

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 689 523**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7105 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2014 PCT/US2014/028849**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.09.2014 WO14153052**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2014 E 14718284 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.07.2018 EP 2968586**

54 Título: **Composiciones a base de ARNM del gen CFTR y métodos y usos relacionados**

30 Prioridad:

14.03.2013 US 201361783663 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

14.11.2018

73 Titular/es:

**TRANSLATE BIO, INC. (50.0%)
29 Hartwell Avenue
Lexington, MA 02421, US y
ETHRIS GMBH (50.0%)**

72 Inventor/es:

**HEARTLEIN, MICHAEL;
GUILD, BRAYDON, CHARLES;
DEROSA, FRANK;
RUDOLPH, CARSTEN;
PLANK, CHRISTIAN y
SMITH, LIANNE**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 689 523 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones a base de ARNm del gen CFTR y métodos y usos relacionados

5 ANTECEDENTES

[0001] La presente invención se refiere a composiciones de ARNm regulador de transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), usos de las mismas, y métodos de fabricación y usos de las mismas.

10 [0002] La fibrosis quística es un trastorno hereditario autosómico que resulta de la mutación del gen CFTR, que codifica un canal de iones de cloruro que se cree que está implicado En la regulación de múltiples otros canales iónicos y sistemas de transporte en células epiteliales. La pérdida de función de CFTR produce una enfermedad pulmonar crónica, producción de moco aberrante y una expectativa de vida dramáticamente reducida. Véase generalmente Rowe et al., *New Engl. J. Med.* 352, 1992-2001 (2005).

15 [0003] A pesar de la clonación del gen CFTR en 1989, la terapia eficaz para la sustitución de CFTR para el tratamiento de fibrosis quística todavía no se ha desarrollado. La literatura ha documentado numerosas dificultades encontradas al tratar de inducir la expresión de CFTR en el pulmón. Por ejemplo, los vectores virales que comprenden el ADN de CFTR desencadenaron respuestas inmunes y los síntomas de CF persistieron después de la administración. Conese y otros, *J. Cyst. Fibros.* 10 Suppl 2, S114-28 (2011); Rosenecker y col., *Curr. Opin. Mol. Ther.* 8, 439-45 (2006). También se ha informado que la administración no viral de ADN, incluido el ADN CFTR, desencadena respuestas inmunes. Alton y col., *Lancet* 353, 947 - 54 (1999); Rosenecker y col., *J Gene Med.* 5, 49-60 (2003). Además, los vectores de ADN no virales encuentran el problema adicional de que la maquinaria del complejo de poro nuclear no suele importar ADN al núcleo, donde se produciría la transcripción. Pearson, *Nature* 25 460, 164-69 (2009).

[0004] Otra fuente de dificultades En la inducción de la expresión de CFTR en el pulmón es el propio entorno de pulmón. Se ha informado que el agente tensioactivo pulmonar reduce la eficacia de transfección para vehículos de transferencia de lípidos catiónicos, tales como Lipofectamina (DOSPA: DOPE).

30 [0005] Ernst y col., *J. Gene Med.* 1, 331 - 40 (1999). Además, Rosenecker et al., 2003, supra, identificaron múltiples componentes inhibidores presentes en el líquido de la superficie de las vías respiratorias que pueden interferir con la transfección mediada por polímeros o mediada por lípidos. La terapia con ARN mensajero ha sido propuesta como un enfoque general para inducir la expresión de una proteína terapéutica o de reemplazo. El concepto de introducción de ARN mensajero (ARNm) como un medio de producción de proteína dentro de un hospedador se ha informado anteriormente (Yamamoto, A. y col., *Eur. J. Pharm.* 2009, 71, 484-489; Debus, H. et. al. *J. Control Rel.* 2010, 148, 334 - 343). Sin embargo, se ha informado de dificultades aparentes específicas de pulmón para la administración de ARNm usando ciertas formulaciones de lipoplexas. Por ejemplo, una comparación del rendimiento *in vitro* e *in vivo* de lipoplex portadores de ARNm o ADN reveló que, aunque la composición de ARNm daba una mayor expresión en células cultivadas, la expresión medida solo se detectó con la composición de ADN cuando se administró intranasalmente al pulmón de ratón. Andries et al., *Mol. Pharmaceut.* 9, 2136-45 (2012).

45 [0006] También hay que señalar que CFTR es un gen relativamente grande en relación con genes modelo o indicadores tales como luciferasa de luciérnaga (FFL). Compare las longitudes de la secuencia de codificación de CFTR de tipo salvaje (SEQ ID NO: 2) y la secuencia de codificación de FFL (SEQ ID NO: 7). La diferencia de longitud puede afectar la estabilidad en algunas circunstancias y, por lo tanto, si la cantidad de expresión de proteína generará una dosis determinada de ARNm y de qué manera. Además, aunque la síntesis *in vitro* de ARNm es generalmente preferible a la síntesis por células debido a la ausencia de ARNm celular normal y otros componentes celulares que constituyen contaminantes indeseables, la síntesis *in vitro* de ARNm con una secuencia codificante larga, tal como ARNm de CFTR, es sustancialmente más difícil de lograr que la síntesis *in vitro* de ARNm con una secuencia de codificación relativamente corta tal como FFL.

50 [0007] La publicación de patente PCT WO2007/024708 y las publicaciones de patente US2010/0203627 y US2011/0035819 discuten la administración terapéutica de ARNm de CFTR pero no proporcionan una reducción demostrada a la práctica de producción de CFTR funcional en el pulmón después de la administración de ARNm de CFTR o suficiente orientación para superar las dificultades asociadas con la inducción de la expresión de CFTR en el pulmón utilizando ARNm de CFTR transcrito *in vitro*. Estos incluyen dificultades para lograr la síntesis *in vitro* del ARNm y dificultades específicas de las interacciones de las composiciones de ARNm con sustancias específicas de pulmón que los investigadores tales como Andries et al., Supra, han demostrado que hacen que las composiciones de ARNm sean ineficaces para la inducción de la expresión incluso cuando las composiciones basadas en ADN sí proporcionaron algún nivel de expresión. El documento WO 2008/045548 describe un ARN CFTR reducido en CpG optimizado en codones.

65 [0008] Por lo tanto, hay una necesidad de materiales mejorados, formulaciones, métodos de producción, y métodos para la administración de CFTR ARNm para la inducción de la expresión de CFTR, incluyendo en el pulmón de mamífero, para el tratamiento de fibrosis quística.

SUMARIO DE LA INVENCION

- 5 [0009] La presente invención se basa, en parte, en el desarrollo de formulaciones de CFTR ARNm y de origen no natural CFTR ARNm y métodos de administración de los mismos que pueden inducir la expresión de CFTR funcional *in vivo*. Las composiciones, métodos y usos descritos en este documento pueden proporcionar expresión de CFTR en el pulmón de un mamífero grande con un perfil de seguridad favorable adecuado para el tratamiento eficaz de la fibrosis quística.
- 10 [0010] Específicamente, la invención proporciona un ARNm transcrito *in vitro* que comprende una secuencia codificante de al menos 80% idéntica a SEQ ID NO: 3 para su uso en el tratamiento de la fibrosis quística en un mamífero.
- 15 [0011] La invención proporciona además una composición que comprende un ARNm y un vehículo, en donde el ARNm es un transcrito *in vitro* de ARNm y tiene una secuencia de codificación al menos 80% idéntica a SEQ ID NO: 3.
- 20 [0012] La presente divulgación también proporciona un procedimiento de producción *in vivo* de CFTR, en particular, en el pulmón de un sujeto (por ejemplo, un mamífero) en necesidad de administración mediante la administración de un ARNm que codifica una proteína CFTR. El ARNm que codifica una proteína CFTR se puede administrar directamente al pulmón del sujeto. Como se usa en el presente documento, una "proteína CFTR" abarca cualquier fragmento, porción completa de una proteína CFTR que puede usarse para sustituir la actividad de la proteína CFTR de origen natural y/o reducir la intensidad, gravedad y/o frecuencia de uno o más síntomas asociados con la fibrosis quística. Por ejemplo, una proteína CFTR adecuada puede tener una secuencia de aminoácidos idéntica a la proteína CFTR humana de tipo salvaje (SEQ ID NO: 1).
- 25 [0013] La divulgación también proporciona un método de inducir la expresión de CFTR en las células epiteliales en un pulmón de un mamífero, el método comprende poner en contacto las células epiteliales en el pulmón del mamífero con una composición, en donde: la composición es una composición farmacéutica que comprende un ARNm transcrito *in vitro*; el ARNm transcrito *in vitro* comprende una secuencia codificante que codifica la SEQ ID NO: 1,
- 30 [0014] La divulgación también proporciona un método de inducir la expresión de CFTR en una célula diana de mamífero, el método comprende poner en contacto la célula diana de mamífero con una composición, comprendiendo la composición un transcrito *in vitro* de ARNm que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.
- 35 [0015] La descripción proporciona una molécula de ARNm de origen no natural que comprende una secuencia de codificación, un 5'-UTR, y un 3'-UTR, en donde la secuencia de codificación codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y la secuencia de codificación es al menos 80% idéntica a SEQ ID NO: 3. En un ejemplo, la secuencia de codificación es aproximadamente 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a SEQ ID NO: 3.
- 40 [0016] En otro ejemplo, la divulgación proporciona una composición que comprende el polinucleótido según la invención una polimerasa de ARN, y trifosfatos de nucleósidos.
- 45 [0017] En otro ejemplo, la divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende un ARNm según la invención.
- 50 [0018] La descripción proporciona un aparato de nebulización o aerosolización cargado con una composición farmacéutica descrita en el presente documento.
- [0019] La descripción proporciona una célula cultivada que comprende un ARNm tal como se describe en este documento y CFTR funcional expresada a partir del ARNm.
- 55 [0020] La descripción proporciona un uso de una composición farmacéutica como se describe en el presente documento para la inducción de expresión de CFTR funcional.
- 60 [0021] En otro ejemplo, la divulgación proporciona un método de inducir la expresión de CFTR en las células epiteliales en un pulmón de un mamífero, el método comprende poner en contacto las células epiteliales con una composición, donde la composición es una composición farmacéutica que comprende un ARNm tal como se describe en el presente documento.
- 65 [0022] En otro ejemplo, la divulgación proporciona un método de inducir la expresión de CFTR en una célula diana de mamífero, el método comprende poner en contacto la célula diana de mamífero con una composición, comprendiendo la composición un ARNm tal como se describe en el presente documento.
- [0023] En otra realización, la presente invención proporciona una composición para uso en un método de

tratamiento de la fibrosis quística mediante la administración a un sujeto en necesidad de tratamiento un ARNm que codifica una proteína CFTR según se describe en el presente documento. En una realización, el ARNm se administra al pulmón del sujeto. En una realización, el ARNm se administra por inhalación, nebulización, administración intranasal o aerosolización. En diversas realizaciones, la administración del ARNm da como resultado la expresión de CFTR en el pulmón del sujeto.

[0024] La presente divulgación proporciona una composición para uso en un método de tratamiento de la fibrosis quística mediante la administración al pulmón de un sujeto en necesidad de tratamiento de un ARNm que comprende una secuencia codificante que codifica SEQ ID NO: 1, En otra realización particular, la presente invención proporciona una composición para uso en un método para tratar la fibrosis quística administrando al pulmón de un sujeto que necesita tratamiento un ARNm que comprende una secuencia codificante de la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una composición para uso en un método para tratar la fibrosis quística administrando al pulmón de un sujeto que necesita tratamiento un ARNm que comprende una secuencia codificante de al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntica a SEQ ID NO: 3.

[0025] En otra realización, la descripción proporciona un método de fabricación de CFTR ARNm *in vitro*, que comprende poner en contacto un polinucleótido aislado como se describe en este documento con una polimerasa ARN en presencia de trifosfatos de nucleósidos, en donde: el polinucleótido aislado y la polimerasa ARN no están contenidas dentro de una célula; el polinucleótido aislado es un molde para la polimerasa ARN; y el polinucleótido aislado comprende un promotor unido operativamente a una secuencia de plantilla, y la polimerasa ARN sintetiza ARNm que comprende una secuencia de codificación que codifica SEQ ID NO: 1.

[0026] Otros objetos y ventajas de la invención se expondrán en parte En la descripción que sigue, y en parte será obvio a partir de la descripción, o puede aprenderse mediante la práctica de la invención. Los objetos y ventajas de la invención se realizarán y alcanzarán por medio de los elementos y combinaciones señaladas particularmente en las reivindicaciones adjuntas.

[0027] Se ha de entender que tanto la descripción general anterior como la siguiente descripción detallada son ejemplares y explicativas solamente y no son restrictivos de la invención, como se reivindica.

[0028] Los dibujos adjuntos, que se incorporan en y constituyen una parte de esta especificación, ilustran varias realizaciones de la invención y junto con la descripción, sirven para explicar los principios de la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0029] Los aspectos y ventajas anteriores de esta invención pueden ser evidentes a partir de la siguiente detallada descripción con referencia a los dibujos adjuntos.

Figura 1A. Detección de la banda "C" madura para la proteína CFTR humana 24 horas después de la transfección con ARNm de CFTR humano. Se observó una producción de proteína exitosa para ARNm no modificado y modificado (SNIM) (que comprende 25% de 2-tiouridina y 5-metilcitosina). La inmunoprecipitación se realizó usando el anticuerpo R&D Systems MAB25031 y la detección usando Ab570.

Figura 1B. Análisis de transferencia Western de pulmones de ratón CFTR KO 24 horas después de la exposición de PEI/nanopartículas de ARNm de CFTR humana no modificada. Los ratones se trataron mediante nebulización (nebulizador de chorro Pari Boy) en el transcurso de aproximadamente una hora. Se realizó la inmunoprecipitación de la proteína CFTR humana derivada según los métodos proporcionados. La banda "C" madura se detecta en todos los ratones tratados mientras que no se observa en los ratones de control.

Figura 2. Diagrama de voltaje de corriente de las corrientes evocadas de 8-Br-cAMP de las células HEK293T tratadas (4 µg de ARNm de hCFTR) y no tratadas. Se induce una gran corriente dentro de las células transfectadas con ARNm de hCFTR en comparación con las células no tratadas. Las células tratadas que se expusieron a un inhibidor específico de la proteína CFTR, CFTRinh-172, muestran una marcada reducción (~ 89%) en el flujo de corriente de iones Cl.

Figura 3. Diagramas de histograma de 8-Br-cAMP evocaron corrientes de células madre HEK293T tratadas (4 µg hCFTR) y no tratadas tras la aplicación de un potencial de membrana de +80mV. Se induce una corriente grande dentro de las células transfectadas con ARNm de hCFTR en comparación con las células no tratadas. Las células tratadas que se expusieron a un inhibidor específico de la proteína CFTR, CFTRinh-172, muestran una marcada reducción (~ 89%) en el flujo de corriente de iones Cl.

Figura 4. Diagrama de voltaje de corriente que compara los perfiles de células HEK 293 de exposición nativa, forskolina y GlyH-101. No se observaron cambios significativos En la corriente en ningún escenario.

Figura 5. Diagrama de voltaje-corriente de las corrientes evocadas por forskolina de las células HEK293 tratadas (4 µg de hCFTR) y no tratadas. Se induce una gran corriente dentro de las células transfectadas con ARNm de

hCFTR en comparación con las células no tratadas. Las células tratadas que se expusieron a un inhibidor específico de la proteína CFTR, GlyH-101, muestran una marcada reducción (~ 95%) en el flujo de corriente de iones Cl como se demuestra en el diagrama de pasos (+100 mV) en el lado derecho del gráfico.

5 **Figura 6.** Hibridación *in situ* de ARNm de CFTR humana en pulmones de ratón CFTR KO no tratados (PBS) (izquierda) y tratados (derecha). Los ratones se expusieron a 30 µg de ARNm de hCFTR no modificado encapsulado en nanopartículas de PEI mediante administración intratraqueal. Se observa tinción positiva sustancial a lo largo de ambos pulmones a las 24 horas después de la administración.

10 **Figura 7.** Hibridación *in situ* de pulmones de ratón CFTR KO tratados con ARNm de CFTR humano a diferentes vistas de aumento (hasta 20 aumentos). Los ratones se expusieron a 30 µg de ARNm de hCFTR no modificado encapsulado en nanopartículas de PEI mediante administración intratraqueal.

15 **Figura 8.** Sección pulmonar representativa de gran aumento (40x) que demuestra la hibridación *in situ* de pulmones de ratón CFTR KO tratados con ARNm de CFTR humano (derecha). Se detectó ARNm de CFTR humano en el citoplasma apical de las células epiteliales bronquiales diana 24 horas después de la administración. Los ratones se expusieron a 30 µg de ARNm de hCFTR no modificado encapsulado en nanopartículas de PEI mediante administración intratraqueal.

20 **Figura 9.** Comparación de la tinción de hibridación *in situ* de pulmones de ratón CFTR KO tratados con ARNm de CFTR humano a las seis horas (izquierda) y 24 horas (derecha) después de la administración. Los ratones se expusieron a 30 µg de ARNm de hCFTR no modificado encapsulado en nanopartículas de PEI mediante administración intratraqueal. Se observa tinción intracelular positiva intensa dentro de las seis horas a lo largo de ambos pulmones dentro de las regiones bronquial y alveolar, mientras que todavía se observa una tinción positiva sustancial a las 24 horas después de la administración.

25 **Figura 10.** Hibridación *in situ* de ARNm de CFTR humana en pulmones de ratón CFTR KO no tratados (PBS) (superior) y tratados (parte inferior). Los ratones se expusieron a 15 µg de ARNm de hCFTR no modificado encapsulado en nanopartículas de lípidos C12-200 vía administración intratraqueal. Se observa tinción positiva sustancial a lo largo de ambos pulmones a las 6 horas después de la administración.

30 **Figura 11.** Secciones pulmonares representativas de gran aumento (40x) que demuestran hibridación *in situ* de pulmones de ratón CFTR KO tratados con ARNm de CFTR humano. Se detectó ARNm de CFTR humana en el citoplasma apical de regiones epiteliales bronquiales diana (izquierda) e intracelular (derecha) seis horas después de la administración. Los ratones se expusieron a 15 µg de ARNm de hCFTR no modificado encapsulado en nanopartículas de lípidos C12-200 mediante administración intratraqueal.

35 **Figura 12.** Selección de diferentes líneas celulares para la expresión de hCFTR. Inmunotransferencia de células CHO y COS-7 (A) y BHK y PKC (B) transfectadas con construcciones de codificación de hCFTR. Los lisados de proteínas se prepararon 24 horas después de la transfección y se rastrearon usando MA1-935 como anticuerpo primario. La flecha indica CFTR putativo. Véase la discusión de la especificidad MA1-935 en el Ejemplo 6.

40 **Figura 13.** Reactividad cruzada de diferentes anticuerpos CFTR antihumanos. (A) - CFTR antihumano de ratón MA1-935 (Chemicon); (B) - CFTR antihumano de ratón AB570 (Fundación de Fibrosis Quística); (C) - CFTR antihumano de ratón AB596 (Fundación de Fibrosis Quística); (D) Conejo antihumano CFTR G449 (Universidad Rockefeller). La flecha indica CFTR.

45 **Figura 14.** Inmunoprecipitación de CFTR humano usando tres anticuerpos diferentes (R29, R66/17 y R66/16) seguido de inmunodetección usando AB596. Carril 1: células T84 (control positivo), Carril 2: tejido pulmonar de cerdo sin tratar (300 mg), Carril 3: tejido pulmonar de cerdo tratado (697 mg), Carril 4: tejido pulmonar de cerdo tratado (163 mg).

50 **Figura 15.** Inmunoprecipitación y transferencia de Western de un ratón a las 24 horas después de la aplicación por pulverización IT de 20 µg de ARN de SNIM de hCFTR/10 µg FFL SNIM RNA cada uno En la formulación HGT5001 del Ejemplo 6. Las células T84 sirvieron un control positivo que muestra la Banda C madura glucosilada y la banda B manosilada de hCFTR. La fracción de extracto celular remanente "sobrenadante" sin fracción inmunoprecipitada. Fracción inmunoprecipitada "IP".

55 **Figura 16.** Inmunoprecipitación de hCFTR de células T84 usando MAB25031 seguido de inmunodetección usando AB570 (A) y MAB1660 (B).

60 **Figura 17.** Inmunoprecipitación de CFTR de células NIH3T3 a las 72 horas después de la transfección con diferentes constructos.

65 **Figura 18.** Inmunoprecipitación de CFTR de células NIH3T3 a las 72 horas después de la transfección con diferentes constructos usando 500 ug de proteína y MAB1660 (paneles izquierdo y central) y una cantidad

incrementada de proteína total (8 mg) usando MAB25031 (panel derecho).

Figura 19. Inmunoprecipitación de hCFTR usando MAB25031 y posterior inmunodetección usando AB570 de muestras de pulmón de cerdo después de la administración de hCFTR SNIMRNA En la formulación de PEI del Ejemplo 6. Carril 1: muestra de lóbulo caudal izquierdo negativo de luciferasa de cerdo n° 2, Carril 2: muestra de regiones pulmonares positivas de luciferasa de cerdo n° 1,

Figura 20. La nebulización se realizó en cerdos anestesiados y ventilados (izquierda). El nebulizador estaba conectado en línea al sistema de ventilación (a la derecha, vea la flecha blanca).

Figura 21. Expresión de luciferasa medida en homogeneizados de muestras de tejido de cerdo de diferentes regiones pulmonares después de la administración en aerosol de 1 mg de ARN SNF de FFL En la formulación de PEI del Ejemplo 6 con el nebulizador de malla EFlow. Las muestras de pulmón se cultivaron ex vivo durante la noche antes de las mediciones de luciferasa (pg luciferasa/mg de tejido pulmonar).

Figura 22. BLI de expresión de luciferasa en muestras representativas de tejido de cerdo de diferentes regiones pulmonares después de la administración en aerosol de 1 mg de ARN SNF FFL En la formulación PEI del Ejemplo 6. Las muestras pulmonares se cultivaron ex vivo durante la noche antes de las mediciones.

Figura 23. Imágenes de BLI de la expresión de luciferasa en muestras de tejido de cerdo representativas de diferentes regiones pulmonares después de la administración en aerosol de 1 mg de ARN SNF de FFL En la formulación de PEI del Ejemplo 6 usando un nebulizador de chorro PARI BOY. Las muestras de pulmón se cultivaron ex vivo durante la noche antes de las mediciones.

Figura 24. BLI de la expresión de luciferasa en muestras de tejido de cerdo representativas de diferentes regiones pulmonares después de la administración en aerosol de cada ARN de SNIM de 1 mg de FFL y ARNm de hCFTR En la formulación de PEI del Ejemplo 6 usando un nebulizador de malla Aeroneb. Las muestras de pulmón se cultivaron ex vivo durante la noche antes de las mediciones.

Figura 25. BLI de expresión de luciferasa en muestras representativas de tejido de cerdo de diferentes regiones pulmonares después de la administración en aerosol de 1 mg de FFL SNIM RNA en "SHIRE Formulation #3" (HGT5001: DOPE: Chol: DMGPEG2K (50: 25: 20: 5) (relación molar) usando un nebulizador de malla Aeroneb. Las muestras de pulmón se cultivaron ex vivo durante la noche antes de las mediciones.

Figura 26. BLI de la expresión de luciferasa en muestras de tejido de cerdo de diferentes regiones pulmonares de un cerdo de control no tratado. El otro cerdo de control no tratado mostró el mismo resultado (datos no mostrados).

Figura 27. BLI de la expresión de luciferasa en muestras de pulmón de cerdos tratados una vez n° 3 y n° 6. La administración en aerosol de cada ARN de SNIM de 1 mg de FFL y de ARN de SNIM de hCFTR En la formulación de PEI del Ejemplo 6 se realizó usando un nebulizador de malla de Aeroneb. Se muestran rebanadas de todo el pulmón de cerdo. Tres filas superiores: cerdo n° 3, tres filas inferiores: cerdo n° 6.

Figura 28. BLI de la expresión de luciferasa en muestras de pulmón de cerdos tratados dos veces n° 4 y n° 8. La administración en aerosol de cada ARN de SNIM de 1 mg de FFL y de ARN de SNIM de hCFTR En la formulación de PEI del Ejemplo 6 se realizó usando un nebulizador de malla de Aeroneb. Se muestran rebanadas de todo el pulmón de cerdo. Tres filas superiores: cerdo n° 4, tres filas inferiores: cerdo n° 8.

Figura 29. BLI de la expresión de luciferasa en muestras de pulmón de cerdos tratados tres veces n° 1 y n° 2. La administración en aerosol de cada ARN de SNIM de 1 mg de FFL y ARN de SNIM de ARNm de hCFTR En la formulación de PEI del Ejemplo 6 se realizó usando un nebulizador de malla de Aeroneb. Se muestran rebanadas de todo el pulmón de cerdo. Tres filas superiores: cerdo n° 1, tres filas inferiores: cerdo n° 2.

Figura 30. Luciferasa IHC en tejido pulmonar de cerdo tratado tres veces n° 1, La administración en aerosol de cada ARN de SNIM de 1 mg de FFL y de ARN de SNIM de hCFTR En la formulación de PEI del Ejemplo 6 se realizó usando un nebulizador de malla de Aeroneb. La expresión de luciferasa apareció en color rosa rojizo (Anti-luciferasa pAb 1: 300, G7451, Promega, Refine AP-Kit, cromógeno: nueva fucsina).

Figura 31. El tejido pulmonar altamente positivo por BLI del cerdo n° 3 tratado triple se sometió a hCFTR IP/WB. Carril 1: células T84 (control positivo), Carril 2: tejido pulmonar de cerdo sin tratar (300 mg), Carril 3: tejido pulmonar de cerdo tratado (697 mg), Carril 4: tejido pulmonar de cerdo tratado (163 mg). El hCFTR complejo maduro glicosilado apareció como la llamada banda C dispersa. La hCFTR rica en manosa apareció como la llamada banda B más densa. Se observó la expresión de hCFTR en células T84 y tejido de pulmón de cerdo de ARN de SNIM de hCFTR tratado con cerdo n° 1, mientras que no se observó expresión de hCFTR en cerdos no tratados.

Figura 32. Inmunoprecipitación de hCFTR usando MAB25031 y posterior inmunodetección usando AB570 de muestras de pulmón de cerdo después de la administración de ARN de SNIM de hCFTR En la formulación de PEI del Ejemplo 6. Carril 1: muestra de lóbulo caudal izquierdo negativo de luciferasa de cerdo nº 2, Carril 2: muestra de regiones pulmonares positivas para luciferasa de cerdo nº 1,

Figura 33 A y B. En la transfección *in vitro* de células HEK 293T con C-terminal His₁₀ etiquetado (CO-CFTR-C-His₁₀) y no etiquetados (CO-CFTR) de codones optimizados CFTR ARN SNIM humano. Después de la transfección, el lisado de células completas se recogió y se analizó la expresión de CFTR humana mediante transferencia de Western utilizando (A) anticuerpo anti-CFTR nº 217 y (B) anticuerpo anti-His 1187. Las muestras transfectadas se compararon con lisado de control HEK 293T sin transfección (Carril 3).

Figura 33 C. En la transfección *in vitro* de células HEK 293T con SNIM ARN que codifica CFTR humano optimizado con codón con una secuencia líder de la hormona de crecimiento y una (GH-CO-CFTR) o SNIM ARN que codifica un C-terminal His₁₀ etiquetado CFTR humano optimizado por codón (CO-CFTR-C-His₁₀). Después de la transfección, se recogió lisado de tejido de pulmón derecho e izquierdo y se analizó la expresión de CFTR mediante transferencia de Western usando el anticuerpo anti-CFTR nº 217. Las muestras transfectadas se compararon con el lisado de control HEK 293T sin transfección (Carril 3).

Figura 34. En la transfección *in vivo* de ratones knockout CFTR con ARN CFTR SNIM humano optimizado con codón etiquetado de C-terminal His₁₀ encapsulado dentro de ya sea un lípido (CKK-E12) o formulación de nanopartículas poliméricas (PEI). Después de la administración nebulizada de cada formulación de ARNm respectiva, se recogió lisado de tejido de pulmón derecho e izquierdo y se analizó la expresión de CFTR mediante transferencia de Western usando anticuerpo anti-His 1187. Se utilizó tejido de pulso knockout CFTR de control y lisado CFT-Hisio HEK293 como controles negativos y positivos respectivamente.

Figura 35. Detección bioluminiscente de la expresión de FFL en muestras de pulmón de porcino recogidas después de la nebulización con agua para inyección.

Figura 36. Detección bioluminiscente de la expresión de FFL en muestras de pulmón de porcino recogidas después de la nebulización con 1 mg de ARN de SNIM de FIM + 1 mg de CO-CFTR SNIM ARN en una formulación de PEI ramificada de 25 kDa.

Figura 37. Detección bioluminiscente de la expresión de FFL en muestras de pulmón de porcino recogidas después de la nebulización con 1 mg de ARN de SNIM de FFL + 5 mg de CO-CFTR SNIM ARN en una formulación ramificada de PEI de 25 kDa.

Figura 38. Detección bioluminiscente de la expresión de FFL en muestras de pulmón de porcino recogidas después de la nebulización con 1 mg de ARN de SNIM de FFL + 10 mg de CO-CFTR SNIM ARN en una formulación ramificada de PEI de 25 kDa.

Figura 39. Cuantificación relativa de expresión de CFTR en diferentes cohortes. Las intensidades de banda se normalizaron a una banda de 150 kDa en la escala de proteínas.

Figura 40. Ejemplo representativo de un bronquio "CFTR-positivo" con al menos una célula epitelial detectada dentro de la capa de células epiteliales y que muestra una señal clara de CFTR localizada en la membrana mediante tinción inmunohistoquímica CFTR usando un anticuerpo anti-CFTR.

Figura 41. Tinción inmunohistoquímica de CFTR en pulmón porcino después de administración de control en aerosol (WFI) o 5 mg de CO-CFTR SNIM ARN.

Figura 42. Representa un nivel de expresión de CFTR "bajo" analizado en pulmón porcino mediante tinción inmunohistoquímica con anti-CFTR después de la administración en aerosol de 5 mg de CO-CFTR SNIM ARN.

Figura 43. Representa un nivel de expresión de CFTR "medio", ensayado en pulmón de cerdo mediante tinción inmunohistoquímica con anti-CFTR después de la administración en aerosol de 5 mg de CO-CFTR SNIM ARN.

Figura 44. Representa un nivel de expresión de CFTR "alto", ensayado en pulmón de cerdo mediante tinción inmunohistoquímica con anti-CFTR después de la administración en aerosol de 5 mg de CO-CFTR SNIM ARN.

Figura 45. Tinción inmunohistoquímica de CFTR en pulmón porcino después de administración de control en aerosol (WFI) o 10 mg de CO-CFTR SNIM ARN.

Figura 46. Cuantificación de números relativos de bronquios/bronquiolos CFTR-positivos por animal. Análisis de cada cohorte (WFI y 1 mg, 5 mg, 10 mg de CFTR humano SNIM ARN) 24 horas después de la administración de aerosol. La expresión de CFTR se normalizó a la intensidad de señal para el estándar de proteína de 150 kDa. (WFI = 9,4 ± 5,6%, 1MG = 15,2 ± 6,6%, 5MG = 25,4 ± 14,1%, 10MG = 20,9 ± 3,7%; WFI vs 5MG p = 0,0281, WFI

contra 10MG p = 0,0174)

Figura 47. Ilustra la detección *in situ* múltiple de ácido nucleico de (A) ubiquitina C y (B) *dap* B en pulmón porcino, suministro posterior en aerosol de agua para inyección por nebulizador.

Figura 48. Ilustra la detección *in situ* de ácido nucleico múltiple de (A) ubiquitina C y (B) *dap* B en pulmón porcino, administración posterior de aerosol de 1 mg de ARN SNF de FFL + 10 mg de CO-CFTR SNIM ARN en una formulación ramificada de PEI de 25 kDa .

Figura 49. Ilustra la detección *in situ* múltiple de ácido nucleico de (A) craneales derechos y (B) craneales izquierdos en administración porcina posterior a aerosol de agua para inyección por nebulizador.

Figura 50. Ilustra la detección *in situ* de ácidos nucleicos múltiples de (A) craneales derechos y (B) craneales izquierdos en administración porcina posterior a aerosol de 1 mg de ARN SNF de FFL + 1 mg de CO-CFTR SNIM ARN en una formulación de PEI ramificada de 25 kDa.

