGUGGGCCGUAACUCAUCC
 AUUGACGUGGACUCGUGAUGCGUCUCCGUGUCGAGAGUGUUAAGUUCUAGUUAUGCC
 GACCGAGGGAAAAGCCAACUAAGUCGACCAAGCCGUACAAAAACGGACAGCUGAGCAAAG
 UCAUGAUCAUCGAAAACUCCACGUGAAAAAGGAUGACAUCUGGCCGUCGGUGGACAG
 AUGACGGUGAAGGAUCUGACUCGGAAGUACACUGAGGGAGGGAAUGCCAUCUCCGAAAA
 CAUCUCAUUCUCAAUCUCCCCUGGACAGAGGGUCGGGUCUGGGCCGCACUGGCUCGGG
 GAAGUCGACUCUUCUUCGGCAUUUCUGCGCUUGCUCAAUACCGAGGGAGAAUCCAGA
 UCGAUGGAGUGUCAUGGGACUCGAUACCCUGCAGCAGUGGGCGAAGGCUUUUGGCGUC
 AUCCCGAAAAGGUGUUAUCUUCUGGGCACUUUAGAAAGAAUCUGGAUCCUACGA
 ACAGUGGUCAGAUCAAGAGAUUUGGAAAAGUCGCGAGACGAAGUGGGCCUCCGGUCCGUGA
 UUGAACAGUUUCCGGGAAAGCUCGACUUCGUGCUUGUGGACGGAGGAUGUGUCUGAGC
 CACGGCCACAAACAGCUCUAGUGCCUGGCUCGGUCGGUCCUGUCGAAAAGCAAAGUCCUG
 CUGCUGGACGAACCGUCGGCACACCUCGAUCCAGUGACGUACCAGAUCAUCCGGCGGACC
 CUGAAGCAGGCCUUCGACAGUCACUGUCAUUUUGUGUGAACACAGAAUCGAAGCUAU
 GUUGGAGUGCCAGCAGUUCUGGUCAUCAAGAAAACAAAGUCCGCCAGUACGAUUCGA
 UUCAGAAGCUCUGAACGAACGGAGCCUUCAGACAGGCGAUCAGCCCAGCGAUCGGG
 UCAAGUUGUUCGCAUCGGAACAGCAGCAAGUGUAAGUCAAGCCUCAGAUCCGUCAC
 UCAAAGAAGAGACUGAAGAAGAAGUGCAAGACACCAGACUCUGA (SEQ ID NO:12)

SEQ ID NO: 13

AUGCAGCGCUCGCCUCUGGAGAAAGCCUCAGUCGUGUCAAAAACUGUUCUUUAGCUGGAC
 UCGCCCAGAUUCUCCGGAAGGGUUUAAGACAGCGCUUGGAGCUCUCCGACUUCACAAA
 CCCUUCGUGGACUCCGCCGACAACCUGUCGGAGAAGCUCGAACCGGAGUGGGACCGGGA
 ACUCGCGUCCAAAAAGAAUCCAAAACUCAUUAUGCACUGCGCCGUCGUUCUUCUGGGC
 CUUUUAUGUUUACGGUAUCUUUCUCUACCUGGGCGAGGUGACGAAAAGCAGUCAGCCGC
 UCCUGCUUGGCAGAAUUAUCGCCUCGUACGAUCCGGUAACAAAGAAGAAGCUCUAAUC
 GCUAUCUACCUCGGUAUCGGAUUGUGCCUGCUUUUCAUCGUGCGCACCCUGUUGCUGCAC
 CCGGCGAUUUUCGGACUCCACCACUCCGAAUGCAAUGAGAAUUGCAAUGUUCUCAU
 GAUCUACAAAAAGACCCUUAACUCUGUCGUCCCGCUCUCCGACAAGAUUCAAUCGGCCA
 GCUGGUGUCGCUUCUUUCGAAUAAUCUUAACAAGUUCGAUGAAGGACUCGCGCUCGCC
 AUUUCGUGUGGAUCGCACCACUUAAGUCGCACUGCUCUAGGGACUGAUUUGGGAGUUG
 CUGCAGGCUUCCGCCUUUUGCGGCCUGGGAUCCUGAUCGUCCUGGCUUUGUCCAGGCU
 GGACUGGGCAGAAUGAUGAUGAAGUACCGGGACCAGCGGGCAGGAAAGAUACAGCGAAAG
 GCUCGUGAUCACUAGCGAAAUGAUCGAGAACAUCCAAUCCGUAAGGCGUACUGCUGGG
 AAGAAGCGAUGGAGAAGAUGAUCGAAAAUCUUCGCCAGACCGAACUCAAACUCACUAGA
 AAGGCUGCCUACGUGCGCUACUUUAACAGCUCAGCAUUUUUCUUCUCCGGAUUUUUCGU
 GGUGUCCUGUCGGUGCUGCCAUCGCCCUGAUCUAGGGGAUCAUUCUUCGCAAAAUCU
 UCACCACGAUCUCAUUCUGCAUUGUCCUCCGGAUGGCCGUGACGCGGCAGUUCUUUGGG
 CAGUGCAAACUUGGUACGAUUCGUGGGGGCCAUUAACAAGAUUCAAGAUUUUCUCAA
 AAGCAGGAGUACAAAACCCUGGAGUACAAUCUGACCACUACGGAAGUCGUGAUGGAAAA
 CGUGACUCGUUUUUGGGAGGAAGGCUUCGGCGAACUUUUUGAAAAGGCAAAGCAAACA
 AUAAACAACAGAAAAGACGUCAAACGGCGAUGACUCGUCGUUCUUCUCCAAUUUCUCCUGC

UCGGCACCCUGUGCUGAAGGACAUCAACUCAAUUUGAACGCGGACAGCUGCUGGCCG
 UGGCGGGAUCGACCCGGGCGUGGGAAAACCCUGUUGUUGAUGGUGAUCUAGGGAGAACUC
 GAACCCUCGGAGGGAAAGAUUAAGCAUAGCGGACGGAUCAGCUUCUGUCCAGUUCUC
 GUGGAUCAUGCCGGGAACCAUUAAGGAAAACAUCAUCUUCGGCGUGUCCUACGACGAGU
 ACCGGUAUAGGUCGGUGAUAAGGCCUGCCAGUUGGAAGAGGACAUCUCCAAGUUCGCU
 GAGAAGGACAACAUCGUGCUCGGUGAAGGGGGCAUACUCUGUCCGGUGGCCAGCGCGC
 GAGAAUUUCGUGGUCGCGCGGUGUACAAAGAUGCGGAUCUCUAUCUGCUGGAUUCGC
 CCUUCGGAUACCCUGAUGUCCUACGGAGAAGGAGAUUCGAAUCGUGCGUGUGCAAG
 UUGAUGGCGAACAAGACUAGGAUCCUGGUCACUCCAAGAUGGAGCACUUGAAGAAGGC
 CGAUAAGAUCUUGAUCCUCAUGAAGGAUCGAGCUACUUUUACGGAACUUUCAGAGC
 UGCAGAACUUGCAGCCGGACUUCUCAAGCAAACUGAUGGGUUGCGACUCGUUCGACCAG
 UUUUCGGCAGAACGGCGGAACUCGAUCCUGACUGAGACUCUGCAUCGCUUUUCGUGGA
 AGCGGAUGCCCCUGUCCUGGACUGAAACCAAGAAGCAAUCCUCAAACAACUCCGAG
 AAUUCGGAGAAAAGCGGAAGAACUCAUCCUUAACCCCAUCAAUAGCAUCCGGAAAGUUC
 UCAAUCGUCCAAAAGACCCCGCUGCAGAUUGGAUCGAAAGAAGAUAGCGACGAACC
 UCUUGAAAGACGGCUGUCCUUGGUGCCAGACUCAGAACAGGGAGAAGCUAUCCUGCCGC
 GGAUCUCCGUGAUCAGCACCCGACCGACUCUGCAGGCUCGCAGACGCCAGAGCGUGCUCA
 ACCUGAUGACCCACUCCGUGAACCCAGGGACAAAACAUCCAUAGAAAGACCACGGCCUCA
 CCAGAAAAGUCUCCUGGCACCGCAAGCCAAACUGACUGAACUGGACAUCUACAGCAGAA
 GGCUCAGCCAAGAAACCGGACUGGAGAUUUCAGAAGAAAUCAACGAGGAAGAUCUAAA
 GAGUGCUUCUUCGACGACAUGGAAUCGAUCCAGCCGUGACCACUUGGAAUACCUAUCUG
 AGAUAACAACCCGUGCACAUAUCCUGAUCUUCGUGCUGAUCUGGUGCCUGGUGAUCUUC
 CUGGCUGAGGUGGCCGCCUCACUGGUGGUGCUUUGGUUGCUGGGGAAUACGCCGCUCCA
 AGACAAGGGAAAACUCCACGCACUCCAGAAACAACUCGUACGCCGUGAUAUCACGUCGAC
 UUCGUCGUACUACGUGUUCUACAUCUACGUCGGUGGCGAGACACUCUCUUGCGGAUGG
 GCUUUUUCGGGGACUGCCACUGGUCCACACCCUGAUCACCGUGUCCAAAACUUCGACC
 ACAAGAUGCUCACAGCGUGCUGCAAGCCCCGAUGAGCACCCUGAAUACCCUCAAGCGG
 GAGGCAUCCUCAACAGAUUCAGCAAGGACAUCGCCAUCCUCGACGACCUUGGCCUUGA
 CCAUCUUCGAUUUCAUCCAGCUUCUUCUCAUCGUGAUCGGGGCAAUCGUGUCGUGGGCG
 UGCUGCAGCCGUACAUCUUCGUGGGCAGUCUGCCAGUGAUCGUCGCUUUAUCAUGCUGC
 GGGCCUACUUUCCAAACUCCCAACAGCUGAAACAACUGGAGUCGGAGGGCCCGCAGCC
 CUAUCUACCCAUUCUGGUGACCAGCCUCAAGGACUGUGGACUCUGAGGGCUUUCGGGA
 GGCAGCCAUACUUCGAGACUCUCUUUCACAAGGCCUGAAUCUCAUACGGCAAUUUGGU
 UUUUGUAUUUGAGUACCCUCCGAUGGUUUCAGAUGCAGCAUUGAGAUGAUUUUUGUGAUC
 UUCUUUAUCGCGGUGACUUUUAUCUCAUCUUGACCACGGGAGAGGGCGAGGGACGGGU
 CGGUAUUUAUCCUGACACUCGCCAUGAACAUUUGAGCACUUUGCAGUGGGCAGUGAAC
 GCUCGAUUGAUGUGGAUAGCCUGAUGAGGUCCGUUUCGAGGGUCUUUAAGUUCAUCGAC
 AUGCCGACGGAGGGAAAGCCCAAAAAGUACGAAACCCUAUAAGAAUGGGCAAUUGAG
 UAAGGUAUUGAUCUACGAGAACAGUCACGUGAAGAAGGAUGACAUCUGGCCUAGCGGGG
 GUCAGAUAGCCGUGAAGGACCUGACGGCAAAAUACACCGAGGGAGGGAAACGCAAUCCU
 GAAAAACAUCUGUUCAGCAUUAAGCCCCGUCAGCGUGUGGGGUUGCUCGGGAGGACCCG
 GUCAGGAAAAUCGACGUUGCUGUCGGCCUUCUUGAGACUUCUGAAUACAGAGGGUGAGA
 UCCAGAUAGCAGCGGUUCGUGGGAUAGCAUACCCUUGCAGCAGUGGGCGCAAGGGCUUC
 GGAGUCAUUCCCAAAAGGUGUUAUCUUUUCGGGAACCUCCGCAAGAAUCUGGAUCC
 GUACGAAACAGUGGAGCGACCAAGAGAUUUGGAAAGUGGCAGAUAGAUGGGGAUUGCGGA
 GCGUCAUCGAACAGUUUCCGGGAAAGCUCGAUUUCGUCCUUGUGGACGGUGGAUGUGUG
 CUGUCGACGGCCAUAAGCAGCUGAUGUGUCUCGCCCGCUCGGUGCUGUCAAAAGCGAAG
 AUCCUCUUGCUGGAUGAGCCAUCAGCCCAUCUGGACCCGGUGACGUACCAGAUCAUAGA
 CGGACGCUGAAACAGGCAUUCGCGGACUGCACUGUGAUCUCUGUGAACAUCCGAUCCGA
 GGCAUCGUGGAGUGUCAACAAUUCUUGGUCAUCGAAGAGAACAAGUGCGGCAGUACG
 ACAGCAUCAAAAGCUGCUGAACGAGAGGUCCUCUUCGCCAGGCCAUCUCCCAUCCG
 ACCGGGUCAAAGCUGUUCUCCUACCGCAACAGCUCAAAAGUGCAAAUCCAAACCCAGAUCC
 CAGCGCUGAAAGAAGAAACUGAAGAAGAAGUGCAAGACACUAGACUGUGA (SEQ ID
 NO:13)