Figura 51. Ilustra la detección *in situ* múltiple de ácidos nucleicos de (A) craneales derechos y (B) craneales izquierdos en administración porcina posterior a aerosol de 1 mg de ARN SNF FFL + 5 mg de CO-CFTR SNIM ARN en una formulación de PEI ramificada de 25 kDa.

Figura 52. Ilustra la detección *in situ* múltiple de ácido nucleico de (A) craneales derechos y (B) craneales izquierdos en administración porcina posterior a aerosol de 1 mg de ARN SNF de FFL + 10 mg de CO-CFTR SNIM ARN en una formulación ramificada de PEI de 25 kDa.

Figura 53. Ilustra la detección positiva de la proteína de luciferasa de luciérnaga activa (FFL) en un pulmón de cerdo tratado mediante luminiscencia tras la exposición a nanopartículas lipídicas de cKK-E12 encapsuladas con ARNm de FFL/CO-CFTR-C-His10. Los cerdos se trataron con 1 mg de FFL + 9 mg de nanopartículas lipídicas encapsuladas con ARNm de CO-CFTR-C-His10 mediante nebulización utilizando un nebulizador jet Pari y se sacrificaron 24 horas después del tratamiento. La luminiscencia de FFL se visualizó usando un bioluminómetro de IVIS.

Figura 54. Ilustra ejemplos de resultados de la expresión de hCFTR en células HEK transfectadas usando complejos nebulizados administrados a los cerdos 10, 11 y 12 (dosis de 1 mg).

Figura 55. Ilustra ejemplos de resultados de la expresión de hCFTR en células HEK transfectadas usando complejos nebulizados administrados a los cerdos 13, 14 y 15 (dosis de 5 mg) y en células HEK transfectadas utilizando complejos nebulizados administrados a los cerdos 19, 20 y 21 (dosis de 10 mg) .

Figura 56. Ilustra ejemplos de resultados de la expresión de hCFTR en células HEK transfectadas utilizando complejos nebulizados administrados al cerdo 16 (dosis de 5 mg), 22 (dosis de 10 mg) y 67 (dosis de 1 mg).

Figura 57. Ilustra ejemplos de resultados de la expresión de hCFTR en células HEK transfectadas usando complejos nebulizados administrados a los cerdos 17, 18 (dosis de 5 mg), 23, 24 (dosis de 10 mg) y 68, 69 (dosis de 1 mg).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Definiciones

[0030] Tal como se utiliza aquí, el término "polinucleótido" se usa generalmente para referirse a un ácido nucleico (por ejemplo, ADN o ARN). Los términos polinucleótido, ácido nucleico, ADN, ARN y ARNm incluyen tales moléculas que están compuestas de: residuos estándar o no modificados; residuos no estándar o modificados; y mezclas de residuos estándar y no estándar.

[0031] Tal como se utiliza aquí, el término "ARNm" se utiliza para referirse a ARN modificado y no modificado que incluye tanto una región codificante como una región no codificante.

[0032] Tal como se utiliza aquí, la expresión de un ARNm "región codificante" se refiere generalmente a la porción que, cuando se traduce resulta en la producción de un producto de expresión, tal como un polipéptido, proteína o enzima.

[0033] Una "nucleobase no estándar" es un resto de base distinta de las bases adenina naturales (A), citosina (C), guanina (G), timina (T) o uracilo (U). La nucleobase no estándar es un análogo de una nucleobase específica (A, C, G, T o U) cuando sus propiedades de apareamiento de bases en una doble hélice de ácido nucleico y el locus de incorporación por ADN o polimerasa ARNs en una doble hélice de ácido nucleico (incluyendo una hélice de ARN-ADN local tal como la formada durante la transcripción de un molde de ADN por polimerasa ARN) son muy similares

a una de las cinco nucleobases enumeradas anteriormente, con la excepción de que los análogos de T generalmente también serán análogos de U y viceversa. Para los propósitos de determinar el porcentaje de identidad de una primera secuencia con respecto a una segunda secuencia, un análogo de una base no es un desajuste con la base natural; por ejemplo, pseudouridina coincide con uridina, 5-metilcitosina coincide con citidina, etc.

[0034] El término "no estándar" que se utiliza en conjunción con términos incluyendo, pero no limitado a "nucleósido", "base", "nucleótido", o "residuo" debe interpretarse de la misma manera como si se utiliza en conjunción con "nucleobase".

[0035] El "contenido de GC" es la fracción o porcentaje de residuos de nucleobases totales en una secuencia de ácido nucleico que son residuos de guanina, restos de citosina o análogos de los mismos. Por ejemplo, una secuencia de 100 nt que contiene exactamente 30 citosinas, exactamente 30 guaninas, exactamente un análogo de citosina y exactamente un análogo de guanina tiene una riqueza de GC del 62%.

[0036] Como se usa en este documento, un "codón desfavorecido" se refiere a un codón que se traduce de manera menos eficiente o rápidamente por células de mamífero que otro codón para el mismo residuo de aminoácido. Los codones desfavorecidos generalmente incluyen codones con una A o U En la posición 3ª o "oscilación" del codón. Para una discusión de codones desfavorecidos, véase, por ejemplo, la publicación de patente de Estados Unidos 2009/0069256 A1.

[0037] Una "molécula de ARNm de origen no natural " es un ARNm que no se produce a través de procesos de transcripción y de empalme normales de las células de tipo salvaje. Un ARNm puede calificarse como no natural en virtud de su secuencia (por ejemplo, una serie de codones y/o uno o más UTR que no están presentes en cualquier ARNm de CFTR de origen natural) y/o porque incluye residuos de nucleótidos no convencionales. Una molécula de ARNm no natural se puede sintetizar *in vitro*.

[0038] En cada una de las Tablas 1 y 2 a continuación, la columna NWT indica la base no salvaje en la posición (Pos.) en la secuencia codificadora CFTR (véase, por ejemplo, SEQ ID NO: 3), y la columna WT indica la base de tipo salvaje en la misma posición (véase, por ejemplo, SEQ ID NO: 2 o la entrada RefSeq para CFTR humana (número de acceso NM_000492.3, 10 de febrero de 2013, versión, disponible en GenBank; tenga en cuenta que la secuencia de NM_000492.3 contiene una secuencia no codificante de manera que la secuencia de codificación se produce en la posición 133 a 4575, de modo que, por ejemplo, la posición 7 en las tablas siguientes corresponde a la posición 139 de la secuencia NM_000492.3).

ARNm de CFTR no natural

[0039] Además de proporcionar métodos de producción de CFTR funcional *in vivo* utilizando ARNm de CFTR de origen natural o de tipo salvaje (y composiciones que comprenden que el ARNm), la descripción también proporciona ARNm de CFTR no natural que codifica la proteína CFTR (por ejemplo, SEQ ID NO: 1). En algunas realizaciones se purifica o se aísla, el ARNm de CFTR no natural.

[0040] En otras realizaciones, el ARNm de CFTR de origen no natural está presente en una célula. En algunas realizaciones, la célula que comprende el ARNm de CFTR no natural no sintetiza el ARNm de CFTR no natural y/o no comprende ADN complementario al ARNm de CFTR no natural y/o un gen de CFTR funcional; la célula puede comprender opcionalmente un gen CFTR inactivo, tal como un gen CFTR con una mutación sin sentido, desplazamiento de marco, inserción o delección que hace que el producto de expresión del gen no sea funcional. En algunas realizaciones, la célula que comprende el ARNm de CFTR que no se produce de manera natural comprende adicionalmente la proteína CFTR funcional traducida a partir del ARNm de CFTR no natural. La célula puede ser, por ejemplo, una célula epitelial de pulmón, una célula de hígado o una célula de riñón. En algunas realizaciones, la célula está en un cultivo celular.

Secuencia de codificación CFTR

[0041] El ARNm de CFTR descrito en este documento comprende una secuencia de codificación con menos complementos de promotores crípticos que SEQ ID NO: 2 (es decir, la secuencia de codificación CFTR humano de tipo salvaje), un menor número de repeticiones directas y/o invertidas que SEQ ID NO: 2, menos codones desfavorecidos que SEQ ID NO: 2, y/o el contenido de GC de la secuencia de codificación es menor que el contenido de GC de SEQ ID NO: 2.

[0042] Los promotores crípticos, las repeticiones directas y/o invertidas y/o los codones desfavorables de una secuencia pueden ser reconocidos por un experto en la técnica usando métodos rutinarios. Por ejemplo, el contenido de repetición directa y/o invertida de una secuencia se puede determinar por análisis de secuencia (Liu et al., Journal of Theoretical Biology (2014) 344: 19-30). El contenido del promotor críptico de una secuencia también puede determinarse por análisis de secuencia, por ejemplo, presencia de secuencias de Shine-Dalgarno dentro de una construcción o similar.

[0043] El ARNm de CFTR de acuerdo con la invención está transcrito *in vitro*, es decir, el ARNm se sintetizó en un entorno artificial no dentro de una célula biológica (por ejemplo, un sistema de transcripción *in vitro* de células libres). Generalmente, la transcripción *in vitro* implica proporcionar una plantilla de ADN que comprende un promotor y una secuencia complementaria al ARNm deseado (que puede ser circular o lineal), una polimerasa ARN y trifosfatos de nucleósidos en condiciones de reacción adecuadas (sales, tampones y temperatura). Los inhibidores de la RNasa, los agentes reductores y/o la pirofosfatasa pueden estar presentes En la mezcla de reacción. En algunas realizaciones, la polimerasa ARN es polimerasa ARN de T7.

Tabla 1. Bases de tipo no silvestre que se pueden utilizar en la secuencia de codificación de CFTR que codifica ARNm.

Pos.	NWT	WT	Pos.	NWT	WT	Pos.	NWT	WT
7	c	a	87	g	a	175	c	a
12	c	g	91	a	c	177	c	a
15	g	u	93	g	c	180	a	g
18	c	g	96	u	g	183	c	g
30	u	c	99	g	a	186	g	u
33	c	u	105	u	a	189	u	a
36	g	c	111	c	a	198	c	u
45	c	u	117	g	a	201	g	u
48	c	u	123	c	u	204	g	a
52	u	a	126	g	u	210	c	u
53	c	g	129	a	u	213	c	u
54	a	c	135	g	u	216	a	c
60	u	c	138	g	u	219	g	u
61	c	a	141	u	c	220	a	c
63	g	a	144	c	u	222	a	g
66	u	a	147	c	a	223	a	c
69	c	u	150	g	u	225	g	a
70	c	u	153	g	a	228	c	u
72	u	g	156	g	a	231	c	u
75	a	g	157	c	u	238	c	a
78	g	a	159	c	g	240	g	a
81	g	a	163	c	a	243	c	u
84	u	c	165	g	a	252	c	u
85	c	a	174	c	u	255	u	a

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

ES 2 689 523 T3

5

Pos.	NWT	WT
261	c	u
264	g	a
268	c	u
270	c	a
276	g	a
282	a	c
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

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Pos.	NWT	WT
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

Pos.	NWT	WT
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

ES 2 689 523 T3

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Pos.	NWT	WT
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
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

Pos.	NWT	WT
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

Pos.	NWT	WT
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

ES 2 689 523 T3

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Pos.	NWT	WT
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
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

Pos.	NWT	WT
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

Pos.	NWT	WT
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

ES 2 689 523 T3

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Pos.	NWT	WT
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
1830	u	a
1836	g	a
1839	g	u
1845	g	a
1848	c	a
1849	c	u
1851	g	a

Pos.	NWT	WT
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

Pos.	NWT	WT
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

ES 2 689 523 T3

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Pos.	NWT	WT
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

Pos.	NWT	WT
2258	c	g
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
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

Pos.	NWT	WT
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

ES 2 689 523 T3

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Pos.	NWT	WT
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

Pos.	NWT	WT
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
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

Pos.	NWT	WT
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

ES 2 689 523 T3

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Pos.	NWT	WT
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

Pos.	NWT	WT
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
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

Pos.	NWT	WT
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

ES 2 689 523 T3

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Pos.	NWT	WT
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

Pos.	NWT	WT
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

Pos.	NWT	WT
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
3954	c	u
3957	g	a
3960	c	u
3969	c	g
3972	u	c
3973	c	a
3975	g	a
3976	a	u

ES 2 689 523 T3

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Pos.	NWT	WT
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
4118	c	g
4119	g	u
4122	c	u
4126	c	u

Pos.	NWT	WT
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

Pos.	NWT	WT
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
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
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

Tabla 2. Subconjunto de bases de tipo no silvestre que se pueden utilizar en la secuencia de codificación de CFTR que codifica ARNm.

5	Pos.	NWT	WT	Pos.	NWT	WT	Pos.	NWT	WT
	7	c	a	186	g	u	385	u	c
	15	g	u	189	u	a	390	u	c
	18	c	g	201	g	u	396	c	u
10	33	c	u	213	c	u	399	c	g
	45	c	u	216	a	c	409	u	c
	54	a	c	225	g	a	412	u	c
	60	u	c	238	c	a	417	u	c
15	61	c	a	240	g	a	423	a	c
	63	g	a	252	c	u	429	c	u
	66	u	a	255	u	a	435	c	u
	72	u	g	270	c	a	444	c	u
20	81	g	a	282	a	c	447	u	a
	84	u	c	291	c	a	457	c	a
	85	c	a	294	a	g	462	c	a
	87	g	a	304	u	c	492	a	u
25	93	g	c	309	u	a	498	a	g
	96	u	g	310	c	a	501	c	g
	126	g	u	312	c	a	504	g	a
	129	a	u	315	u	c	507	g	c
30	135	g	u	318	c	a	510	g	u
	138	g	u	324	g	c	514	u	c
	141	u	c	327	c	u	525	u	a
	147	c	a	333	c	g	526	u	a
35	150	g	u	342	a	g	527	c	g
	159	c	g	345	a	g	531	c	u
	163	c	a	351	g	c	534	u	a
	165	g	a	369	c	a	538	u	c
40	175	c	a	372	g	c	544	u	a
	177	c	a	375	c	a	545	c	g
	180	a	g	378	a	c	555	u	c
45	183	c	g	384	u	c	558	u	c

50

55

60

65

ES 2 689 523 T3

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Pos.	NWT	WT
564	c	g
573	c	u
588	g	a
615	g	u
624	c	g
631	u	c
642	u	a
645	u	c
663	a	g
672	u	c
684	a	u
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

Pos.	NWT	WT
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

Pos.	NWT	WT
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

ES 2 689 523 T3

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Pos.	NWT	WT
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

Pos.	NWT	WT
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

Pos.	NWT	WT
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

ES 2 689 523 T3

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Pos.	NWT	WT
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

Pos.	NWT	WT
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

Pos.	NWT	WT
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

ES 2 689 523 T3

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Pos.	NWT	WT
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

Pos.	NWT	WT
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
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

Pos.	NWT	WT
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
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

5
10
15
20
25
30

Pos.	NWT	WT
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
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

Pos.	NWT	WT
4188	g	a
4206	u	c
4207	c	a
4209	u	g
4212	c	a
4224	c	g
4242	u	g
4248	c	a
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

Pos.	NWT	WT
4335	u	c
4344	a	g
4347	u	c
4353	a	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

35
40

[0044] La presente invención comprende un ARNm de CFTR de origen no natural que comprende una secuencia codificante de la SEQ ID NO: 3 para su uso en el tratamiento de la fibrosis quística en un mamífero. Se describen secuencias codificantes de ARNm de CFTR no naturales ejemplares adicionales en la sección Breve Descripción de Secuencias, tal como, por ejemplo, SEQ ID NOS: 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 17. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un ARNm de CFTR que comprende una secuencia codificante al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a cualquiera de SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, un ARNm de CFTR no natural comprende una 5'UTR, 3'UTR, una secuencia de codificación del péptido señal o una estructura de tapa o cola como se describe a continuación.

45
50

[0045] ARNm de CFTR descritos anteriormente que comprende la secuencia que difiere de la secuencia de codificación de tipo salvaje CFTR puede proporcionar ventajas con respecto a la eficacia y facilidad de preparación de codificación. Por ejemplo, las reacciones de transcripción *in vitro* que usan un polinucleótido que comprende una secuencia molde que se complementa con la secuencia codificante de CFTR pueden proporcionar un mayor rendimiento de ARN; un polinucleótido que comprende dicha secuencia molde puede ser más estable (es decir, menos propenso a la mutación) durante el crecimiento en una célula hospedadora, reduciendo la cantidad de purificación necesaria para generar un molde utilizable en una reacción; y la traducción *in vivo* de un ARNm que comprende la secuencia codificante puede ser mayor.

Secuencia de péptidos señal

55
60

[0046] En algunas realizaciones, un ARNm que codifica una proteína CFTR incorpora una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido señal. Como se usa en este documento, el término "péptido señal" se refiere a un péptido presente en una proteína recién sintetizada que puede dirigir la proteína hacia la ruta secretora. En algunas realizaciones, el péptido señal se escinde después de la transposición en el retículo endoplásmico después de la traducción del ARNm. El péptido señal también se denomina secuencia señal, secuencia líder o péptido líder. Típicamente, un péptido señal es un péptido corto (por ejemplo, 5-30, 5-25, 5-20, 5-15 o 5-10 aminoácidos de longitud). Un péptido señal puede estar presente en el extremo N de una proteína recién sintetizada. Sin desear estar ligado a ninguna teoría particular, la incorporación de una secuencia que codifica un péptido señal en un ARNm que codifica CFTR puede facilitar la secreción y/o la producción de la proteína CFTR *in vivo*.

65

[0047] Un péptido señal adecuado para uso con la presente invención puede ser una secuencia heterogénea derivada de diversas proteínas eucariotas y procariotas, en particular, las proteínas secretadas. En algunas realizaciones, un péptido señal adecuado es una secuencia rica en leucina. Véase Yamamoto Y et al. (1989), *Biochemistry*, 28: 2728 - 2732. Un péptido señal adecuado puede derivarse de una hormona de crecimiento humano

(hGH), preproteína de albúmina sérica, precursor de cadena ligera Ig kappa, preproteína de Azurocidina, precursor de cistatina-S, precursor de tripsinógeno 2, bloqueador de canales de potasio, conotoxina alfa 1p1.3, conotoxina alfa, alfa-galactosidasa, celulosa, proteinasa aspártica nepentesina-1, quitinasa ácida, preproxina K28, precursor de zygocina toxina asesina y toxina del cólera. Las secuencias peptídicas señal ejemplares se describen en Kober, et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 110: 1164-73, 2012.

[0048] En algunas realizaciones, un ARNm que codifica CFTR puede incorporar una secuencia que codifica un péptido señal derivada de la hormona de crecimiento humana (hGH), o un fragmento de la misma. A continuación se muestra una secuencia de nucleótidos no limitante que codifica un péptido señal de hGH.

Secuencia de la hormona de crecimiento humana 5' (hGH) (SEQ ID NO: 18):

```
AUGGCCACUGGAUCAAGAACCUCACUGCUCGCUUUUGGACUGCUUUGCCUGC
CCUGGUUGCAAGAAGGAUCGGCUUCCCGACCAUCCACUCUCC
```

Secuencia de la hormona de crecimiento humana 5' alternativa (hGH) (SEQ ID NO: 19):

```
AUGGCAACUGGAUCAAGAACCUCUCCUGCUCGCAUUCGGCCUGCUCUGUCUCC
CAUGGCUCCAAGAAGGAAGCGCGUUCUCCACUAUCCCCUCUCG
```

[0049] En algunas realizaciones, un ARNm según la presente invención puede incorporar una secuencia de péptido señal de codificación que tiene al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad con la SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 19.

5'-UTR, 3'-UTR, cola de poli-A, tapa y residuos de nucleótidos no estándar

[0050] En algunas realizaciones, el ARNm comprende una secuencia en su extremo 5' UTR que es idéntica a SEQ ID NO: 4 o es al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 98% o al menos un 99% idéntica a la SEQ ID NO: 4.

[0051] En algunas realizaciones, el ARNm comprende una secuencia en su 3'-UTR que es idéntica a la SEQ ID NO: 5 o es al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 98%, o al menos el 99%, idénticas a la SEQ ID NO: 5.

[0052] En algunas realizaciones, el ARNm comprende una cola poli-A. En algunas realizaciones, la cola de poli A tiene una longitud de al menos 70, 100, 120, 150, 200, 250, 300, 400 o 500 residuos. En algunas realizaciones, la cola de poli A tiene una longitud que varía de 70 a 100, 100 a 120, 120 a 150, 150 a 200 o 200 a 300, 300 a 400 o 400 a 500 residuos. Las colas de poli A se pueden agregar usando una variedad de técnicas reconocidas en la técnica. Por ejemplo, se pueden añadir largas colas de poli A a ARN transcrito sintético o *in vitro* usando polimerasa de poli A (Yokoe, y col., *Nature Biotechnology*, 1996; 14: 1252-1256). Un vector de transcripción también puede codificar colas largas de poli A. Además, las colas de poli A se pueden agregar mediante transcripción directamente de productos de PCR. El poli A también se puede ligar al extremo 3' de un ARN sentido con ligasa de ARN (véase, por ejemplo, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 2ª edición, editado por Sambrook, Fritsch y Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: edición de 1991)). En algunas realizaciones, se puede usar una cola poli-U o poli-C en su lugar o además de una cola poli-A. Por ejemplo, los ARNm que codifican CFTR pueden incluir una estructura de cola poli(C) 3'. Una cola poli-C adecuada en el extremo 3' del ARNm incluye típicamente entre 10 y 200 nucleótidos de citosina (por ejemplo, aproximadamente 10 a 150 nucleótidos de citosina, aproximadamente 10 a 100 nucleótidos de citosina, aproximadamente 20 a 70 nucleótidos de citosina, aproximadamente 20 a 60 nucleótidos de citosina, o aproximadamente 10 a 40 nucleótidos de citosina). La cola de poli-C se puede agregar a la cola poli-A o puede sustituir a la cola poli-A.

[0053] En algunas realizaciones, el ARNm comprende una tapa 5', por ejemplo, una estructura de CAP1. Para las enzimas y procedimientos de encapsulado de ARNm, véase, por ejemplo, Fechter, P.; Brownlee, G.G. "Recognition of mRNA cap structures by viral and cellular proteins" *J. Gen. Virology* 2005, 86, 1239-1249; Publicación de patente europea 2 010 659 A2; Patente de EE.UU. N° 6.312.926. Típicamente, se añade una cápsula 5' de la siguiente manera: primero, una fosfatasa terminal de ARN elimina uno de los grupos fosfato terminales del nucleótido 5', dejando dos fosfatos terminales; el trifosfato de guanosina (GTP) se agrega después a los fosfatos terminales a través de una transferasa de guanililo, produciendo un enlace trifosfato 5'5'; y el nitrógeno 7 de la guanina es luego metilado por una metiltransferasa. Los ejemplos de estructuras de tapa incluyen, pero sin limitación, m7G(5')ppp(5')A, G(5')ppp(5')A y G(5')ppp(5')G.

[0054] En algunas realizaciones, el ARNm comprende uno o más residuos de nucleótidos no estándar. Los residuos de nucleótidos no estándar pueden incluir, por ejemplo, 5-metil-citidina ("5mC"), pseudouridina ("ψU") y/o 2-tio-uridina ("2sU"). Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 8.278.036 o WO2011012316 para una discusión de dichos residuos y su incorporación en ARNm. En algunas realizaciones, el ARNm puede ser ARN de SNIM. Como se usa en el presente documento, SN IM ARN es un acrónimo de ARN mensajero no inmunogénico estabilizado, que designa ARN mensajeros producidos por transcripción *in vitro* (IVT) que incluyen ciertos porcentajes de nucleótidos modificados en la reacción de IVT como se describe en la publicación PCT WO 2011/012316. El ARN SNIM utilizado en los ejemplos divulgados en este documento se produjo mediante IVT en donde el 25% de los restos U eran 2-tio-uridina y el 25% de los residuos C eran 5-metilcitidina. La presencia de residuos de nucleótidos no estándar puede hacer que un ARNm sea más estable y/o menos inmunogénico que un ARNm de control con la misma secuencia, pero que contenga solo residuos estándar. En otras realizaciones, el ARNm puede comprender uno o más residuos de nucleótidos no estándar elegidos entre isocitosina, pseudoisocitosina, 5-bromouracilo, 5-propiniluracilo, 6-aminopurina, 2-aminopurina, inosina, diaminopurina y citosina de 2-cloro-6-aminopurina, así como combinaciones de estas modificaciones y otras modificaciones de nucleobases. Ciertas realizaciones pueden incluir adicionalmente modificaciones adicionales al anillo de furanosa o nucleobase. Las modificaciones adicionales pueden incluir, por ejemplo, modificaciones o sustituciones de azúcar (por ejemplo, una o más de una modificación de 2'-O-alquilo, un ácido nucleico bloqueado (LNA)). En algunas realizaciones, los ARN pueden complejarse o hibridar con polinucleótidos y/o polinucleótidos peptídicos (PNA) adicionales. En realizaciones en las que la modificación de azúcar es una modificación de 2'-O-alquilo, dicha modificación puede incluir, pero sin limitación, una modificación 2'-deoxi-2'-fluoro, una modificación de 2'-O-metilo, una Modificación 2'-O-metoxietilo y una modificación 2'-desoxi. En ciertas realizaciones, cualquiera de estas modificaciones puede estar presente en 0-100% de los nucleótidos, por ejemplo, más de 0%, 1%, 10%, 25%, 50%, 75%, 85%, 90%, 95 %, o 100% de los nucleótidos constituyentes individualmente o en combinación.

Composiciones que comprenden ARNm de CFTR

[0055] En ciertas realizaciones, las moléculas de ARNm se pueden administrar como ARNm desnudo o sin embalar. En algunas realizaciones, la administración del ARNm en las composiciones de la invención se puede facilitar mediante la inclusión de un vehículo adecuado. En ciertas realizaciones, el vehículo se selecciona basándose en su capacidad para facilitar la transfección de una célula diana con uno o más ARNm.

[0056] Como se usa en este documento, el término "vehículo" incluye cualquiera de los estándares farmacéuticos portadores, vehículos, diluyentes, excipientes y similares que están destinados generalmente para uso en relación con la administración de agentes biológicamente activos, incluyendo ARNm.

[0057] En ciertas realizaciones, los portadores empleados en las composiciones de la invención pueden comprender una vesícula liposomal, u otros medios para facilitar la transferencia de un ARNm a las células diana y/o tejidos. Los vehículos adecuados incluyen, pero no se limitan a, portadores basados en polímeros, tales como polietilenimina (PEI) y polímeros de bloque de múltiples dominios, nanopartículas lipídicas y liposomas, nanoliposomas, nanoliposomas que contienen ceramida, proteoliposomas, exosomas naturales y sintéticamente derivados, cuerpos lamelares naturales, sintéticos y semisintéticos, nanopartículas, nanopartículas de fosatosilicato de calcio, nanopartículas de fosfato de calcio, nanopartículas de dióxido de silicio, partículas nanocristalinas, nanopartículas de semiconductores, polvos secos, poli(D-arginina), nanodendrimeros, suministro basado en almidón sistemas, micelas, emulsiones, geles sol, niosomas, plásmidos, virus, nucleótidos de fosfato de calcio, aptámeros, péptidos, conjugados de péptidos, conjugados dirigidos a moléculas pequeñas y otras etiquetas vectoriales. También se contempla el uso de bio-nanocápsulas y otros ensambles de proteínas de la cápsida viral como un vehículo adecuado. (Hum. Gene Ther. 2008 Sep; 19 (9): 887 - 95).

[0058] En algunas realizaciones, el vehículo comprende un catión orgánico, tal como un lípido catiónico o un polímero orgánico catiónico. Si está presente, el lípido catiónico puede ser un componente de vesículas liposómicas que encapsulan el ARNm.

[0059] En ciertas realizaciones de la invención, el vehículo se formula usando un polímero, como vehículo, solo o en combinación con otros portadores. Los polímeros adecuados pueden incluir, por ejemplo, poliácridatos, poliácridilatos, polilactida, copolímeros de polilactida-poliglicólidos, policaprolactonas, dextrano, albúmina, gelatina, alginato, colágeno, quitosano, ciclodextrinas, protamina, protamina PEGilada, PLL, PLL PEGilada y polietilenimina (PEI). Cuando está presente PEI, puede ser PEI ramificada de un peso molecular que varía de 10 a 40 kDa, por ejemplo, PEI ramificada de 25 kDa (Sigma N° 408727). Polímeros ilustrativos adicionales adecuados para la presente invención incluyen los descritos En la publicación PCT WO2013182683.

[0060] El uso de portadores de liposomas para facilitar la administración de polinucleótidos a las células diana se contempla por la presente invención. Los liposomas (p. ej., nanopartículas lipídicas liposómicas) son generalmente útiles en una variedad de aplicaciones en investigación, industria y medicina, particularmente para su uso como portadores de compuestos diagnósticos o terapéuticos *in vivo* (Lasic, Trends Biotechnol., 16: 307-321, 1998, Drummond et al., Pharmacol. Rev., 51: 691-743, 1999) y se caracterizan habitualmente como vesículas microscópicas que tienen un espacio acuoso interior secuestrado de un medio externo por una membrana de una o

más bicapas. Las membranas de bicapa de liposomas se forman típicamente mediante moléculas anfífilas, tales como lípidos de origen sintético o natural que comprenden dominios hidrofílicos e hidrófobos espacialmente separados (Lasic, Trends Biotechnol., 16: 307-321, 1998). Las membranas de bicapa de los liposomas también pueden formarse por polímeros anfífilos y tensioactivos (por ejemplo, polimerasomas, niosomas, etc.).

[0061] En ciertas realizaciones, el ARNm se compleja con nanopartículas de lípidos para facilitar la administración a la célula diana. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención se pueden combinar con una mezcla de lípidos multicomponente que emplea uno o más lípidos catiónicos, lípidos adicionales tales como lípidos no catiónicos (también denominados lípidos auxiliares), lípidos a base de colesterol, y/o lípidos PEGilados para la encapsulación de ARNm.

Lípidos catiónicos

[0062] En algunas realizaciones, una nanopartícula lipídica adecuada contiene un lípido catiónico. Como se usa en este documento, la frase "lípido catiónico" se refiere a cualquiera de varias especies de lípidos que tienen una carga positiva neta a un pH seleccionado, tal como el pH fisiológico. Algunos lípidos catiónicos, en particular, los conocidos como lípidos catiónicos valorables o titulables en el pH son particularmente eficaces para administrar ARNm. Varios lípidos catiónicos (por ejemplo, titulables) se han descrito en la literatura, muchos de los cuales están disponibles en el mercado. Los lípidos catiónicos particularmente adecuados para uso en las composiciones de la invención incluyen los descritos en las publicaciones de patentes internacionales WO 2010/053572 (y particularmente, C12-200 descrita en el párrafo [00225]) y WO 2012/170930. En algunas realizaciones, se usa el lípido catiónico cKK-E12 (descrito en WO 2013/063468). En algunas realizaciones, se usa el lípido catiónico de cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxi)propilo]-N,N,N-trimetilamonio o "DOTMA". (Feigner y otros (Proc. Nat'l Acad. Sci. 84, 7413 (1987), Patente de EE.UU. N° 4.897.355). DOTMA se puede formular solo o se puede combinar con el lípido neutro, dioleoilfosfatidilo-etanolamina o "DOPE" u otros lípidos catiónicos o no catiónicos en un vehículo de transferencia liposomal o una nanopartícula lipídica, y tales liposomas pueden usarse para potenciar la administración de ácidos nucleicos en células diana. Otros lípidos catiónicos adecuados incluyen, por ejemplo, 5-carboxispermilglicinadioctada-cilamida o "DOGS", 2,3-dioleiloxi-N-[2(espermina-carboxamido)etilo]-N,N-dimetilo-1-propanamio o "DOSPA" (Behr y col., Proc. Nat'l Acad. Sci. 86, 6982 (1989), US 5.171.678. US 5.334.761), 1,2-Dioleoil-3-Dimetilamonio-Propano o "DODAP", 1,2-Dioleoil-3-Trimetilamonio-propano o "DOTAP". Los lípidos catiónicos contemplados también incluyen 1,2-diesteariloxi-N,N-dimetilo-3-aminopropano o "DSDMA", 1,2-dioleiloxi-N,N-dimetilo-3-aminopropano o "DODMA", 1,2-dilinoileiloxi-N,N-dimetilo-3-aminopropano o "DLinDMA", 1,2-dilinoileiloxi-N,N-dimetilo-3-aminopropano o "DLinDMA", cloruro de N-dioleilo-N,N-dimetilamonio o "DODAC", bromuro de N,N-diestearilo-N,N-dimetilamonio o "DDAB", N-(1,2-dimiristiloxiprop-3-ilo)-N,N-dimetilo-N-hidroxi-etilamonio o "DMRIE", 3-dimetilamino-2-(colest-5-en-3-beta-oxibutano-4-oxi)-1-(cis,cis-9,12-octadecadienoxi)propano o "CLinDMA", 2-[5'-(colest-5-en-3-beta-oxi)-3'-oxapentoxi]-3-dimetilo 1-1-(cis,cis-9', 1'-2'-octadecadienoxi)propano o "CpLinDMA", N,N-dimetilo-3,4-dioleilo-xibencilamina o "DMOBA", 1,2-N,N'-dioleilcarbamil-3-dimetilaminopropano o "DOcarbDAP", 2,3-Dilinoileiloxi-N,N-dimetilpropilamina o "DLinDAP", 1,2-N,N'-Dilinoileilcarbamil-3-dimetilaminopropano o "DLincarbDAP", 1,2-Dilinoileilcarbamil-3-dimetilaminopropano o "DLinCDAP", 2,2-dililoilexilo-4-dimetilaminometilo-[1,3]-dioxolano o "DLin-DMA", 2,2-dilinoileilo-4-dimetilaminoetilo-[1,3]-dioxolano o "DLin-K-XTC2-DMA", y 2-(2,2-di((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-ilo)-1,3-dioxolano-4-ilo)-N,N-dimetiletanamina (DLin-KC2-DMA) (Véase, documento WO 2010/042877; Semple et al., Nature Biotech. 28: 172 - 176 (2010)), o mezclas de los mismos. (Heyes, J., y col., J Controlled Release 107: 276 - 287 (2005); Morrissey, DV., Y col., Nat. Biotechnol. 23 (8): 1003 - 1007 (2005); Publicación PCT WO2005./121348A1).

[0063] En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención emplean nanopartículas lipídicas que comprenden un lípido catiónico ionizable descrito en la solicitud de patente provisional 61/617.468, presentada el 29 de marzo de 2013, tales como, por ejemplo, (15Z,18Z)-N,N-dimetilo-6-(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-ilo)tetracos-15,18-dien-1-amina (HGT5000), (15Z,18Z)-N,N-dimetilo-6-((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-ilo)tetracos-4,15,18-trien-1-amina (HGT5001) y (15Z,18Z)-N,N-dimetilo-6-((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-ilo)tetracos-5,15,18-trien-1-amina (HGT5002).

[0064] En algunas realizaciones, uno o más de los lípidos catiónicos presentes en una composición de este tipo comprenden al menos uno de un imidazol, dialquilamino, o resto de guanidinio. En una realización preferida, uno o más de los lípidos catiónicos no comprende una amina cuaternaria.

Lípidos no catiónicos/auxiliares

[0065] En algunas realizaciones, una nanopartícula de lípidos adecuada contiene uno o más lípidos no catiónicos ("auxiliares"). Como se usa en el presente documento, la frase "lípido no catiónico" se refiere a cualquier lípido neutro, zwitteriónico o aniónico. Como se usa en este documento, la frase "lípido aniónico" se refiere a cualquiera de varias especies de lípidos que llevan una carga neta negativa a un pH seleccionado, tal como el pH fisiológico. En algunas realizaciones, un lípido no catiónico es un lípido neutro, es decir, un lípido que no lleva una carga neta en las condiciones bajo las cuales se formula y/o se administra la composición. Lípidos no catiónicos incluyen, pero no se limitan a, distearoilfosfatidilcolina (DSPC), dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG), dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG), dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE),

palmitoileoilfosfatidilcolina (POPC), palmitoileoilfosfatidiletanolamina (POPE), di-oleoilfosfatidiletanolamina 4-(N-maleimidometilo)-ciclohexano-1-carboxilato (DOPE-mal), dipalmitoileoilfosfatidiletanolamina (DPPE), dimiristoilfosfoetanolamina (DMPE), diestearoilfosfatidiletanolamina (DSPE), 16-O-monometilo PE, 16-O-dimetilo PE, 18-1-trans PE, 1-estearoil-2-oleoilfosfatidiletanolamina (SOPE), o una mezcla de los mismos.

5

Lípidos a base de colesterol

[0066] En algunas realizaciones, una nanopartícula de lípidos adecuada comprende uno o más lípidos basados en colesterol. Por ejemplo, amplios lípidos catiónicos adecuados basados en colesterol incluyen, por ejemplo, colesterol, colesterol PEGilado, DC-Choi (N,N-dimetilo-N-etilcarboxamidocolesterol), 1,4-bis (3-N-oleilamino-propilo) piperazina (Gao, y col., Biochem. Biophys., Res. Comm. 179, 280 (1991), Wolf et al., BioTechniques 23, 139 (1997), Patente de EE.UU. N° 5.744.335) o ICE.

10

Lípidos PEGilados

15

[0067] En algunas realizaciones, una nanopartícula lipídica adecuada comprende uno o más lípidos PEGilados. Por ejemplo, el uso de fosfolípidos modificados con polietilenglicol (PEG) y lípidos derivatizados tales como ceramidas derivatizadas (PEG-CER), incluyendo N-octanoil-esfingosina-1-[succinilo(metoxi-polietilenglicol)-2000] (C8 PEG-2000 ceramida) se contempla en la presente invención en combinación con uno o más de los lípidos catiónicos y, en algunos casos, otros. En algunas realizaciones, los lípidos PEGilados adecuados comprenden PEG-ceramidas que tienen cadenas de acilo más cortas (por ejemplo, C₁₄ o C₁₈). En algunas realizaciones, se puede usar el lípido PEGilado DSPE-PEG-Maleimida-Lectina. Otros lípidos modificados con PEG contemplados incluyen, pero no se limitan a, una cadena de polietilenglicol de hasta 5 kDa de longitud unido covalentemente a un lípido con cadena(s) alquilo de longitud C₆-C₂₀. Sin desear estar ligado a una teoría particular, se contempla que la adición de lípidos PEGilados puede evitar la agregación compleja y aumentar la vida de circulación para facilitar el suministro del ARNm encapsulado en el lóbulo a la célula diana.

20

25

[0068] En ciertas realizaciones, la composición comprende una de las siguientes combinaciones de lípidos:

30

C12-200, DOPE, colesterol, DMG-PEG2K;

DODAP, DOPE, colesterol, DMG-PEG2K;

35

HGT5000, DOPE, colesterol, DMG-PEG2K;

HGT5001, DOPE, colesterol, DMG-PEG2K;

XTC, DSPC, colesterol, PEG-DMG;

40

MC3, DSPC, colesterol, PEG-DMG;

ALNY-100, DSPC, colesterol, PEG-DSG;

45

cKK-E12, DOPE, Chol, PEGDMG2K.

[0069] En algunas realizaciones, relaciones lípidos:ARNm puede ser de 5:1 (mg:mg), 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1 y mayores de hasta 30:1 (mg:mg) o más. Las relaciones de N/P pueden estar en el rango de 1,1:1 hasta 10:1 o más. Ejemplos de relaciones de lípidos son 40:30:20:10, 55:20:20:5, 50:25:20:5 (lípido catiónico:lípido auxiliar:col:lípido de PEG).

50

[0070] En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas según la invención no comprenden un agente mucolítico (por ejemplo, N-acetilcisteína, erdoesteína, bromheksin, carbocisteína, guaifenesina, o glicerol yodado).

Aparatos cargados con una composición farmacéutica

55

[0071] En algunas realizaciones, una composición farmacéutica de acuerdo con la invención, tal como una composición a base de lípido catiónico o PEI que comprende un ARNm de CFTR de origen no natural, se proporciona dentro de un aparato para administración al sistema respiratorio de un sujeto. El aparato puede ser, por ejemplo, un aparato de instilación, aerosolización o nebulización. Los aparatos adecuados incluyen, por ejemplo, un nebulizador jet PARI Boy, nebulizador Aeroneb® Lab, MicroSprayer® o nebulizador de malla EFlow. Alternativamente, se pueden usar inhaladores de polvo seco o aparatos de aerosolización tales como inhaladores portátiles.

60

Usos y métodos

65

ARNm para usos y métodos según la invención

[0072] Entre otras cosas, la presente divulgación proporciona métodos para la producción *in vivo* de una proteína CFTR, en particular, en un pulmón de un mamífero. En algunas realizaciones, la divulgación proporciona métodos para inducir la expresión de CFTR en células epiteliales en un pulmón de un mamífero, que comprende poner en contacto las células epiteliales con una composición farmacéutica que comprende un ARNm transcrito *in vitro*, donde el ARNm transcrito *in vitro* comprende una secuencia codificante que codifica SEQ. ID NO: 1 (la secuencia de aminoácidos de CFTR humana de tipo salvaje). La divulgación también proporciona usos de composiciones farmacéuticas que comprenden un ARNm transcrito *in vitro*, en el que el ARNm transcrito *in vitro* comprende una secuencia codificante que codifica la SEQ ID NO: 1, para la inducción de la expresión de CFTR en células epiteliales en un pulmón de un mamífero.

[0073] La descripción proporciona además métodos de inducción de la expresión de CFTR en una célula diana de mamífero, el método comprende poner en contacto la célula diana de mamífero con una composición, comprendiendo la composición un ARNm transcrito *in vitro* que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. La descripción proporciona además un uso de composición, comprendiendo la composición un ARNm transcrito *in vitro* que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, para la inducción de la expresión de CFTR en una célula diana de mamífero.

[0074] Se observó que vectores que comprenden la SEQ ID NO: 2 con frecuencia se sometieron a mutaciones de inserción/delección/reordenamiento en células huésped en condiciones de crecimiento típicas, lo que resulta en una población heterogénea de vectores que no podrían ser utilizados directamente para la transcripción *in vitro*. Se encontró que el crecimiento de células hospedadoras en condiciones tales como baja temperatura, luz tenue y/o células de baja copia como CopyCutter® redujo, pero no eliminó, la aparición de la mutación. Por consiguiente, puede ser aconsejable que reacciones de transcripción *in vitro* de ARNm que comprenden una secuencia codificante al menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 2 de usar una plantilla obtenida cultivando el vector como se describió anteriormente, cosechando y linealizando el vector, y purificando la especie deseada para uso en la reacción de transcripción. La etapa de purificación puede ser, por ejemplo, cromatografía de exclusión por tamaño o intercambio aniónico débil.

[0075] El ARNm transcrito *in vitro* para usos y métodos descritos en el presente documento puede comprender un 5'-UTR, 3'UTR, poli A, residuos de cola poli-C y/o poli-U, tapa y/o de nucleótidos no estándar, como se discutió en la sección anterior con respecto a tales características.

Composiciones farmacéuticas para usos y métodos

[0076] Las composiciones farmacéuticas para uso de acuerdo con la invención pueden comprender ARNm para usos y métodos como se discute en la sección anterior y los ingredientes adicionales como se discutió en la sección anterior en relación con composiciones que comprenden ARNm de CFTR. Por lo tanto, se contempla el uso y/o la administración de composiciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de los vehículos discutidos anteriormente.

[0077] En algunas realizaciones preferidas, las composiciones farmacéuticas comprenden PEI, tales como PEI ramificada que tiene un peso molecular que oscila 10-40 kDa, por ejemplo, 25 kDa.

[0078] En otras realizaciones preferidas, las composiciones farmacéuticas comprenden un lípido catiónico, un lípido pegilado, y un lípido adicional (tal como un lípido neutro). El lípido catiónico, el lípido pegilado y/o el lípido adicional se pueden elegir entre los enumerados en la sección anterior con respecto a las composiciones que comprenden ARNm de CFTR.

Vías de administración para la inducción de la expresión en el pulmón

[0079] En algunas realizaciones de métodos y usos para la inducción de la expresión de CFTR en un pulmón de un mamífero, una composición farmacéutica como se describe anteriormente se administra por una vía elegida de la instilación intratraqueal, la nebulización, y aerosolización. El aparato para administrar la composición puede elegirse entre los aparatos enumerados en la sección anterior con respecto a aparatos cargados con una composición farmacéutica.

[0080] En realizaciones preferidas, la composición se administra a través de nebulización o aerosolización. Algunas formulaciones de lípidos pueden tener una tendencia a agregarse cuando se intenta la nebulización, pero en general es posible resolver problemas de agregación ajustando la formulación, por ejemplo, sustituyendo el lípido catiónico.

Tratamiento de la fibrosis quística

[0081] Entre otras cosas, la presente invención se puede usar para tratar la fibrosis quística. En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona una composición para uso en un método para tratar la fibrosis quística administrando a un sujeto que necesita tratamiento un ARNm que codifica una proteína CFTR como se describe en este documento o una composición farmacéutica que contiene el ARNm. El ARNm o una composición

farmacéutica que contiene el ARNm pueden administrarse directamente al pulmón del sujeto. Se pueden usar diversas rutas de administración para la administración pulmonar. En algunas realizaciones, un ARNm o una composición que contiene un ARNm descrito en este documento se administra por inhalación, nebulización o aerosolización. En diversas realizaciones, la administración del ARNm da como resultado la expresión de CFTR en el pulmón del sujeto (por ejemplo, células epiteliales del pulmón).

[0082] En una realización particular, la presente divulgación proporciona una composición para uso en un método de tratamiento de la fibrosis quística mediante la administración al pulmón de un sujeto en necesidad de tratamiento un ARNm que comprende una secuencia codificante que codifica SEQ ID NO: 1, En particular, la presente divulgación proporciona una composición para uso en un método para tratar la fibrosis quística administrando al pulmón de un sujeto que necesita tratamiento un ARNm que comprende una secuencia codificante de la SEQ ID NO: 3. En otras realizaciones, la presente divulgación proporciona una composición para uso en un método para tratar fibrosis quística administrando al pulmón de un sujeto que necesita tratamiento un ARNm que comprende una secuencia codificante al menos 80%, 85%, 90%, 95% o 99% idéntica a SEQ ID NO: 3. ARNm de CFTR no naturales adicionales ejemplares que se pueden usar para tratar la fibrosis quística se describen en la sección Breve Descripción de Secuencias, como, por ejemplo, SEQ ID NOS: 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 17.

EJEMPLOS

[0083] Los siguientes ejemplos específicos deben interpretarse como meramente ilustrativos, y no limitativos del resto de la descripción en modo alguno. Sin una elaboración adicional, se cree que un experto en la técnica puede, en base a la descripción en el presente documento, utilizar la presente invención en su máxima extensión.

[0084] A menos que se indique lo contrario, el ARN del ARNm de CFTR y SNIM utilizado en los ejemplos descritos en el presente documento comprendía una UTR 5' con la secuencia de SEQ ID NO: 4, una secuencia codificante (CDS) con la secuencia de SEQ ID NO: 3, y un 3' UTR con la secuencia de SEQ ID NO: 5. ARNm de FFL y ARN de SNIM usado en los Ejemplos descritos aquí comprendía un 5' UTR, CDS, y 3' UTR con las secuencias de SEQ ID NOS: 6, 7, y 8, respectivamente.

Ejemplo 1: ARNm de codificación de ARNm sintetizado *in vitro*

[0085] *Síntesis de ARN mensajero.* El ARNm del regulador de conductancia transmembrana de la fibrosis quística humana (CFTR) y la luciferasa de la luciérnaga (FFL) se sintetizaron mediante transcripción *in vitro* a partir de un molde de ADN plasmídico que codifica el gen, seguido de la adición de una estructura de tapón de 5' (Tapón 1) (Fechter, P., Brownlee, GG "Recognition of mRNA cap structures by viral and cellular proteins" J. Gen. Virology 2005, 86, 1239-1249) y una cola 3' poli(A) de aproximadamente 200 nucleótidos de longitud según lo determinado por electroforesis en gel. Las regiones 5' y 3' no traducidas estaban presentes en cada producto de ARNm.

[0086] Los ejemplos de ARNm de CFTR no naturales incluyen 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 o SEQ ID NO: 17 descritos en la sección Breve Descripción de Secuencias.

Ejemplo 2: Expresión CFTR y actividad en células HEK

[0087] Este ejemplo demuestra que la proteína CFTR completamente funcional se expresa a partir de ARNm de CFTR sintética humana administrada a las células.

[0088] *Transfección de células y CFTR.* Células HEK293T de riñón embrionario humano se cultivaron en DMEM (Invitrogen Cat n° 11965-092) suplementado con 10% de suero bovino fetal, 2 mM L-glutamina, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml estreptomycin. El día antes de la transfección, las células se plaquearon en placas de 6 pocillos a una confluencia del 50-60% y se incubaron en condiciones normales de cultivo de tejidos (36°C en una atmósfera humidificada de 5% de CO₂, 95% de aire). Se diluyeron 60 µl de Lipofectamine 2000 (Invitrogen n° de catálogo 11668019) en 900 µl de medio de suero reducido por OptiMem (Invitrogen n° de catálogo 31985-062) y se agitaron suavemente en vórtice. 24 µg ARNm de CFTR (4 µg por placa) se diluyó en 900 µl de medios de OptiMEM. El ARNm se añadió inmediatamente a la Lipofectamina diluida y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. El medio de recubrimiento se aspiró suavemente de las células HEK293T y se reemplazó con 1 mL de medio de suero reducido de OptiMem. 300 µl de complejo de ARNm/Lipofectamina se añadió a cada pocillo y las células se dejaron descansar bajo condiciones de cultivo tisular normales durante 24 horas antes de ser replataadas por el desprendimiento mecánico en cubreobjetos de vidrio recubiertos con poli-L-lisina (BD Biosciences, BD Biocoat) para que las células puedan transferirse fácilmente a una cámara de registro para registro electrofisiológico. Las células se incubaron en condiciones estándar de cultivo de tejidos durante un mínimo de otras 24 horas y se usaron dentro de las 48 horas de la siembra final.

[0089] *Registro electrofisiológico.* Se realizaron registros de parche-pinza de células enteras a temperatura ambiente usando un amplificador Axopatch 200B con electrodos de 5-8 MΩ. Los datos se digitalizaron (50 kHz) y se filtraron (5 kHz) de forma apropiada. La resistencia de la serie fue compensada (70-80%) para minimizar los errores de voltaje.

Los registros de tensión-pinza se realizaron con una solución de pipeta de la siguiente composición: 140 mM de NMDG-Cl; 5 mM de EGTA; 1 mM de MgCl₂; 10 mM de HEPES; pH 7,2; 310 mOsm/l. La solución de baño contenía: 140 mM de NaCl, 3 mM de KCl, 2 mM de MgCl₂, 2 mM de CaCl₂ y 10 mM de HEPES; pH 7,3, ajustado a 315 mOsm/l con D-glucosa. Los registros de abrazadera de tensión comenzaron 3-5 minutos después de establecer la configuración de célula completa.

[0090] Las células se sujetaron por voltaje a un potencial de retención de -60 mV o 0 mV y una serie de etapas de voltaje positivo y negativo (cualquiera de -80 mV a +80 mV o -100 a +100 mV en incrementos de 20 mV) inyectado en las células HEK293T grabadas para evocar las corrientes de cloruro de células enteras inducidas por CFTR (Cl⁻). El análogo permeable a la membrana de cAMP, 8-Br-cAMP (500 μM, Sigma Aldrich) se aplicó durante 4 minutos a las células registradas para facilitar las corrientes CFTR. El bloqueador de CFTR 'gold-standard', CFTRinh-172 (10 μM, Sigma) se aplicó al final de cada registro para bloquear la corriente de Cl⁻ inducida por CFTR. Los registros de control se realizaron en células HEK293T no transfectadas.

[0091] Compuestos de prueba. Los compuestos de ensayo se aplicaron usando un sistema de perfusión rápida DAD-16VC (ALA Scientific Instruments, EE.UU.) con la pipeta de eyección colocada aproximadamente 200 μM de la célula registrada. 8-Br-cAMP se preparó como una concentración madre de 500 mM en ddH₂O. CFTRinh-172 se preparó como una reserva de 10 mM en DMSO. Todos los compuestos fueron almacenados a -20°C y se descongelaron rápidamente y se diluyeron a la concentración final deseada inmediatamente antes del uso.

[0092] Análisis. Todos los análisis se realizaron utilizando el software Clampfit (MDS Analytical Technologies) y Excel (Microsoft). Todos los valores son la máxima amplitud de corriente pico evocada. Las diferencias estadísticas en los datos se evaluaron mediante la prueba t de Student, pareado o no apareado, según corresponda, y se consideraron significativos a $P < 0,05$.

[0093] Producción de proteínas de CFTR humana in vitro. La producción de proteína CFTR humana a través de ARNm de hCFTR se realizó mediante la transfección de ARNm de CFTR humana en células HEK293T descritas en este documento. Las células tratadas y no tratadas se recogieron y se sometieron a métodos de inmunoprecipitación 24 horas después de la transfección. La detección de proteína CFTR humana mediante análisis de transferencia de Western demuestra que la proteína CFTR glicosilada completamente compleja (designada como banda "C") se produjo a partir del ARN mensajero sintético (Figura 1A).

[0094] Actividad de proteína de CFTR humana in vitro. Para determinar la actividad de la proteína CFTR derivada de ARNm de CFTR humana sintética producida después de la transfección, se realizaron ensayos de pinzamiento de parche de células enteras en células HEK 293 y HEK 293T. Las células tratadas así como las células de control (no tratadas y transfectadas simuladas) se sometieron a sustratos de activador (8-Br-AMPAM, forskolina) e inhibidor (CFTRinh-172, GlyH-101) para ayudar a determinar los cambios en el flujo de corriente (transporte de iones cloruro).

[0095] Las células HEK293T fueron transfectadas con 4 μg de ARNm de hCFTR y se analizaron 24 horas después de la transfección. Se realizaron ensayos de fijación de células enteras para medir el flujo de corriente, como se representa mediante el transporte de iones cloruro tras la aplicación de un voltaje establecido. Un gráfico de corriente vs voltaje como resultado de una rampa de voltaje de -80 mV a +80 mV (representada en la Figura 2) demuestra diferencias sustanciales en la corriente cuando se comparan células tratadas con ARNm no tratadas frente a hCFTR. Este aumento de la corriente después de la exposición a 8-Br-cAMP, un conocido activador de la proteína CFTR, sugiere que la proteína CFTR humana está presente en estas células. Tras el tratamiento de estas células previamente transfectadas con un inhibidor de CFTR específico conocido, CFTRinh-172, la corriente respectiva cae de nuevo a niveles casi de control (~ 89% de disminución). Dicha disminución después de la exposición de este inhibidor apoya fuertemente la presencia de proteína CFTR humana. Estos resultados en suma demuestran que el ARNm de hCFTR sintético puede producir proteína CFTR humana activa.

[0096] Por otra parte, ensayos de actividad de células enteras CFTR se realizaron usando un sistema automatizado (IonWorks) dentro de las células HEK293. Como se describió anteriormente, las células tratadas así como las células de control (no tratadas y transfectadas simuladamente) se sometieron a sustratos activadores e inhibidores para ayudar a determinar los cambios en el flujo de corriente (transporte de iones cloruro). En estos estudios, se empleó forskolina como activador de la proteína CFTR y una parte de las células transfectadas con ARNm de hCFTR se expuso adicionalmente a un inhibidor de CFTR específico diferente, GlyH-101. Se cree que GlyH-101 actúa como un bloqueante de poro CFTR que actúa sobre el lado de la membrana extracelular de la proteína. En particular, esta acción de mecanismo es diferente de la de CFTRinh-172, que se informa que funciona desde el lado intracelular de la proteína CFTR.

[0097] La Figura 4 representa un gráfico de corriente-voltaje de la línea celular parental HEK293 tratada con forskolina así como GlyH-101. No se observó un cambio significativo en la corriente, lo que sugiere que estos activadores/inhibidores de CFTR específicos no tienen efecto sobre las proteínas endógenas presentes en la línea celular.

[0098] Un gráfico de corriente frente a voltaje como resultado de una rampa de voltaje de -100 mV a 100 mV

(representado en la Figura 5) demuestra diferencias sustanciales en la corriente cuando se comparan las células HEK293 no tratadas frente a las células tratadas con ARNm de hCFTR. Este aumento en la corriente después de la exposición a la forskolina, un activador conocido de la proteína CFTR, es indicativo de que la proteína CFTR humana está presente en estas células. Tras el tratamiento de estas células previamente transfectadas con un inhibidor de CFTR específico conocido diferente, GlyH-101, la corriente respectiva cae de nuevo a niveles casi de control (~ 95% de disminución). Dicha disminución después de la exposición de este inhibidor apoya fuertemente la presencia de proteína CFTR humana.

[0099] En total, estos datos de inhibición que son el resultado de dos mecanismos distintos apoyan firmemente la identidad de una proteína CFTR completamente funcional derivada del ARN mensajero CFTR humano sintético.

Ejemplo 3: Expresión de CFTR *in vivo*

[0100] Este ejemplo demuestra que la proteína CFTR se expresa de forma efectiva *in vivo* a partir de un ARNm que codifica CFTR administrada mediante administración pulmonar.

[0101] *Protocolo de formulación 1.* Se mezclaron alícuotas de soluciones etanólicas de 50 mg/mL de C12-200, DOPE, Chol y DMG-PEG2K y se diluyeron con etanol hasta un volumen final de 3 mL. Separadamente, se preparó una solución acuosa tamponada (10 mM de citrato/150 mM de NaCl, pH 4,5) de ARNm de CFTR a partir de una solución madre de 1 mg/mL. La solución lipídica se inyectó rápidamente en la solución acuosa de ARNm y se agitó para producir una suspensión final en etanol al 20%. La suspensión de nanopartículas resultante se filtró, se diafiltró con 1x PBS (pH 7,4), seguido de agua, se concentró y se almacenó a 2-8°C. Concentración final = 1,09 mg/mL de ARNm de CFTR (encapsulado). $Z_{ave} = 80,2$ nm ($Dv_{(50)} = 55,5$ nm; $Dv_{(90)} = 99,6$ nm).

[0102] *Protocolo de formulación 2.* Se mezclaron alícuotas de una solución acuosa PEI de 2,0 mg/mL (ramificada, 25 kDa) con una solución acuosa de ARNm de CFTR (1,0 mg/mL). La mezcla compleja resultante se pipeteó hacia arriba y hacia abajo varias veces y se dejó de lado durante 20 minutos antes de la inyección. Concentración final = 0,60 mg/mL de ARNm de CFTR (encapsulado). $Z_{ave} = 75,9$ nm ($Dv_{(50)} = 57,3$ nm; $Dv_{(90)} = 92,1$ nm).

[0103] *Análisis de la proteína FFL y CFTR producida a través de nanopartículas cargadas con ARNm administradas intratraquealmente.* Todos los estudios se realizaron usando ratones hembra BALB/C o ratones KO de CFTR. Las muestras FFL se introdujeron a través de instilación directa (MicroSprayer®) o nebulización (PARI Boy o Aeroneb) dosis respectiva de ARNm de FFL encapsulado. El ARNm de CFTR se introdujo usando un nebulizador jet PARI Boy. Los ratones se sacrificaron y perfundieron con solución salina después de dejar tiempo para la expresión.

[0104] *Administración intratraqueal de ARNm de FFL.* Los materiales de prueba FFL se administraron mediante una única administración de aerosol intratraqueal a través de un Microsprayer™ (50 µl/animal) mientras que los animales se anestesiaron con inyección intraperitoneal de una mezcla de 50-100 mg/kg de ketamina y 5-15 mg/kg de xilazina.

[0105] *Administración por nebulización (aerosol) de ARNm de FFL.* Los materiales de prueba de FFL se administraron mediante una inhalación de aerosol única mediante el nebulizador Aeroneb® Lab (volumen de dosis nominal de hasta 8 mL/grupo). El material de prueba se administró a una caja que contenía todo el grupo de animales (n = 4) y se conectó a un sistema de flujo de oxígeno y secuestrante.

[0106] *Administración de ARNm de CFTR.* El ARNm de CFTR se preparó de la manera descrita en el Ejemplo 6 a continuación. Se colocaron cuatro ratones knockout CFTR en una caja de cámara de aerosol y se expusieron a 2 mg de ARNm de CFTR humano no modificado optimizado de codón total (que comprende la secuencia de codificación de SEQ ID NO: 3) mediante nebulización (nebulizador jet PARI Boy) en el transcurso de aproximadamente una hora. Los ratones se sacrificaron 24 horas después de la exposición.

[0107] *Eutanasia.* Los animales se sacrificaron mediante asfixia con CO₂ en tiempos representativos después de la administración de la dosis (± 5%) seguido de toracotomía y exanguinación. La sangre completa (volumen máximo obtenible) se recogió por punción cardíaca y se descartó.

[0108] *Perfusión.* Después de la exanguinación, todos los animales se sometieron a perfusión cardíaca con solución salina. En resumen, la perfusión intracardíaca de todo el cuerpo se realizó insertando una aguja de calibre 23/21 unida a una jeringa de 10 mL que contenía solución salina introducida en la luz del ventrículo izquierdo para perfusión. La aurícula derecha se incidió para proporcionar una salida de drenaje para perfundir. Se aplicó una presión suave y constante al émbolo para perfundir al animal después de colocar la aguja en el corazón. Se aseguró un flujo adecuado de la solución de enjuague cuando el perfundido que sale fluye limpio (sin sangre visible) lo que indica que la solución de enjuague ha saturado el cuerpo y el procedimiento se completó.

[0109] *Colección de tejido.* Después de la perfusión, todos los animales tenían el hígado y se cosecharon los pulmones (derecho e izquierdo). Los grupos seleccionados fueron sometidos a aproximadamente la mitad del hígado y ambos pulmones (derecho e izquierdo) se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y se almacenaron por separado a una temperatura nominal de -70°C. Se sometieron grupos selectos a aproximadamente

la mitad del hígado colocados en un casete de histología por animal. Además, los pulmones se inflaron con un 10% de NBF a través de una cánula que se insertó en la tráquea. La tráquea se ató con una ligadura y los pulmones (derecho e izquierdo) y la tráquea se colocaron intactos en un casete de histología por animal. Todos los casetes de histología se almacenaron a temperatura ambiente en 10% de NBF durante 24 horas y se transfirieron a etanol al 70%.

[0110] *Expresión de FFL en ratones tratados con FFL.* Tras el análisis de las muestras de tejido, se detectó la expresión de FFL en ratones tratados con FFL (datos no mostrados).

[0111] *Expresión de CFTR en ratones knockout CFTR.* La expresión de CFTR se detectó por inmunoprecipitación: análisis de transferencia de Western de pulmones de ratón tratados con ARNm de CFTR. La banda "C" madura se detectó en los pulmones izquierdo y derecho de todos los ratones tratados mientras que no se observó en los ratones de control (Figura 1B). Los anticuerpos utilizados fueron MAB25031 (R&D Systems) para la inmunoprecipitación y SAB4501942 (Sigma) para la detección mediante análisis de transferencia Western.

[0112] Los resultados mostrados aquí indican que una proteína CFTR se puede expresar con éxito *in vivo* basado en la administración de pulmón de ARNm. Además, el hecho de que el ARNm de CFTR se haya administrado con éxito al pulmón de ratones knock out CFTR y haya resultado en una producción efectiva de proteína en el pulmón indica que la producción de proteína *in vivo* basada en ARNm de CFTR puede usarse para tratar la deficiencia de proteína CFTR.

Ejemplo 4: Administración de ARNm de CFTR por pulmón utilizando nanopartículas poliméricas

[0113] La administración de ARN mensajero humano CFTR a los pulmones de un ratón se puede lograr a través de cualquiera inhalación directa, así como la nebulización. Usando métodos de hibridación *in situ*, se puede detectar con éxito el ARNm de CFTR humano después de la administración intratraqueal de nanopartículas cargadas con ARNm de CFTR humano a ratones. La administración se puede llevar a cabo empleando nanopartículas basadas en lípidos (por ejemplo, C12-200) así como nanopartículas poliméricas (por ejemplo, polietilenimina, PEI).