SEQ ID NO: 14

AUGCAAAGGCCCAUUGGAGAAGGCCUCAGUGGUGUCGAAGCUGUUCUUCUGUGGAC
CAGGCCUAUCCUCCGGAAGGGAUACAGACAGCGGCUGGAACUGUCCGAUAUCUACCAGAU
CCCCAGCGUGGACAGCGCCGAUAAUCUCAGCGAAAAGCUGGAACGGGAAUGGGACCGCGA
ACUCGCUUCGAAGAAGAACCCGAAGCUGAUUAAUGCUCUGCGGAGAUUUUUUUUGGC
GGUUAUGUUUUACGGAAUCUUUCUGUACUUGGGAGAGGUCACGAAGGCUGUGCAGCCU
CUGCGUCUGGGACGGAUUAUCGCGUCGUAUGACCCCGACAAUAAGGAAGAACGCAGCAU
CGCAAUCUACCUGGGCAUCGGAUUGUGCCUGCUGUUCUUCGUGAGAACUCUCCUGCUGCA
UCCAGCCAUCUUCGGACUCCACCACAUUGGAAUGCAGAUAGAGAAUCGCAAUGUUCUCCU
GAUCUACAAGAAAACGCUCAAGCUCAGCAGCCGCGUGCUGAUAAAGAUACAGCAUCGGUCA
AUUGGUGUCCCUGCUGCGAAUAACCUCAACAAGUUCGACGAAGGGUUGGCCUCGCUCA
CUUCGUGUGGAUCGCACCUCUGCAAGUGGCCUCUGCUGAUGGGACUGAUUUGGGAGCUGC
UGCAGGCUUCCGCUUUCUGCGGCCUGGGAUUUCUUAUCGUGCUUGCUCUGUUCAGGGCG
GACUGGGACGCAUGAUGAUGAAGUACCGGGACCAACGGGCUGGAAAGAUACGCGAACGG
CUGGUGAUCACUCCGAAUGAUUGAGAAUAUCCAGUCAGUCAAGGCGUACUGCUGGGGA
AGAAAAGACAAAGAUUGAUGAUAUUUUCUGAGACAAACCGAGCUGAAGCUGAACCGGA
AAGCGCCUACGUCAGAUACUUAAGCUCAGCUUUUUUUUCUGGGUUUUUCGUC
GUGUUCUGUCGGUGCUUCCUAUGCCCUGAUUAAAGGGCAUCUUCUGCGCAAGAUCUUC
ACUACGAUCUAUUCUGCAUCGUGCUGCGCAUGGCUGUGACCAGACAAUUCUCCUGGGCC
GUGCAAAGGUAACGUAUCACUGGGAGCCAUACAAGAUCUACAGAUUUCUCCGAGCAAA
ACAGGAGUAUAAGACCCUGGAGUACAACCUGACUACUACCGAGGUGGUGAUGGAGAACG
UGACUGCGUUUUGGGAAGAAGGGUUCGGCGAACUGUUUGAAAAGGCCAAGCAGAACAAU
AACAAACAGAAAGACUUCAAACGGAGAUGACUCGCGUUCUUUUCGAAUCUACGCCUGCU
GGUACCCCAGUGUUGAAGAUUAACUUAAGAUUGAGAGAGGACAGCUGCUGGGCUG
UGCGGGACAGCACCUGGAGCAAAAAACUUCACUCCUGAUGGUGAUAUGGGACAAACUC
GAACCGUCAGAGGGGAAGAUUAAACACUCGGGAAGAAUCUCAUUUUGCUCCAAUUUUC
AUGGAUUUUGCCGGGAACCAUUAAAGAAAACAUUAUCUUCGGCGUGUCCUACGACGAGU
ACCGCUACAGAUCCGUGAUCAAAGCAUGCCAGCUGGAAGAGGACAUUCGAAAAUUCGU
GAAAAAGACAAUAUCGUGCUCGGGGAAGCGGGCAUCACCCUCAGCGGAGGACAAACGGGC
ACGGAUUUCGUCGCACGCGCAGUCUACAAAGACGCCGAUCUCUACCUUCUGGACAGCCC
AUUCGGGUUAUCUGGACGUGCUCACCGAGAAAGAGAUUCUUGAAAGCUGCGUCUGCAAGC
UCAUGGCCAACAAGACCCGCAUCCUCGUGACGUCGAAGAUGGAAACUUAAGAAGGGCU
GACAAAGAUUCUAUUCUCCUGAAGGGAGCUCUAUCUUCUACGGCACCUUUUCCGAGCUC
CAGAAUCUGCAACCGGACUUCUCGUCCAAGCUGAUGGGCUGCGAUUCGUUUGAUCAGUU
CUCGCGGAGCGGAGAAACAGCAUUCUGACGGAACCCUGCACCGGUUCUCGUGGAAGG
CGAUGCACCGGUGUCGUGGACCGAAACUAAAGAAGCAAUCGUUCAAGCAGACGGGAGAGU
UUGGAGAGAAGCGGAAAAACUCCAUCCUAACCCGAUCAACAGCAUCCGGAAGUUCAGCA
UCGUGCAAAAAGACCCCGCUCCAGAUUGAAUGGCAUUGAAGAGGACUCCGACGAACCUUG
GAACGCAGACUGAGCCUCGUGCCGGAUUCAGAACAGGGAGAAGCCAUUCUGCCACGGAUC
UCCGUGAUCAGCACUGGGCCAAUCUCCAAGCACGGCGGAGGCAGUCCGUGCUGAAUCUU
AUGACGCACAGCGUGAACCAAGGGCAGAACAUCUUAAGAAAAACGACCGCUUCGACCAGG
AAAGUCUCCUCGCCCAACAAGCUAACCCUACCGAACUGGAUAUCUACUCCCGCAGACUG
UCGCAAGAGACUGGCCUUGAGAUUCUCCGAAGAGAUUAAACGAAGAAGAUUCUAAAGAAUG
UUUCUUCGAUGAUUUGGAAUCAUCCCGGCAGUGACCACUUGGAACACCUACUUGCGCU
AUAUCACUGUGCACAAAAGCCUUAUCUUCGUCCUCAUCUGGUGCCUCGUAUCUUCUCCUG
CUGAGGUCGACGCCUCGUGGUCGUGCUCUGGUUGCUCGGAACACUCCGUCGAGGAUA
AGGGGAAUUCGACUCACUCGCGGAACAAUUCGUACGCGUCAUUAUCACCUUCGACGUCGU
CAUACUACGUGUUUACAUCUACGUGGGAGUGGCUGACACUCUGUUGGCUAUGGGGUUC
UUUCGCGGCCUGCCACUGGUCAUACUCUUAUCUGUGUCCAAAAUCCUUCUACACAAG
AUGUUGCAUUCAGUCUGCAAGCACCGAUGUCCACCCUCAAUACCCUUAAGGCUGGGCGG
AUUCUCAACCGCUUCUGGAAAGACUCCGAUCCUCGAUGAUCUUCUGCCUCUACCAUC
UUUGAUUUAUCCAGCUGCUCUGAUCGUGAUCGGAGCGAUUGCCUGGUGGCAGUGUU

GCAGCCGUACAUCUUUGUCGCAACUGUGCCGGUCAUCGUCGCCUUCAUCAUGCUGCGCGC
CUACUUCUUGCAAACGUCACAGCAACUGAAGCAGCUUGAAUCCGAGGGAAAGAUACCUA
UCUUCACCCACCUCGUGACUUCGCUGAAGGGGCGUGGACGCGUCGCGCAUUUGGAAGGC
AACCGUACUUCGAGACUUUGUCCACAAGGCGCUAAUCUUCACACUGCCAAUUGGUUCU
UGUACCUGUCAACGCUGAGAUGGUUUCAGAUGCAGGUAUCGAAAUGAUCUUCGUGAUCUUC
UUUAUCGCGGUGACUUUCAUCUGAUCCUGACUACCGGAGAGGGAGAAGGACGGGUGGG
UAUUAUCCUCACUCUGGCGAUGAACAUCAUGUCGACGCUUCAGUGGGCGGUGAAUAGCU
CAAUCGAUGUCGACUCGUGAUGCGCUCGUGAGCCGGUGUUUAAGUUCACUGACAUG
CCAACUGAAGGGAAAGCCGACCAAGUCGACCAAAACCGUACAAAAACGGACAGCUCUCCAAG
GUGAUGAUUAUCGAGAAUCCACGUGAAAAAGGACGACAUCUGGCCAUCCGGUGGACA
GAUGACCGGUAAGGACCUGACCCGGAAGUACACUGAGGGAGGCAACGCAAUCCUUGAGA
ACAUCAGCUUCUCCAUCUCGCCCGGUCAGAGGGUGGGCCUUCUUGGCCGGACCGGAUCGG
GAAAGUCCACUCUUCUGUCGGCCUUUCUUCGCCUCUUGAAUACUGAAGGGGAAAUCAG
AUCGACGGAGUGUCGUGGGAUAGCAUCACUCGACGAGUGGGCGAAAGCGUUUGGAGU
AAUCCCCAAAAGGUCUUUAUCUUUAGCGGAACCUUCGAAAGAAUCUCGAUCCUUAUG
AACAGUGGUCAGAUAAGAGAUUUGGAAAGUCGCGGACGAGGUUGGCCUUCGGAGUGUA
AUCGCGAAUUCGCGGAAAACUCGACUUGUCCUUGUAGAUGGGGGAUGCCUUCGUC
GCAUGGGCACAAGCAGCUCUAGUGCCUGGCGCAUCCGUCCUCUCUAAAAGCGAAAAUUCU
UCUCUUGGAUGAACCUUCGGCCAUUCUGGACCCGGUAACGUUAUCAGAUCAUCAGAAGGAC
ACUUAAGCAGGCGUUUGCCGACUCGACGGUGAUUCUCUGUGAGCAUCGUUACGAGGCCA
UCGUCGAAUCCAGCAAUUUCUGUCAUCGAAGAGAAUAAAGGUCCGCGCAGUACUCC
AUCCAGAAGCUGCUUAAUGAGAGAUCAUUGUCCGGCAGGCGAUUUCACCAUCCGAUAG
GGUGAAACUUUUUCCACACAGAAUUCGUCGAAGUGCAAGUCCAAACCGCAGAUCCGG
CCUUGAAAAGAAGAGACUGAAGAAGAAGUUAAGACACGCGUCUUUA (SEQ ID NO: 14)

SEQ ID NO: 15

AUGCAGCGGUCCCCGUCGAAAAGGCCAGUGUCGUGUCCAAACUCUUCUUCUUAUGGACU
CGGCCUUAUCCUAGAAAGGGGUAUCGGCAGAGGCUUGAGUUGUCUGACAUCUACAGAU
CCCCUCGGUAGAUUCGGCGGAUAACCUUCGCGAGAAGCUCGAAACGGGAAUUGGACCGCGA
ACUCGCGUCUAAGAAAACCCGAAGCUCAUCAACGCACUGAGAAGGUGCUUCUUCUGGGC
GUUCAUGUUCUACGGUAUCUUCUUGUAUCUCGGGGAGGUCACAAAAGCAGUCCAACCCC
UGUUGUUGGGUCGCAUUAUCGCCUCGUACGACCCCGUAACAAAGAAGAACGGAGCAUC
GGCAUCUACCCGGAUCGGACUGUGUUGCUUUUCAUCGUCAGAAACAUUUUGUUGCA
UCCAGCAAUCUUCGGCCUCCAUCACAUCGGUAUGCAGAUUGCAGAAUCGUAUGUUUAGCUU
GAUCUACAAAAGACACUGAAACUCUCGUCGCGGGUGUUGGAUAAAGAUUCCAUCGGUC
AGUUGGUGUCCUGCUUAGUAAUAACCUCAACAAAUUCGAUGAGGGACUGGCGCUGGCA
CAUUUCGUGUGGAUUGCCCCGUUGCAAGUCGCCUUUUGAUGGGCCUUAUUUGGGAGCU
GUUGCAGGCAUCUGCCUUUUGGGCCUGGGAUUUCUGAUUGUGUUGGCAUUGUUUCAGG
CUGGGCUUGGGCGGAUGAUGAUGAAGUAUCGCGACCAGAGAGCGGGUAAAUCUCGGAA
AGACUCGUAUCACUUCGAAAUGAUCGAAAACAUCAGUCGGUCAAGCCUUAUUGCUG
GGAAGAAGCUAUGGAGAAGAUGAUUGAAAACUCCGCCAAACUGAGCUGAAACUGACCC
GCAAGGCGGGCUAUGUCCGGUAUUUCAAUUCGUCAGCGUUCUUCUUUCCGGGUUCUUC
GUUGUCUUUCUCUCGGUUUUGCCUUAUGCCUUGAUUAAGGGGAUUAUCCUCGCAAGAU
UUUACACAGAUUUCGUUCGCAUUGUAUUGCGCAUGGCAGUACACGGCAAUUUCCGU
GGGCCGUGCAGACAUGGUAUGACUCGCUUGGAGCGAUCAACAAAUAUCCAGACUUCUUG
CAAAAGCAAGAGUAACAAGACCCUGGAGUACAAUCUUAUCUACGAGGUAUUAUUGGA
GAAUGUGACGGCUUUUUGGGAAGAGGGUUUUGGAGAACUGUUUGAGAAAGCAAAGCAGA
AUAACAACAACCGCAAGACCUCAAUUGGGGACGAUUCUCCUGUUUUUCUGAACUUCUCC
UGCUGGAACACCCGUGUUGAAGGACAUAUUUCAAGAUUGAGAGGGGACAGCUUCUC
GCGGUAGCGGGAAGCACUGGUGCGGAAAAACUAGCCUCUUGAUGGUGAUUAUGGGGGA
GCUUGAGCCAGCGAGGGGAAGAUUAAAACUCGCGGCGUAUCUCAUUCUGUAGCCAGU
UUUCAUGGAUCAUGCCCGAACCAUUAAGAGAACAUAUUUCCGAGUAUCCUAUGAU
GAGUACCGAUACAGAUCCGUAUUAAGGCGUGCCAGUUGGAAGAGGACAUUUUAAGU

CGCCGAGAAGGAUACAUCGUCUUGGGAGAAGGGGUUUACAUUGUCGGGAGGGCAGC
GAGCGCGGAUCAGCCUCGCGAGAGCGGUUAUACAAAGAUGCAGAUUUGUAUCUCUUGAU
UCACCGUUUGGAUACCGACGUAUUGACAGAAAAAGAAUUCUUCGAGUCGUGCGUGUG
UAAACUUUUGGCUAAAUAAGACGAGAAUCCUGGUGACAUCAAAAUUGGAACACCUUAAGA
AGGCGGACAAGAUCUGAUCUCCACGAAGGAUCGUCCUACUUUUACGGCACUUUCUCAG
AGUUGCAAAACUUGCAGCCGGACUUCUCAAGCAAACUCUUGGGGUGUGACUCAUUCGAC
CAGUUUCAGCGCGGAACGGCGGAACUCGACUUCUUGACGGAACGCUCGACCGGAUUCUCGU
GAGGGUGAUGCCCGGUUACGUGGACCGAGACAAAGAAGCAGUCGUUUUAAAGCAGACAGG
AGAAUUUGGUGAGAAAAGAAAGAACAGUAUCUUGAAUCCUUAUUAAACUCAUUCGCAAGU
UCUCAUUCGUCCAGAAAACUCCACUCGAGAUUGAAUUGGAAUUGAAGAGGAUUCGGACGAA
CCCUGGAGCGCAGGCUUAGCCUCGUGCCGGAUUCAGAGCAAGGGGAGGCCAUUCUUCUCC
CGGAUUUCGUGAUUUCAACCGGACUACACUUCAGGGCGAGCGGAAGGCAAUCCGUGCUC
AACCUCAUGACGCAUUCGGUAAACCAGGGGCAAACAUUCACCGCAAAACGACGGCCUCA
ACGAGAAAAGUGUCACUUGCACCCAGGCGAAUUUGACUGAACUCGACAUCUACAGCCGU
AGGCUUUUCGAAGAAACCGGACUUGAGAUCAGCGAAGAAUCAAUGAAGAAGAUUUGAA
AGAGGUAUUUGAUGACAUGGAAUCAAUCCAGCGGUGACAACGUGGAAACAGUACU
UGCGUUACAUCACGGUGCACAAGUCCUUGAUUUUCGUCCUACUCUGGUGUCUCGUGAUC
UUUCUCGUGAGGUCGACGCGUCACUUGUGGUCCUCUGGUCGUUUGGUAUACGCCUUG
CAAGACAAAGGCAAUUCUACACACUCAAGAAACAAUCCUUAUGCCGUGAUUAUCACUUC
UACAAGCUUGAUUACGUGUUUACAUCUACGUAGGAGGCGGACACUCGUCAGCGGA
UGGGUUUCUUCGAGGACUCCACUCGUUCACACGCUUAUCACUGUCUCCAAGAUUCUCC
ACCAUAGAUGCUUCAUAGCGUACUCGAGGCUCCAUUGUCCACCUUGAAUACGCUCAAGG
CGGGAGGUUUUGAAUUCGUUCUCAAAAAGAUUUGCAAUUUUGGAUGACCUUCUGCCC
CUGAGCUUCGACUUCUACUCCAGUUGUUGCUGAUCGUGAUUUGGGCUAUUGCAGUAGU
CGCUGUCCUCCAGCCUUAUUUUUGUCGCGACCGUUCGUGAUCGUGGCGUUUAUCAU
GCUGCGGGCUAUUUUCUUGCAGACGUCACAGCAGCUUAAGCAACUGGAGUCUGAAGGGA
GGUCGCCUACUUUACGCAUCUUGUGACCAGUUUGAAGGGAUUGUGGACGUUGCGCGCC
UUUGCAGCGACCCUACUUUGAAACACUGUUCACAAAGCGCUGAAUCUCCUACGCGGA
AAUUGGUUUUUGAUUUUGAGUACCCUCCGUAUGGUUCAGAUUGCGCAUUGAGAUGAUUU
UGUGAUUCUUUAUCGCGGUGACUUUAUCUCCAUCUUGACCACGGGAGAGGGCGAGG
GACGGGUCGGUAUUUACUGACACUCGCCAUGAACAUUAUGAGCACUUUGCAGUGGGCA
GUGAACAGCUCGAAUUGAUGUGGAUAGCCUGAUGAGGUCGUUUUCGAGGGUUCUUUAAGU
CAUCGACAUGCCGACGGAGGGAAGCCACAAAAGUACGAAACCUUAUAAGAAUGGGC
AAUUGAGUAAGGUAUUGAUCUAGAACAGUCACGUGAAGAAGGAUGACAUUCGGCCU
AGCGGGGUCAGAUAGCCGUGAAGGACCUGACGGCAAAUACACCGAGGGAGGGAAACGC
AAUCCUUGAAAACAUCUCGUUCAGCAUUAAGCCCGGUCAGCGUGUGGGGUUGCUCGGGA
GGACCGGUCAGGAAAAUCGACGUUGCUGUCGGCCUUCUUGAGACUUCUGAAUACAGAG
GGUGAGAUCCAGAUUCGACGGCGUUUCGUGGGAUAGCAUCACCUUGCAGCAGUGGGCAA
AGCGUUUGGAGUAAUCCCCAAAGGUCUUUAUCUUUAGCGGAACCUUCCGAAAGAAUC
UCGAUCCUUAUGAACAGUGGUCAGAUCAAGAGAUUUGGAAAGUCGCGGACGAGGUUGGC
CUUCGGAGUGUAAUCGAGCAGUUUCGGGAAAAUCGACUUGUCCUUGUAGAUGGGGG
AUGCGUCCUGUCGCAUGGGCACAAGCAGCUCUUGUGCCUGGCGGAUCCGUCCUCUUA
AGCGAAAUUCUUCUUGGAUGAACCUUCGGCCAUUCUGGACCCGGUAACGUAUCAGA
UCAUCAGAAGGACACUUAAGCAGGCGUUUGCCGACUGCACGGUGAUUCUCUGUGAGCAU
CGUAUCGAGGCAUGCUCGAAUGCCAGCAAUUUCUUGUCAUCGAAAGAGAAUAGGUCGG
CCAGUACGACUCCAUCAGAAAGCUGCUUUAUGAGAGAUCAUUGUCCGGCAGGCGAUUU
CACCAUCCGAUAGGGUGAAACUUUUCCACACAGAAUUCGUCGAAGUGCAAGUCCAAA
CCGAGAUUCGGCCUUGAAAGAAGAGACUGAAGAAGAAGUUCAAGACACGCGUCUUA
CCAUCACCAUACCAUACCAUACCAUUA (SEQ ID NO:15)

SEQ ID NO:16

AUGGCCACUGGAUCAAGAACCUCACUGCUCGCUUUUGGACUGCUUUGCCUGCCCUGGU
UGCAAGAAGGAUCGGCUUUCCCGACCAUCCACUCUCCAUGCAGCGGUCCCGCUCGAAAA

GGCCAGUGUCGUGUCCAAACUCUUCUUCUCAUGGACUCGGCCUAUCCUUAGAAAGGGGU
 AUCGGCAGAGGCUUGAGUUGUCUGACAUACCUAGAUCCCCUCGGUAGAUUCGGCGGAU
 AACCUUCGCGAGAAGCUCGAAACGGGAAUGGGACCGCGAACUCGCGUCUAAGAAAAACCCG
 AAGCUCAUCAACGCACUGAGAAGGUGCUUCUUCUGGGCGUUCUAGUUCUACGGUAUCUU
 CUUGUAUCUCGGGGAGGUCACAAAAGCAGUCCAACCCUUGUUGUUGGGUCGCAUUUUCG
 CCUCGUACGACCCCGAUAAACAAGAAGAACGGAGCAUCGCGAUCUACCUCGGGAUCGGAC
 UGUGUUUGCUUUUCAUCGUCAGAACACUUUUGUUGCAUCCAGCAAUCUUCGGCCUCCAUC
 ACAUCGGUAUGCAGAUGCGAAUCGCUAUGUUUAGCUUGAUCUACAAAAGACACUGAAA
 CUCUCGUCGCGGGGUGUUGGAUUAAGAUUUUCAUCGGUCAGUUGGUGUCCUCGUUAGUAA
 UAACCUCAACAAAUCGAUGAGGGACUGGGCGUGGCACAUUUCGUGUGGAUUGCCCCGU
 UGCAAGUCGCCCCUUUGAUGGGCCUUUUUUGGGAGCUUUGCAGGCAUCUGCCUUUUGU
 GGCCUGGGAUUUCUGAUUGUGUUGGCAUUGUUUCAGGCUGGGCUUGGGCGGAUGAUGAU
 GAAGUAUCGCGACCAGAGAGCGGGUAAAAUCUCGGAAAGACUCGUCAUCACUUCGGAAA
 UGAUCGAAAAACAUCAGUCGGUCAAGCCUAUUGCUGGGAAGAAGCUAUGGAGAAGAUG
 AUUGAAAACUCGCGAACACUGAGCUAACACUGACCCGCAAGCGGGCGUAUGUCGGUAU
 UUCAAUUCGUCAGCGUUCUUCUUUUCGGGUUCUUCGUUGUCUUUCUCUGGUUUUUGCC
 UUAUGCCUUGAUUAAGGGGAUUUUCUCGCAAGAUUUUACCCACGAUUUCGUUCGCA
 UUGUAUUGCGCAUGGCAGUGACACGGCAAUUUCGUGGGCCGUGCAGACAUGGUAUGAC
 UCGCAAGUCGCCCCUUUGAUGGGCCUUUUUUGGGAGCUUUGCAAAAAGCAAGAGUACAUG
 GGAGUACAAUCUACUACUACGGAGGUAGUAAUGGAGAAUGUGACGGCUUUUUGGGAAG
 AGGGUUUUGGAGAACUGUUUGAGAAAGCAAAGCAGAAUACAACAACCGCAAGACCUCU
 AAUGGGGACGAUCCUGUUUUUCUGAACUUCUCCUCGUCGGAACACCCGUGUUGAAG
 GACAUCAAUUUCAAGAUUGAGAGGGGACAGCUUCUCGCGUAGCGGGAAGCACUGGUC
 GGGAAAAACUAGCCUUCUGAUGGUGAUUAUGGGGGAGCUUGAGCCAGCGAGGGGAAGA
 UAAAACACUCCGGGCGUAUCUAUUCUGUAGCCAGUUUCAUGGAUCAUGCCCAGAACCA
 UAAAAGAGAAUCAUUUUCGGAGUAUCCUAUGAUGAGUACCGAUACAGAUUCGGUCAUU
 AAGGCGUGCCAGUUGGAAGAGGACAUUUCUAAGUUCGCGGAGAAAGGAUACAUCGUCUU
 GGGAGAAAGGGGUAAUACAUUGUCGGGAGGGCAGCGAGCGCGGAUCAGCCUCGCGAGAG
 CGUAUACAAGAUGCAGAUUUGUAUCUGCUUGAUUCACCGUUUGGAUACCUCGACGUA
 UUGACAGAAAAAGAAUCUUCGAGUCGUGCGUGUAAACUUUUGGCUAAAUAAGACGAG
 AAUCCUGGUGACAUCAAAAUGGAACACCUUUAAGAAGGGCGACAAGAUCCUGAUCCUC
 ACGAAGGAUCGUCCUACUUUACGGCACUUUCUCAGAGUUGCAAAAACUUGCAGCCGGAC
 UUCUCAAGCAAAUCUAUGGGGUGUGACUCAUUCGACAGUUCAGCGCGGAACCGCGGAA
 CUCGAUCUUGACGGAACCGUCGACCCGAUUCUGCUUGAGGGUGAUGCCCGGUAUCGUG
 ACCGAGACAAAAGAAGCAGUCGUUUAAGCAGACAGGAGAAUUUGGUGAGAAAAAGAAAGA
 ACAGUAUCUUGAAUCCUAUUAAUCUCAAUUCGCAAGUUCUCAAUUCGUCCAGAAAACUCCAC
 UGCAGAUCAAUGGAAUUGAAGAGGAUUCGGACGAACCCUGGAGCGCAGGCUUAGCCUC
 GUGCCGGAUUCAGAGCAAGGGGAGGCCAUUCUCCCCGGAUUUCGGUGAUUUCAACCGG
 ACCUACACUUCAGGGCAGGCGAAGGCAAUCCGUGCUAACCUCAUGACGCAUUCGGUAAA
 CCAGGGGCAAAAACAUACCCGCAAAAACGACGGCCUCAACGAGAAAAGUGUCACUUGCACC
 CCAGGCGAAUUUGACUGAACUCGACAUUCACAGCCGUAGGCUUUCGCAAGAAACCGGACU
 UGAGAUACAGCGAAGAAAUCAUGAAGAAGAUUUGAAAAGAGUGUUUUUGAUGACAUGG
 AAUCAAUCCCAGCGGUGACAACGUGGAACACAUACUUGCGUUACAUCACGGUGACAAG
 UCCUUGAUUUUCGUCCUACUCUGGUGUCUGUGAUUUUCUCGUGAGGUCGCAGCGUCA
 CUUGUGGUCCUCUGGCUGCUUGGUAUUCGCCCUGCAAAGACAAAAGGCAAUUCACACAC
 UCAAGAAAACAAUCCUUGCCGUGAUUAUCACUUCUACAAGCUCGUUUUACGUGUUUA
 CAUCUACGUAGGAGUGGCGACACUCUGCUCGCGAUGGGUUUCUUCGAGGACUCCACU
 CGUUCACACGCUUAUCACUGUCUCCAAGAUUCUCCACCAUAAGAUGCUUCAUAGCGUACU
 GCAGGCUCCAUUGUCCACCUUGAAUACGCUCAAGCGGGAGGUUUUUGAAUCGCUUCUC
 AAAAGAUUUGCAAUUUUGGAUGACCUUCUGCCCCUGACGAUCUUCGACUUCAUCCAGU
 UGUUGCUGAUCGUGAUUGGGCUAUUGCAGUAGUCGUCUCCAGCCUUACAUUUUU
 GUCGCGACCGUUCGGUGAUCGUGGCGUUUAUCAUGCUGCGGGCCUAAUUUCUGCAGAC
 GUCACAGCAGCUUAAGCAACUGGAGUCUGAAGGGAGGUCGCCUAUCUUUACGCAUCUUG
 UGACCAGUUUGAAGGGAUUGUGGACGUUGCGCGCCUUUGGCAGGCAGCCUACUUUGAA