[0114] *Administración de ARNm de CFTR usando nanotransportadores poliméricos.* Los ratones CFTR KO se trataron con nanopartículas cargadas con ARNm de CFTR basadas en polietilenimina (PEI) mediante administración intratraqueal (30 µg de ARNm encapsulado). Los ratones tratados se sacrificaron seis horas y veinticuatro horas después de la administración y los pulmones se recogieron y se fijaron en formalina tamponada neutra al 10% (NBF). La hibridación *in situ* se empleó para la detección del ARNm de CFTR humana exógena (Figura 6). Se observó tinción sustancial 24 horas después de la administración con distribución generalizada en ambos pulmones de ratón tratados con CFTR KO mientras que no se observó tinción para ratones de control tratados con PBS.

[0115] El análisis de los pulmones tratados a mayores aumentos (hasta 20 aumentos) reveló una tinción intracelular positiva extensa a lo largo de las regiones bronquiales y alveolares de ambos pulmones (Figura 7). Tras un aumento adicional (40x), se observó tinción positiva dentro del citoplasma de células epiteliales bronquiales apicales diana (Figura 8). Por lo tanto, se puede concluir que la API de ARN mensajero se administró con éxito a las células epiteliales bronquiales apicales diana. Además, aunque puede observarse una tinción sustancial a las 6 horas después de la administración, la detección positiva significativa de ARNm de hCFTR todavía se observó después de 24 horas (Figura 9).

[0116] Se observó tinción intracelular positiva sustancial a lo largo de ambos pulmones dentro de regiones bronquiales y alveolares a las 24 horas post-administración.

Ejemplo 5: Administración pulmonar de ARNm de CFTR usando nanopartículas basadas en lípidos

[0117] *Administración de ARNm de CFTR usando nanotransportadores basados en lípidos.* Como se mencionó anteriormente, la liberación exitosa de pulmón de ARNm de CFTR humano se puede lograr a través de vehículos de administración basados en nanopartículas lipídicas. Aquí se describen ejemplos de nanopartículas lipídicas catiónicas cargadas con ARNm de hCFTR que utilizan C12-200 como el componente lipídico catiónico.

[0118] Se logró la detección exitosa de ARNm de CFTR humano dentro de los pulmones de ratones CFTR KO mediante hibridación *in situ*. Los ratones knockout se trataron con 15 µg de ARNm de hCFTR encapsulado en nanopartículas de lípidos basadas en C12-200 y se sacrificaron 6 horas después de la administración. Se observó la detección positiva del ARNm de hCFTR a lo largo de las regiones bronquiales y alveolares de ambos pulmones en comparación con los ratones de control tratados con PBS (Figura 10).

[0119] Con un aumento adicional (40x), se observó la detección positiva del ARNm de CFTR humana dentro del citoplasma apical de células epiteliales bronquiales y también como regiones alveolares terminales intracelulares (Figura 11).

[0120] En total, se puede lograr la administración exitosa de ARN mensajero CFTR sintético humano utilizando

sistemas de administración poliméricos (PEI) y basados en nanopartículas lipídicas (C12-200). Estos sistemas proporcionaron la acumulación intracelular de la sustancia farmacológica dentro de las células diana de los ratones. Además, cantidades sustanciales de ARNm de hCFTR estaban presentes en estas células diana 24 horas después de la administración.

5

Ejemplo 6: Validación de la expresión de CFTR humano usando anticuerpo específico

[0121] *Validación de anticuerpos para la detección de proteína CFTR humana en células de ratón, cerdo, y cultivadas.* Se realizaron experimentos para identificar un anticuerpo que es específico para la proteína hCFTR, que no reacciona de forma cruzada con el ratón y el análogo de cerdo y que está disponible en suficiente cantidad para experimentos futuros. Brevemente, la prueba de varios anticuerpos anti-hCFTR de fuentes académicas y comerciales condujo a la identificación de una combinación de anticuerpos anti-hCFTR que fueron capaces de detectar proteína CFTR humana después de inmunoprecipitación y transferencia de Western (IP/WB) sin reactividad cruzada para CFTR murino porcino. Por lo tanto, los anticuerpos anti-hCFTR adecuados para la detección de la proteína hCFTR sin reactividad cruzada para CFTR murino o porcino se identificaron en base a los resultados de IP/WB.

10

15

[0122] Las células fueron transfectadas con ARNm de hCFTR y se prepararon lisados de proteína utilizando ProteoExtract Transmembrane Kit (Merck) a las 24 horas después de la transfección y la fracción de membrana se cribó mediante transferencia Western para hCFTR usando anticuerpo CFTR anti-humano de ratón (MA1-935). Los lisados de las células 16HBE se usaron como control positivo. La Figura 12A presenta los datos de las células CHO y COS-7.

20

[0123] Las células de riñón de hámster bebé (BHK), descritas como negativas para CFTR en la literatura, se transfectaron de manera similar a las células CHO y COS-7 y los lisados de proteínas se cribaron mediante transferencia de Western. A diferencia de los informes publicados anteriormente, se pudo observar una señal positiva clara para CFTR usando el anticuerpo monoclonal anti-CFTR de ratón (Figura 12B). Para probar la especificidad del anticuerpo utilizado en el análisis de transferencia Western, se usaron células de riñón de cerdo de cerdo knockout de CFTR (PKC), amablemente proporcionadas por el profesor Eckhardt Wolf (Universidad Ludwig Maximilians, Múnich), en experimentos de transfección y lisados de proteínas para expresión de CFTR. Como era evidente en la Figura 12B, no se pudo detectar ninguna señal para CFTR en células PKC. Sin embargo, la transfección tampoco dio como resultado ninguna expresión de hCFTR detectable. Usando luciferasa como control para la transfección, se descubrió que las células PKC expresan luciferasa varias veces menos eficiente en comparación con las células CHO o COS-7. Como no se pudo detectar ninguna diferencia significativa En la intensidad de la banda de hCFTR en ninguna de las líneas celulares cribadas después de la transfección, se realizó un cribado exhaustivo de otros anticuerpos hCFTR con sensibilidades y especificidad más altas frente a hCFTR.

25

30

35

[0124] *Detección de anticuerpos a través de transferencias Western.* Los lisados de proteínas se prepararon a partir de línea celular epitelial bronquial humana (BEAS-2B), línea celular de riñón embrionario humano (HEK), pulmones de ratón y pulmón de cerdo utilizando el ProteoExtract Transmembrane Kit (Merck) y fracción membrana utilizada para inmunotransferencia usando diferentes anticuerpos primarios (MA1- 935 de Thermo Scientific Pierce Antibodies, Rockford, IL, EE. UU., AB596 del Consorcio de Fibrosis Quística, Universidad de Pensilvania, PA, EE. UU., y AB570 del Consorcio de Fibrosis Quística, Universidad de Pensilvania, PA, EE.UU.). Los datos se resumen como la Figura 13.

40

45

[0125] Mientras que MA1-935 detectó CFTR en las tres especies, AB596 detecta CFTR humano y murino pero no porcino y el anticuerpo G449 detecta específicamente CFTR humano específicamente. Con AB570, no estaba claro si las bandas de peso molecular ligeramente bajo observadas con muestras murinas y porcinas son de hecho CFTR o productos no específicos. En experimentos posteriores (datos no mostrados), se encontró que MA1-935 reconoce una banda que no es CFTR. Por lo tanto, en general, los resultados MA1-935 se consideraron como resultados confirmatorios generados usando otros anticuerpos, pero los experimentos en los que el único anticuerpo anti-CFTR usado fue MA1-935 no se consideraron concluyentes.

50

[0126] *Inmunoprecipitación de hCFTR (IP-hCFTR) a partir de muestras de tejido.* Dado que todos los anticuerpos cribados produjeron varias bandas no específicas y ninguno de ellos produjo el patrón de bandas característico de hCFTR (banda C representando la proteína completamente glicosilada y la banda B que representa la forma de núcleo manosilado), la inmunoprecipitación (IP) de hCFTR y la posterior detección por transferencia Western se estableció para aumentar la sensibilidad y especificidad de la detección aumentando así la relación señal/ruido.

55

[0127] Experimentos IP iniciales se realizaron en colaboración con el Prof. Burkhard Tümmler (Medizinische Hochschule Hannover) mediante protocolos y anticuerpos publicados por van Barneveld et al. 2012, Immunochemical analysis of Mutant CFTR in Lung explants, Cell Physiol. Biochem. 30, 587-595 (2012)). Las células de carcinoma de colon humano (T84) que sobreexpresan hCFTR se usaron como controles positivos para experimentos de IP.

60

65

[0128] La inmunoprecipitación de hCFTR usando tres anticuerpos diferentes (R29, R66/17 y R66/16) seguido de

inmunodetección con AB596 dio como resultado la detección específica de hCFTR en lisados de proteínas de pulmones de cerdos tratados con un aerosol de ARN SNIM hCFTR como se describe en el Ejemplo 8 a continuación (Figura 14).

5 **[0129] Formulación HGT5001.** Los experimentos en aerosol usando ARN de SNIM de hCFTR en una formulación de HGT5001: DOPE; Chol; PEGDMG2K (cantidades relativas 50:25:20:5 (mg:mg:mg:mg)) ("Formulación HGT5001") se en ratones y los lisados proteicos de los pulmones aislados a las 24 horas después de la administración del ARNm también se analizaron por IP usando los mismos anticuerpos y condiciones que para los lisados de los cerdos. Sin embargo, no se pudo detectar ningún patrón característico de bandas CFTR maduras para las muestras de ratón (Figura 15).

15 **[0130] Inmunoprecipitación de hCFTR (IP-hCFTR) a partir de células transfectadas in vitro.** Los resultados iniciales de IP utilizando material de tejido de cerdos proporcionaron la evidencia de la factibilidad técnica de la detección de hCFTR tras la administración de transcritos *in vivo*. Sin embargo, dado que ninguno de los anticuerpos utilizados en la inmunoprecipitación de CFTR (R29, R66/17 y R66/16) está disponible comercialmente, se seleccionaron otros anticuerpos disponibles comercialmente para determinar su eficacia en reacciones de IP. Se probaron dos anticuerpos de sistemas de I+D (MAB25031 y MAB1660).

20 **[0131]** Lisados de proteína se prepararon a partir de células T84 y se utilizó 500 µg de proteína total en la reacción de IP utilizando diferentes concentraciones de anticuerpo MAB25031. La cantidad de proteína hCFTR inmunoprecipitada se detectó a continuación mediante inmunoblotación usando AB570 (Cystic Fibrosis Foundation). AB596 en estas condiciones dio como resultado un fondo mucho más alto y por lo tanto no se ensayó más. Como se revela en la Figura 16A, no hubo un aumento adicional en la cantidad de proteína CFTR precipitada cuando la concentración de anticuerpo IP aumentó de 2 µg/ml a 4 µg/ml. Se detectaron tanto las formas glicosiladas completamente glicosiladas como las únicas (bandas C y B, respectivamente). Los mismos inmunoprecipitados también se cribaron utilizando MAB1660 como anticuerpo primario en transferencia Western. Sin embargo, con este anticuerpo, solo la banda C era visible (Figura 16B).

30 **[0132]** Después de la detección exitosa de hCFTR endógeno a partir de inmunoprecipitados de T84 usando anticuerpo MAB25031, se realizaron experimentos en células NIH3T3 con el objetivo de detectar la proteína hCFTR después de la transfección. Las células NIH3T3 se transfectaron con ARN de SNIM de hCFTR. Los lisados de proteínas se prepararon 72 horas después de la transfección y las cantidades de proteína se cuantificaron usando el método BCA. La proteína humana CFTR se inmunoprecipitó a partir de 500 µg de lisado de proteína total usando anticuerpo MAB25031 a 2 µg/ml seguido de inmunotransferencia usando AB570 (Figura 17). Sin embargo, no se pudo detectar CFTR. Las células transfectadas con LacZ que codifica ARNm se analizaron como muestras de control para el efecto de la transfección per se sobre la cantidad de proteína CFTR.

35 **[0133]** El aumento de la cantidad de proteína total utilizada en la inmunoprecipitación desde 500 µg a 8 mg no dio como resultado ninguna proteína hCFTR detectable después de la inmunodetección con AB570. Otro anticuerpo específico de hCFTR, MAB1660 (R&D Systems), también se cribó para determinar la inmunoprecipitación (Figura 18). Sin embargo, este anticuerpo no precipita CFTR tan eficazmente como MAB25031. Por lo tanto, todas las inmunoprecipitaciones futuras se realizaron con MAB25031.

45 **[0134]** La falta de detección hCFTR en muestras de ARNm transfectado puede no significar necesariamente falta de funcionalidad de los ARNms probados como experimentos cinéticos usando luciferasa como gen marcador han demostrado que la máxima expresión con el ARNm se observa a las 24 horas después de la transfección. La falta de detección de hCFTR se debe más bien a la concentración insuficiente de hCFTR en las muestras analizadas o a la falta de especificidad de los anticuerpos aplicados.

50 **[0135] Formulación de PEI.** Las condiciones establecidas se ensayaron para su factibilidad para detectar hCFTR después de ARN de SNIM hCFTR en la administración a cerdos (véase Ejemplo 7) de una formulación de nanopartículas con 25 kDa de PEI ramificada ("PEI Formulation") preparada de la siguiente manera. La cantidad requerida de SNIM ARN se diluyó justo antes de la aplicación en agua para inyección (Braun, Melsungen) hasta un volumen total de 4 mL y se añadió rápidamente a 4 mL de una solución acuosa de PEI ramificada de 25 kDa usando una pipeta con una relación N/P de 10. La solución se mezcló pipeteando hacia arriba y hacia abajo diez veces y se nebulizó como dos fracciones separadas de 4,0 mL, una después de otra, a los pulmones del cerdo utilizando el nebulizador indicado. Una muestra de la luciferasa que expresa áreas pulmonares del cerdo n° 1 y otra del lóbulo caudal del cerdo n° 2, donde no se pudo detectar actividad de luciferasa, indicando así la falta de administración y/o expresión del ARNm, se seleccionaron como controles positivos y negativos. Los lisados de proteínas preparados a partir de estas muestras se inmunoprecipitaron usando MAB25031 (R&D Systems) y se detectó la proteína hCFTR usando AB570. Como se muestra en la Figura 19, la expresión de la luciferasa se correlacionó con la expresión del ARNm de hCFTR. La muestra del lóbulo caudal izquierdo del cerdo n° 2 donde no se detectó actividad de luciferasa, también fue negativa para hCFTR (carril 1) mientras que hCFTR pudo detectarse en muestras del cerdo n° 1 que fueron positivas para luciferasa (carril 2).

65

Ejemplo 7: Administración de ARNm en aerosol

[0136] *Establecimiento del suministro de aerosol de ARNm encapsulado a los pulmones de los cerdos.* La administración en aerosol de luciferasa de luciérnaga (FFL) a los pulmones de los cerdos se estableció mediante un procedimiento experimental por etapas. En un primer paso, se nebulizaron formulaciones de ARN de SNIM de FFL a cerdos anestesiados durante la ventilación controlada. En una segunda etapa, se cortaron los pulmones inmediatamente después de que se completó la administración de aerosol y se incubaron las muestras de pulmón en medio de cultivo celular durante la noche antes de que se realizara la medición de luciferasa ex vivo en muestras de pulmón mediante BLI.

[0137] Los cerdos del Landrace alemán se obtuvieron de la Universidad Técnica de Munich, Weihenstephan, Alemania. Los cerdos tenían un peso corporal de 35-90 kg. Cada tratamiento se realizó en un cerdo. En total, cinco cerdos fueron tratados. El primer cerdo (peso de 90 kg) se trató con ARN de SNIM de FFL En la formulación de PEI del Ejemplo 6 usando un nebulizador de malla EFlow y medición de la actividad de luciferasa en homogeneizados de pulmón. El segundo cerdo (60 kg de peso) se trató con ARN de SNIM de FFL En la formulación de PEI del Ejemplo 6 usando un nebulizador de malla EFlow y la medición de la actividad de luciferasa en muestras de pulmón por BLI. El tercer cerdo (80 kg de peso) se trató con ARN de SNIM de FFL En la formulación de PEI del Ejemplo 6 usando un nebulizador de chorro PARI BOY y medición de la actividad de luciferasa en muestras de pulmón mediante BLI. El cuarto cerdo (60 kg de peso) se trató con ARNm de ARN de SNF de FFL/ARNm de hCFTR En la formulación de PEI del Ejemplo 6 usando un nebulizador de malla Aeroneb y la medición de la actividad de luciferasa en muestras de pulmón mediante BLI. El quinto cerdo (35 kg de peso) se trató con ARN de SNIM de FFL En la formulación HGT5001 del Ejemplo 6 usando un nebulizador de malla Aeroneb y la medición de la actividad de luciferasa en muestras de pulmón mediante BLI.

[0138] La sedación en cerdos se inició mediante premedicación con azaperona 2 mg/kg de peso corporal, ketamina 15 mg/kg de peso corporal, atropina 0,1 mg/kg de peso corporal y seguido por la inserción de una línea intravenosa a la vena auricular lateral. Los cerdos se anestesiaron por inyección intravenosa de propofol 3-5 mg/kg de peso corporal según fue necesario. La anestesia se mantuvo con isoflurano (2-3%) con una inyección en bolo de propofol al 1% a 4 a 8 mg/kg de peso corporal para mejorar la anestesia según sea necesario. La duración de la anestesia fue de aproximadamente 1-3 horas. Los cerdos se mataron con una inyección en bolo de pentobarbital (100 mg/kg de peso corporal) y cloruro de potasio a través de la vena de la oreja lateral. Se extirparon los pulmones y se recogieron muestras de tejido de diversas regiones pulmonares, seguido de incubación en un medio de cultivo celular durante la noche. Para la medición de la actividad de luciferasa, las muestras de tejido se homogeneizaron y se analizaron en un luminómetro de tubo o se incubaron en un baño de medio que comprendía sustrato de D-luciferina y se sometieron a BLI de luciferasa ex vivo.

[0139] *Detalles y resultados para cerdo n° 1,* La configuración experimental se ilustra en la Figura 20. Para la administración de aerosol se conectó un nebulizador de malla EFlow en línea con el tubo de ventilación del respirador. La administración de aerosol tomó aproximadamente 60 minutos y fue más larga de lo esperado de los experimentos de control con un sistema abierto. Esto fue aparentemente causado por una contrapresión incrementada durante la nebulización como se evidencia por el flujo de salida del aerosol en el depósito del nebulizador de malla. Se prepararon ocho mililitros de la formulación de PEI del Ejemplo 6 que comprendía 1 mg de ARN de SNIM de FFL en agua para inyección como se describe en WP5 y se nebulizaron en dos porciones separadas de 4 mL, una después de otra. La medición de luciferasa se realizó en homogeneizados tisulares de especímenes de pulmón extirpados de diversas regiones pulmonares después de una incubación durante la noche en medio de cultivo celular. Los valores de expresión se mapearon de acuerdo con el origen de las muestras de pulmón (Figura 21).

[0140] Los resultados mostraron la expresión de luciferasa con éxito en el tejido pulmonar de cerdo. La expresión de luciferasa fue más alta en las partes centrales del pulmón y disminuyó hacia regiones más distales del pulmón. El patrón de expresión se correlacionó con el patrón de deposición esperado de las nanopartículas de ARN de SNIM de FFL-PEI inhaladas de acuerdo con los parámetros de ventilación elegidos. Los niveles de expresión de luciferasa estaban en el mismo intervalo que el observado en los experimentos con ratones en WP5 utilizando la misma formulación de PEI del Ejemplo 6.

[0141] *Detalles y resultados para cerdo n° 2.* La administración en aerosol del ARN de SNIM de FFL En la formulación de PEI del Ejemplo 6 en el cerdo n° 2 se realizó como en el cerdo n° 1, pero se midió la actividad de luciferasa en especímenes pulmonares mediante formación de imágenes bioluminiscentes (BLI). Este experimento se realizó para establecer la medición de la luciferasa ex vivo de muestras de pulmón cultivadas en órganos por BLI. La medición de luciferasa se observó claramente en muestras de tejido individuales de diferentes regiones pulmonares del cerdo tratado (Figura 22). El experimento confirmó los resultados obtenidos del cerdo n° 1,

[0142] *Detalles y resultados para cerdo n° 3.* La administración de aerosol en el cerdo n° 1 y n° 2 con el nebulizador de malla EFlow reveló algunas dificultades técnicas y un tiempo de nebulización inadecuado. Por lo tanto, el cerdo n° 3 se trató usando el nebulizador de chorro PARI BOY que se conectó a la tubería de ventilación a través de un conector en T. La administración de aerosol duró más (aproximadamente 80 min) que con el nebulizador de malla EFlow y la administración de aerosol no fue satisfactoria. Se detectó una actividad de luciferasa muy baja en muestras de pulmón en rodajas de diferentes regiones pulmonares del cerdo tratado (Figura 23).

[0143] *Detalles y resultados para cerdo n° 4.* Los resultados de los experimentos previos demostraron que un nebulizador de malla es más adecuado para la administración de aerosol a los pulmones de cerdos en la configuración elegida que un nebulizador a chorro. Por esta razón, se ensayó otro nebulizador de malla para este fin que nebulizó satisfactoriamente la formulación de PEI del Ejemplo 6 cuando se ensayó en un sistema abierto. El cerdo n° 4 se trató usando el nebulizador de malla Aeroneb que estaba conectado en línea al tubo del respirador. En este experimento, se administró conjuntamente 1 mg de ARNm de hCFTR junto con 1 mg de ARN de SNIM de FFL en la formulación de PEI del Ejemplo 6. Esto se realizó para evaluar la estabilidad de la formulación y la nebulización de nanopartículas co-formuladas ARN de SNIM de FFL/hCFTR ARNm-PEI con respecto a la dosificación repetida que se realizará en el Ejemplo 8. La formulación fue estable y no reveló incompatibilidad con la nebulización. La actividad de luciferasa se observó claramente en especímenes de tejido individuales de diferentes regiones pulmonares del cerdo tratado (Figura 24).

[0144] El experimento confirmó los resultados obtenidos del cerdo n° 1 y el cerdo n° 2, aunque se obtuvieron niveles de expresión más elevados. El experimento mostró que el nebulizador de malla de Aeroneb era el más adecuado para la administración de la formulación de PEI del Ejemplo 6 a los pulmones de los cerdos. Además, el experimento demostró que el ARN de SNIM de FFL todavía estaba activo cuando se administró conjuntamente junto con ARNm de hCFTR.

[0145] *Detalles y resultados para cerdo n° 5.* El cerdo n° 5 se trató con 1 mg de ARN de SNIM de FFL en la formulación HGT5001 del Ejemplo 6 en forma de aerosol con el nebulizador de malla Aeroneb. La formulación podría aerosolizarse sin dificultades técnicas. La actividad de luciferasa se observó claramente en muestras de tejido individuales de diferentes regiones pulmonares del cerdo tratado (Figura 25).

[0146] El experimento mostró que ARN de SNIM de FFL en aerosol en la formulación HGT5001 del Ejemplo 6 es activo en el tejido pulmonar de cerdo, aunque los niveles de expresión fueron de aproximadamente 15-20 veces menores que en los cerdos tratados con la formulación PEI del Ejemplo 6.

[0147] *Conclusión.* Se obtuvieron resultados exitosos usando el nebulizador de malla Aeroneb con la formulación PEI del Ejemplo 6. Se trataron cuatro cerdos con la formulación PEI del Ejemplo 6 para identificar la configuración experimental óptima para la administración de aerosol. Los resultados demostraron que la expresión de luciferasa podría detectarse en homogeneizados de pulmón de cerdo y por BLI. La expresión de luciferasa fue más alta en las partes centrales de los pulmones y apenas se observó en las áreas distales de los pulmones. Se descubrió que el nebulizador de malla Aeroneb ofrece los mejores resultados junto con el tiempo de administración más corto. De acuerdo con estos experimentos, se trató otro cerdo con ARN de SNIM de FFL encapsulado en la formulación HGT5001 del Ejemplo 6. Aunque la expresión de luciferasa se observó claramente en algunas partes de los pulmones de cerdo, los niveles de expresión fueron menores que para ARN de SNIM de FFL en la formulación PEI del Ejemplo 6. Los resultados de este paquete de trabajo demostraron claramente que la administración de ARN SNIM a los pulmones de cerdos como un modelo animal preclínico grande era factible usando diversas formulaciones tales como formulación basada en polímeros y formulaciones basadas en lípidos (por ejemplo, PEI) (por ejemplo, HGT5001). Los resultados de este ejemplo proporcionaron una prueba de concepto para la administración exitosa de ARN SNIM a los pulmones de un animal grande que imita de cerca la situación en pacientes humanos mediante un nebulizador utilizado en la práctica clínica.

Ejemplo 8: Administración de ARNm *in vivo* (dosis semanal)

[0148] Un ensayo se realizó para evaluar la viabilidad de una aplicación en aerosol una vez por semana en los cerdos. La practicidad se definió como la realización de tres aplicaciones de aerosoles de ARNm modificado en intervalos de una semana sin inducción de enfermedad pulmonar (ausencia de eventos adversos superiores al grado 2). Los objetivos adicionales fueron para evaluar i) el grado de angustia de los animales, ii) los eventos adversos que ocurrieron durante la evaluación de laboratorio o clínica de los cerdos, y iii) la medición de las proteínas inducidas (luciferasa y hCFTR).

[0149] Se estableció la administración repetida de aerosol de ARN de SNIM en la formulación de PEI a los pulmones de los cerdos. Los grupos de dos cerdos se trataron una, dos o tres veces a intervalos débiles con ARN de SNIM de FFL/ARN de SNIM de hCFTR en la formulación de PEI del Ejemplo 6. Dos cerdos no tratados sirvieron como controles. Los pulmones se extirparon 24 horas después del tratamiento y la actividad de luciferasa *ex vivo* se midió en muestras de pulmón aisladas mediante BLI. La expresión de la proteína hCFTR se analizó usando IP/WB. Inmunohistoquímica (IHC) se realizó para la detección de la expresión de luciferasa a nivel celular. La toxicología se investigó midiendo las citoquinas inflamatorias en la química del suero y la sangre. La histopatología se realizó en muestras de pulmón. El protocolo de estudio "Pilot project: Repeated application of modified mRNA to establish an animal model for aerosol therapy of cystic fibrosis in pigs" fue aprobado por las autoridades locales antes del inicio de los experimentos (licencia de experimentos con animales N°: 0-045-12)

[0150] *Diseño experimental.* Los cerdos, raza Landrace alemana, hembra de aproximadamente 6 semanas de edad (~ 25 kg de masa corporal en promedio) En la nebulización, se compraron En la Universidad Técnica de Munich, Weihenstephan, Alemania. Los cerdos fueron aleatorizados y tratados de acuerdo con el siguiente esquema (Tabla

3). Los grupos de tratamiento de cada dos cerdos fueron los siguientes:

Grupo 0 - Grupo de control sin tratamiento

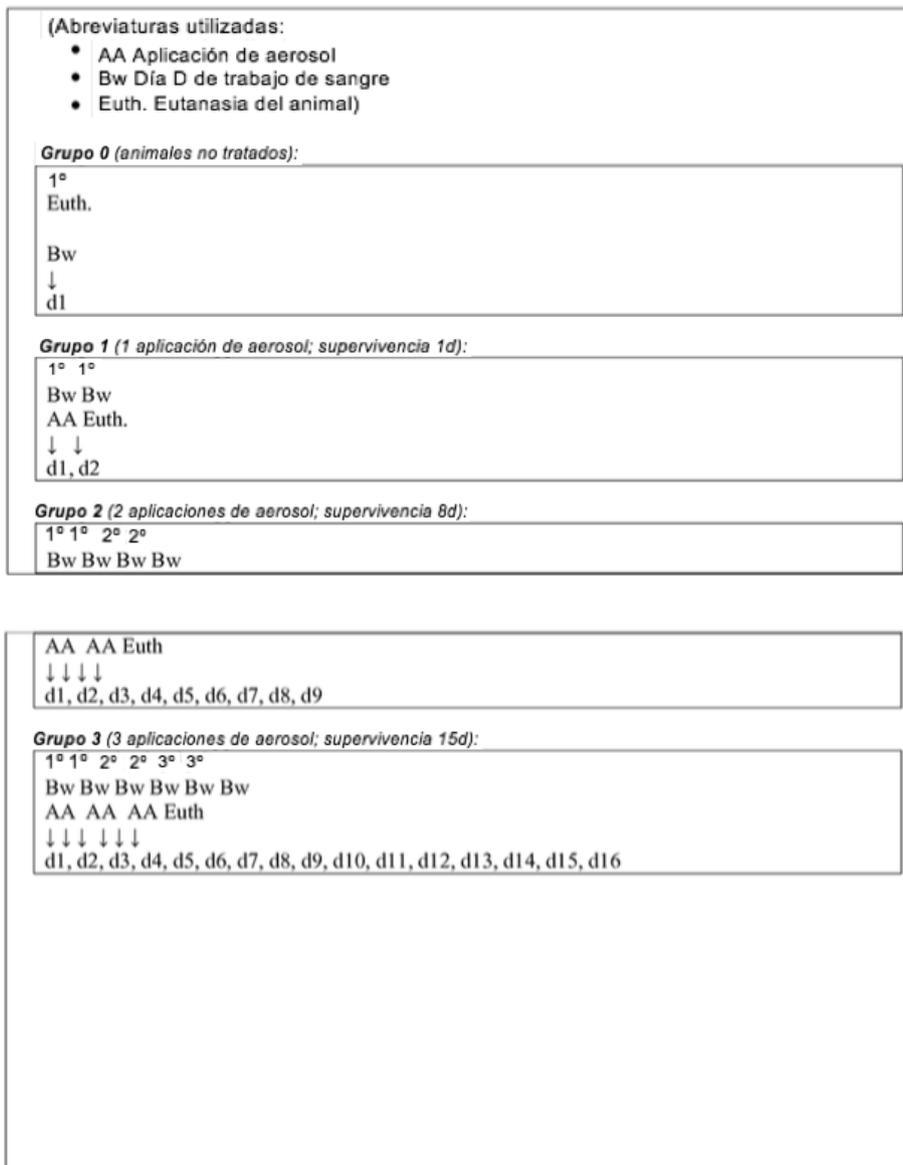
5 **Grupo I** - Administración en aerosol de 1 mg ARN de SNIM de FFL y 1 mg de ARN de SNIM de hCFTR en la formulación PEI del Ejemplo 6 en el día 1,

10 **Grupo II** - Administración en aerosol de 2 mg de ARN de SNIM de hCFTR en la formulación de PEI del Ejemplo 6 en el día 1 y 1 mg de ARN de SNIM de FIM y 1 mg de ARN de SNIM de hCFTR en la formulación de PEI del Ejemplo 6 en el día 8.

15 **Grupo III** - Administración en aerosol de 2 mg de ARN de SNIM de hCFTR (6379-186) en la formulación de PEI del Ejemplo 6 en el día 1 y día 8, administración en aerosol de 1 mg de ARN de SNIM de FIM y 1 mg de ARN de SNIM de hCFTR en la formulación PEI del Ejemplo 6 en el día 15.

[0151] El esquema para el tratamiento y evaluación de cada grupo se muestra en la Tabla 3. Además de las intervenciones ilustradas, el examen físico de los cerdos se realizó diariamente.

Tabla 3. Diagrama de línea temporal de diferentes grupos de tratamiento.



65 [0152] *Procedimiento experimental.* La sedación en cerdos se inició mediante premedicación con azaperona 2 mg/kg de peso corporal, ketamina 15 mg/kg de peso corporal, atropina 0,1 mg/kg de peso corporal y seguido por la

inserción de una vía intravenosa en la vena auricular lateral. Los cerdos se anestesiaron por inyección intravenosa de propofol 3-5 mg/kg de peso corporal según fue necesario. La anestesia se mantuvo con infusión intravenosa continua de propofol al 1% según se requiriera. Los parámetros de ventilación se emparejaron con el dióxido de carbono endexpiratorio y se ajustaron si era necesario. La anestesia, los parámetros respiratorios y cardiovasculares se monitorizaron continuamente utilizando oximetría de pulso, capnografía, sonda de temperatura rectal y estado reflejo. Los animales recibieron una infusión de solución electrolítica equilibrada a 10 mL/kg/h. La duración de la anestesia fue de aproximadamente 80-120 min. Los cerdos fueron extubados después del inicio de suficiente respiración espontánea. Los cerdos fueron sacrificados con una inyección en bolo de pentobarbital de 100 mg/kg de peso corporal a través de la vena lateral de la oreja después de la sedación. Los pulmones se extirparon y se cortaron aproximadamente 13 cm de espesor. Se recogieron muestras de tejido de diversas regiones pulmonares, seguido de incubación en cultivo celular. Para la medición de la actividad de luciferasa, las muestras de tejido se incubaron en un medio de baño que comprende sustrato de D-luciferina y se sometieron a luciferasa BLI ex vivo.