ACACUGUCCACAAAGCGCUGAAUCUCCAUCGCGAAAUUGGUUUUUGUAUUUGAGUAC
CCUCCGAUGGUUUCAGAUGCAGCAUUGAGAUGAUUUUUGUAUCUUCUUUAUCGCGGUGA
CUUUUAUCUCCAUCUUGACCACGGGAGAGGGCGAGGGACGGGUCGGUAUUUAUCUGACA
CUCGCCAUGAACAUUAUGAGCACUUUGCAGUGGGCAGUGAACAGCUCGAUUUGAUGUGGA
UAGCCUGAUGAGGUCCGUUUCGAGGGUCUUUAAGUUCUACGACAUGCCGACGGAGGGAA
AGCCACAAAAAGUACGAAACCCUAUAAGAAUUGGGCAAUUGAGUAAGGUAUUGAUCUAC
GAGAACAGUCACGUGAAGAAGGAUGACAUCUGGCCUAGCGGGGUCAGAUGACCGUGAA
GGACCUGACGGCAAAUACACCGAGGGAGGGAAACGCAAUCCUUGAAAACUUCUGUUA
GCAUUAGCCCGGUCAGCGUGUGGGGUUGCUCGGGAGACCGGGUCAGGAAAUCGACG
UUGCUGCGCCUUCUUGAGACUUCUGAAUACAGAGGGUGAGAUCCAGAUCCGACGGCGU
UUCGUGGGAUAGCAUACCUUGCAGCAGUGGGCGAAAAGCGUUUGGAGUAAUCCCCAAA
AGGUCUUUAUCUUUAGCGGAACCUUCCGAAAGAAUCUCGAUCCUUAUGAACAGUGGUA
GAUCAAGAGAUUUGGAAAGUCGCGGACGAGGUUGGCCUUCGAGUGUAAUCGAGCAGUU
UCCGGGAAAACUCGACUUGUCCUUGUAGAUGGGGGAUGCGUCCUGUCGCAUGGGCACA
AGCAGCUCUAGUGCCUGGGCGAUCCGUCCUCUAAAAGCGAAAAUUCUUCUUGGAUG
AACCUUCGGCCAUCUGGACCCGUAACGUAUCAGAUCAUCAGAAGGACACUUAAGCAGG
CGUUUGCCGACUGCAGGGUUAUCUCUGUGAGCAUCGUAUCGAGGGCAUGCUCGAAUGCC
AGCAAUUUCUUGCAUCGAAGAGAAUAGGUCGCCAGUACGACUCCAUCAGAAAGCUG
CUUAAUGAGAGAUCAUUGUUCGGCAGGCGAUUUCACCAUCCGAUAGGGUGAAACUUU
UCCACACAGAAUUCGUCGAAGUGCAAGUCCAACCGCAGAUCCGCGCCUUGAAAGAAG
AGACUGAAGAAGUUAAGACACGCGUCUUUA (SEQ ID NO:16)

SEQ ID NO: 17

AUGCAGCGUCCCGCUCGAAAAGGCCAGUGUCGUGUCCAACUCUUCUUCUUAUGGACU
CGGCCUUAUCUUAGAAAAGGGUUAUCGGCAGAGGCUUGAGUUGUCUGACAUCUACCAGAU
CCCCUCGGUAGAUUCGGCGGAUAACCUUCUCGGAGAAGCUCGAACGGGAAUGGGACCGCGA
ACUCGCGUAAGAAAAACCCGAAAGCUACAACGCACUGAGAAGGUGCUUCUUCUGGCG
GUUCAUGUUCUACGGUAUCUUCUUGUAUCUCGGGGAGGUCACAAAAGCAGUCCAACCCC
UGUUGUUGGGUCGCAUUAUCGCCUCGUACGACCCGUAACAAAGAAGAACGGAGCAUC
GCGAUCUACCUCGGGAUCGGACUGUGUUUGCUUUCAUCGUCAGAACACUUUUGUUGCA
UCCAGCAAUCUUCGGCCUCCAUACAUCGGUAUGCAGAUCCGAAUCGUAUGUUUAGCU
GAUCUACAAAAAGACACUGAAACUCUCGUCGCGGGUGUUGGAUAAAGAUUCCAUCGGUC
AGUUGGUGUCCUGCUUAGUAAUAAACCUCAACAAUUCGAUGAGGGACUGGCGCUGGCA
CAUUUCGUGUGGAUUGCCCCGUUGCAAGUCGCCUUAUGAUGGGCCUUAUUUGGGAGCU
GUUGCAGGCAUCUGCCUUUGUGGCCUGGGAUUUCUGAUUGUGUUGCAUUGUUUAGG
CUGGGCUUUGGGCGGAUGAUGAUGAAGUAUCGCGACCAGAGAGCGGGUAAAAUCUCGGAA
AGACUCGUAUCACUUCGAAAUGAUCGAAAACAUCCAGUCGGUCAAGCCUUAUUGCUG
GGAAGAAGCUAUGGAGAAGAUGAUUGAAAACCUCCGCCAAACUGAGCUGAAACUGACCC
GCAAGGCGGCUAUGUCCGGUUAUUCAAUUCGUCAGCGUUCUUCUUUCCGGGUUCUUC
GUUGUCUUUCUCGGUUUUGCCUUAUGCCUUGAUUAAGGGGAUUAUCCUCCGCAAGAU
UUUACACCGAUUUCGUUCUGCAUUGAUUGCGCAUGGCAGUGACACGGCAAUUCCGU
GGGCCGUGCAGACAUGGUAUGACUCGUUGGAGCGAUCACAAAAUCCAAGACUUCUUG
CAAAAGCAAGAGUACAAGACCCUGGAGUACAACUUACUACUACGGAGGUAGUAAUGGA
GAAUGUGACGGCUUUUUGGGAAGAGGGUUUUGGAGAACUGUUUGAGAAAGCAAAGCAGA
AUAACAACAACCGCAAGACCUAAAUGGGGACGAUUCUCCUGUUUUUCUGAACUUCUCC
UGCUCGGAACACCCGUGUUGAAGGACAUCAAUUCAAGAUUGAGAGGGGACAGCUUCUC
GCGGUAGCGGGAAGCACUGGUGCGGAAAAACUAGCCUUCUUGAUGGUGAUUAUGGGGGA
GCUUGAGCCCAGCGAGGGGAAGAUUAAACACUCCGGGCGUAUCUCAUUCUGUAGCCAGU
UUUCAUGGAUCAUGCCCGGAACCAUUAAGAGAAUCAUUAUUCGGAGUAUCCUAUGAU
GAGUACCGAUACAGAUCCGUAUUAAGGCGUGCCAGUUGGAAGAGGACAUUUCUUAAGU
CGCCGAGAAGGAUAACAUCGUCUUGGGAGAAGGGGGUAUUACAUUGUCGGGAGGGCAGC

GAGCGCGGAUCAGCCUCGCGAGAGCGGUUAUACAAAGAUGCAGAUUUGUAUCUGCUUGAU
 UCACCGUUUGGAUACCUCCGACGUUUUGACAGAAAAAGAAUCUUCGAGUCGUGCGUGUG
 UAAACUUUUGGCCUAAUAGACGAGAAUCCUGGUGACAUCAAAAAUGGAACACCUUUAAGA
 AGGGCGACAAGAUCUGAUCCUCCACGAAGGAUCGUCCUACUUUUACGGCACUUUCUCAG
 AGUUGCAAAACUUGCAGCCGGACUUCUCAAGCAAAACUCAUGGGGUGUGACUCAUUCGAC
 CAGUUCAGCGCGGAACGGCGGAACUCGUAUCUUGACGGAAACGCUGCACCGAUUCUGCUU
 GAGGGUGAUGCCCCGGUAUCGUGGACCGAGACAAAAGAAGCAGUCGUUUUAGACAGACAGG
 AGAAUUUGGUGAGAAAAGAAAGAACAGUAUCUUGAAUCCUAAUUAACUCAUUCGCAAGU
 UCUCAAUCGUCAGAAAACUCCACUGCAGAUUGAAUUGAAUUGAAGAGGAUUCGGACGAA
 CCCCUGGACCGCAGGCUUAGCCUCGUGCCGGAUUCAGAGCAAGGGGAGGCCAUUCUUC
 CGGAUUUCGGUGAUUUCAACCGGACCUACACUUCAGGGCGAGGCGAAGGCAUUCGUGCUC
 AACCUCAUGACGCAUUCGGUAAACCAGGGGCAAAACAUUCACCGCAAAACGACGGCCUCA
 ACGAGAAAAGUGACUUCGACCCCCAGGCGAAUUUGACUGAACUCGACAUCUACAGCCGU
 AGGCUUUCGCAAGAAACCGGACUUGAGAUACAGCGAAGAAUCAAUGAAGAAGAUUUGAA
 AGAGUGUUUCUUUGAUGACAUGGAAUCCAGCCAGCGGUGACAAACGUGGAACAUACU
 UGCGUUACAUCACGGUGACAAGUCCUUGAUUUUCGUCUCAUCUGGUGUCUCGUGAUC
 UUUUCGCGUGAGGUCGACGCGUCACUUGUGGUCUCUGGUCGUUUGGUAUACGCCUUG
 CAAGACAAAGGCAUUCUACACACUCAAGAAACAUAUCCUUGCCGUGAUUAUCACUUC
 UACAAGCUGUAUUACGUGUUUUACAUCUACGUAGGAGGGCCGACACUCUGCGAGA
 UGGGUUUUCUCCGAGGACUCCACUCGUUCACACGCUUAUCACUGUCUCAAGAUUCUCC
 ACCAUAGAUGCUUCAUAGCGUACUGCAGGCUCCAUUGCCACCUUGAAUACGCUCAAGG
 CGGGAGGUAAUUUGAAUCGCUUCUCAAAAGAUUUGCAUUUUUGGAGACCUUGCGCGCC
 CUGACGAUCUUCGACUUCAUCCAGUUGUUGCUGAUCGUGAUUUGGGGCUAUUGCAGUAGU
 CGCUGUCCUCCAGCCUUAUUUUUGUCGCGACCGUUCGGUGAUCGUGGCGUUUAUCAU
 GCUGCGGGCCUUAUUUCUUGCAGACGUCACAGCAGCUUAAGCAACUGGAGUCUGAAGGGA
 GCGGAGGUAAUUUACGCAUCUUGUGACCAGUUUGAAGGGAUUUGGGACGUUGCGCGCC
 UUUGGCAGGCAGCCUACUUUGAAACACUGUCCACAAAGCGCUGAAUCUCAACGGCA
 AAUUGGUUUUUUGAUUUUGAGUACCCUCCGUAUGGUUUCAGAUGCAGUUGAGAUUUUU
 UGUGAUCUUCUUUAUCGCGGUGACUUUUUAUCUCAUCUUGACCACGGGAGAGGGGAGG
 GACGGGUCGUAUUUACCGACACUCGCAUGCAACAUUAUGAGCAUUCGAGUUGGAGGCA
 GUGAACAGCUCGAUUGAUGGGAUAGCCUGAUGAGGUCCGUUUCGAGGGUCUUUAAGUU
 CAUCGACAUGCAGCGAGGGAAAGCCACAAAAGUACGAAACCCUUAUAGAAUUGGGC
 AAUUGAGUAAGGUAUUGAUCUAGCAGACAGUCACGUGAAGAAGGAUGACAUCUGGCCU
 AGCGGGGUCAGAUACCGGUAAGGACCUAGCGCAAAAUACACCGAGGGAGGGAACGC
 AAUCUUGAAAACAUCUCGUUCAGCAUUAAGCCCCGUCAGCGUGUGGGGUUGCUCGGGA
 GGACCGGGUCAGAAAACGACGCUUGCUGUCGCGCCUUCUUGAGACUUCUGAAUACAGAG
 GGUGAGAUCAGAUCCAGCGCGUUCGUGGGAUAGCAUACCCUUGCAGCAGUGGGCGAA
 AGCGUUUGGAGUAAUCCCCAAAAGGUCUUUAUCUUUAGCGGAACCUUCGAAAGAAUC
 UCGAUCCUUAUGAACAGUGGUCAGAUCAAGAGAUUUGGAAAGUCGCGGACGAGGUUGGC
 CUUCGGAGUGUAUCGAGCAGUUUCGGGAAAACUCGACUUCUUGUUGUUGAUGGGGG
 AUGCGUCCUGCGAUGGGCACAAGCAGCUCUAGUGCCUGGCGGGAUCCGUCCUCUCUCAA
 AGCGAAAUAUCUUCUUGGAUGAACCUUCGGCCAUUCGGACCCGUAACCGUACAGUA
 UCAUCAGAAGGACACUUAAGCAGGCGUUUGCCGACUGCACGGUGAUUCUCUGUGAGCAU
 CGUAUCGAGGCCAUGCUCGAAUGCCAGCAAUUUUCUUGUACUGAAGAGAAUAAAGUCCG
 CCAGUACGACUCCAUCCAGAAGCUGCUUAAUGAGAGAUCAUUGUUCGGCAGGCGAAUU
 CACCAUCCGAUAGGGUGAAACUUUUUCCACACAGAAAUUCGUGCAAGUGCAAGUCAA
 CCGCAGAUCCGCGCCUUGAAAGAAGAGACUGAAGAAGAAGUUAAGACACGCGUCUUUA
 A (SEQ ID NO:17)

SEQ ID NO: 18

AUGGCCACUGGAUCAAGAACCUCACUGCUGCUCGUUUUGGACUGCUUUGCCUGC
 CCUGGUUGCAAGAAGGAUCGGCUUUCGACCAUCCACUCUCC (SEQ ID NO:18)

SEQ ID NO: 19

AUGGCAACUGGAUCAAGAACCUCUCCUCCUGCUCGCAUUCGGCCUGCUCUGUCUCC
 CAUGGCCUCCAAGAAGGAAGCGGUUCCCCACUAUCCCCCUCUCG (SEQ ID NO:19)

SEQ ID NO: 20

CGGUGGCAUCCUUGACCCUCCCCAGUGCCUCUCCUGGCCUGGAAGUUGCC
 ACUCCAGUGCCCACCAGCCUUGUCCUAAUAAAAUUAAAGUUGCAUCAAGCU

Аналоги.

Описание становится наиболее ясным в свете идей, представленных в ссылках, цитируемых в описании. Варианты реализации изобретения в описании предоставляют иллюстрацию вариантов реализации изобретения и не должны истолковываться как ограничивающие возможности изобретения. Специалист в данной области техники без труда поймет, что изобретение охватывает множество других вариантов реализации. Все публикации и патенты, указанные в данном документе, включены в качестве ссылки во всей их полноте. По мере того, как включенный посредством ссылок материал противоречит или не согласуется с этим описанием, данное описание заменяет любой такой материал. Цитирование любого источника в данном документе не означает, что такие источники являются первоочередными по отношению к данному изобретению.

Все числа, выражающие количества ингредиентов, условий реакции и тому подобные, использование в описании, включая формулу изобретения, следует понимать как приблизительные и способные меняться в зависимости от свойств, которые планируются получить с помощью данного изобретения. По меньшей мере и не в качестве попытки ограничить применение доктрины эквивалентов к объему форму-

лы изобретения, каждый числовой параметр следует истолковывать, принимая во внимание число значащих цифр и обычных подходов округления. Повторение серии чисел с различным числом значащих цифр в описании не должно быть истолковано как подразумевающее, что числа с меньшим количеством значащих цифр имеют такую же точность, как числа с большим количеством значащих цифр.

Использование единственного числа в сочетании с термином "содержащий" в формуле изобретения и/или в описании может означать "один", но это также согласуется со значением "один или более", "по меньшей мере один" и "один или более одного". Использование термина "или" в формуле изобретения используется для обозначения "и/или", если явно не указано, что это относится только к альтернативе или если варианты являются взаимоисключающими, хотя описание поддерживает определение, которое относится только к альтернативам и "и/или".

Термин "по меньшей мере", предшествующий ряду элементов, следует понимать как обозначение каждого элемента в последовательности, если не указано иное. Специалисты в данной области техники поймут или будут способны убедиться, используя не более, чем рутинные техники, множество эквивалентов к отдельным вариантам реализации изобретения, описанным в данном документе. Такие эквиваленты охватываются последующей формулой изобретения.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данной заявке, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом с обычной квалификацией в данной области техники, к которой это изобретение принадлежит. Хотя любые способы и материалы, аналогичные или эквивалентные тем, которые рассмотрены в данном описании, могут быть использованы в практике настоящего изобретения, предпочтительные способы и материалы описаны ниже.

Публикации, обсуждаемые в данном документе, приводятся исключительно для их раскрытия до даты подачи настоящей заявки. Ничто в данном документе не должно быть истолковано как признание того, что настоящее изобретение не может предшествовать такой публикации в силу ее предшества данному изобретению. Кроме того, приведенные даты публикации могут отличаться от фактических дат публикации, которые могут нуждаться в независимом подтверждении.

Благодаря этому описанию и раскрытым примерам, и другие варианты осуществления настоящего изобретения будут очевидны для среднего специалиста в данной области техники. Предполагается, что описание и примеры рассматриваются только в качестве иллюстрации, а истинная сущность и предназначение изобретения указаны в прилагаемой формуле изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ продукции белка регулятора трансмембранной проводимости при муковисцидозе (CFTR) в легком млекопитающего, указанный способ включает: введение в легкое указанного млекопитающего посредством аэрозолизации композиции, содержащей нагруженную мРНК наночастицу, при этом указанная наночастица представляет собой липосому, при этом указанная мРНК представляет собой *in vitro* транскрибируемую мРНК и имеет кодирующую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 3, при этом указанная мРНК кодирует белок CFTR человека, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и при этом указанная мРНК является немодифицированной.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанная мРНК имеет кодирующую последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 3.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанная мРНК имеет кодирующую последовательность, по меньшей мере на 100% идентичную SEQ ID NO: 3.

4. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанная мРНК содержит 5'-нетранслируемую область (UTR) и/или 3'-UTR.

5. Способ по п.4, отличающийся тем, что указанная 5'-UTR содержит SEQ ID NO: 4 и/или указанная 3'-UTR содержит SEQ ID NO: 5.

6. Способ по п.4, отличающийся тем, что указанная мРНК дополнительно содержит поли-А хвост.

7. Способ по п.6, отличающийся тем, что указанный поли-А хвост имеет длину по меньшей мере 70, 100, 120, 150, 200 или 250 остатков.

8. Способ по п.4, отличающийся тем, что указанная мРНК дополнительно содержит 5'-кэп.

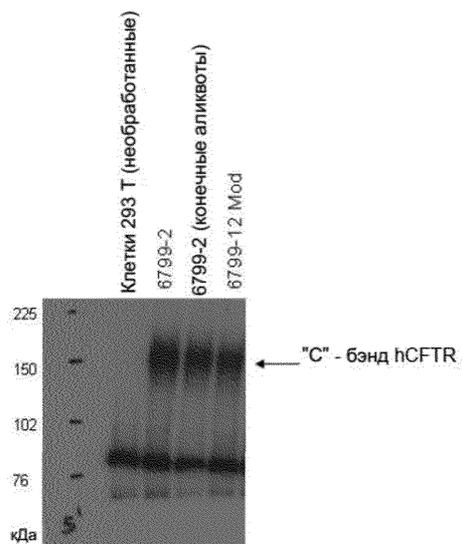
9. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанная аэрозолизация представляет собой небулизацию.

10. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанный белок CFTR человека экспрессируется в эпителиальных клетках легкого.

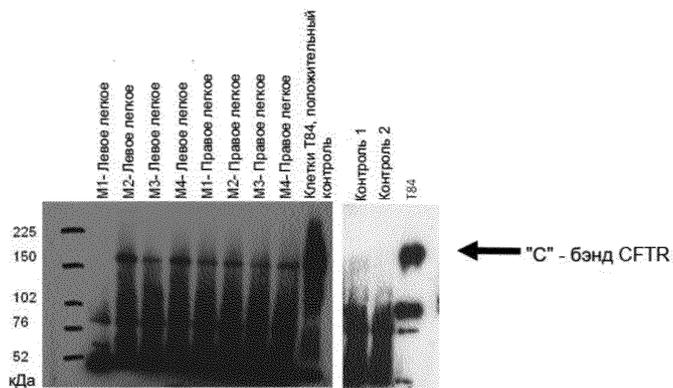
11. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанная композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель.

12. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанная липосома содержит один или более пегилированных липидов.

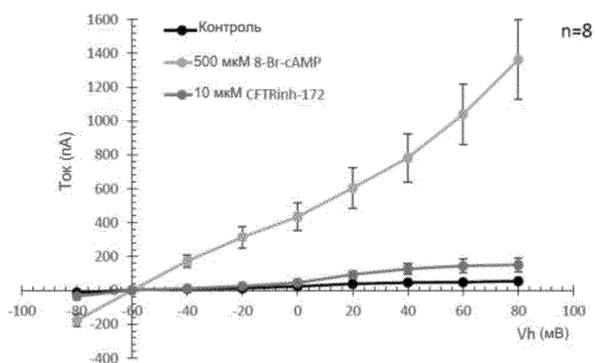
13. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанная липосома дополнительно содержит один или более катионных липидов и один или более некатионных липидов.