Expresión de luciferasa en grupos de tratamiento por BLI.

[0153] Para el **Grupo 0** (grupo de control sin tratamiento), no se observó actividad de luciferasa en las rodajas de pulmón (Figura 26).

[0154] Para el **Grupo I** (administración en aerosol de 1 mg de ARN de SNIM de FFL y 1 mg de ARN de SNIM de hCFTR en la formulación de PEI del Ejemplo 6), la actividad de luciferasa se detectó claramente en muestras de pulmón de cerdos tratados una vez nº 3 y nº 6 (Figura 27). La expresión de luciferasa fue más alta en las partes centrales de los pulmones.

[0155] Para el **Grupo II** (administración en aerosol de 2 mg de ARN de SNIM de hCFTR en la formulación PEI del Ejemplo 6 en el día 1 y 1 mg ARN de SNIM de FFL y 1 mg ARN de SNIM de hCFTR en la formulación PEI del Ejemplo 6 en el día 8), la actividad de Luciferasa se detectó claramente en muestras de pulmón de cerdos tratados dos veces nº 4 y nº 8 (Figura 28). La expresión de luciferasa fue más alta en las partes centrales de los pulmones. Se debe considerar que las muestras se almacenaron durante 10 horas adicionales en un medio de cultivo celular antes de la medición debido a un corte de energía el día de las mediciones y los problemas técnicos resultantes con el sistema BLI.

[0156] Para el **Grupo III** (administración en aerosol de 2 mg de ARN de SNIM de hCFTR en la formulación PEI del Ejemplo 6 en el día 1 y día 8, administración en aerosol de 1 mg ARN de SNIM de FFL y 1 mg ARN de SNIM de hCFTR en la formulación PEI del Ejemplo 6 en el día 15), la actividad de luciferasa se detectó claramente en muestras de pulmón de cerdos tratados con tres veces nº 1 y nº 2 (Figura 29). La expresión de luciferasa fue más alta en las partes centrales de los pulmones.

[0157] *Propiedades de las nanopartículas de ARN-PEI de SNIM.* El tamaño de partícula y el potencial zeta se midieron para las formulaciones de ARN-PEI de SNIM antes de la nebulización (Tabla X1). Las nanopartículas SNIM ARN-PEI podrían formarse de forma reproducible con un tamaño que varía entre 25-37 nm y potenciales zeta que varían de 30-49 mV.

Tabla X1. Tamaño de partícula y medidas de potencial Zeta

Nº de cerdo	Nº de tratamiento	Radio ± D.E. (nm)	Potencial zeta ± D.E. (mV)
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

[0158] *Expresión de luciferasa en grupos de tratamiento por IHC.* IHC para FFL se realizó en muestras de tejido de rodajas de pulmón (Sophistolab AG, Eglisau, Suiza) que fueron positivas por BLI y se compararon con el tejido pulmonar de un cerdo no tratado y tejido tumoral de ratón positivo para luciferasa como control positivo. Como se esperaba, se observó una señal fuerte en el tejido tumoral de ratón positivo para luciferasa, mientras que el tejido pulmonar del cerdo no tratado no mostró tinción específica. Se pudo observar un patrón de tinción claramente detectable en el tejido pulmonar del cerdo nº 1 que recibió tres tratamientos. La expresión de FFL era más

prominente en el epitelio bronquial de las vías aéreas grandes y pequeñas (Figura 30).

[0159] *Detección de la proteína hCFTR en tejido pulmonar del cerdo tratado por IP/WB.* El tejido pulmonar altamente positivo por BLI del cerdo n° 1 tratado tres veces se sometió a hCFTR IP/WB de acuerdo con el protocolo descrito por van Barneveld A y col., Cell Physiol Biochem. 30, 587 - 95 (2012) (Figura 31). El hCFTR glicosilado complejo maduro aparece como la llamada banda C dispersa. La hCFTR rica en manosa aparece como la llamada banda B, más densa. Claramente, la expresión de hCFTR se observa en células de control positivo T84 y tejido pulmonar de cerdo n° 1 tratado con ARN de SNIM de hCFTR en la formulación de PEI del Ejemplo 6. La expresión de la proteína hCFTR no se observó en cerdos no tratados. Una comparación de la expresión de la proteína hCFTR en tejido pulmonar humano a partir de un estudio publicado utilizando el protocolo idéntico (van Barneveld A et al., Supra) sugirió que la expresión de hCFTR en tejido pulmonar de cerdo después de tratamiento con aerosol SNIM de hCFTR era similar a la expresión hCFTR en pulmón humano sano.

[0160] Este descubrimiento se confirmó adicionalmente mediante el uso de un conjunto diferente de anticuerpos para la detección de la proteína hCFTR por IP/WB en pulmón de cerdo tratado (véase el Ejemplo 6). Una muestra de la luciferasa que expresa áreas pulmonares del cerdo n° 1 y otra del lóbulo caudal del cerdo n° 2, donde no se pudo detectar actividad de luciferasa, indicando así la falta de expresión y/o expresión del ARNm como controles positivo y negativo. Los lisados de proteínas preparados a partir de estas muestras se inmunoprecipitaron usando MAB25031 (R&D Systems) y se detectó la proteína hCFTR usando AB570. Como se muestra en la Figura 32, la expresión de la luciferasa se correlacionó con la expresión del ARNm de hCFTR. La muestra del lóbulo caudal izquierdo del cerdo n° 2 donde no se detectó actividad de luciferasa, también fue negativa para hCFTR (carril 1), mientras que hCFTR podría detectarse en muestras del cerdo n° 1 que eran positivas para luciferasa (carril 2).

[0161] *Toxicología: Evaluación histológica preliminar de muestras de pulmón.* Se realizó una evaluación histológica de muestras de pulmones tomadas después de la eutanasia de tres animales. Después de la inclusión en secciones de parafina, las muestras de pulmón se tiñeron con Hematoxilina-Eosina para la evaluación morfológica. Los hallazgos fueron consistentes a través de las muestras de los tres cerdos, dos de los cuales (cerdo n° 1 y cerdo n° 2) recibieron tres aplicaciones de aerosol y el tercero (cerdo n° 7) fue un control no tratado sin aplicación de aerosol.

[0162] *Toxicología: Angustia.* Solo el cerdo n° 2 y el cerdo n° 1 mostraron signos leves de distrofia los días 2-4 después del primer tratamiento. Por lo tanto, tres aplicaciones de aerosol dentro de las tres semanas causaron solo una leve angustia.

[0163] *Toxicología: Eventos adversos.* El tipo y la frecuencia de los eventos adversos (EA) se analizaron mediante parámetros de laboratorio (sangre, MBS y BAL) y mediante el examen físico de los cerdos (definido como un objetivo secundario en este ensayo).

[0164] El suero y muestras de sangre total fueron tomadas en los puntos de tiempo definidos por el protocolo de estudio. Doce parámetros representativos (hemoglobina, hematocrito, AP, ALT, AST, CK, bilirrubina, creatinina, glucosa, potasio, trombocitos y glóbulos blancos) son indicativos para mostrar patología específica del órgano (sangre, médula ósea, hígado, músculo, y riñón) fueron seleccionados y los resultados de las pruebas obtenidos a partir de la VetMedLab, Ludwigsburg, Alemania se clasificaron de acuerdo con VCOG, versión de 2011.

[0165] Los resultados mostraron que no se observaron eventos adversos graves (EA) en los cerdos (una EA de los grados 3, 4 o 5 habrían calificado como severos). No hubo deterioro de los parámetros de laboratorio después de la aplicación en aerosol de ARN de SNIM en la formulación PEI del Ejemplo 6. Para los ligeros cambios en algunos parámetros (por ejemplo, CK o enzimas hepáticas) es más probable que estos cambios hayan sido causados por el procedimiento experimental per se (p.ej. inyecciones y anestesia). Tampoco se pudo detectar ningún efecto negativo de la aplicación repetida, incluso después de la tercera aplicación, los cerdos del grupo 3 no muestran EA mayor que EA grado 2. Incluso los EA grado 1 o 2 son raros y no muestran correlación con la aplicación en aerosol de ARN de SNIM en la formulación de PEI del Ejemplo 6.

[0166] Además de las muestras de sangre repetidas, se evaluaron otros dos parámetros para evaluar procesos patológicos en el pulmón: i) fluido de lavado bronco-alveolar (BALF) - tomado después de la eutanasia, y ii) muestras de microbiología (MBS) (frotis de la tráquea - tomada durante la anestesia). Se extrajo BALF de cada cerdo durante la autopsia y se almacenó a -80°C para un examen posterior. Los frotis traqueales se tomaron antes de cada aplicación de aerosol y se examinaron microbiológicamente. Estos exámenes revelaron un amplio espectro de patógenos, incluyendo *Bordetella bronchiospectica* (un patógeno común del tracto respiratorio del cerdo) y *Escherichia coli*. Los cerdos fueron tratados una vez con tulatromicina en inyección (1 ml de Draxxin® 10%).

[0167] *Examen físico.* Además de los parámetros de laboratorio, los exámenes físicos de los cerdos se realizaron en los períodos de observación entre las aplicaciones de aerosoles (para detalles véase 1.1.2 del anexo 1 y anexo 4 del protocolo de estudio). Como no se definió un sistema para documentar, calificar y asignar la atribución del EA, ya sea para la intervención o para los cerdos, se utilizó el sistema de criterios toxicológicos comunes (CTC) establecido para perros y gatos (publicado por VCOG en 2011). Para calificar los parámetros de laboratorio, se utilizaron ULN (límites superiores de la normalidad) específicos de la especie y LLN (límites inferiores de la normalidad). Las

evaluaciones clínicas se realizaron dentro de las siguientes seis categorías de EA:

- (1) eventos alérgicos/inmunológicos; (2) pulmonar/respiratorio; (3) signos clínicos constitucionales; (4) dermatológico/piel; (5) gastrointestinal; y (6) pulmonar/respiratorio.

[0168] Los resultados mostraron que no se observó EA grave (sin grado 3, 4 o 5) en los cerdos. No hubo deterioro de los parámetros evaluados mediante el examen físico después de la aplicación en aerosol de ARN SNIM en la formulación PEI. Los dos cerdos del grupo 3 mostraron EA de grado 1 y 2 en tres de los parámetros respiratorios (broncoespasmo/sibilancias, edema de laringe y disnea) pero estos hallazgos leves o moderados se restringieron a uno o dos días. Ya que estas observaciones solo ocurrieron después de la primera aplicación de anestesia/intubación/aerosol en estos dos cerdos pero no después de la segunda o tercera aplicación de aerosol en estos dos cerdos o en cualquier otro cerdo, es poco probable que estos hallazgos sean causados por la sustancia bajo investigación .

[0169] Conclusión. Los resultados de este ejemplo demostraron que la formulación de PEI que codifica FFL y el ARN de SNIM de hCFTR podría ser aerosolizada con éxito repetidamente a los pulmones de los cerdos sin pérdida de actividad después de cada ciclo de tratamiento y sin eventos adversos. La expresión de luciferasa se encontró en partes centrales del tejido pulmonar, pero apenas se detectó en las áreas pulmonares distales. El patrón regional de expresión de luciferasa se correlacionó con el patrón de deposición esperado de la formulación PEI del Ejemplo 6 de acuerdo con los ajustes utilizados para la ventilación controlada. La inmunohistoquímica en muestras de pulmón seleccionadas de cerdos tratados mostró expresión de luciferasa predominantemente en el epitelio bronquial de las vías respiratorias grandes y pequeñas. IP/WB demostró claramente la expresión de la banda C glicosilada en forma compleja de CFTR humano maduro en pulmón de cerdo tratado que estuvo ausente en muestras de pulmón de pulmón de cerdo sin tratar y de luciferasa. Expresión de hCFTR en tejido de pulmón de cerdo después de tratamiento con ARN de SNIM de hCFTR aerosol fue comparable a la expresión hCFTR en pulmón humano sano en comparación con informes publicados que utilizan el protocolo idéntico para detección de proteína hCFTR. Los eventos adversos de grado 1 o 2 fueron muy raros y no mostraron correlación con la aplicación en aerosol del ARN SNIM en la formulación PEI. Por lo tanto, la expresión de la proteína hCFTR se demostró con éxito en pulmones de cerdos tratados con ARNm de SNC hCFTR.

Ejemplo 9: ARNm que codifica CFTR que contiene un péptido señal

[0170] Este ejemplo demuestra que una proteína CFTR puede expresarse de manera efectiva a partir de un ARNm que codifica CFTR con una secuencia que codifica un péptido señal.

[0171] Síntesis de ARN mensajero. Para el experimento, codón etiquetado His₁₀ de C-terminal optimizado regulador de la conductancia transmembrana de fibrosis quística humana (CO-CFTR-C-His₁₀) (SEQ ID NO: 15), un codón optimizado CFTR humano con un líder de secuencia señal de la hormona de crecimiento (GH-CO-CFTR) (SEQ ID NO: 16) y CFTR humano codificado optimizado (CO-CFTR) (SEQ ID NO: 17) Se sintetizaron ARN de SNIM mediante transcripción *in vitro* a partir de un molde de ADN de plásmido usando métodos estándar. **Transfección de células y CFTR.** Células HEK293T de riñón embrionario humano se cultivaron en DMEM (Invitrogen n° de catálogo 11965-092) suplementado con 10% de suero bovino fetal, 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina. El día antes de la transfección, las células se plaquearon en placas de 6 pocillos a una confluencia del 50-60% y se incubaron en condiciones normales de cultivo de tejidos (36°C en una atmósfera humidificada de 5% de CO₂, 95% de aire). En la preparación para la transfección, se diluyeron 60 µl de Lipofectamine 2000 (Invitrogen n° de catálogo 11668019) en medio de suero reducido con OptiMem (Invitrogen n° de catálogo 31985-062) y se agitaron suavemente en vórtice. Para el experimento de 4 µg de cualquiera de CO-CFTR, GH-CO-CFTR o CO-CFTR-C-His₁₀ SNIM ARN se diluyó en 900 µl de Medios OptiMem. El ARNm se añadió inmediatamente a la Lipofectamine® diluida y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. El medio de recubrimiento se aspiró suavemente y se reemplazó con 1 mL de medio de suero reducido de OptiMem y 300 µl de cada complejo de ARNm/lipofectamina® respectivo. Las células se incubaron en condiciones estándar de cultivo de tejidos.

[0172] Análisis Western. Aproximadamente 48 células después de la transfección se eliminaron de sus respectivas placas y se lisaron. El lisado de células enteras se sometió a separación por SDS-PAGE y se sondeó mediante transferencia Western. Como se muestra en la Figura 33, la expresión robusta de la proteína CFTR humana se detectó después de CO-CFTR, GH-CO-CFTR y transfección de ARNm de CO-CFTR-C-His₁₀ humana, por anti-CFTR (A y B) o anticuerpos anti-His (C) (Figura 33).

Ejemplo 10: Administración *in vivo* de ARNm de CO-CFTR-C-His a ratones knockout CFTR

[0173] Análisis de la proteína CFTR humana producida a través de nanopartículas cargadas con ARNm administradas intratraquealmente. Todos los estudios se realizaron con ratones CFTR KO. La formulación de ARNm de CFTR o el control del vehículo se introdujo usando un nebulizador jet PARI Boy. Los ratones se sacrificaron y se perfundieron con solución salina, después de un período de tiempo predeterminado, para permitir la expresión de proteínas a partir del ARNm.

[0174] *Síntesis de ARN mensajero.* En el ejemplo, regulador de conductancia transmembrana de la fibrosis quística humana optimizado de codón etiquetado C-terminal His₁₀ (CO-CFTR-C-His₁₀) de ARN SNIM y ARN de SNIM de FFL optimizado por codón se sintetizaron mediante transcripción *in vitro* a partir de moldes de ADN de plásmido.

5 **[0175]** *Formulación de PEI.* Para el enfoque, la administración y la expresión de ARNm de CO-CFTR-C-His₁₀ en los pulmones de ratones knockout CFTR se evaluó usando formulaciones de nanopartículas tanto poliméricas y basadas en lípidos. Formulaciones de nanopartículas poliméricas con PEI ramificada de 25 kDa preparada de la siguiente manera. La cantidad requerida de ARN SNIM se diluyó justo antes de la aplicación en agua para inyección (Braun, Melsungen) hasta un volumen total de 4 mL y se añadió rápidamente a 4 mL de una solución acuosa de PEI ramificada de 25 kDa usando una pipeta a una relación N/P de 10. La solución se mezcló pipeteando hacia arriba y hacia abajo diez veces y se nebulizó como dos fracciones separadas de 4,0 mL, una después de otra, a los pulmones del ratón usando el nebulizador indicado.

10 **[0176]** *Formulación de cKK-E12.* Para el experimento de nanopartículas basadas en lípidos, se creó una formulación de lípidos usando ARN de SNIM de CO-CFTR-C-His₁₀ en una formulación de cKK-E12: DOPE: Chol: PEGDMG2K (cantidades relativas 50:25:20:5 (mg:mg:mg:mg)). La solución se nebulizó a los pulmones del ratón usando el nebulizador indicado.

15 **[0177]** *Administración por nebulización (aerosol) de ARNm de CO-CFTR-C-His₁₀ humano.* Los materiales de prueba de CFTR se administraron mediante una inhalación de aerosol única a través del nebulizador Jet PARI Boy (volumen de dosis nominal de hasta 8 mL/grupo). El material de prueba se administró a una caja que contenía todo el grupo de animales (n = 4) y se conectó a un sistema de flujo de oxígeno y secuestrante.

20 **[0178]** *La administración de ARNm de CO-CFTR-C-His₁₀.* El ARNm de CFTR se preparó de la manera descrita anteriormente. Se colocaron cuatro ratones knockout CFTR en una caja de cámara de aerosol y se expusieron a 2 mg de ARNm de CFTR humano no modificado optimizado de codón total (que comprende la secuencia de codificación de SEQ ID NO: 3) mediante nebulización (nebulizador jet Pari Boy) en el transcurso de aproximadamente una hora. Los ratones se sacrificaron 24 horas después de la exposición.

25 **[0179]** *Eutanasia.* Los animales se sacrificaron mediante asfixia con CO₂ en tiempos representativos después de la administración de la dosis (± 5%) seguido de toracotomía y exanguinación. La sangre completa (volumen máximo obtenible) se recogió por punción cardíaca y se descartó.

30 **[0180]** *Perfusión.* Después de la exanguinación, todos los animales se sometieron a perfusión cardíaca con solución salina. En resumen, la perfusión intracardíaca de todo el cuerpo se realizó insertando una aguja de calibre 23/21 unida a una jeringa de 10 mL que contenía solución salina introducida en la luz del ventrículo izquierdo para perfusión. La aurícula derecha se incidió para proporcionar una salida de drenaje para perfundir. Se aplicó una presión suave y constante al émbolo para perfundir al animal después de colocar la aguja en el corazón. Se aseguró un flujo adecuado de la solución de enjuague cuando el perfundido que sale fluye limpio (sin sangre visible) lo que indica que la solución de enjuague ha saturado el cuerpo y se completó el procedimiento.

35 **[0181]** *Colección de tejidos.* Después de la perfusión, se les cosecharon los pulmones a todos los animales (derecho e izquierdo). Ambos pulmones (derecho e izquierdo) se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y se almacenaron por separado a una temperatura nominal de -70°C.

40 **[0182]** *Expresión de CFTR humano a partir de ARNm de CO-CFTR-C-His₁₀ en ratones con CFTR inactivado.* La expresión de CFTR se detectó mediante análisis de transferencia de Western de lisado de tejido recogido de pulmones de ratón tratados con ARNm de CFTR. Se detectó una banda "C" madura en los pulmones izquierdo y derecho de todos los ratones tratados, tanto para las formulaciones basadas en lípidos como en las basadas en polímeros (Figura 34). La expresión de la banda madura "C" se verificó por comparación con lisado recogido de células positivas de CO-CFTR-C-His₁₀ humano de HEK 293T como se describe en el Ejemplo 9. En contraste, no se observó señal detectable en el lisado recogido de tipo salvaje sin tratar ratones de control (Figura 34). Tomados en conjunto, estos datos sugieren que las formulaciones poliméricas y basadas en lípidos (como la formulación cKK-E12 listada anteriormente) son efectivas para la administración pulmonar de ARNm de CFTR, por ejemplo, por inhalación, y que una vez administrado, el ARNm de CFTR optimizado para codón puede expresar la proteína CFTR humana.

Ejemplo 11: Estudio de escalada de dosis *in vivo*

45 **[0183]** *Escalada de dosis de la administración de aerosol de ARNm encapsulado con PEI a los pulmones de los cerdos.* La administración en aerosol de una combinación de ARN de SNIM de luciferasa de luciérnaga (FFL) y ARN de SNIM de CFTR (CO-CFTR) humano optimizado por codón en concentraciones variables a pulmones de cerdo se estableció mediante un procedimiento experimental por etapas. En una primera etapa, la formulación de ARN de SNIM FFL/CO-CFTR se nebulizó a cerdos anestesiados durante la ventilación controlada. En una segunda etapa, los animales se sacrificaron mediante inyección en bolo de pentobarbital (100 mg/kg de peso corporal) y cloruro de potasio a través de la vena de la oreja lateral después de la sedación 24 horas después de que se completó la

administración de aerosol. Los pulmones fueron extirpados y cortados a especímenes de tejido de aproximadamente 1 cm de grosor. Para la medición de la actividad de luciferasa, las muestras de tejido se incubaron en un medio de baño que comprende sustrato de D-Luciferina y se sometieron a luciferasa BLI ex vivo. Después de BLI, se tomaron muestras de regiones de luciferasas positivas y luciferasas negativas para histopatología, inmunohistoquímica e hibridación in situ. Las muestras residuales se congelaron por choque en nitrógeno líquido y posteriormente se almacenaron a -80°C hasta el análisis por IPWB y Elisa.

[0184] *Síntesis de ARN mensajero.* En el ejemplo, el ARN de SNIM del regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística humana codificada con codón (CO-CFTR), el ARN de SNIM del ARNm de FFL optimizado en codones se sintetizaron por transcripción *in vitro* a partir de moldes de ADN plasmídico utilizando métodos estándar.

[0185] *Diseño experimental.* Los cerdos del Landrace alemán se obtuvieron de la Universidad Técnica de Múnich, Weißenstephan, Alemania. Los cerdos tenían un peso corporal de 35-90 kg. El estudio se diseñó usando cerdos con la misma edad y peso para controlar la variabilidad. Se estableció una cohorte única de 6 cerdos (3 machos y 3 hembras) para cada grupo experimental del estudio de 4 brazos. La primera cohorte se trató con agua para inyección (WFI) sola, que se administró usando un nebulizador de malla Aeroneb. La segunda cohorte se trató con una solución de 1 mg de ARN de SNIM de FFL y 1 mg de ARN de SNIM de CFTR (CO-CFTR) humano optimizado por codón en la formulación de PEI que se describe a continuación, usando un nebulizador de malla Aeroneb. La tercera cohorte recibió 1 mg de ARN de SNIM de FFL y 5 mg de ARN de SNIM de CFTR (CO-CFTR) humano optimizado por codón en la formulación de PEI que se describe a continuación. La cuarta cohorte se trató con 1 mg de ARN de SNIM de FFL y 10 mg de ARN de SNIM de CFTR (CO-CFTR) humano optimizado por codón en la formulación de PEI que se describe a continuación. El esquema para el tratamiento y evaluación de cada grupo se muestra en la Tabla 4 a continuación.

Tabla 4. Diseño experimental para el estudio de escalada de dosis

Cohorte	Cerdos (Nº y Sexo)	Tratamiento	Formulación
1	6 (3 hombres + 3 mujeres)	N/A	WFI
2	6 (3 hombres + 3 mujeres)	1 mg FFL + 1 mg CO-CFTR	25 kDa PEI + WFI ramificado
3	6 (3 hombres + 3 mujeres)	1 mg FFL + 5 mg CO-CFTR	25 kDa PEI + WFI ramificado
4	6 (3 hombres + 3 mujeres)	1mg FFL + 10mg CO-CFTR	25 kDa PEI + WFI ramificado

[0186] *Formulación de ARNm - PEI.* Se realizó un procedimiento de formulación estandarizado ejemplar descrito a continuación justo antes del tratamiento de los animales.

Materiales:

[0187]

Bomba de jeringa (dispositivo de mezcla):
 Fabricante: KD Scientific
 Tipo: KDS-210-CE

Jeringuilla:

[0188]

Fabricante: B.Braun
 Tipo: Omnifix, 20 mL o 30 mL/Luer Lock Solo
 Ref: 4617207V

Tubería:

[0189]

Fabricante: B.Braun
 Tipo: Conjunto de Extensión Safeflow
 Ref.: 4097154

Aguja:

[0190]

5 Fabricante: B. Braun
 Tipo: Sterican, 20G x 1 1/2"
 Ref.: 4657519

Válvula de mezcla:

[0191]

10 Fabricante: B. Braun
 Tipo: Discifix C 3SC
 Ref.: 16494C

15 Agua para inyección:

[0192]

20 Fabricante: B. Braun
 Tipo: Aqua
 Ref.: 82423E

25 [0193] Método de ejemplo para la preparación de poliplejos que contienen 1 mg de ARN de SNIM de hCFTR y 1 mg de ARN de SNIM de FFL N/P 10 en un volumen de 8 mL: 3 mL de agua para inyección y 3 mL de solución madre de ARN (c: 1 mg/mL en agua; 1,5 mL de ARNm de FFL + 1,5 mL de ARNm de CFTR) se cargaron en un tubo halcón de 15 mL. En un segundo tubo Falcon se mezclaron 5,61 mL de agua para inyección con 0,39 mL de solución madre brPEI (c: 10 mg/mL en agua). Se fijaron dos jeringas de 20 mL en el dispositivo de mezcla. Cada uno de ellos estaba conectado a una aguja a través de un tubo. Una jeringa se llenó con ARN y la otra con solución de PEI utilizando la función de extracción de la bomba de jeringa. (Configuraciones: Diámetro: 20,1mm, Flujo: 5mL/min, Volumen: 5,9mL). Las agujas se quitaron y los tubos se conectaron a la válvula mezcladora. Era importante conectar la jeringa que contenía la solución de ARN a la posición en ángulo de la válvula. Para controlar el diámetro de salida, se conectó una aguja. La mezcla se realizó utilizando la función de infusión de la bomba de jeringa (Configuraciones: Diámetro: 20,1 mm, Flujo: 40 mL/min, Volumen: 5,8 mL). Para lograr un índice de polidispersidad reproducible, las muestras se fraccionaron manualmente durante la mezcla. Los primeros μ L hasta que el flujo fue estable (100-200 μ L) y los últimos μ l que a veces contenían burbujas de aire se recogieron en un tubo separado. La mezcla se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente para la formación de poliplejo y después se almacenó en hielo. Para diferentes dosis, los parámetros fueron modificados y adaptados como se muestra En la Tabla 5.

40 **Tabla 5:** Volúmenes ejemplares y ajustes para diferentes volúmenes de mezcla

Cohorte	Componente ARNm			Componente PEI		
	V (ARN SNIM 1mg/mL) (mL)	V (ARN SNIM hCFTR 1mg/mL) (mL)	Agua (mL)	V (reserva brPEI; 10 mg/mL) (mL)	Agua (mL)	Volumen aerosolizado (ml)
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

Cohorte	V (retirada) (ml)	V (infusión) (ml)
2	5,9	5,8
3	13,9	13,8
4	23,9	23,8

60 V (retirada y V (infusión) designan el ajuste en la bomba de jeringuilla para aspiración y dispensión, respectivamente, de los componentes de ARNm y PEI

65 [0194] *Transfección de células HEK para verificar la funcionalidad de los complejos nebulizados.* Después de la nebulización, se utilizó una alícuota de complejos (80 μ l) para transfectar las células HEK. Un día antes de la transfección, 1x10⁶ células se sembraron en placas de 6 pocillos. En el día de la transfección, el medio se eliminó de

las células, las células se lavaron con PBS una vez seguido de lo cual se añadieron 80 µl de complejos junto con 920 µl de medio MEM sin suero por pocillo. Para cada complejo, se prepararon tres pocillos replicados. Las células se incubaron con los complejos durante 4 horas bajo condiciones estándar de cultivo celular. Al final de la incubación, se retiró el medio que contenía complejo y se añadió medio MEM que contenía suero (1 ml) por pocillo. Las placas se incubaron en condiciones de cultivo celular estándar. 24 horas después de la transfección, los lisados de proteínas se prepararon usando el mismo protocolo y los tampones utilizados para los tejidos animales con exclusión del paso de homogeneización. Las células de tres pozos se combinaron para el análisis. La expresión de CFTR humano se detectó usando inmunoprecipitación con anticuerpo R24.1 (R&D Systems) y transferencia Western con una combinación de anticuerpos 217, 432 y 596 (todos de Cystic Fibrosis Consortium, Universidad de Pensilvania, PA, EE.UU.). Se pudo detectar hCFTR para todos los complejos nebulizados en cerdos (véanse las Figuras 54-57).

[0195] Aplicación en aerosol. El aerosol (WFI solo 44 mL, formulación modificada de PEI de ARNm en WFI: 8, 24 y 44 ml) se nebulizó y se inhaló en el cerdo anestesiado a través de un nebulizador de malla Aeroneb®. La sedación en cerdos se inició mediante premedicación con azaperona 2 mg/kg de peso corporal, ketamina 15 mg/kg de peso corporal, atropina 0,1 mg/kg de peso corporal y seguido por la inserción de una vía intravenosa en la vena auricular lateral. Los cerdos se anestesiaron por inyección intravenosa de propofol 3-5 mg/kg de peso corporal según fue necesario. La anestesia se mantuvo con isoflurano (2-3%) con una inyección en bolo de propofol al 1% a 4 a 8 mg/kg de peso corporal para mejorar la anestesia según sea necesario. La duración de la anestesia fue de aproximadamente 1-3 horas. Los cerdos se sacrificaron con una inyección en bolo de pentobarbital (100 mg/kg de peso corporal) y cloruro de potasio a través de la vena de la oreja lateral 24 horas después de la finalización de la aerosolización. Se extirparon los pulmones y se recogieron muestras de tejido de diversas regiones pulmonares. Las muestras almacenadas se sometieron a diferentes métodos de evaluación tales como bioluminiscencia, histopatología, IP/transferencia Western y Elisa.