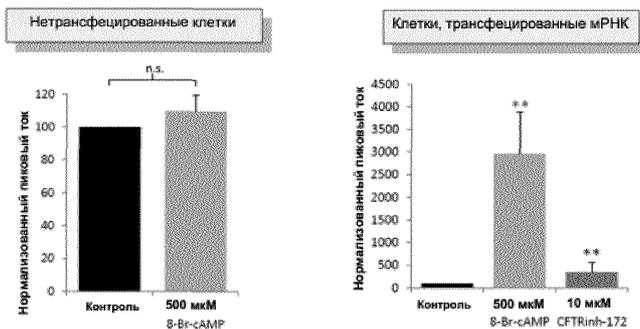
Фиг. 1А



Фиг. 1В



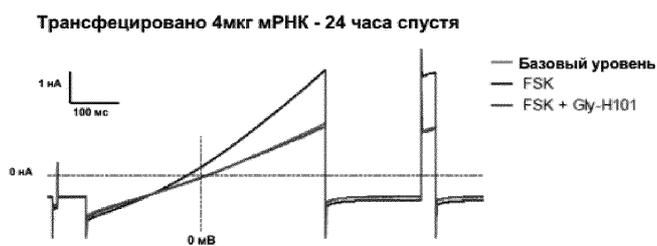
Фиг. 2



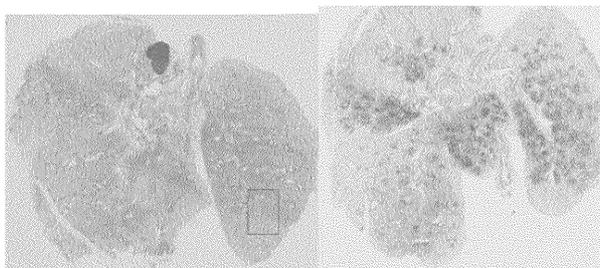
Фиг. 3



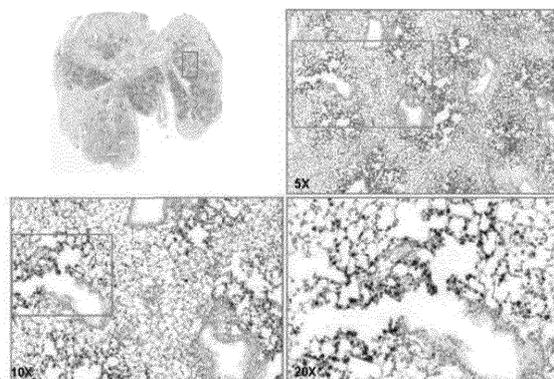
Фиг. 4



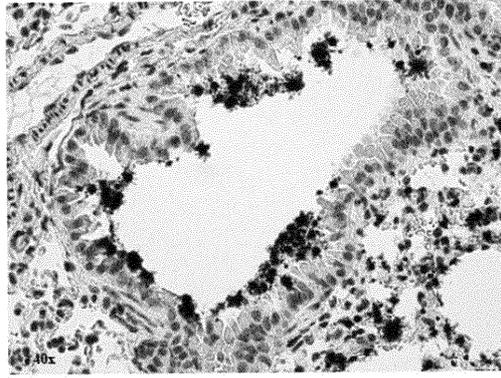
Фиг. 5



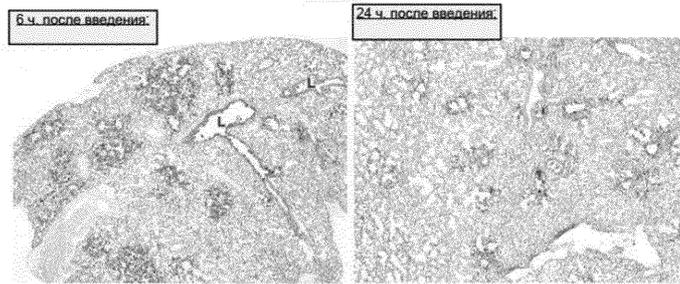
Фиг. 6



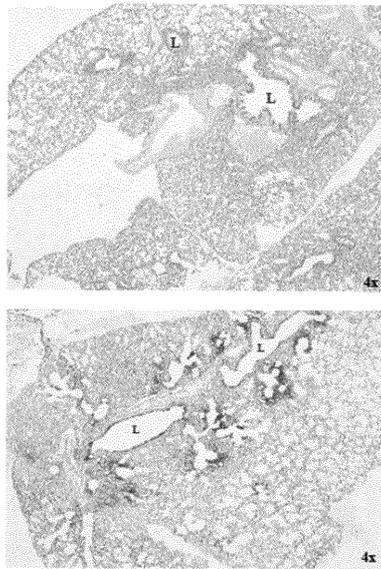
Фиг. 7



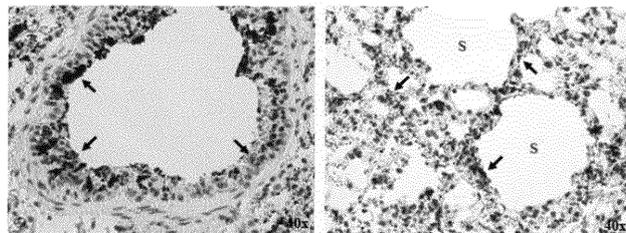
Фиг. 8



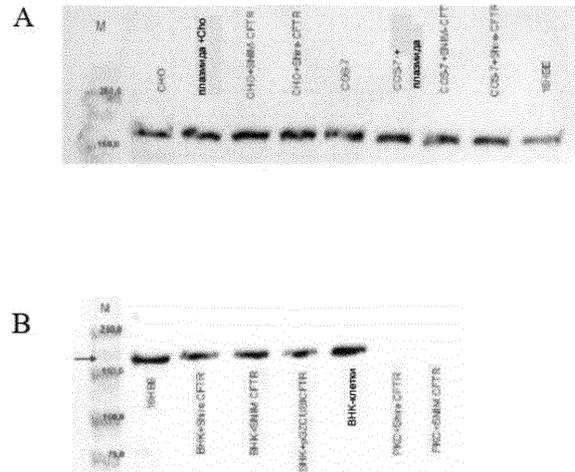
Фиг. 9



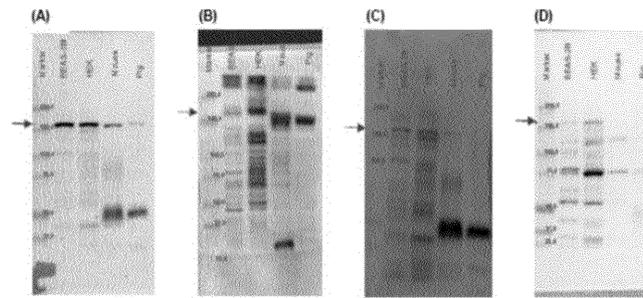
Фиг. 10



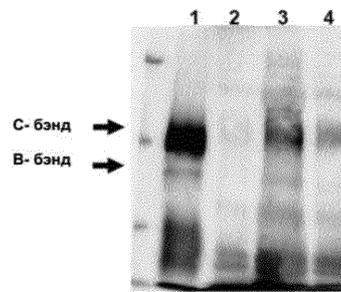
Фиг. 11



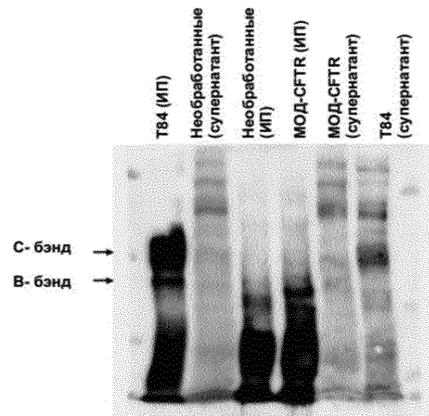
Фиг. 12А и В



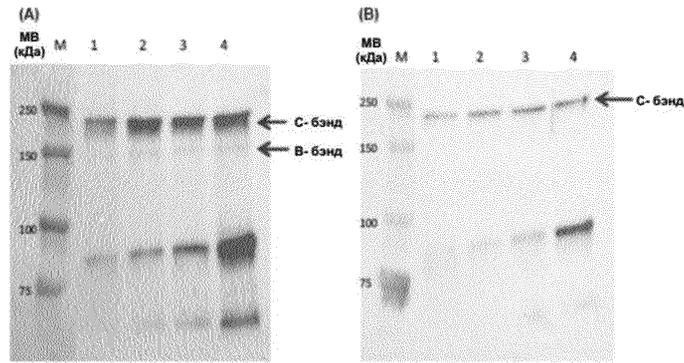
Фиг. 13А-Д



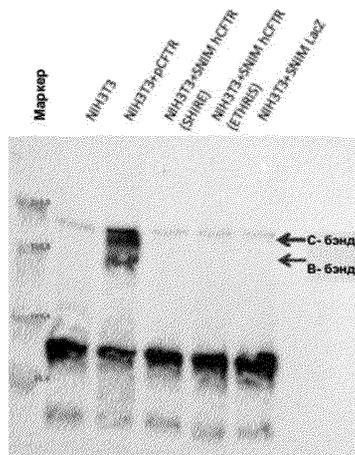
Фиг. 14



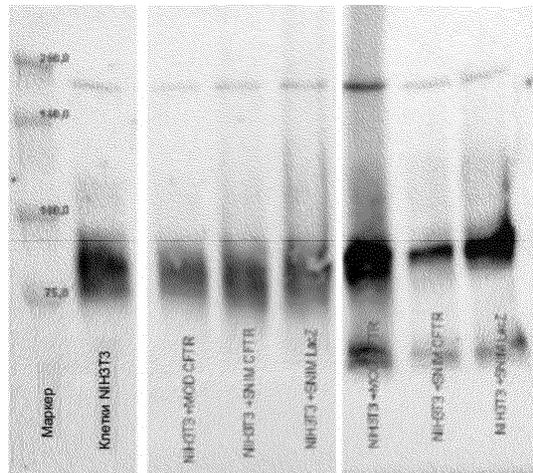
Фиг. 15



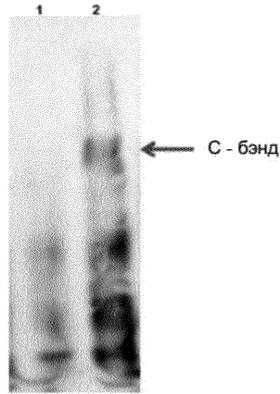
Фиг. 16А и В



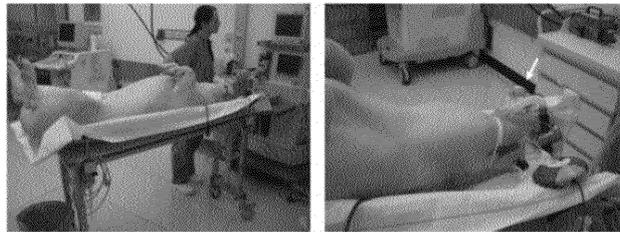
Фиг. 17



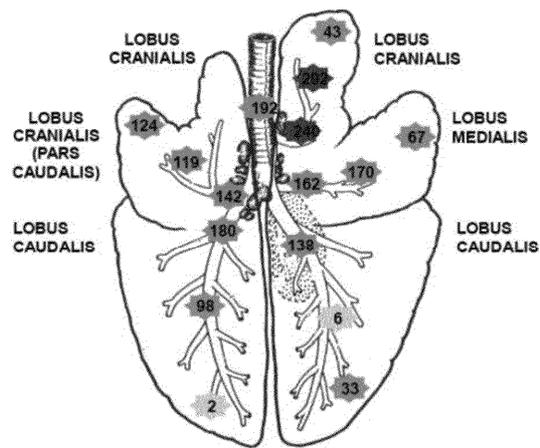
Фиг. 18



Фиг. 19

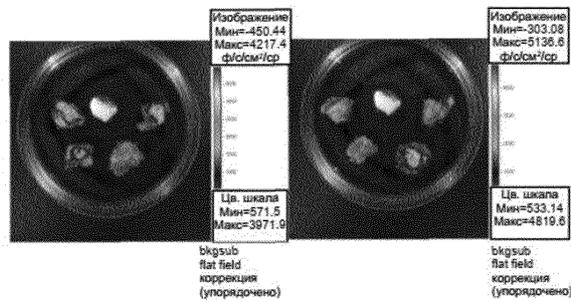


Фиг. 20

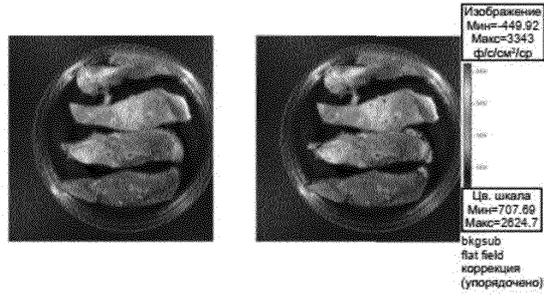


Дорзальный вид на свинью

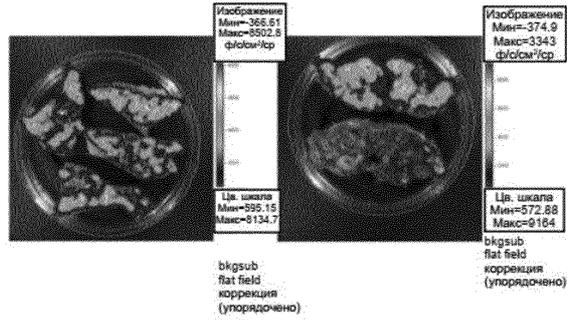
Фиг. 21



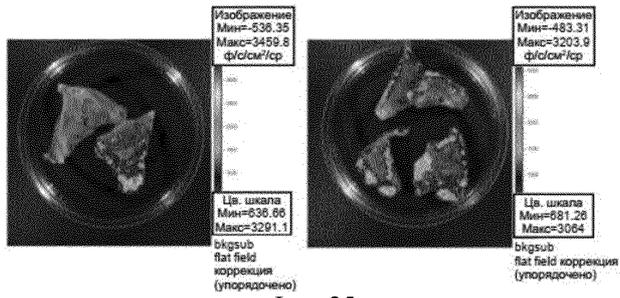
Фиг. 22



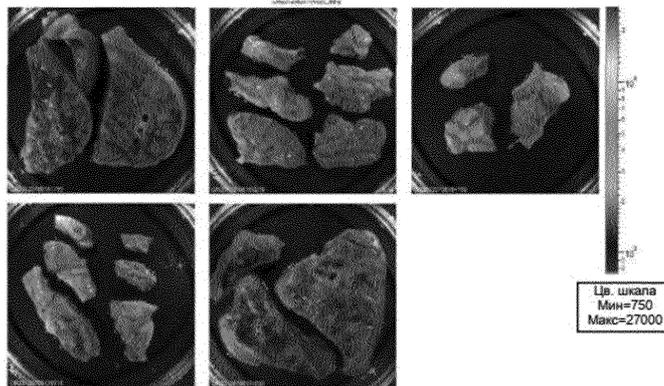
Фиг. 23



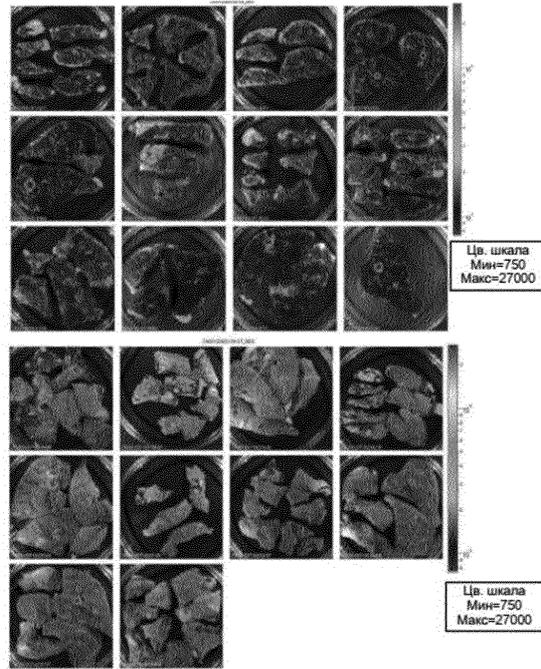
Фиг. 24



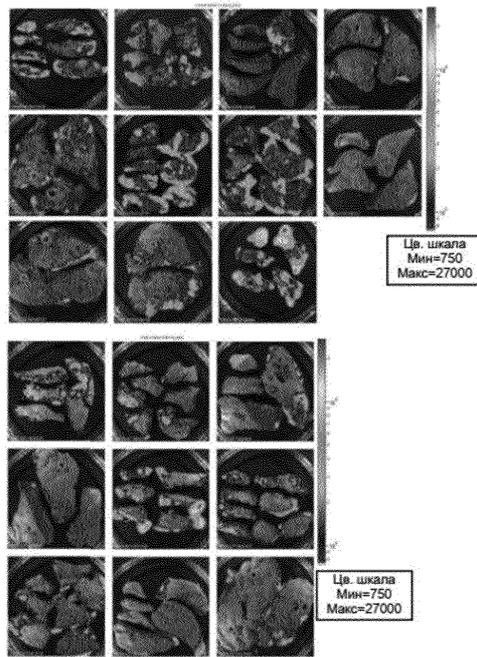
Фиг. 25



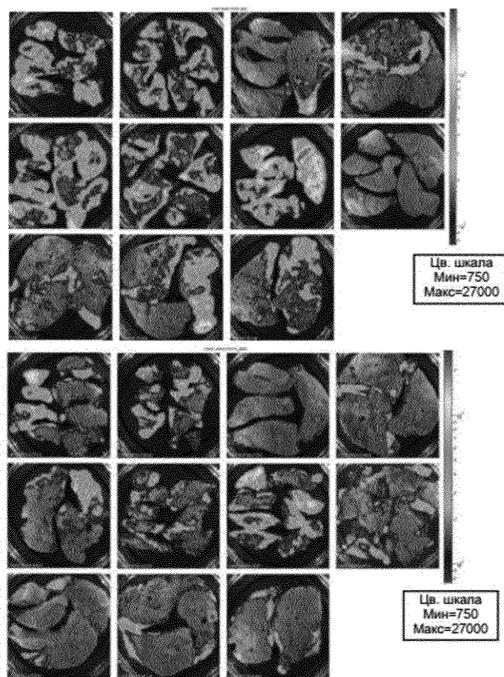
Фиг. 26



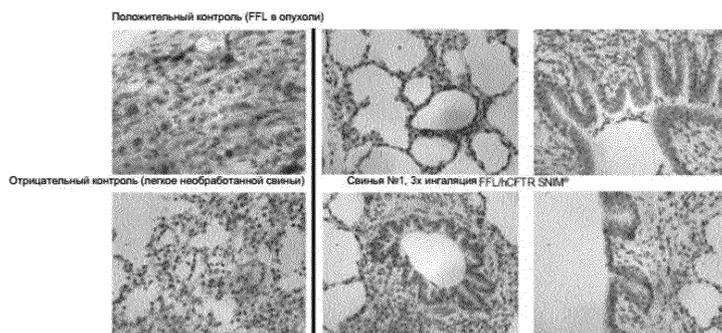
Фиг. 27



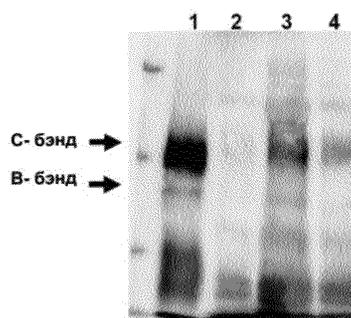
Фиг. 28



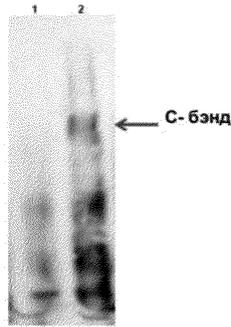
Фиг. 29



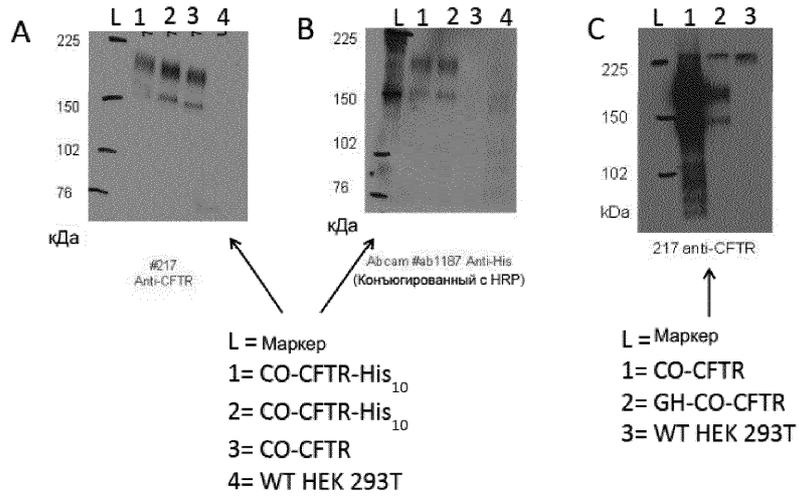
Фиг. 30



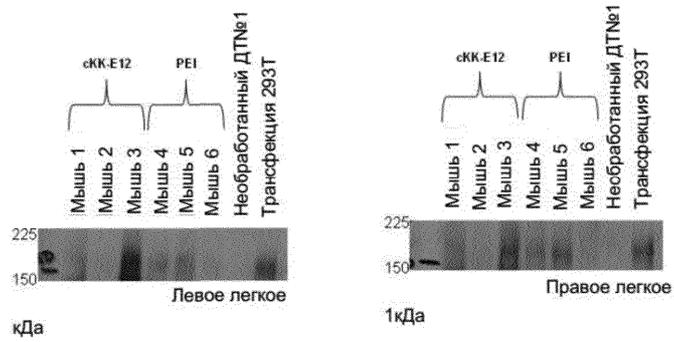
Фиг. 31



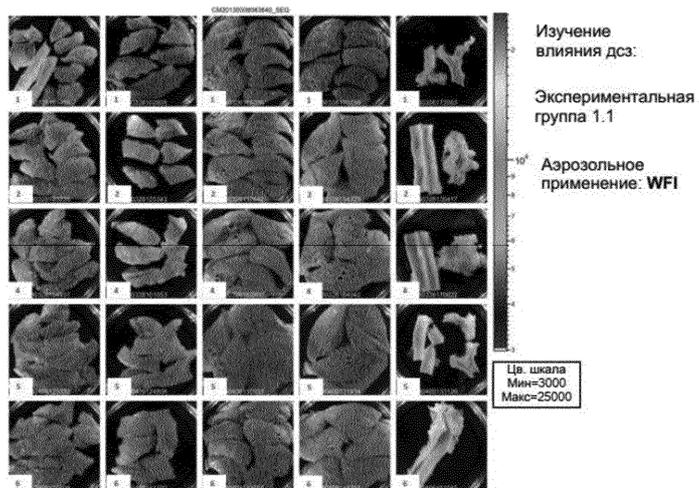
Фиг. 32



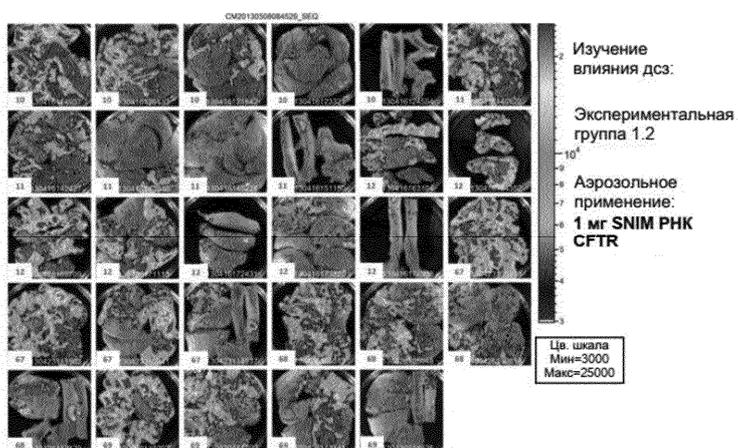
Фиг. 33



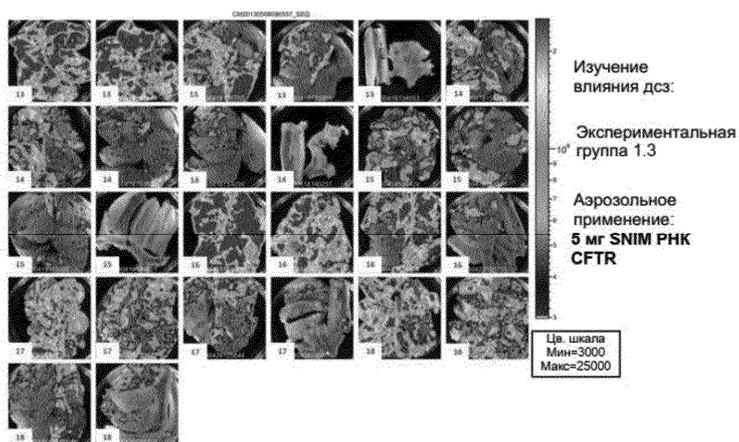
Фиг. 34



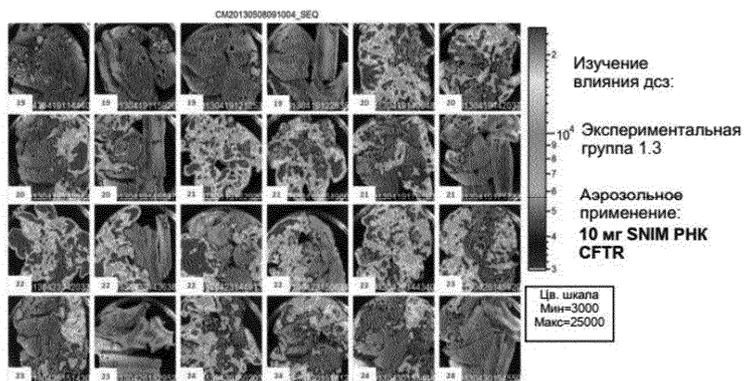
Фиг. 35



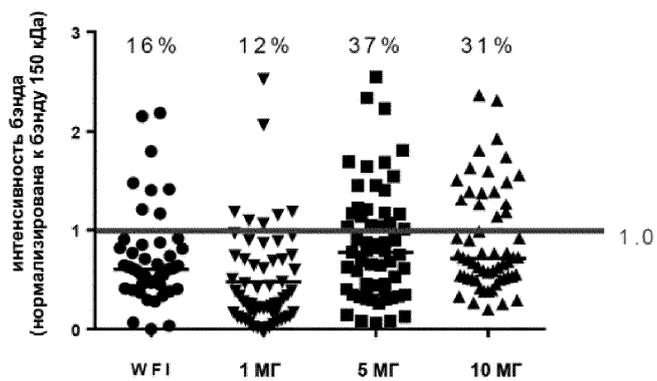
Фиг. 36



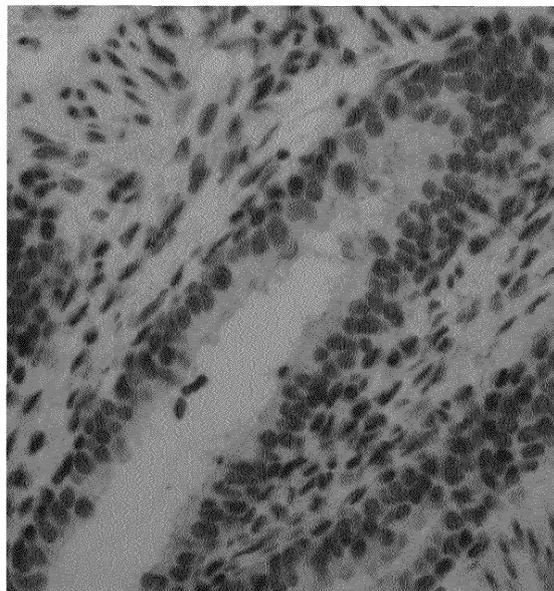
Фиг. 37



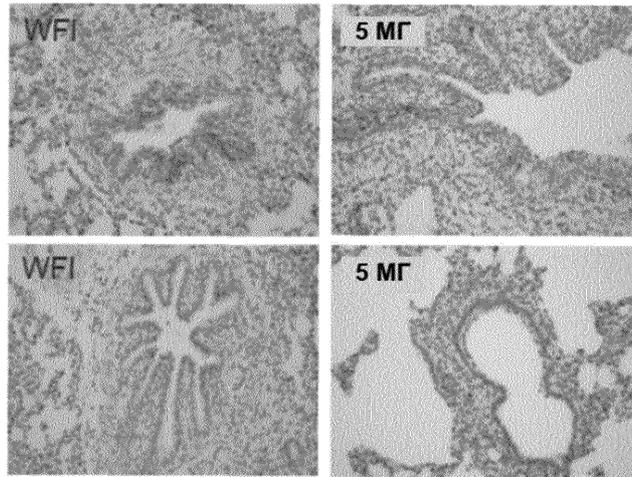
Фиг. 38



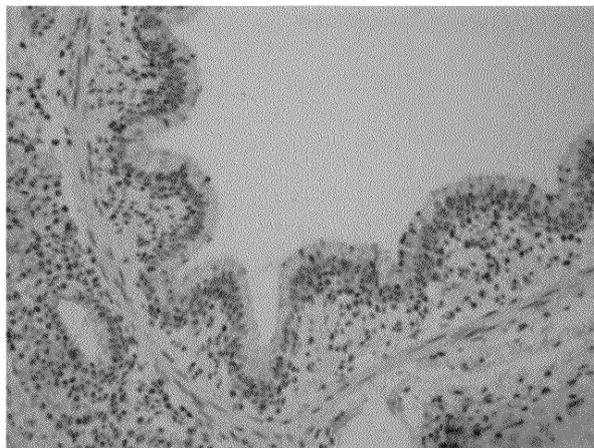
Фиг. 39



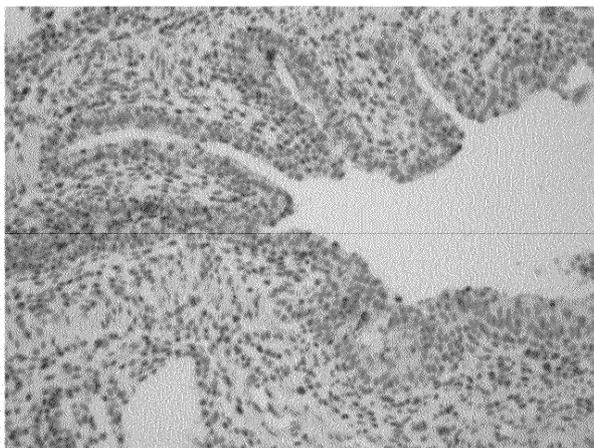
Фиг. 40



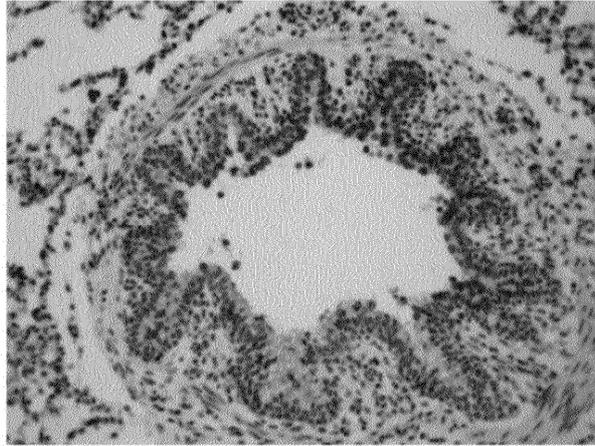
Фиг. 41



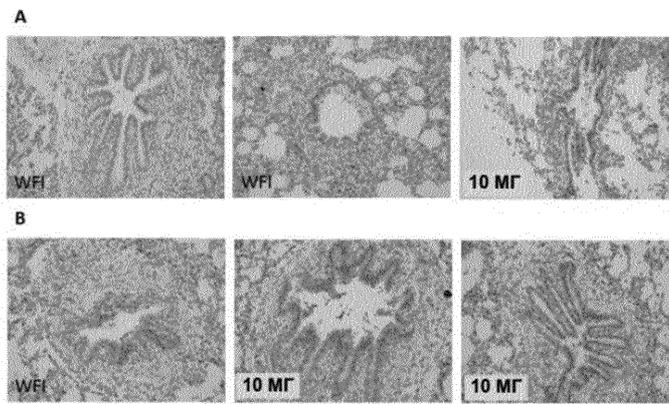
Фиг. 42



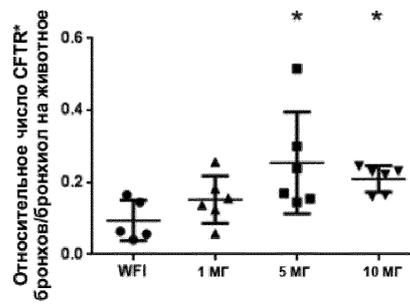
Фиг. 43



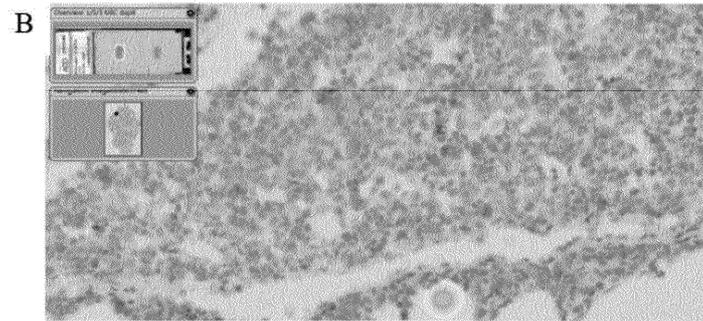
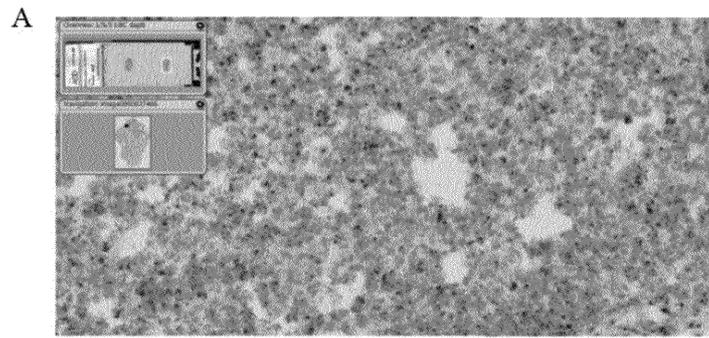
Фиг. 44