[0196] Análisis de bioluminiscencia. Para la medición de la actividad de luciferasa, las muestras de tejido se homogeneizaron y se analizaron en un luminómetro de tubo o se incubaron en un baño de medio que comprendía sustrato de D-luciferina y se sometieron a BLI de luciferasa *ex vivo*. Los datos ilustran que se observó una fuerte señal de bioluminiscencia para cada una de las cohortes 2-4 (1 mg, 5 mg y 10 mg respectivamente), en comparación con las muestras de control de tejido pulmonar de la cohorte 1 (control de vehículo WFI) (Figuras 35-38)

[0197] Análisis de expresión de CFTR mediante transferencia Western e inmunohistoquímica. Las muestras de tejidos positivos para FFL se extirparon (un mínimo de 10 muestras por cada cerdo dentro de una cohorte) y se analizaron por inmunoprecipitación/transferencia de Western (IP-WB) e inmunohistoquímica para CFTR humana. Brevemente, se prepararon lisados de proteínas a partir de pulmones de cerdo de la siguiente manera: se usaron entre 300 y 400 mg de tejido pulmonar para el análisis. El tejido se homogeneizó en tampón de base (20 mM de Tris, 150 mM de NaCl, pH 8,0) que contenía inhibidores de proteasa usando LysingMatrixA (MPBiomedicals, Ref: 6910-500) y Homogeneizador "FastPrep24" (MP Biomedicals). La mezcla de tejidos completa se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf preenfriado de bloqueo de 2 mL y se añadieron 25 µl de yodoacetamida (Sigma: I6125) y 1 µl de corte Omni (1:5 diluido en tampón de corte Omni) (Epicentre: OC7810K). Las muestras se incubaron en hielo durante 5 minutos, seguido por la adición de 26 µl de solución de SDS al 10%. Las muestras se incubaron adicionalmente a 4°C durante 60 min en un agitador. Después de la incubación, se añadieron a las muestras 260 µl de tampón de lisis (850 µl de tampón básico + TritonX-100 al 10% + deoxolato de sodio al 5%) y se incubaron a 4°C en un agitador durante 90 minutos. Finalmente, los lisados de proteínas se centrifugaron a 13.000 rpm a 4°C durante 10-20 minutos y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo de Eppendorf. La concentración de proteína se cuantificó usando el ensayo de proteína BCA (Pierce). Las muestras se dividieron en partes alícuotas que contenían 10 mg de proteína total y los volúmenes finales se ajustaron con tampón de base a 1 mL por muestra. En base a los datos presentados en el Ejemplo 6, la inmunoprecipitación de CFTR se llevó a cabo usando el anticuerpo R24.1 y fue seguida por inmunodetección de transferencia Western de CFTR usando una combinación triple de tres anticuerpos diferentes obtenidos del Consorcio de Fibrosis Quística de la Universidad de Pensilvania, Pensilvania, EE.UU. (anticuerpos 217, 432, 596). Para controlar la variabilidad intragrupo entre diferentes animales y la variabilidad en la expresión de CFTR, la banda de marcadores en el estándar de tamaño de proteína correspondiente a 150 kDa se estableció como referencia y las inserciones de banda de diferentes grupos se normalizaron a este valor. Como se demuestra en la Figura 39, solo el 16% de la muestra de tejido analizada de los cerdos de control de la cohorte 1 dio como resultado un nivel de expresión de CFTR mayor que el valor inicial. Por el contrario, las cohortes 3 y 4, que representan los grupos de tratamiento de 5 mg y 10 mg respectivamente, dieron como resultado más del 30% de muestras de tejido pulmonar positivas para un nivel de expresión de CFTR superior al valor inicial (Figura 39). Además, el aumento en la expresión de CFTR observado en las cohortes 3 y 4 fue casi dos veces mayor que el control.

[0198] El análisis de la inmunohistoquímica de CFTR se realizó por cuantificación de bronquios y bronquios positivos para CFTR. Se consideró que un bronquio/bronquiolo era positivo si se detectaba al menos una célula epitelial dentro de la capa de células epiteliales que mostraba una señal clara de CFTR localizada en la membrana. En la Figura 40 se representa una imagen representativa de una muestra "positiva". Las codificaciones para la inmunohistoquímica de CFTR se optimizaron mediante la evaluación de la especificidad de los anticuerpos disponibles contra CFTR utilizando un único anticuerpo o combinaciones de hasta tres anticuerpos,

respectivamente. Se observaron señales claras específicas de CFTR después de la incubación del anticuerpo 596. Los datos demuestran que se detectaron células epiteliales positivas por CFTR en secciones de tejido pulmonar de las cuatro cohortes, demostrando la detección de CFTR humana y porcina mediante el procedimiento de inmunohistoquímica (Figura 41 y 45). Aunque se observaron bajos niveles de expresión de CFTR (Figura 42), medio (Figura 43) y alto (Figura 44) para la cohorte 3, el hallazgo general demuestra que el tratamiento de 5 mg de ARN de SNTR de CFTR humano optimizado por codón resultó en un mayor número de células positivas por CFTR y la intensidad total de la señal CFTR en comparación con el control del vehículo. Los datos también ilustran una potenciación aún mayor de la expresión de CFTR después de 10 mg de tratamiento, demostrando así un claro efecto de respuesta a la dosis (Figura 45). La cuantificación de números absolutos y relativos de bronquios/bronquiolos positivos para CFTR respalda adicionalmente estos hallazgos, revelando un número significativamente mayor en animales que se trataron con 5 o 10 mg de ARN de SNIM de CFTR humano en comparación con el control de vehículo (Figura 46). Indicando una elevación general en los niveles de expresión de CFTR después del tratamiento con ARN CFIM humano de SNIM.

[0199] Análisis de expresión de CFTR mediante hibridación *in situ* (ISH). Se extirparon muestras de tejidos positivos para FFL (mínimo de 10 muestras para cada cerdo dentro de una cohorte) y se sometió a un análisis de hibridación *in situ* manual utilizando la tecnología de sonda "ZZ" RNAscope® (Advanced Cell Diagnostic). Las sondas se generaron en base a la secuencia optimizada de codón de ARN de SNIM de CFTR humano optimizado por codón (SEQ ID NO: 17). Brevemente, el ensayo RNAscope® es un ensayo de hibridación *in situ* diseñado para visualizar moléculas de ARN individuales por célula en tejido fijado con formalina e incluido en parafina (FFPE) montado en portaobjetos. Cada muestra de tejido embebida se pretrató de acuerdo con el protocolo del fabricante y se incubó con una sonda de ARN específica de CFTR humana específica del blanco. La sonda hCFTR se mostró unida a CFTR, con reactividad cruzada con humanos, ratones, ratas, cerdos y monos. Una vez unida, la sonda se hibrida con una cascada de moléculas de amplificación de señal, a través de una serie de 6 ciclos consecutivos de amplificación. La muestra se trató luego con una sonda marcada con HRP específica para el casete de amplificación de señal y se ensayó mediante visualización cromática usando 3,3'-diaminobenzidina (DAB). Se usó una sonda específica para Ubiquitina C como control positivo (Figuras 47A y 48A), mientras que se usó *dapB* como control negativo (Figuras 47B y 48B). La señal CFTR positiva se comparó con la del tejido pulmonar porcino tratado no tratado y tratado con vehículo (Figura 49A y B). Las muestras teñidas se visualizaron bajo un microscopio de campo brillante estándar. Los datos demuestran que el tratamiento con 1 mg de ARN de SNIM de CFTR humano optimizado por codón produjo un aumento dramático en la expresión de CFTR tanto en el tejido pulmonar derecho (A) como izquierdo (B) de la cohorte 2, en comparación con el control del vehículo (Figura 49 y 50A y B). Además, se observó un aumento adicional en la expresión de CFTR para los grupos de tratamiento de 5 mg y 10 mg, como se demostró mediante un aumento dramático de la tinción observada en las muestras de pulmón derecho (A) e izquierdo (B) analizadas para las cohortes 3 y 4 (Figuras 51 y 52 A y B). Tomados en conjunto, estos datos apoyan firmemente la administración efectiva de ARNm por inhalación y expresión de CFTR humano en ambos lóbulos del pulmón y sus diversos tejidos.

[0200] Conclusión. Los resultados demostraron que tanto la luciferasa como el ARNm de CFTR pueden administrarse de manera efectiva *in vivo* a los tejidos pulmonares. Se observó expresión de luciferasa a lo largo de varias muestras de tejido recogidas de diferentes regiones dentro de los pulmones derecho e izquierdo. Por lo tanto, sugiere que la nebulización es un enfoque eficaz para la administración de ARNm y da como resultado una distribución bastante uniforme. Además, aparte de luciferasa, el ARNm de CFTR también se administró de manera eficiente a los pulmones, lo que dio como resultado una expresión de proteína potenciada. La expresión y la actividad proteica se verificaron mediante IP-WB, inmunohistoquímica e hibridación *in situ*. Cada enfoque demostró claramente un aumento dependiente de la dosis en el suministro de ARNm y la expresión y/o actividad de CFTR, dentro de los tejidos del pulmón. Tomados en conjunto, los experimentos ponen de manifiesto la practicidad y la viabilidad general para suministrar ARNm de CFTR al pulmón de un sujeto humano y demuestran la eficacia de la producción de proteína CFTR *in vivo* para uso terapéutico.

Ejemplo 12: Expresión *in vivo* en el pulmón

[0201] Este ejemplo muestra la expresión *in vivo* exitosa en el pulmón después del suministro en aerosol de nanopartículas cargadas con ARNm. Todos los estudios se realizaron con cerdos del Landrace alemán, obtenidos de la Universidad Técnica de Munich, Weihenstephan, Alemania. Los cerdos tenían un peso corporal de 35-90 kg. La formulación de ARNm de FFL/CO-CFTR-C-His10 o el control del vehículo se introdujo usando un nebulizador jet Pari. Los cerdos se sacrificaron y se perfundieron con solución salina, después de un período de tiempo predeterminado, para permitir la expresión de proteína a partir del ARNm.

[0202] Síntesis de ARN mensajero. En el ejemplo, el ARNm de luciferasa de la mosca de fuego optimizada por codones (CO-FFL) se sintetizó mediante transcripción *in vitro* a partir de moldes de ADN plasmídico.

[0203] Formulación de cKK-E12. Para el experimento de nanopartículas basadas en lípidos, se creó una formulación de lípidos usando 1 mg de FFL + 9 mg de ARNm de CO-CFTR-C-His₁₀ encapsulado en una formulación de cKK-E12:DOPE:Chol:PEGDMG2K (cantidades relativas 40:30:25:5 (relación en moles). La solución se nebulizó a los pulmones de cerdo utilizando el nebulizador indicado.

5 [0204] *Aplicación en aerosol.* El aerosol (formulación de Salina o CO-FFL cKK-E12) se nebulizó e inhaló en el cerdo anestesiado. La sedación en cerdos se inició mediante premedicación con azaperona 2 mg/kg de peso corporal, ketamina 15 mg/kg de peso corporal, atropina 0,1 mg/kg de peso corporal y seguido por la inserción de una vía intravenosa en la vena auricular lateral. Los cerdos se anestesiaron por inyección intravenosa de propofol 3-5 mg/kg de peso corporal según fue necesario. La anestesia se mantuvo con isoflurano (2-3%) con una inyección en bolo de propofol al 1% a 4 a 8 mg/kg de peso corporal para mejorar la anestesia según sea necesario. La duración de la anestesia fue de aproximadamente 1-3 horas. Los cerdos se mataron con una inyección en bolo de pentobarbital (100 mg/kg de peso corporal) y cloruro de potasio a través de la vena de la oreja lateral. Se extirparon los pulmones y se recogieron muestras de tejido de diversas regiones pulmonares, seguido de incubación en un medio de cultivo celular durante la noche. Las muestras almacenadas se sometieron a detección de bioluminiscencia.

15 [0205] *Análisis de bioluminiscencia.* Para la medición de la actividad de luciferasa, las muestras de tejido se homogeneizaron y se analizaron en un luminómetro de tubo o se incubaron en un baño de medio que comprendía sustrato de D-luciferina y se sometieron a BLI de luciferasa *ex vivo*. Se observó una fuerte señal de bioluminiscencia para cada uno de los cerdos (A) FFL/CO-CFTR-C-His10 tratados con ARNm, en comparación con (B) muestras de tejido pulmonar de control de cerdos (control del vehículo salino) (Figura 53 A y B).

20 [0206] Estos datos ilustran que el ARNm de FFL/CFTR se administró con éxito y se expresó en el pulmón mediante administración en aerosol.

20 BREVE DESCRIPCIÓN DE SECUENCIAS

[0207]

- 25 SEQ ID NO 1, Secuencia de aminoácidos de CFTR de tipo salvaje.
- SEQ ID NO 2. Secuencia codificante de ARNm de CFTR de tipo salvaje.
- 30 SEQ ID NO 3. Secuencia de codificación del ARNm de CFTR no natural nº 1,
- SEQ ID NO 4. CFTR ARNm 5'-UTR.
- SEQ ID NO 5. CFTR ARNm 3'-UTR nº 1,
- 35 SEQ ID NO 6. FFL 5' UTR.
- SEQ ID NO 7. Secuencia de codificación de FFL.
- 40 SEQ ID NO 8. FFL 3' UTR.
- SEQ ID NO 9. Secuencia codificante de ARNm de CFTR no natural nº 2.
- SEQ ID NO 10. Secuencia codificante de ARNm de CFTR no natural nº 3.
- 45 SEQ ID NO 11. Secuencia codificante de ARNm de CFTR no natural nº 4.
- SEQ ID NO 12. Secuencia codificante de ARNm de CFTR no natural nº 5.
- 50 SEQ ID NO 13. Secuencia codificante de ARNm de CFTR no natural nº 6.
- SEQ ID NO 14. Secuencia codificante de ARNm de CFTR no natural nº 7.
- SEQ ID NO 15. Secuencia de codificación de ARNm de fusión de His₁₀ CFTR humana C-terminal optimizada con codón.
- 55 SEQ ID NO 16. Secuencia codificante de ARNm de CFTR humana optimizada en codón con una secuencia líder de hormona de crecimiento.
- SEQ ID NO 17. ARNm de CFTR humano optimizado con codón
- 60 SEQ ID NO 18. Secuencia líder de ARNm nº 1
- SEQ ID NO 19. Secuencia de líder de ARNm nº 2
- 65 SEQ ID NO 20. ARNm de CFTR 3'-UTR nº 2.

SEQ ID NO: 1

[0208]

5 MQRSPLEKASVVSKLFFSWTRPILRKGYRQRLELSDIYQIPSV
SADNLSEKLEREWDRELASKKNPKLINALRRCFFWRFMFYGIFLYLGEVTKAVQPLLL
GRIIASYDPDNKEERSIAIYLGIGLCLLFIVRTLHHPAIFGLHHIGMQMRIA MFSLI
10 YKKTLLKSSRVLDKISIGQLVSLLSNNLNKFDEGLALAHFVWIAPLQVALLMGLIWEL
LQASAF CGLGFLIVLALFQAGLGRMMM KYRDQRAGKISERLVITSEMIENIQSVKAYC
WEEAMEKMIENLRQTELKLRKAA YVRYFNSSAFFFSGFFVFLSVLPYALIKGIILR
KIFTTISFCIVLRMAVTRQFPWAVQTWYDSLGAINKIQDFLQKQEYKTLEYNLTTTEV
15 VMENVTAFWEEGFGELFEKAKQNNNNRKTNSGDDSLFFSNFSLGTPVLKDINFKIER
GQLLAVAGSTGAGKTSLLMVIMGELEPSEGKIKHSGRISFCSQFSWIMPGTIKENIIF
GVSYDEYRYSVIKACQLEEDISKFAEKDNIVLGE GGITLSSGGQRARISLARAVYKDA
DLYLLDSPFGYLDVLTKEIFEVSCVKLMANKTRILVTSKMEHLKKADKILILHEGSS
20 YFYGTSELQNLQPDFSSKLMGCDSFDQFSAERRNSILTETLHRFSLEGDAPVSWTET
KKQSFKQTGEFGEKRKNSILNPINSIRKFSIVQKTPLOMNGIEEDSDEPLERRLSLVP
DSEQGEAILPRISVISTGPTLQARRRQSVLNLMTHSVNOGQNIHRKTTASTRKVSLAP
QANLTELDIYSRRLSQETGLEISEEINEEDLKECFDDMESIPAVTTWNTYLRYITVH
25 KSLIFVLIWCLVIFLAEVAASLVVLWLLGNTPLQDKGNSTHSRNNSYAVIITSTSSYY
VFYIYVGVADTLLAMGFFRGLPLVHTLITVSKILHHKMLHSVLQAPMSTLNTLKAGGI
LNRFSKDIAILLDDLLPTIFDFIQLLLIVIGAI AVVAVLQPYIFVATVPVIVAFIMLR
AYFLQTSQQLKQLESEGRSPIFTHLVTSLKGLWTLRAFGGRQPYFETLFHKALNLHTAN
WFLYLSTLRWFQMRIEMIFVIFIAVTFISILTTEGEGEGRVGIILTAMNIMSTLQWA
30 VNSSIDVDSL MRSVSRVFKFIDMPTEGKPTKSTKPYKNGQLSKVMIIENSHVKKDDIW
PSGGQMTVKDLTAKYTEGGNAILENISFSISPGQRVGLLGR TGSGKSTLLSAFLRLN
TEGEIQIDGVSWDSITLQQWRKAFGVIPQKV FIFSGTFRKNLDPYEQWSDQEIWKVAD
EVGLRSVIEQFPGKLDVFLVDGGCVLSHG HKQLMCLARSVLSKAKILLLDEPSAHLDP
35 VTYQIIRRTLKQAFADCTVILCEHRIEAMLECCQFLVIEENKVRQYDSIQKLLNERSL
FRQAISPSDRVKLFPHRNSSKCKSKPQIAALKEETEEEVQDTRL (SEQ ID NO:1)

SEQ ID NO: 2

[0209]

40
45
50
55
60
65

5 AUGCAGAGGUCGCCUCUGGAAAAGGCCAGCGUUGUCUCCAAACUUUUUUUCAGCUGGACC
AGACCAAUUUUUGAGGAAAAGGAUACAGACAGCGCCUGGAAUUGUCAGACAUAUACCAAU
CCCUUCUGUUGAUUCUGCUGACAAUCUAUCUGAAAAAUUGGAAAGAGAAUGGGAUAGAG
10 AGCUGGCCUCAAAGAAAAAUCCUAAAACUCAUUAUUGCCCUUCGGCGAUGUUUUUCUGG
AGAUUAUGUUCUAUGGAAUCUUUUUAUUAUUUAGGGGAAGUCACCAAAGCAGUACAGCC
UCUCUJACUGGGGAAGAAUCAUAGCUUCCUAUGACCCGGUAACAAGGAGGAACGCUCUA
UCGCGAUUAUCUAGGCAUAGGCUUAUGCCUUCUCUUUAUUGUGAGGACACUGCUCCUAC
15 ACCCAGCCAUUUUUUGGCCUUCAUACACAUUGGAAUUGCAGAUGAGAAUAGCUAUGUUUAGU
UUGAUUUUAAGAAGACUUUAAGCUGUCAAGCCGUGUUCUAGAUAAAAUAAGUAUUGG
ACAACUUGUAGUCUCCUUCCAACAACCCUGAACAAAUUUGAUGAAGGACUUGCAUUGG
CACAUUCGUGUGGAUCGCUCUUUGCAAGUGGCACUCCUCAUGGGGCUAUCUGGGGAGU
20 UGUUAACAGGCUGGCCUUCUGUGGACUUGGUUCCUGAUAGUCCUUGCCUUUUUCAGG
CUGGGCUAGGGAGAAUGAUGAUGAAGUACAGAGAUACAGAGAGCUGGGAAGAUACAGUGAA
AGACUUGUGAUUACCUCAGAAAUGAUUGAAAAUAUCCAUCUGUUAAGGCAUACUGCUG
GGAAGAAGCAAUGGAAAAAUUGAUUGAAAAUCUUAAGACAAACAGAACUGAAACUGACUC
GGAAGGCAGCCUUAUGUGAGAUACUCAAUAGCUCAGCCUUCUUCUUCUCAGGGUUCUUU
25 GUGGUGUUUUUAUCUGUGCUUCCCUAUGCACUAAUCAAGGAAUCAUCCUCCGGAAAAU
AUUACCACCAUCUCAUUCUGCAUUGUUCUGCGCAUGGCGGUCACUCGGCAAUUUCCUG
GGCUGUACAAACAUGGUUAGACUCUCUUGGAGCAAUAAACAAAAUACAGGAUUUCUUAC
AAAAGCAAGAAUUAAGACAUUGGAAUUAACUUAACGACUACAGAAGUAGUGAUGGAG
AAUGUAAACAGCCUUCUGGGAGGAGGGAAUUGGGGAAUUUUUUGAGAAAAGCAAAACAAAA
30 CAAUAAACAAUAGAAAAACUUCUAAUUGGUGAUGACAGCCUUCUUCAGUAAUUUCUCAC
UUCUUGGUACUCCUGUCCUGAAAGAUUUUUUUAAGAUAGAAAAGAGGACAGUUGUUG
GCGGUUGCUGGAUCCACUGGAGCAGGCAAGACUUCACUUCUAAUGAUGAAUUGGGGAG
ACUGGAGCCUUCAGAGGGUAAAAUUAAGCACAGUGGGAAGAAUUUCAUUCUGUUCUCAGU
35 UUUCUGGAUUUAGCCUGGCACCAUUAAAAGAAAAUAUCAUCUUUGGUGUUUCCUUAUGAU
GAAUAUAGAUACAGAAGCGUCAUCAAGCAUGCCAACUAGAAGAGGACAUUCUCCAAGUU
UGCAGAGAAAAGACAAUAUAGUUCUUGGAGAAGGUGGAAUCACACUGAGUGGAGGUAAC
GAGCAAGAAUUUCUUUAGCAAGAGCAGUAUACAAAGAUGCUGAUUUUGUAUUUAUAGAC
UCUCCUUUUGGAUACCUAGAUGUUUUAACAGAAAAAGAAUUAUUUGAAAGCUGUGUCUG
40 UAAACUGAUGGCUAACAAAAACUAGGAUUUUGGUCACUUCUAAAAUGGAACAUUUAAAGA
AAGCUGACAAAAUUAUUUUUUGAAUGAAGGUAGCAGCUAUUUUUUUGGGACAUUUUCA
GAACUCCAAAAUCUACAGCCAGACUUUAGCUCAAAAUCUAGGGGAUGUGAUUCUUUCGAC
CAUUUAGUGCAGAAAGAAGAAUUCAAUCCUAAACUGAGACCUUACACCGUUUCUUAU
AGAAGGAGAUUCUCCUGUCUCCUGGACAGAAACAAAAAAACAUCUUUUAAACAGACUG
45 GAGAGUUUGGGGAAAAAGGAAGAAUUCUAAUUCUCAAUCCAAUCAACUCUAUACGAAAA
UUUUCCAUUGUGCAAAGACUCCUUACAAAUGAAUGGCAUCGAAGAGGAUUCUGAUGA
GCCUUUAGAGAGAAGGCUGUCCUAGUACCAGAUUCUGAGCAGGGAGAGGGCAUACUGC
CUCGCAUCAGCGUGAUCAGCACUGGCCCCACGCUUCAGGCACGAAGGAGGCAGUCUGUC
UGAACCUGAUGACACACUCAGUUAACCAAGGUCAGAACAUCACCGAAAGACAACAGCAU
50 CCACACGAAAAGUGUCACUGGCCCCUCAGGCAAACUUGACUGAACUGGAUUAUUAUUCAA
GAAGGUUAUCUCAAGAAACUGGCUUGGAAUAAGUGAAGAAUUAACGAAGAAGACUUA
AAGGAGUGCCUUUUUGAUGAUUUGGAGAGCAUACCAGCAGUGACUACAUGGAACACAUA
CCUUCGAUUAUUACUGUCCACAAGAGCUUAAUUUUUGUCUAAUUUGGUGCUUAGUAA
UUUUUCUGGCAGAGGUGGCUGCUUCUUGGUUUGUCUGUGGCUCUUGGAAACACUCCU

55

60

65

CUUCAAGACAAAGGGAAUAGUACUCAUAGUAGAAAUAACAGCUAUGCAGUGAUUAUCAC
 CAGCACCAGUUCGUAUUUUGUGUUUUACAUUUACGUGGGAGUAGCCGACACUUUGCUUG
 5 CUAUGGGAUUCUUCAGAGGUCUACCACUGGUGCAUACUCUAAUCACAGUGUCGAAAAUU
 UACACCACAAAAUGUUACAUUCUGUUCUUAAGCACCUAUGUCAACCCUCAACACGUUG
 AAAGCAGGUGGGAUUCUAAAUAAGAUUCUCCAAAGAUUAAGCAAUUUUGGAUGACCUUCU
 GCCUCUUAACCAUUAUUUGACUUAUCCAGUUGUUUUAAUUGUGAUUGGAGCUAUAAGCAG
 10 UUGUCGCAGUUUACAACCCUACAUCUUUGUUGCAACAGUGCCAGUGAUAGUGGCCUUUU
 AUUAUGUUGAGAGCAUAAUUCUCCAAACCUCACAGCAACUCAAAACAACUGGAAUCUGAA
 GGCAGGAGUCCAAUUUUCACUCAUCUUGUUACAAGCUUAAAAGGACUAUGGACACUUCG
 UGCCUUCGGACGGCAGCCUACUUUGAAACUCUGUUCACAAAGCUCUGAAUUUACAUA
 UGCCAACUGGUUCUUGUACCGUACAACACUGCGCUGGUUCCAAAUUGAGAAUAGAAUA
 15 UUUUUGUCAUCUUCUUCAUUUGCUGUUACCUUCAUUUCCAUUUUAAACAACAGGAGAAGGA
 GAAGGAAGAGUUGGUUUUAUCCUGACUUUAGCCAUGAAUAUCAUGAGUACAUAUGCAGUG
 GGCUGUAAAACUCCAGCAUAGAUGUGGGAUAGCUUGAUGCGAUCUGUGAGCCGAGUCUUUA
 AGUUCAUUGACAUGCCAACAGAAGGUAAACCUACCAAGUCAACCAAACCAUACAAGAAUG
 GCCAACUCUCGAAAGUUAUGAUUAUUGAGAAUUCACACGUGAAGAAAGAUAGACAUCUGG
 20 CCCUCAGGGGGCCAAAUGACUGUCAAGAUUCACAGCAAAAUACACAGAAGGUGGAAA
 UGCCAUUUAGAGAACAUUUCCUUCUCAAUAAGUCCUGGCCAGAGGGUGGGCCUCUUGG
 GAAGAACUGGAUCAGGGAAGAGUACUUUGUUUUCAGCUUUUUUGAGACUACUGAACACU
 GAAGGAGAAAUCCAGAUCCGAUGGUGUGUCUUGGGAUUCAAUAACUUUGCAACAGUGGAG
 GAAAGCCUUUGGAGUGAUACCACAGAAAGUAUUUAUUUUUUCUGGAACAUUUAGAAAAA
 25 ACUUGGAUCCCUAUGAACAGUGGAGUGAUCAAGAAAUAUGGAAAGUUGCAGAUAGAGGUU
 GGGCUCAGAUUCUGUGAUAGAACAGUUUCCUGGGAAGCUUGACUUUGUCCUUGUGGAUGG
 GGGCUGUGUCCUAAGCCAUGGCCACAAGCAGUUGAUGUGCUUGGCCUAGAUCUGUUCUCA
 GUAAGGCGAAGAUCUUGCUGCUUGAUGAACCCAGUGCUCAUUUGGAUCCAGUAACAUAAC
 CAAUUAUUAGAAGAACUCUAAAACAAGCAUUUUGCUGAUUUGCACAGUAAUUCUCUGUGA
 30 ACACAGGAUAGAAGCAAUGCUGGAAUGCCAACAUUUUUGGUCAUAGAAGAGAACAAG
 UGCGGCAGUACGAUUCUCCAGAAACUGCUGAACGAGAGGAGCCUCUCCGGCAAGCCA
 UCAGCCCCUCCGACAGGGUGAAGCUCUUUCCCCACCGGAACUCAAGCAAGUGCAAGUCUA
 AGCCCCAGAUUGCUGCUCUGAAAGAGGAGACAGAAGAAGAGGUGCAAGAUACAAGGCUU
 35 UAG (SEQ ID NO:2)

SEQ ID NO: 3

[0210]

AUGCAGCGGUCCCCGUCGAAAAGGCCAGUGUCGUGUCCAAACUCUUCUUCUCAUGGACU
 CGGCCUAUCCUUAGAAAAGGGGUAUCGGCAGAGGCUUGAGUUGUCUGACAUCUACCAGAU
 45 CCCCUCGGUAGAUUCGGCGGAUAACCUCUCGGAGAAGCUCGAACGGGAAUUGGACCGCGA
 ACUCGCGUCUAAAGAAAAACCCGAAGCUCAUCAACGCACUGAGAAGGUGCUUCUUCUGGCG
 GUUCAUGUUCUACGGUAUCUUCUUGUAUCUCGGGGAGGUCACAAAAGCAGUCCAACCCCU
 GUUGUUGGGUCGAUUUAUCGCCUCGUACGACCCCGAUAACAAAGAAGAACGGAGCAUCGC
 GAUCUACCUCGGGAUCGGACUGUGUUUGCUUUUCAUCGUCAGAACACUUUUGUUGCAUCC
 50 AGCAAUCUUCGGCCUCCAUCACAUCGGUAUGCAGAUGCGAAUCGCUAUGUUUAGCUUGAU
 CUACAAAAGACACUGAAACUCUCGUCGCGGGUGUUGGAUAAGAUUUCCAUCGGUCAGU
 UGGUGUCCUGCUUAGUAAUAACCUCAACAAAUUCGAUGAGGGACUGGCGCUGGCACAU
 UUCGUGUGGAUUGCCCCGUUGCAAGUCGCCCUUUUGAUGGGCCUUAUUUGGGAGCUGUU

GCAGGCAUCUGCCUUUUUGUGGCCUGGGAAUUUCUGAUUGUGUUGGCAUUGUUUCAGGCUG
 GGCUUGGGCGGAUGAUGAUGAAGUAUCGCGACCAGAGAGCGGGUAAAAUCUCGGAAAGA
 CUCGCUAUCACUUCGGAUAUGAUCGAAAACAUCAGUCGGUCAAGCCUUAUUGCUGGGAA
 5 GAAGCUAUGGAGAAGAUGAUUUGAAAACCUCCGCCAAACUGAGCUGAAACUGACCCGCAA
 GGCGGCGUAUGUCCGGUAUUUCAAUUCGUCAGCGUUCUUCUUUCCGGGUUCUUCGUUG
 UCUUUUCUCUGGUUUUGCCUUUGCCUUUGAUUAAGGGGAUUUACCCUCCGCAAGAUUUUC
 ACCACGAUUUCGUUCUGCAUUGUAUUGCGCAUUGGCAGUGACACGGCAAUUUCCGUGGGCC
 10 GUGCAGACAUGGUAUGACUCGCUUGGAGCGAUAACAACAAAUCCAAGACUUCUUGCAAAA
 GCAAGAGUACAAGACCCUGGAGUACAUCUUACUACUACGGAGGUAGUAAUGGAGAAUG
 UGACGGCUUUUUGGGAAGAGGGUUUUGGAGAACUGUUUGAGAAAGCAAAGCAGAAUAAAC
 AACAAACCGCAAGACCUCAAAUGGGGACGAUUCUCCUGUUUUUCUGAACUUCUCCUGCUC
 GGAACACCCGUGUUGAAGGACAUCAAUUUCAAGAUUGAGAGGGGACAGCUUCUCGCGGU
 15 AGCGGGAAGCACUGGUGCGGGAAAAACUAGCCUCUUGAUGGUGAUUAUGGGGGAGCUUG
 AGCCCAGCGAGGGGAAGAUUAAACACUCCGGGCGUAUCUCAUUCUGUAGCCAGUUUUCAU
 GGAUCAUGCCCGGAACCAUUAAAGAGAACAUCAUUUUCGGAGUAUCCUAUGAUGAGUAC
 CGAUACAGAUCCGUCAUUAAAGGCGUGCCAGUUGGAAGAGGACAUUUCUAAGUUCGCCGA
 GAAGGAUAAACAUCGUCUUGGGAGAAGGGGGUAUUACAUUGUCGGGAGGGCAGCGAGCGC
 20 GGAUCAGCCUCGCGAGAGCGGUAAUACAAGAUGCAGAUUUUGUAUCUGCUUGAUUCACCG
 UUUGGAUACCUCGACGUAUUGACAGAAAAAGAAAUCUUCGAGUCGUGCGUGUAAAACU
 UAUGGCUAAUAAGACGAGAAUCCUGGUGACAUCAAAAAAUGGAACACCUUAAGAAGGCGG
 ACAAGAUCCUGAUCCUCCACGAAGGAUCGUCCUACUUUUACGGCACUUUCUCAGAGUUGC
 25 AAAACUUGCAGCCGGACUUCUCAAGCAAACUCAUGGGGUGUGACUCAUUCGACCAGUUCA
 GCGCGGAACGGCGGAACUCGAUCUUGACGGAAACGCGUCACCGAUUCUCGUUGAGGGUG
 AUGCCCCGUAUCGUGGACCGAGACAAAGAAGCAGUCGUUUAAAGCAGACAGGAGAAUUU
 GGUGAGAAAAGAAAGAACAGUAUCUUGAAUCCUAUUAACUCAAUUCGCAAGUUCUCAAU
 CGUCCAGAAAACUCCACUGCAGAUUGAAUGGAAUUGAAGAGGAUUCGGACGAACCCUUGG
 30 AGCGCAGGCUUAGCCUCGUGCCGGAUUCAGAGCAAAGGGGAGGCCAUUCUUCCCCGGAUUU
 CGGUGAUUUACAACCGGACCUACACUUCAGGCGAGGGCAAAGGCAAUCCGUGCUCACCCUCA
 UGACGCAUUCGGUAAACAGGGGGCAAAACAUCACCGCAAAACGACGGCCUCAACGAGAA
 AAGUGUCACUUGCACCCACGGCGAAUUUGACUGAACUCGACAUCUACAGCCGUAGGCUUU
 CGCAAGAACCAGGACUUGAGAUUCAGCGAAGAAAUCAAAUGAAGAAGAUUUUGAAAGGCGG
 35 UUCUUUGAUUGACAUGGAAUCAUCCAGCGGUGACAACGUGGAACACAUAUCUUGCGUUA
 CAUCACGGUGCACAAGUCCUUGAUUUUCGUCCUCAUCUGGUGUCUCGUGAUUUUCUCGC
 UGAGGUCGCGAGCGUCACUUGUGGUCCUCUGGCUGCUUGGUAUACGCCCCUUGCAAGACAA
 AGGCAAUUCUACACACUCAAGAAACAUAUCCUAUGCCGUGAUUAUCACUUCUACAAGCUC
 40 GUAUUACGUGUUUACAUCUACGUAGGAGUGGCCGACACUCUGCUCGCGAUGGGUUUCU
 UCCGAGGACUCCACUCGUUJCACACGCUUJAUACUUGUCUCAAGAUUCUCCACCAUAAGA
 UGCUUCAUAGCGUACUGCAGGCUCCAUGUCCACCUUGAAUACGCUCAAGGCGGGAGGUA
 UUUUGAAUCGCUUCUCAAAAAGAUUUUGCAAUUUUGGAUGACCUUCUGCCCCUGACGAUC
 UUCGACUUCAUCCAGUUGUUGCUGAUCGUGAUUGGGGCUAUUGCAGUAGUCGUCGUCCU
 45 CCAGCCUACAUUUUUGUCGCGACCGUUCGCGUGAUCGUGGCGUUUAUCAUGCUGCGGGC
 CUAUUUCUUGCAGACGUCACAGCAGCUUAAGCAACUGGAGUCUGAAGGGAGGUCGCCUA
 UCUUUACGCAUCUUGUGACCAGUUUGAAGGGAUUGUGGACGUUGCGCGCCUUUGGCAGG
 CAGCCUACUUUGAAACACUGUCCACAAAGCGCUGAAUCUCCAUCGGCAAAUUGGUUU
 UUGUAUUUGAGUACCCUCCGAUGGUUUCAGAUGCGCAUUGAGAUGAUUUUUGUGAUCUU