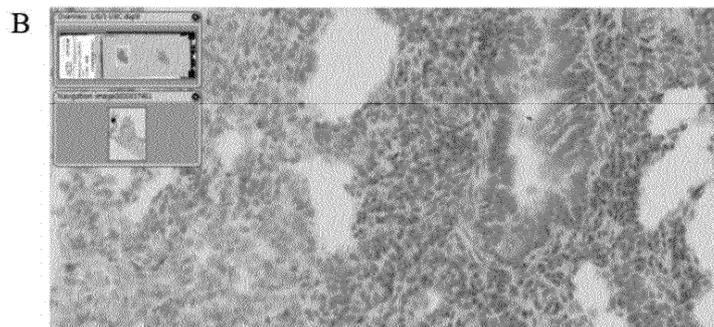
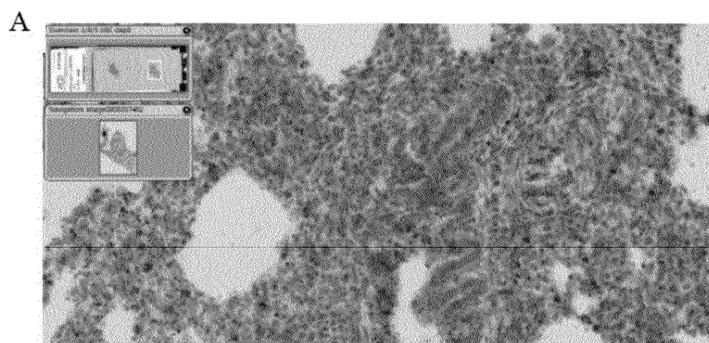
Фиг. 45



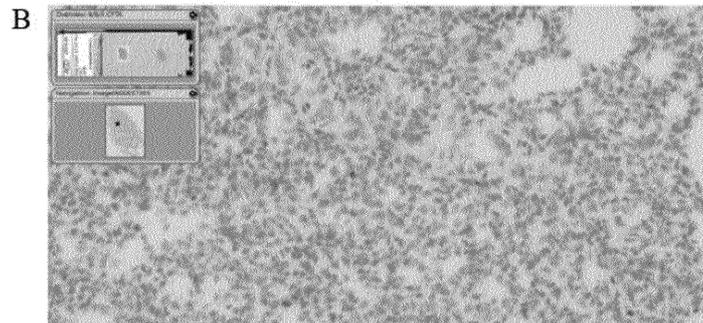
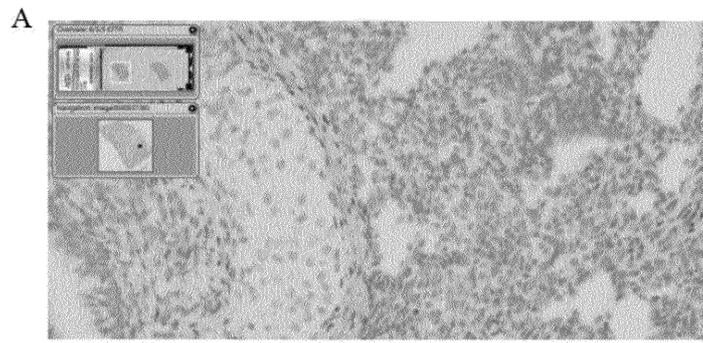
Фиг. 46



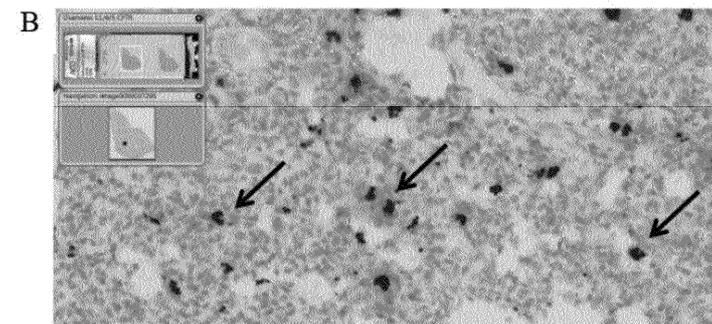
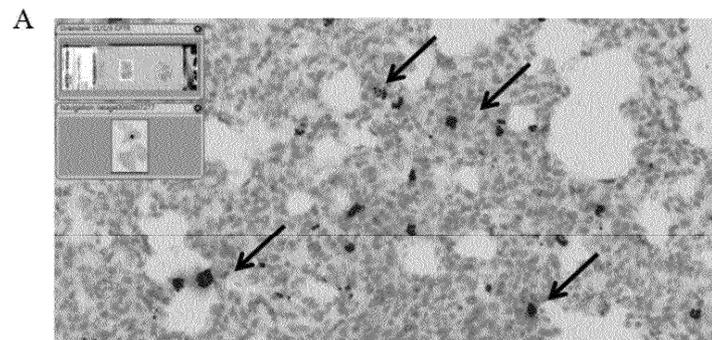
Фиг. 47А и В



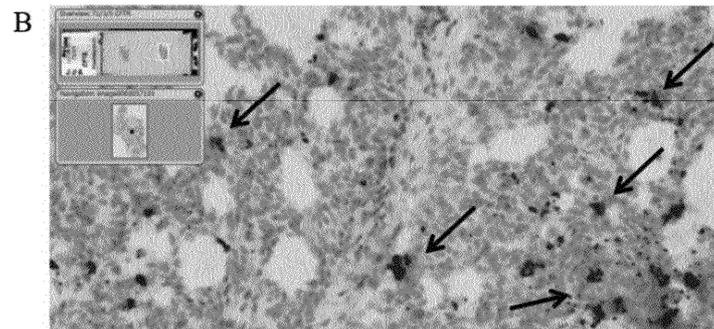
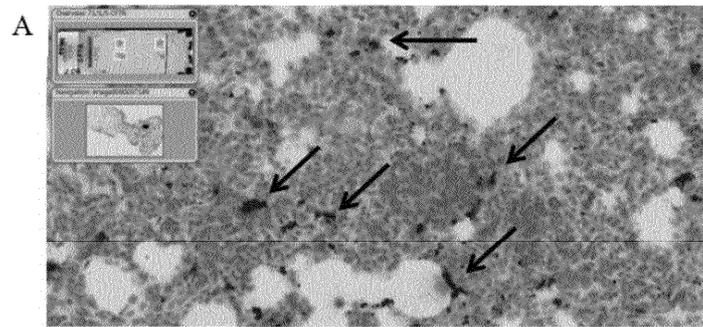
Фиг. 48А и В



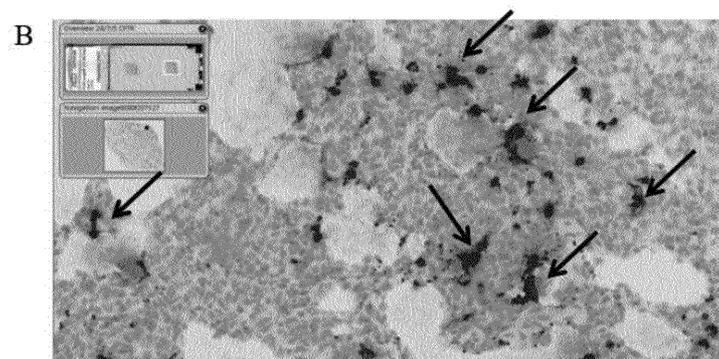
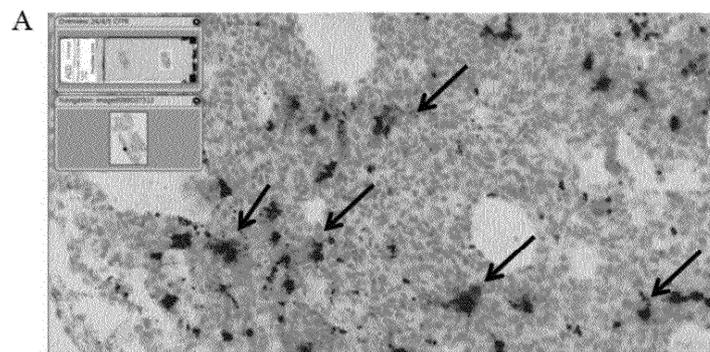
Фиг. 49А и В



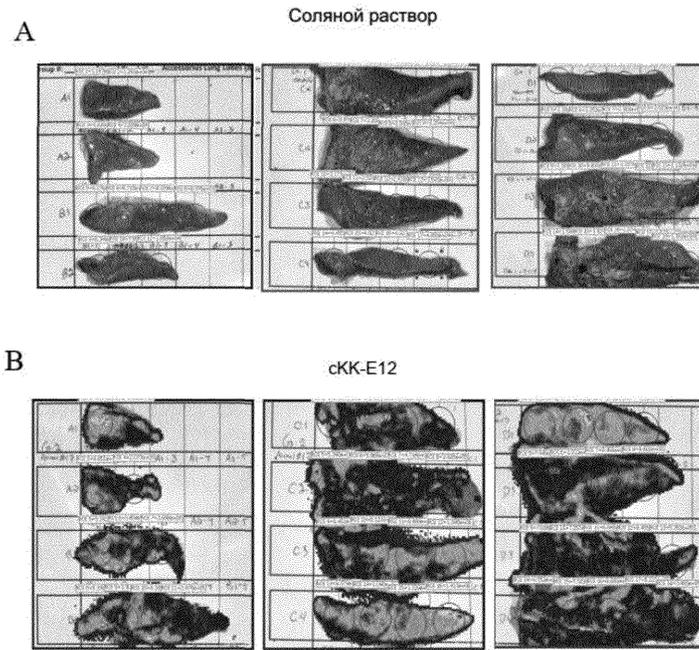
Фиг. 50А и В



Фиг. 51А и В

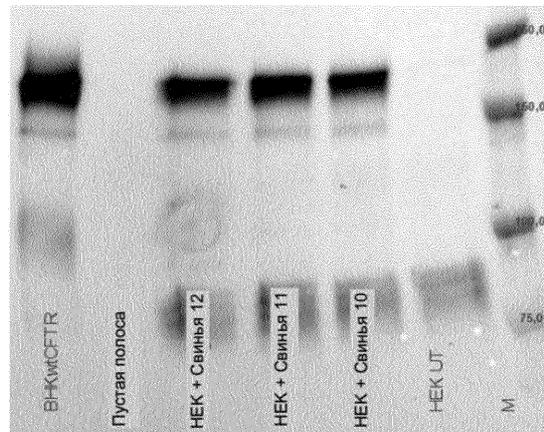


Фиг. 52А и В



Фиг. 53А и В

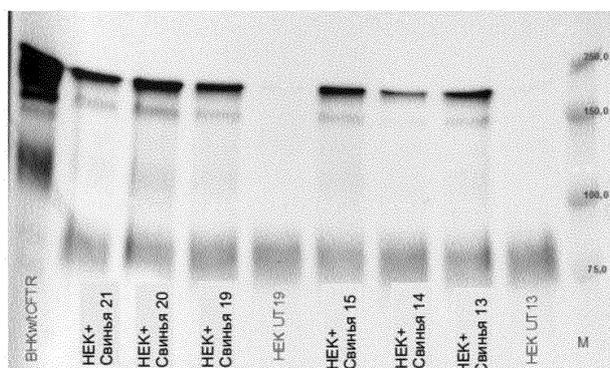
Клетки HEK трансфицированы с использованием комплексов, дававшихся свиньям 10, 11 и 12 (доза 1 мг)
 HEK-UT - нетрансфицированные клетки.



Фиг. 54

Клетки HEK трансфицированы с использованием комплексов, дававшихся свиньям 13, 14 и 15 (доза 5 мг)
 Клетки HEK трансфицированы с использованием комплексов, дававшихся свиньям 19, 20 и 21 (доза 10 мг)

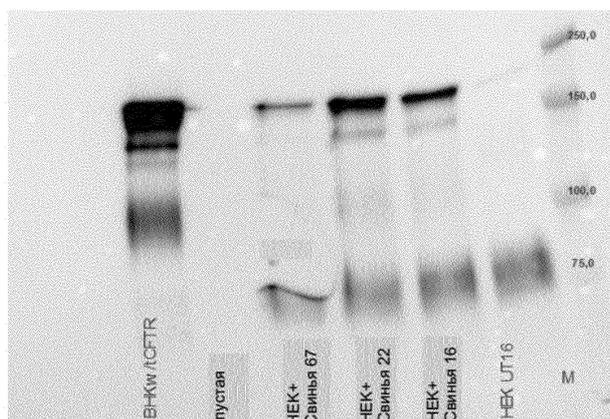
NEK-UT - нетрансфицированные клетки, использованные для комплексов из свиней 19-21
 NEK-UT - нетрансфицированные клетки, использованные для комплексов из свиней 13-25



Фиг. 55

Клетки HEK трансфицированы с использованием комплексов, дававшихся свиньям 16 (доза 5 мг), 22 (доза 10 мг) и 67 (доза 1 мг)

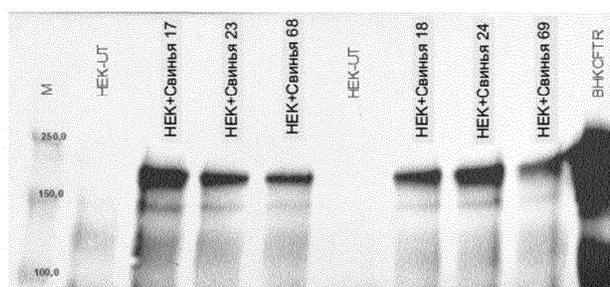
NEK-UT 16 - нетрансфицированные клетки, использованные для комплексов из свиней 16, 22 и 67



Фиг. 56

Клетки HEK трансфицированы с использованием комплексов, дававшихся свиньям 17-18 (доза 5 мг), 23-24 (доза 10 мг) и 68-69 (доза 1 мг)

NEK-UT - нетрансфицированные клетки



Фиг. 57



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2