50

55

60

65

CUUUUAUCGCGGUGACUUUUUAUCUCCAUCUUGACCACGGGAGAGGGCGAGGGACGGGUCG
 5 GUAUUUAUCCUGACACUCGCCAUGAACAUUAUGAGCACUUUGCAGUGGGGCAGUGAACAGC
 UCGAUUGAUGUGGAUAGCCUGAUGAGGUCCGUUUCGAGGGUCUUUAAGUUCAUCGACAU
 GCCGACGGAGGGAAAGCCACAAAAAGUACGAAACCCUUAUAAGAAUGGGCAAUUGAGUA
 AGGUAUAUGAUCAUCGAGAACAGUCACGUGAAGAAGGAUGACAUCUGGCCUAGCGGGGGU
 CAGAUGACCGUGAAGGACCUGACGGCAAAAUACACCGAGGGAGGGAACGCAAUCCUUGA
 10 AAACAUCUCGUUCAGCAUUAAGCCCCGGUCAGCGUGUGGGGUUGCUCGGGAGGACCGGGUC
 AGGAAAAUCGACGUUGCUGUCGGCCUUCUUGAGACUUCUGAAUACAGAGGGGUGAGAUC
 AGAUCGACGGCGUUUCGUGGGGAUAGCAUCACCUUGCAGCAGUGGGCGAAAAGCGUUUGGA
 GUAUCCCCCAAAGGUCUUUAUCUUUAGCGGAACCUUCCGAAAGAAUCUCGAUCCUUAU
 GAACAGUGGUCAGAUCAAGAGAUUUGGAAAGUCGCGGACGAGGUUGGCCUUCGGAGUGU
 15 AAUCGAGCAGUUUCCGGGAAAACUCGACUUUGUCCUUGUAGAUGGGGGAUGCCUGU
 CGCAUGGGCACAAGCAGCUCUAGUGCCUGGGCGGAUCCGUCCUCUCUAAAGCGAAAUUC
 UUCUCUUGGAUGAACCUUCGGCCCAUCUGGACCCGGUAACGUAUCAGAUCAUCAGAAGGA
 CACUUAAGCAGGCGUUUGCCGACUCGACGGUGAUUCUCUGUGAGCAUCGUAUCGAGGCCA
 UGCUCGAAUGCCAGCAAUUUCUUGUCAUCGAAGAGAAUAAGGUCCGCCAGUACGACUCCA
 20 UCCAGAAGCUCGUUAAUGAGAGAUCAUUGUCCGGCAGGCAGUUUCACCAUCCGAUAGG
 GUGAAACUUUUUCCACACAGAAAUUCGUCGAAGUGCAAGUCCAAACCGCAGAUCCGCGCC
 UUGAAAGAAGAGACUGAAGAAGAAGUUCAAGACACGCGUCUUUA (SEQ ID NO:3)

SEQ ID NO: 4

25 [0211]

30 GGACAGAUCCUGGAGACGCCAUCCACGCUGUUUUGACCUCUAGAAGACACCGGGAC
 CGAUCCAGCCUCCGCGGGCCGGAACGGUGCAUUGGAACGCGGAUUCGCCGUGCCAAGAGU
 GACUCACCGUCCUUGACACG (SEQ ID NO:4)

SEQ ID NO: 5

35 [0212]

40 CGGGUGGCAUCCUGUGACCCUCCCCAGUGCCUCUCCUGGCCUUGGAAGUUGCCACUCC
 AGUGCCACCAGCCUUGUCCUAAUAAAUAAGUUGCAUC (SEQ ID NO:5)

SEQ ID NO: 6

45 [0213] GGGAUCCUACC (SEQ ID NO: 6)

SEQ ID NO: 7

50 [0214]

55 AUGGAAGAUGCCAAAAACAUUAAGAAGGGCCAGCGCCAUUCUACCCACUCGAAGACGGG
 ACCGCCGGCGAGCAGCUCACAAAGCCAUUGAAGCGCUACGCCUUGGUGCCCGGCACCAUC
 GCCUUUACCGACGCACAUUCGAGGUGGACAUUACCUACGCCGAGUACUUCGAGAUGAGC
 GUUCGGCUGGCAGAAAGCUAUGAAGCGCUAUGGGCUGAAUACAAACCAUCGGAUCGUGGU
 GUGCAGCGAGAAUAGCUUUCAGUUCUUAUGCCCGUGUUGGGUGCCUGUUCUUCGGUG
 UGGCUGUGGCCCCAGCUAACGACAUCUACAACGAGCGCGAGCUGCUGAACAGCAUGGGCA
 60 UCAGCCAGCCACCGUCGUUUCGUGAGCAAGAAAGGGCUGCAAAAAGAUCCUCAACGUGC
 AAAAGAAGCUACCGAUCAUACAAAAGAUCAUCAUCAUGGAUAGCAAGACCGACUACCAG

65

5 GGCUUCCAAAGCAUGUACACCUUCGUGACUUCCCAUUUGCCACCCGGCUUCAACGAGUAC
 GACUUCGUGCCCGAGAGCUUCGACCCGGGACAAAACCAUCGCCUGAUCGAACAGUAGU
 GGCAGUACCGGAUUGCCCAAGGGCGUAGCCCUACCGCACCCGCACCCGCUUGUGUCCGAUUC
 AGUCAUGCCCGCGACCCCAUCUUCGGCAACCAGAUAUCCCCGACACCCGCUAUCCUCAGC
 GUGGUGCCAUUUCACCACGGCUUCGGCAUGUUCACCACGCUGGGCUACUUGAUCUGCGGC
 10 UUUCGGGUCGUGUCUCAUGUACCGCUUCGAGGAGGAGCUAUUCUUGCGCAGCUUGCAAGAC
 UAUAAAGAUUCAUUCUGCCUGCGUGGCCACACUAUUUAGCUUCUUCGCUAAGAGCACU
 CUCAUCGACAAGUACGACCUAAGCAACUUGCACGAGAUCCGACGCGGGGGCGCCGCUC
 AGCAAGGAGGUAGGUGAGGCCGUGGCCAAACGCUUCCACCUACCAGGCAUCCGCCAGGGC
 UACGGCCUGACAGAAACAACCAGCGCCAUUCUGAUCACCCCGAAGGGGACGACAAGCCU
 15 GGCGCAGUAGGCAAGGUGGUGCCCUUCUUCGAGGCUAAGGUGGUGGACUUGGACACCGG
 UAAGACACUGGGUGUGAACCAGCGCGGCGAGCUGUGCGUCCGUGGCCCAUGAUCAGAG
 CGGCUACGUUAACAACCCCGAGGCUACAAACGCUCUCAUCGACAAGGACGGCUGGCUGCA
 CAGCGGCGACAUCGCCUACUGGGACGAGGACGAGCACUUCUUAUCUGGACCGGCUGAA
 GAGCCUGAUCAAAUACAAGGGCUACCAGGUAGCCCCAGCCGAACUGGAGAGCAUCCUGCU
 20 GCAACACCCCAACAUCUUCGACGCCGGGGUCGCCGGCCUGCCCGACGACGAUGCCGGCGA
 GCUGCCCGCCGACUGCGUCGUGCGUGGAACACGGUAAAACCAUGACCGAGAAGGAGAUCGU
 GGACUAUGUGGGCCAGCCAGGUUACAACCGCCAAGAAGCUGCGCGGUGGUGUUGUGUUCG
 UGGACGAGGUGCCUAAAGGACUGACCGGCAAGUUGGACGCCCGCAAGAUCGCGAGAUUC
 UCAUUAAGGCCAAGAAGGGCGGCAAGAUCGCCGUGUA (SEQ ID NO:7)

25 **SEQ ID NO: 8**

[0215] UUUGAAUU (SEQ ID NO: 8)

30 **SEQ ID NO: 9**

[0216]

35 AUGCAGAGAAGCCCCUGGAAAAGGCCAGCGUGGUGUCCAAGCUGUUCUUCAGCUGGACC
 AGACCCAUCCUGAGAAAGGGCUACAGACAGAGACUGGAACUGAGCGACAUCUACCAGAUC
 CCCAGCGUGGACAGCGCCGACAACCUGAGCGAGAAGCUGGAAAGAGAGUUGGGACAGAGA
 GCUGGCUAGCAAGAAGAACCCCAAGCUGAUAACGCCUUGAGGGCGGUGCUUCUUCUGGGC
 40 GUUUUUGUUCUACGGCAUCUUCUGUACCUGGGCGAAGUGACAAAGGCCGUGCAGCCCCU
 GCUCCUGGGCAGAAUCAUUGCCAGCUACGACCCCGACAACAAGAGGAAAGAUCUAUCGC
 CAUCUACCUGGGCAUCGGCCUGUGCCUGCUGUUCUUCGUGCGGACACUGCUGCUGCACCC
 CGCCAUCUUCGGCCUGCACCACAUCGGCAUGCAGAUGAGAAUCGCCAUGUUCAGCCUGAU
 CUACAAGAAAACCCUGAAGCUGAGCAGCAGGGUGCUGGACAAGAUCAGCAUCGGACAGCU
 45 GGUGUCCCUGCUGAGCAACAACCUGAACAAGUUCGACGAGGGACUGGCCUUGGCUCACUU
 CGUGUGGAUCGCUCCACUGCAGGUCGCCUGCUGAUGGGCCUGAUCUGGGAGCUGCUGCA
 GGCCAGCGCUUUCUGCGGCCUGGGCUUUCUGAUUGUGCUGGCCUUGUUCAGGCUGGCCU
 GGGCAGGAUGAUGAUGAAGUACAGGGACCAGAGAGCCGGCAAGAUCAGCGAGAGACUGG
 UCAUCACCAGCGAGAUGAUCGAGAACAUCAGAGCGUGAAGGCCUACUGCUGGGAAGAG
 50 GCCAUGGAAAAGAUGAUCGAAAACCUAGAGACAGACCGAGCUGAAGCUGACCAGAAAAGGC
 CGCCUACGUGCGGUACUUAACAGCAGCGCCUUCUUCUUCUCCGGCUUCUUCGUGGUGUU
 CCUGUCCGUGCUGCCUACGCCUGAUAAGGGCAUCAUCCUGAGGAAGAUCUUCACCAC

55

60

65

5 CAUUUCUUUCUGCAUCGUGCUGAGAAUGGCCGUGACCAGACAGUUCUUUCUGGGCCGUGCA
GACUUGGUACGACAGCCUGGGCGCCAUCAACAAGAUCAGGACUUCUUCGAGAAGCAGGA
GUACAAGACCCUCGAGUACAACCUGACCACCACCGAGGUGGUCAUGGAAAACGUGACCGC
CUUCUGGGAGGAAGGCUUCGGCGAGCUGUUCGAGAAGGCCAAGCAGAACAACAACA
10 GAAAGACCAGCAACGGGACGACUCCUGUUCUUCUCCAACUUCUCCUGCGUGGGCACCC
CCGUGCUGAAGGACAUCAACUUCAAGAUCGAGAGAGGCCAGCUGCUCGCCGUGGGCCGCU
CUACAGGCGCUGGCAAGACCUCUCUGCUGAUGGUCAUCAUGGGCGAGCUGGAACCCAGCG
AGGGCAAGAUCAAGCACAGCGGCAGAAUCAGCUUCUGCAGCCAGUUCAGCUGGAUCAUGC
CCGGCACCAUCAAAAGAGAAUCAUCAUCUUCGGCGUGUCCUACGACGAGUACAGAUACAGAA
15 GCGUGAUCAAGGCCUGCCAGCUGGAAGAGGACAUCAGCAAGUUCGCCGAGAAGGACAACA
UCGUGCUGGGCGAGGGCGGCAUCACCCUGUCUGGGCGCCAGAGAGCCAGAAUCAGCCUGG
CCAGAGCCGUGUACAAGGACGCCGACCUGUACCUGCUGGACAGCCCCUUCGGCUACCUGG
ACGUGCUGACCCGAGAAAGAGAUUCUUCGAGAGCUGCGUGUGCAAGCUGAUGGCCAACAAG
ACCAGAAUCCUGGUCACCAGCAAGAUGGAACACCUGAAGAAGGCCGACAAGAUCCUGAUC
20 CUGCACGAGGGCAGCAGCUACUUCUACGGCACAUUCAGCGAGCUGCAGAACCUGCAGCCC
GACUUCAGCAGCAAACUGAUGGGCUGCGACAGCUUCGACCAGUUCAGCGCCGAGAGAAGA
AACAGCAUCCUGACCCGAGACACUGCACAGAUUCAGCCUGGAAGGGCAGCCCCCGUGUCU
UGGACCCGAGACAAAGAAGCAGAGCUUCAAGCAGACCCGGCGAGUUCGGCGAGAAGAGAAA
GAACUCCAUCCUGAACCCCAUCAACAGCAUCCGGAAGUUCAGCAUCGUGCAGAAAACCCC
25 CCUGCAGAUGAACGGCAUCGAAGAGGACAGCGACGAGCCCCUGGAAAGACGGCUGAGCCU
GGUGCCUGACAGCGAGCAGGGCGAGGCCAUCCUGCCUAGAAUCAGCGUGAUCAGCACCCGG
CCCCACCCUGCAGGCUAGAAGGGCGGCAGAGCGUGCUGAACCUGAUGACCCACAGCGUGAA
CCAGGGCCAGAACAUCCACCCGCAAGACCACCGCCAGCACCAGAAAGGUGUCCUUGGCCUCC
UCAGGCCAACCCUGACCCGAGCUGGACAUCUACAGCAGAAGGCUGAGCCAGGAAACCCGGCCU
30 GGAAAUCAGCGAGGAAAUCAACGAAGAGGACCUGAAAGAGUGCUUCUUCGACGACAUGG
AAUCCAUCCCCGCCGUGACCACCUGGAACACCUACCUGCGGUACAUCACCCGUGCACAAGA
GCCUGAUCUUCGUGCUGAUCUGGUGCCUGGUCAUUCUCCUGGCCGAGGUGGCCGCCAGCC
UGGUGGUGCUGUGGCCUCCUGGGAAACACCCUUCUGCAGGACAAGGGCAACAGCACCCACA
35 GCAGAAACAACAGCUACGCCGUGAUAUCAUCCUCCACCAGCUCCUACUACGUGUUCUACA
UCUACGUGGGCGUGGGCCGACACCCUGCUGGCCUAUGGGCUUCUUCAGAGGCCUGCCCCUGG
UGCACACCCUGAUCACCCGUGUCCAAGAUCUUCGACCAUAAGAUGCUGCACAGCGUGCUGC
AGGCUCCCAUGAGCACCCUGAACACACUGAAGGCUGGGCGGCAUCCUGAACAGGUUCAGCA
AGGAUAUCGCCAUCCUGGACGACCUGCUGCCUUCGACCAUCUUCGACUUCUACUCCAGCUGC
40 UGCUGAUCGUGAUCGGCGCUAUCGCCGUGGUGGCCGUGCUGCAGCCUACAUCUUCGUGG
CCACCCUGCCCCGUGAUCGUGGCCUUCAUUAUGCUGAGAGCCUACUUCUGCAGACCAGCC
AGCAGCUGAAGCAGCUGGAAAAGCGAGGGCAGAAGCCCCAUUCUACCCACCUCGUGACCA
GCCUGAAGGGCCUGUGGACCCUGAGAGCCUUCGGCAGACAGCCCUACUUCGAGACACUGU
UCCACAAGGCCUGAACCCUGCACACCCGCCAACUGGUUUCUGUACCUGUCCACCCUGAGAU
45 GGUUCCAGAUGAGGAUCGAGAUGAUCUUCGUCUUCUUCUUAUCGCCGUGACCUUCAUCU
CUAUCCUGACCACCGGCGAGGGCGAGGGAAGAGUGGGAAUCAUCCUGACCCUGGGCAUGA
ACAUCAUGAGCACACUGCAGUGGGCCGUGAACAGCAGCAUCGACGUGGACAGCCUGAUGA
GAAGCGUGUCCAGAGUGUUAAGUUAUCGACAUGCCUACCGAGGGCAAGCCCACCAAGA
GCACCAAGCCUACAAGAACGGCCAGCUGAGCAAAGUGAUGAUAUCGAGAACAGCCACG
50 UCAAGAAGGACGACAUCUGGCCACGCGGCGGACAGAUGACCCGUGAAGGACCUGACCCGCA
AGUACACAGAGGGCGGCAACGCUAUCCUGGAAAACAUCAGCUUCAGCAUCAGCCCAGGCC

55
60
65

AGAGAGUGGGCCUGCUGGGGAGAACAGGCAGCGGCAAGUCUACCCUGCUGUCCGCCUUC
5 UGAGACUGCUGAACACCGAGGGCGAGAUCCAGAUUCGAUGGCGUGUCCUGGGACUCCAUA
CCCUGCAGCAGUGGGCGCAAGGCCUUCGGCGUGAUCCCCCAGAAGGUGUUAUCUUCAGCG
GCACCUUCAGAAAGAACCUGGACCCUACGAGCAGUUGGUCGACCAGGAAAUCUGGAAGG
UCGCCGAUGAAGUGGGCCUGAGAUCCGUGAUCGAGCAGUUCGCCGGCAAGCUGGACUUCG
10 UGCUGGUGGACGGCGGCUGCGUGCUGAGCCACGGCCACAAGCAGCUGAUGUGUCUGGCC
GCUCCGUGCUGAGCAAGGCUAAGAUUCUGCUGGACGAGCCUAGCGCCCACCUGGACC
CUGUGACCUACCAGAUCAUCAGAAGGACCCUGAAGCAGGCCUUCGCCGACUGCACCUGA
UCCUGUGCGAGCACAGAAUCGAGGCCAUGCUGGAAUGCCAGCAGUUCUGGUAUCGAAG
AGAACAAGUGCGGCAGUACGACAGCAUCCAGAAGCUGCUGAACGAGAGAAGCCUGUUC
15 AGACAGGCCAUCAGCCCCAGCGACAGAGUGAAGCUGUUCCCCCACCGCCAACAGCAGCAAG
UGCAAGAGCAAGCCCCAGAUCCGCCGCCUGAAAAGAAGAGACUGAGGAAGAGGUGCAGGAC
ACCAGACUGUGA (SEQ ID NO:9)

SEQ ID NO: 10

20 [0217]

AUGCAGCGGUCCCCGUCGAAAAGGCCAGUGUCGUGUCCAAACUCUUCUUCUUAUGGACU
25 CGGCCUAUCCUUAAGAAAGGGUUAUCGGCAGAGGCCUUGAGUUGUCUGACAUCUACCAGAU
CCCCUCGGUAGAUUCGGCGGAUAACCUCUCGGAGAAGCUCGAACGGGAAUUGGACCGCGA
ACUCGCGUCUAAGAAAACCCGAAGCUCAUCAACGCACUGAGAAGGUGCUUCUUCUGGCG
GUUCAUGUUCUACGGUAUCUUCUUGUAUCUCGGGGAGGUCACAAAAGCAGUCCAACCCCU
30 GUUGUUGGGUCGAUUAUCGCCUCGUACGACCCCGAUAACAAAGAAGAACGGAGCAUCGC
GAUCUACCUCGGGAUCGGACUGUGUUUGCUUUUCAUCGUCAGAACACUUUUGUUGCAUCC
AGCAAUCUUCGGCCUCCAUCACAUCGGUAUGCAGAUUGCAGAAUCGCUAUGUUUAGCUUGAU
CUACAAAAGACACUGAAACUCUCGUCGCGGGUGUUGGAUAAGAUUCCAUCGGUCAGU
UGGUGUCCCGUCUUAAGUAAUAACCUCAACAAAUUCGAUGAGGGACUGGGCGUGGCACAU
35 UUCGUGUGGACUUGCCCCGUCGCAAGUCGACUGCUCUUAUGGGACUGAUAUUGGAAACUGU
GCAGGCCAGCGCCUUUUGCGGCCUGGGAUUUCUCAUUGUGCUUUGCACUUUCCAAGCAGG
GCUCGGCAGAAUGAUGAUGAAGUACAGGGACCAGAGAGCCGGAAAGAUUCAGAACGGC
UCGUGAUUACUUCAGAAAUGAUCGAGAACAUAUCGUGAAAGCGUACUGCUGGGAA
GAGGCGAUGGAAAAGAUGAUCGAAAACCUCAGACAGACCGAGUUGAAGCUGACCCGGAA
40 GGCCGCGUACGUCAGAUACUUAACAGCAGCGCUUUCUUCUUCUGGGCUUCUUCGUCGU
GUUCCUGUCGGUGCUGCCGUAUGCCCUCAUUAAGGGAAUUAUCUUGCGGAAGAUCUUUA
CUACUAUCUUAUUUGCAUCGUCCUUCGGAUGGCGGUCACUCGGCAGUUCGCGUGGGCCG
UGCAGACCUGGUACGACAGCCUCGGGGCAUCAACAAGAUCCAAGACUUUCUCCAAAAGC
AAGAGUACAAAACCCUCGAAUACAACCUCACCACUACUGAAGUGGUAUGGAAAACGUGA
45 CCGCCUUUUGGGAAGAAGGCUUCGGAGAACUGUUCGAGAAGGCGAAGCAAAACAACAAU
AAUCGCAAGACUAGCAACGGGGAUGACUCACUGUUCUUCAGCAAUUUCACUCUCGCGC
ACCCCGGUGCUUAAGGACAUAACUUAAGAUUGAACGCGGACAGCUCUUGGCGGUGGCC
GGAUCCACCGGAGCAGGAAAGACUAGCCUGCUGAUGGUGAUCUAGGGUGAGCUGGAACC
50 GUCCGAAGGCAAAAUCAAGCACUCCGGCAGAAUCAGCUUCUGCUCGCAGUUUUCGUGGAU
CAUGCCAGGAACCAUCAAGAGAACAUAUCUUUGGAGUCUCAUACGAUGAGUACCGCUA
CAGAAGCGUGAUUAAGGCCUGCCAGCUUGAAGAGGACAUCUCCAAGUUCGCGGAAAAGG
ACAACAUCGUGCUGGGUGAGGGAGGGAUCACGUUGUCGGGCGGUCAGAGAGCCCGCAUU
UCGUGGCACGGGCGUGUACAAGGAUGCGGAUCUUUACCUUCUGGACUCGCCAUUCGGU

55

60

65

5 UACCUCGACGUGCUGACCGAAAAAGAAAUCUUCGAGAGCUCGUGUGUAAGCUGAUGGC
 UAAUAAGACUAGAAUCCUCGUGACGUCCAAAAUGGAACAUCUUAAGAAGGCGGAUAAGA
 UUCUCAUUCUUCACGAGGGGUCGAGCUACUUCUACGGGACUUUUAGCGAGCUGCAGAAU
 UUGCAGCCGGACUUCAGCUCAAAGCUCUAGGGCUGCGACUCGUUCGAUCAGUUCAGCGCC
 GAACGGCGCAAUUCGAUCUUGACGGAAACCCUGCACAGAUUCUCGUGGAGGGAGAUGCA
 10 CCUGUCUCGUGGACCGAAACCAAGAAGCAGUCCUUAAGCAGACGGGAGAGUUCGGAGAA
 AAGCGGAAGAACUCAUCCUCAACCCAAUCAACUCCAUCGCAAAUUCUCAUUCGUGCAG
 AAAACUCCACUCGAGAUGAACGGUAUCGAAGAGGGAUUCGGACGAGCCACUUGAGCGGAG
 ACUGUCGUGGUGCCAGAUUCAGAACAGGGGGAGGCAAUCCUGCCGCGCAUUUCCGUGAU
 CAGCACUUGGGCCGACCCUCCAAGCUAGACGCAGGCAAUCAGUGCUGAAUCUCAUGACCCA
 CUCCGUCAACCGAGGACAGAAUAUCCACCGCAAGACCACCGCGUCGACUAGAAAGGUGUC
 15 AUUGGCACCGCAAGCAAAUUUGACUGAACUUGACAUCUACUCACGGCGCCUCUCCCAAGA
 AACCGGAUUGGAAAUCUCCGAAGAGAUUAACGAAGAAGAUUUGAAAGAGUGUUCUUCG
 ACGAUUUGGAGUCGAUCCCGCAGUGACCACUUGGAAUACGUAUCUUCGGUACAUCACCG
 UGCACAAGAGCCUGAUUCUUCGUCCUACUCUGGUGCCUGGUGAUCUUUCUGGCCGAAGUCG
 CCGCUUCGUGGUCGUGCUGUGGUCGUCGGUAAUACCCCGCUCCAAGACAAAGGCAAUU
 20 CCACUCACUCGCGCAACAACAGCUACGCUGUGAUUAUCAGUCAACCUCGUCGUACUAUG
 UGUUCUACAUCUACGUGGGAGUCGCGGACACUCUGCUCGCUAUGGGCUUCUUCGCGGAC
 UGCCCCUGGUCCACACUCUCAUCACGGUGAGCAAGAUCUCAUAAGAUGCUCUCAAU
 CCGUGCUGGAGCCCGGAGCUCUCAACACUCUGAAGGCGGGUGGAAUCUUGAACA
 GAUUUCCAAAGACAUCGCGAUUCUGGACGAUCUGCUCACUCACUAUCUUCGACUUA
 25 UCCAACUGCUGCUGAUCGUAUCGGAGCUAUCGCCGUGGUGGCUUCCAGCCGUAUA
 UCUUCGUGGCCACUGUGCCGGUGAUUGUCGCUUUAUCAUGUUGCGCGCGUACUUCUUGC
 AAACCUCGAGCAACUCAAGCAACUGGAGUCCGAGGGCCGAGCCCAAUCUUUACCCAUC
 UGGUGACUUCACUGAAAGGUCUGUGGACCCUCCGCGCCUUUGGUCGCCAGCCUACUUCG
 30 AAACUCUCUUUCACAAAGCACUGAAUCUCCACACUGCAAACUGGUUCUUGUACCUGUCCA
 CCCUGCGGUGGUUCCAAAUGCGGAUCGAGAUGAUCUUUGUCAUCUUCUUAUCGCCGUGA
 CUUUUAUCUCCAUCCUACACCACCGGCGAGGGAGAGGGGAGAGUGGGAAUCAUCCUGACGC
 UGGCGAUGAAUAUCAUGUCCACUUGCAGUGGGCCGUCAAUUCGAGCAUCGACGUGGAU
 35 UCGCUGAUGCGCAGCGUGUCGCGUGUUAAGUUCUUCGAUUGCCCACCGAAGGUAAA
 CCCACCAAGAGCACGAAGCCUUAACAAGAACGGGACGUCUCAAAAGGUGAUGAUUAUCGAG
 AACUCCCAUGUGAAGAAGGACGACAUCUGGCCAUCCGGAGGACAGAUGACCGUGAAGGAC
 CUGACCGCCAAAUAACACGGAGGGCGGAAAUGCAAUCCUCGAAAACAUCUCGUUCUCCAUC
 UCGCCUGGCCAAAGGGUGGGACUUUUGGGACGCACUGGAUCCGGAAAGAGCACCCUGCUU
 40 AGCGCCUUCUUGAGGCUCUUGAACACCGAGGGCGAAAUCCAGAUCGAUGGCGUGUCGUGG
 GAUUCGAUACCCUGCAGCAGUGGAGAAAGGCCUUCGGGGUGAUCCCGCAAAAAGUGUUC
 AUCUUCUCCGGAACGUUUCGGAAAAACCUUGACCCAUAACGAACAUGGUCGGAUCAAGAG
 AUUUGGAAGGUCGCCGACGAAGUGGGGUCGCGUCCGUGAUCGAGCAGUUCGCGGAAA
 ACUGGACUUCGUCUUGGUCGACGGCGGAUGCGUCCUGUCCACGGACUAAGCAGCUGAU
 45 GUGCCUGGCCCGCAGCGUCCUUUCAAAGCUAAGAUCUCCUGCUGGGAUGAACCUUCAGC
 ACACCUCGACCCGGUCACCUACCAGAUCAUCAGACGGACCCUGAAACAGGCCUUUGCGGA
 UUGUACUGUGAUCUUGUGUGAACACCGCAUUGAAGCCAUGCUGGAGUGCCAGCAGUUC
 UGGUCAUCGAAGAGAAACAAGUGCGGCAGUACGAUUCUCAAUCCAAAACUGCUCAAUGAG
 CGGUCCCUGUUCAGACAGGCAAUUAGCCCGAGCGACAGGGUCAAAUUGUUCUCCCAUAGA

50 AAUUCGUCGAAAUGUAAGUCAAAAGCCUCAGAUCCGCGGCACUGAAAGAAGAAACUGAAGA
 AGAGGUGCAAGACACCAGACUGUGA (SEQ ID NO:10)

55 **SEQ ID NO: 11**

[0218]

60

65

AUGCAGAGAAGCCCACUGGAAAAGGCGUCGGUGGUGUCAAAAGCUGUUCUUUAGCUGGAC
 CAGACCUAUCUUGCGGAAGGGAUACCGCCAACGCCUGGAGCUGUCGGACAUCUACCAGAU
 5 UCCGUCAGUGGGAUUCAGCAGACAAUCUCUCCGAAAAGCUGGAACCGGAAUUGGGACAGAG
 AGUUGGCGUCAAAAGAAGAACCCAAAGUUGAUCAAUGCCCUGCGCCGUCUUCUUCUGGC
 GGUUCAUGUUCUACGGAAUCUUUCUGUACCUCGGCGAAGUCACCAAGGCUGUGCAACCGC
 UUCUGCUGGGACGCAUCAUCGCCUCAUACGACCCGGACAACAAGGAAGAACGCUCUCAUG
 CAAUCUACCUCGGGAUCGGCCUCUGCCUGCUGUUUAUCGUGCGGACGCUGCUGCUCCAUC
 10 CAGCCAUUUUCGGACUGCACCACAUUGGCAUGCAAAUGCGGAUCGCCAUGUUCAGCCUGA
 UCUACAAAAGACCCUGAAGUUGAGCUCACGGGUGUUGGAUAAGAUUUCGAUCGGACAG
 CUGGUGUCGCUGCUCUCCAACAACCUCAACAAGUUUGACGAAAGGCCUGGCACUGGCCAC
 UUCGUGUGGGAUUGCCCCGUUGCAAGUCGCCUUUUGAUGGGCCUUUUUUGGGAGCUGUU
 GCAGGCAUCUGCCUUUUGUGGGCCUGGGAUUUCUGAUUGUGUUGGCAUUGUUUCAGGCUG
 15 GGUUUGGGCGGAUGAUGAUGAAGUACUCGCGACAGAGAGCGGGUAAAAUCUCGGAAAGA
 CUCGUAUCACUUCGGAAAUGAUCGAAAACAUCAGUCGGUCAAAAGCCUAUUGCUGGGAA
 GAAGCUAUGGAGAAGAUGAUUGAAAACCUCGCCAAACUGAGCUGAAAACUGACCCGCAA
 GGCGGCGUAUGUCCGGUAUUUCAAUUCGUCAGCGUUCUUCUUUUCGGGUUCUUCGUUG
 UCUUUUCUCUGGUUUUUGCCUUUGCCUUGAUUAAGGGGAUUAUCCUCCGCAAGAUUUUC
 20 ACCACGAUUUCGUUCUGCAUUGUAUUGCGCAUGGCAGUGACACGGCAAUUUCGUGGGCC
 GUGCAGACAUGGUAUGACUCGCUUGGAGCGAUAACAAAUCCAAGACUUCUUGCAAAA
 GCAAGAGUACAAGACCCUGGAGUACAAUCUUAACUACUACGGAGGUAGUAAUGGAGAAUG
 UGACGGCUUUUUGGGAGGAAGGAUUCGGCGAAUUGUUCGAAAAGGCUAAGCAGAACAAC
 25 ACAAUCGGAACCCUCCAUAUGGGGACGAUUCGCGUUCUUCUGAAUUUCUCCUGCUG
 GGAACGCCCUGUCUUAAGACAUCAACUUCAGAUCGAACGGGGCCAGCUGCUCGCGGUC
 GCGGGCAGCACUGGAGCGGGAAAGACUUCUCCUGCUCUAGGUCAUCAUGGGAGAGCUGGA
 GCCCUCGGAGGGCAAAAUCAAGCACUCGGGGAGGAUCUCAUUUUGCAGCCAGUUCUGGUG
 GAUCAUGCCCGGUACUAUCAAAAGAAAACAUCAUCUUUGGAGUCAGCUAUGACGAGUACC
 30 GCUACCGGUCGGUGAUCUAAAGGCCUGCCAGCUGGAAGAAGAUUCUCCAAGUUCGCCGAAA
 AGGACAACAUUGUGCUGGGAGAAGGUGGAAUCACUCUCUCGGGAGGCCAGCGCGCACGG
 AUCUCACUCGCAAGGGCCGUGUACAAGGAUGCCGAUUUGUACCUGUUGGAUUCGCCGUUC
 GGUAUUCUUGAUGUCCUCACUGAGAAAGAGAUUUUUGAGUCGUGCGUCUGUAAGCUGAU
 35 AAUCCUUUUCUCCAUGAGGGUAGCUCUAUCUUCUACGGCACCUUUUCGGAACUGCAGAA
 UCUGCAGCCGACUUCUCAUAAAACUGAUGGGAUUGGACUCGUUCGAUCAGUUCUGGC
 GGAGCGGCGGAACUCGAUCCUACCGAAACUCUCCACCGGUUCAGCCUCGAGGGAGAUUC
 CCCAGUCAGCUGGACCGAAACUAAGAAGCAGUCCUUCAAACAGACCGGAGAGUUCGGAGA
 AAAACGCAAGAACUCCAUCCUCAUCCAUAACAGCAUCCGCAAGUUCAGCAUCGUGCA
 40 GAAAACUCCACUUCAGAUGAACGGAAUCGAAGAGGAUAGCGACGAGCCGCUUGAGCGGA
 GAUUGUCACUGGUGCCGGACAGCGAGCAAGGGGAAGCGAUUCUGCCGCGGAUCUCCGUGA
 UCUCGACUGGCCCUACCCUCCAAGCUCGCAGACGCCAGAGCGUGCUGAAUCUCAUGACCC
 ACUCAGUCAACCAGGGACAAAACAUCAUAGAAAGACCACCGCUUCAACCCGAAAGUGU

45

 50

 55

 60

 65

5 CACUUGCACCGCAGGCAAACCUGACCGAACUCGACAUCUACAGCAGACGGCUCUCACAAG
 AAACUGGAUUGGAGAUACAGCGAAGAGAUC AACGAAGAAGAUUCUCAAAGAAUGCUUCUUC
 GACGAUAUGGAGUCCAUCCAGCAGUCACUACGUGGAAUACCUACCUCGCUACAUCACU
 GUGCACAAGAGCCUGAUUUUCGUGUUGAUCUGGUGCCUGGUCAUUCUUCUGGCCGAGGU
 GGCCGCGAGCCUCGUGGUCCUCUGGCUCGCGCAAUACGCCGUCGCAAGAUAAAGGGAAA
 UCCACGCAUAGCAGAAACAACUCAUACGCAGUGAUCAUACUAGCACUUAUCGUACUA
 10 CGUGUUCUACAUCUACGUGGGGGUGGCCGAUACUCUGUUGGCAAUGGGGAUUCUUAGAG
 GGCUGCCUCUGGUGCAUACUCUGAUCACUGUGUCCAAGAUCUCCACCACAAGAUGCUC
 ACUCCGUGCUUCAGGCCCCUAUGUCAACUCUCAACACCCUCAAGGCCGGAGGUUUCUUA
 AUCGCUUUUCAAGGACAUCGCCAUUCUGAUGACUUGCUUCCCCUGACUAUCUUCGCU
 UUAUCCAGUUGCUGCAUUGUGAUCGGCGCUAUUGCCGUCGUCGCAGUGCGCAACCGU
 15 ACAUCUUUGUGGCUACCGUCCAGUCAUUGUGGCCUUCAUCAUGCUCAGGGCAUACUUUC
 UCCAGACCAGCCAGCAGCUAAGCAGCUCGAAUCCGAAGGCAGAUCCGCCAUUCUACCCC
 ACCUCGUCACUUCGCUCAAGGGCCUCUGGACCCUGCGCGCCUUCGGUCGCCAGCCGUAUU
 UCGAAACCCUGUCCAUAAGACACUGAACCUCAUACUGCGAACUGGUUUUCUCUACCUUU
 CAACCCUGAGGUGGUUCCAGAUAGAGAAUCGAGAUUAUCUUUGUGAUCUUCUUUAUCGCU
 20 GUGACGUUCAUCUCCAUUCACUACCGGGCAGGGAGAGGGCAGAGUGGGGAUUUACCUUC
 ACGCUGGCCAUGAAUAUCAUGAGCACGCUGCAGUGGGCCGUCAAUAGCAGCAUCGACGUG
 GACUCCUGAUGCGGUCCGUGUCGAGAGUGUUUAAAGUUCAUCGAUAUGCCUACUGAAGG
 GAAACCGACCAAGUCGACCAAGCCGUACAAGAAUGGGCAGCUGAGCAAGGUGAUGAUUA
 UUGAGAACUCCAUGUGAAGAAGGACGACAUCUGGCCAGCGGAGGCCAGAUACCCGUGA
 25 AGGACUUGACCGCUAAGUACACUGAGGGUGGAAAUGCCAUUCUUGAGAAUAUCAGCUUC
 UCGAUCUCGCCGGGACAACGCGUGGGAUUGCUCGGGCGCACUGGCAGCGGCAAUCCACC
 CUGCUUAGCGCUUUUCUGAGGGCUGCUAACACUGAAGGUGAAAUUCAAAUCGAUGGAGU
 GUCGUGGGAUAGCAUCACCCUUAACAGUGGCGCAAGGCCUUCGGCGUGAUCCCUAAAA
 GGUCUUUAUCUUCUGGGGACGUUCCGGAAAAAUUCUGACCCCUACGAACAGUGGUCAGA
 30 CCAAGAGAUUUGGAAAGUCGCGAGAUGAGGUCGGACUGCGCUCAGUGAUCGAACAGUUUC
 CGGGUAAACUUGACUUCGUGCUCGUCGAUGGAGGUUUGCGUCCUGUCCACGGACAUAAGC
 AGCUGAUGUGUCUGGCGCGCUCGGUCCUCUCCAAAGCGAAGAUCUUGCUGCUCGAUGAAC
 CGUCCGCCACCUUGAUCCAGUGACCUAUCAGAUCAUUCGGGAAACUUUGAAGCAAGCCU
 35 UCGCUGACUGCACCGUCAUCCUCUGCGAACACCGGAUCGAGGCAAUGCUGGAGUGCCAAC
 AGUUUCUGGUCAUUCGAAGAAAACAAAGUGCGCCAGUAUGACUCGAUCCAAAAACUUCUG
 AACGAGCGUCCUCUUCGGCAGGCAAUCAGCCCAUCCGACCGCGUGAAGUUUGUCCCU
 CAUCGGAAUAGCUCCAAAUGCAAUUCGAAGCCGCAUGAUCGCUGCCUUGAAAGAAGAACCC
 GAAGAAGAAGUCCAAGACACUAGGUUGUAG (SEQ ID NO:11)

40 **SEQ ID NO: 12**

[0219]

45 AUGCAGCGGUCCCCUCUGGAGAAGGCUUCCGUGGUCAGCAAGCUGUUCUUCUGUGGACC
 AGACCUAUCCUCCGCAAGGGAUACCGCCAGCGCCUGGAGCUGUCAGAUUAUCUACCAGAUC
 50 CCAAGCGUGGACUCAGCCGACAAUCUGAGCGAAAAGCUGGAACGGGAGUGGGACCGGGA
 GCUCGCCUCCAAGAAGAAUCCGAAGUUGAUCAAUGCGCUGCGCAGAUGCUCUUCUGGGC
 GUUUAUGUUUUACGGCAUCUUCUGUAUCUCGGAGAAGUGACCAAAGCCGUGCAGCCGC
 UGCUCUUGGGUAGGAUCAUUGCUUCGUACGCCGACAACAAAGAAGAACGCUCCAUCG
 CCAUCUACCUCGGAAUCGGUCUGUGCCUGCUCUUUAUCGUGCGCACUCUCCUGCUGCAUC

55
 60
 65

5 CGGCGAUCUUCGGACUGCACCACAUCGGCAUGCAAUUGCGGAUCGCAAUGUUCACUGA
 UCUACAAAAAGACUCUGAAGCUCAGCUCCAGAGUGCUGGAUAAGAUCUCGAUCGGGCAAC
 UCGUCAGCCUGCUGUCGAACAAUCUGAAUAAGUUCGACGAAGGGUUGGCCUCGCACAUU
 UCGUGUGGAUCGCACCGCUGCAAGUGGCGCUCCUGAUGGGACUCAUUGGGAACUGCUCC
 AAGCCAGCGCGUUUUGCGGACUCGGAUUCCUGAUCGUGCUCGCCUGUCCAAGCCGGAC
 UGGGGCGCAUGAUGAUGAAGUACCGCGAUCAGCGGGCAGGAAAGAUCUCCGAGCGGUUG
 10 GUGAUCACUUCGAAAUGAUCGAGAAUAUUCAGUCCGUGAAGGCCUACUGCUGGGAAGA
 AGCUAUGGAAAAGAUUGAUGAAAACUUGCGGCAAACUGAGCUGAAAUUGACUCGCAAAG
 CGGCAUACGUCCGCUACUCAAUAGCAGCGCCUUCUUCUUUUCGGGCUUUUUCGUGGUGU
 UUCUGAGCGUGCUGCCCUACGCUCUGAUCAAAGGGAAUCAUCCUCCGGAAAAUCUACCA
 CCAUUUCGUUCUGAUCGUGUUGCGCAUGGCCGUGACUCGCCAGUUCUCCUGGGCGGUGC
 15 AGACCUGGUACGACAGCUUGGGGGCAAUCAUAAGAUAAGACUUCUUGCAAAGCAG
 GAGUACAAGACUCUGGAGUACAACCUGACCACCACUGAAGUCGUGAUGGAGAACGUGACC
 GCCUUUUGGGAAGAGGGUUUUGGAGAACUGUUUGAGAAAGCAAAGCAGAAUAACAACAA
 CCGCAAGACCUCAAAUGGGGACGAUUCUCCUGUUUUUCUGAACUUCUCCUGCUCGGAAC
 ACCCGUGUUGAAGGACAUCAAUUUCAAGAUUGAGAGGGGACAGCUUCUCGCGGUAGCGG
 20 GAAGCACUGGGGCGGGAAAAACUAGCCUCUUGAUGGUGAUUAUGGGGGAGCUUGAGCCC
 AGCGAGGGGAAGAUUAAAACACUCCGGGCGUAUCUCAUUCUGUAGCCAGUUUCAUGGAU
 CAUGCCCGGAACCAUUAAGAGAACAUAUUUUCGGAGUAUCCUAUGAUGAGUACCGAU
 ACAGAUCGGUCAUUAAGGCGUGCCAGUUGGAAGAGGACAUUCUAAGUUCGCCGAGAAG
 GAUAACAUCGUCUUGGGAGAAGGGGGUAUUACAUUGUCGGGAGGGCAGCGAGCGGGAU
 25 CAGCCUCGCGAGAGCGGUUAUACAAAGAUGCAGAUUUGUAUCUGCUUGAUUACCGUUUG
 GAUACCUCGACGUUUUGACAGAAAAAGAAAUCUUCGAGUCGUGCGUGUGUAAACUUAUG
 GCUAAUAAGACGAGAAUCCUGGUGACUCCAAAAUGGAGCAUCUCAAGAAGGCGGACAA
 GAUCCUGAUUCUGCAUGAGGGAUCAAGCUAUUUCUACGGAACUUUUUCCGAGCUGCAGA
 ACCUCCAGCCGGAUUUUAGCUCCAAGCUGAUGGGUUGCGACUCAUUCGACCAAUUCUCGG
 30 CUGAGCGGCGGAACUCAUCCUGACCGAAACCCUGCAUCGCUUCUCCUUGAGGGGAGU
 CCCCUGUGUCGUGGACUGAGACUAAAAAGCAGUCGUUUAAGCAAACUGGGCAAUUCGGC
 GAAAAGCGGAAGAAUAGCAUCCUCAACCCAAUCAACAGCAUUCGGAAGUUCAGCAUCGUC
 CAAAAGACCCCGCUCCAGAUGAACGGCAUUGAAGAGGACUCAGACGAGCCAUUGGAAAGA
 35 CGCCUGUCACUGGUCCCAGAUUCGGAGCAGGGUGAAGCAAUUCUGCCUCGGAUCUCGGUC
 AUCUCGACUGGCCCCACUCUCCAAGCUCGGCGGAGACAGAGCGUGCUUAACUUGAUGACC
 CACUCCGUGAACCAGGGUCAGAACAUCCACCGCAAACACCACCGCCUCCACCAGGAAGGUG
 UCACUGGCCCCUCAAGCCAAUCUGACUGAGUUGGAUAUCUACUCCAGAAGGCUCAGCCAG
 GAAACCGGACUGGAAAUCUCGGAAGAGAUCAACGAAGAGGAUCUCAAGAGUGUUUCUU
 40 CGACGACAUGGAAUCAAUCCUUGCUGUCACUACUUGGAACACCUAUCUCCGCUACAUAAC
 CGUGCACAAGUCACUCAUUCGUCCUGAUCUGGUGCCUCGUGAUCUCCUGGCCGAGGU
 CGCAGCAUCGCUUGGUCGUGCUGUGGCUGCUCGGCAACACCCCACUCCAAGACAAAGGCAA
 CAGCACCAUUCUCCGCAACAACUCCUACGCGGUGAUCAUCAUUAACUUCGUCCUACUA
 45 CGUCUUUUACAUCUACGUGGGCGUGGGGACACGCUCUUGGCUAUGGGGUUCUUUCGCGG
 GCUGCCUCUUGUCCACACGCUCAUCACUGUGUCAAAAGAUUCUCCACCACAAAAUGCUGCA
 CUCCGUGCUCCAGGCCCUAUGUCGACUUUGAACACGCUUAAGGCCGGAGGCAUCCUUA
 CAGAUUCUCGAAAGAUUUCGCGAUCUUGGACGAUCUUCUGCCGUGACUAUCUUUGACUU
 CAUCCAACUCCUGCUGAUCGUAUCGGUGCCAUCGCAGUGGUCGCGGUGCUCCAACCGUA
 50 CAUUUUCGUGGGCAGUCUGGCCGGUGAUCGUGGCGUUAUCAUGCUGCGGGCUUACUUUCU

55

60

65

UCAGACCUCACAGCAGCUGAAGCAACUCGAAUCGGAGGGUAGAUCACCAAUCUUUACCCA
 CCUCGUCACCUCGCUGAAGGGACUCUGGACCCUGCGCGCAUUUGGACGGCAACCGUACUU
 5 CGAGACUCUCUCCAUAAGGCCUGAAUCUGCAUACGGCGAAUUGGUUUUUUACUCUC
 GACGCUCGCGUGGUUCCAGAUGCAGCAUUGAGAUUUUUUCGUAUCUUUUUACUCGCGGU
 GACCUUCAUCUCCAUCCUCACCACGGGUGAGGGAGAGGGCAGAGUCGGAAUUAUCCUCAC
 UCUGGCCAUGAACAUCAUGUCCACUCUGCAGUGGGCCGUCAACUCAUCCAUUGACGUGGA
 CUCGCUGAUGCUCGUCGAGAGUGUUAAGUUAUCGAUAUGCCGACCGAGGGAAA
 10 GCCAACUAAGUCGACCAAGCCGUACAAAAACGGACAGCUGAGCAAGGUCAUGAUAUCGA
 AAACUCCACGUGAAAAAGGAUGACAUCUGGCCGUCGUGGACAGAUAGACGGUGAAGG
 AUCUGACUGCGAAGUACACUGAGGGAGGGAAUGCCAUCCUCGAAAACAUCUCAUUCUCA
 UCUCCCCUGGACAGAGGGUCGGGUCUGGGCCGCACUGGCUCGGGGAAGUCGACUCUUC
 UUCGCGCAUUUCUGCGCUUGCUCAAUACCGAGGGAGAAAUCCAGAUCGAUGGAGUGUCA
 15 UGGGACUCGAUACCCUGCAGCAGUGGCGCAAGGCCUUUUGGCGUCAUCCCGCAAAAAGGUG
 UUCAUCUUCUCGGGCACUUUAGAAAGAAUCUGGAUCCCUACGAACAGUGGUCAGAUA
 AGAGAUUUGGAAAGUCGCGAGACGAAGUGGGCCUCCGGUCCGUGAUUGAACAGUUUCCGG
 GAAAGCUCGACUUCGUGCUUGUGGACGGAGGAUGUGUGCUGAGCCACGGCCACAAACAGC
 UCAUGUGCCUGGCUCGGUCGGUCCUGUCGAAAGCAAGAUCUCCUGCUGGACGCAACCGU
 20 CGGCACACCUCGAUCCAGUGACGUACCAGAUCAUCCGGCGGACCCUGAAGCAGGCCUUCG
 CAGACUGCACUGUCAUUUUGUGUGAACAACAGAAUCGAAGCUAUGUUGGAGUGCCAGCAG
 UUCUGGUCAUUCGAAGAAAACAAGUCCGCCAGUACGAUUCGAUUCAGAAGCUGCUGAAC
 GAACGGAGCCUCUUCAGACAGGGCAUCAGCCCCAGCGAUCGGGUCAAGUUGUCCCGCAU
 CGGAACAGCAGCAAGUGUAAGUCAAGCCUCAGAUCGCUGCACUCAAGAAGAGACUGA
 25 AGAAGAAGUGCAAGACACCAGACUCUGA (SEQ ID NO:12)

SEQ ID NO: 13

30 [0220]

AUGCAGCGCUCGCCUCUGGAGAAAAGCCUCAGUCGUGUCAAAAACUGUUCUUUAGCUGGACU
 35 CGCCCGAUUCUCCGGAAGGGUUUAUAGACAGCGCUUGGAGCUCUCCGACAUCUACCAAUAC
 CCUCCGUGGACUCCGCGACAACCUGUCGGAGAAGCUCGAACCGGAGUGGGACCGGGAA
 CUCGCGUCCAAAAAGAAUCCAAAACUCAUUAUUGCACUGCGCCGUCUUCUUCUGGGCG
 UUUUAUGUUUACGGUAUCUUUCUUCUACCUUGGGCGAGGUGACGAAAGCAGUGCAGCCGCU
 CCUGCUUGGCAGAAUUAUCGCCUCGUACGAUCCGGAUAAACAAGAAGACGCUCAAUUCGC
 40 UAUCUACCUCGGUAUCGGAUUGUGCCUGCUUUUCAUCGUGCGCACCCUGUUGCUGCACCC
 GCGGAUUUUCGGACUCCACCACAUCGGAUUGCAAAUGAGAAUUGCAAUGUUCUCAUUGA
 UCUACAAAAAGACCCUUAACUGUCGUCGCCGUCUCCGACAAGAUUUCAAUCGGCCAGC
 UGGUGUCGCUUCUUUCGAAUAAUCUUAACAAGUUCGAUGAAGGACUCGCGCUCGCCCAU
 UCGUGUGGAUCGCACCACUUAAGUCGCACUGCUCAUUGGACUGAUUUUGGGAGUUGCUGC
 45 AGGCUUCCGCCUUUUGCGGCCUGGGAUUCUGAUCGUCUCCUGGCUUUGUCCAGGCUGGAC
 UGGGCAGAAUGAUGAUGAAGUACCGGGACCGGGCAGGAAAGAUCAGCGAAAGGCUC
 GUGAUACUAGCGAAAUGAUCGAGAACAUCCAAUCCGUAAGGCGUACUGCUGGGGAAGA
 AGCGAUGGAGAAGAUGAUCGAAAUCUUCGCCAGACCGAACUCAAAUCACUAGAAAGG
 CUGCCUACGUGCGCUACUUAAACAGCUCAGCAUUUUUCUUCUCCGGAUUUUUCGUGGUGU
 50 UCCUGUCGGUGCUGCCAUACGCCUGAUCUAAAGGGGAUCAUUCUUCGCAAAAUCUUCACCA
 CGAUCUCAUUCUGCAUUGUCCUCCGGAUUGGCCGUGACCGCGCAGUCCCUUGGGCAGUGC
 AAACUUGGUACGAUUCGCUGGGGGCCAUUAACAAGAUUCAAGAUUUUCUUCAAAAGCAG

55

60

65

5 GAGUACAAAACCCUGGAGUACAUCUGACCACUACGGAAGUCGUGAUGGAAAACGUGAC
 UGCUUUUUGGGAGGAAGGCUUCGGCGAACUUUUUGAAAAGGCAAAGCAAAAACAAUACA
 ACAGAAAGACGUCAAACGGCGAUGACUCGCUUUCUCCAAUUCUCCCUGCUCGGCA
 CCCCUGUGCUGAAGGACAUCAACUCAAUUUGAACGCGGACAGCUCUGGCCGUGGGCG
 GAUCGACCCGGGGCUGGGAAAACCUCGUUGUUGAUGGUGAUC AUGGGAGAACUCGAACCC
 UCGGAGGGAAAGAUUAAGCAUAGCGGACGGAUCAGCUUCUGUCCAGUUCUGUGGAU
 10 CAUGCCGGGAACCAUUAAGGAAAACAUCAUCUUCGGCGUGUCCUACGACGAGUACCGGUA
 UAGGUCGGUGAUCAAGGCCUGCCAGUUGGAAGAGGACAUCUCCAAGUUCGCUGAGAAGG
 ACAACAUCGUGCUCGGUGAAGGGGGCAUUCUCUGUCCGGUGGGCCAGCGCGGAGAAUUU
 CGCUGGCUCGCGCGGUGUACAAAGAUGCAGAUUCUAUCUGCUGGAUUCGCCUUCGGAU
 ACCUCG AUGUCCACCGGAGAAGGAGAUUCUUGCAAUCGUGCGUGUGCAAGUUGAUGG
 AACAAAGACUAGGAUCCUGGUCACUUCCAAAGAUGGAGCACUUGAAGAAGGCCGAUAAGAU
 15 CUUGAUCCUCCAUGAAGGAUCGAGCUACUUUUACGGAACUUUCUCAGAGCUCGAGAACUU
 GCAGCCGGACUUCUCAAGCAAACUGAUGGGUUGCGACUCGUUCGACCAGUUUUCGGCAGA
 ACGGCGGAACUCGAUCCUGACUGAGACUCUGCAUCGCUUUUCGUGGAAGGCCAUGCCCC
 UGUGUCCUGGACUGAAACCAAGAAGCAAUCCUUCAAACAAACUGGAGAAUUCGGAGAAA
 AGCGGAAGAACUCCAUCUUAAACCCCAUCAAUAGCAUCCGGAAGUUCUCAAUCGUCCAAA
 20 AGACCCCGCUGCAGAUGAAUGGCAUCGAAGAAGAUAGCGACGAACCUCUUGAAAAGACGGC
 UGUCCUUGGUGCCAGACUCAGAACAGGGAGAAGCUAUCCUGCCGCGGAUCUCCGUGAUC
 GCACCCGACCGACUCUGCAGGCUCGCAGACGCCAGAGCGUGCUCUACCCUGAUGACCCACU
 CCGUGAACCCAGGACAAAACAUCUCAAUAGAAAGACCACGGCCUCCACCAGAAAAGUCUCC
 25 CCGGACUGGAGAUUUCAGAAGAAAUCAACGAGGAAGAUUUAAAAGAGUGCUUCUUCGAC
 GACAUGGAAUCGAUCCAGCCGUGACCACUUGGAAUACCUAUCUGAGAUACAUCACCGUG
 CACAAAUCCUGAUCUUCGUGCUGAUCUGGUGCCUGGUGAUCUUCUGGCUGAGGUGGCC
 GCCUCACUGGUGGUGCUUUGGUUGCUGGGGAAUACGCCGCUCCAAGACAAGGGAAACUCC
 30 ACGCACUCCAGAAACAACUCGUACGCCGUGAUCUACACGUCGACUUCGUCGUACUACGUG
 UUCUACAUCUACGUCGGUGUGGCAGACACUCUCUUGGGGAUGGGCUUUUUCGGGGACUG
 CCACUGGUCCACACCCUGAUCACCGUGUCCAAAAUCUUGCACCACAAGAUGCUCACACAGC
 GUGCUGCAAGCCCCGAUGAGCACCCUGAAUACCCUCAAGCGGGAGGCAUCCUCAACAGA
 35 UUCAGCAAGGACAUCGCCAUCCUCGACGACCUGUUGCCCCUGACCAUCUUCGAUUUCAUC
 CAGCUUCUUCUCAUCGUGAUCGGGGCAAUCGCUGUCUGGGCGGUGCUGCAGCCGUAUC
 UUCGUGGGCAGUGGCCAGUGAUCGUCGCCUUUAUCAUGCUGCGGGCCUACUUUCUCCAA
 ACUUCCCAACAGCUGAAACAACUGGAGUCGGAGGGCCGACGCCUAUCUUCACCCAUCUG
 GUGACCAGCCUCAAAGGACUGUGGACUCUGAGGGCUUUCGGGAGGCAGCCAUAUCUUCGAG
 40 ACUCUCUUUCACAAGGCCUCGAAUCUCAUACGGCAAUUGGUUUUUGUAUUUGAGUACC
 CUCCGAUGGUUUCAGAUGCAGCAUUGAGAUGAUUUUUGUGAUCUUCUUUAUCGCGGUGAC
 UUUUAUCUCCAUCUUGACCACGGGAGAGGGCGAGGGACGGGUCGGUAUUUAUCCUGACAC
 UCGCCAUGAACAUUAUGAGCACUUGCAGUGGGCAGUGAACAGCUCGAUUGAUGUGGAU
 AGCCUGAUGAGGUCCGUUUCGAGGGUCUUUAAGUUCAUCGACAUGCCGACGGAGGGAAA
 45 GCCACAAAAAGUACGAAACCCUAUAAGAAUGGGCAAUUGAGUAAGGUAUUGAUCUUCG
 AGAACAGUCACGUGAAGAAGGAUGACAUCUGGCCUAGCGGGGGUCAGAUGACCGUGAAG
 GACCUGACGGCAAAAUACACCGAGGGAGGGAAACGCAAUCCUUGAAAACAUCUGUUCAGC
 AUUAGCCCCGUCAGCGUGUGGGGUUGCUCGGGAGGACCGGGUCAGGAAAACUCGACGUU
 GCUGUCGGCCUUCUUGAGACUUCUGAAUACAGAGGGUGAGAUCAGAUUCGACGGCGUUU

50

55

60

65

CGUGGGAUAGCAUCACCUUGCAGCAGUGGGCGCAAGGCGUUCGGAGUCAUCCCCAAAAGG
UGUUCAUCUUUUCGGGAACCUUCCGCAAGAAUCUGGAUCCGUACGAACAGUGGAGCGACC
5 AAGAGAUUUGGAAAGUGGCAGAUAGAAGUGGGAUUGCGGAGCGUCAUCGAACAGUUUCCG
GGAAAGCUCGAUUUCGUCCUUGUGGACGGUGGAUGUGUGCUGUCGCACGGCCAUAAGCA
GCUGAUGUGUCUCGCCCCGUCGGUGCUGUCAAAAGGCGAAGAUCUCUUGCUGGAUGAGCC
AUCAGCCCAUCUGGACCCGGUGACGUACCAGAUCAUAGACGGACGCUGAAACAGGCAUU
10 CGCGGACUGCACUGUGAUCCUCUGUGAACAUCGGAUCGAGGCCAUGCUGGAGUGUCAACA
AUUCUUGGUCAUCAAGAGAAACAAAGUGCGGCAGUACGACAGCAUCCAAAAGCUGCUGA
ACGAGAGGUCCUCUUCGCGCAGGCCAUCUCCCCAUCCGACCGGGUCAAGCUGUCCCCUC
ACCGCAACAGCUCAAAGUGCAAUCCAACCCCAAGAUCCGACGCGCUGAAAGAAGAAACUG
AAGAAGAAGUGCAAGACACUAGACUGUGA (SEQ ID NO:13)

15 **SEQ ID NO: 14**

[0221]

20 AUGCAAAGGUCCCCAUUGGAGAAGGCCUCAGUGGUGUCGAAGCUGUUCUUCUCUGGGACC
AGGCCUAUCCUCCGGAAGGGAUACAGACAGCGGCUGGAACUGUCCGAUAUCUACCAGAUC
CCCAGCGUGGACAGCGCCGAUAAUCUCAGCGAAAAGCUGGAACGGGAAUGGGACCGCGAA
25 CUCGCUUCGAAGAAGAACC CGAAGCUGAUUAAUGCUCUGCGGAGAUUUUCUUUUGGCG
GUUCAUGUUUACGGAAUCUUUCUGUACUUGGGAGAGGUCACGAAGGCUGUGCAGCCUC
UGCUGCUGGGACGGAUUAUCGCGUCGUUAUGACCCCGACAAUAAGGAAGAACGCAGCAUCC
CAAUCUACCUGGGCAUCGGAUUGUGCCUGCUGUUCAUUCGUGAGAACUCUCCUGCUGCAUC
30 CAGCCAUCUUCGGACUCCACCACAUUGGAAUGCAGAUAGAGAAUCGCAAUGUUCUCCUGA
UCUACAAGAAAACGCUCAAGCUCAGCAGCCGCGUGCUCGAUAAGAUCAGCAUCGGUCAAU
UGGUGUCCCGUCUGUCGAAUAACCUCACAAGUUCGACGAAGGGUUGGCCUCCGUCACU
UCGUGUGGAUCGCACCUCUGCAAGUGGCCUCUGCAUUGGGACUGAUUUGGGAGCUGCUGC
AGGCUUCCGCUUUCUGCGGCCUGGGAUUUCUUAUCGUGCUUGCUCUGUCCAGGCGGGAC
35 UGGGACGCAUGAUGAUGAAGUACCGGGACCAACGGGCUGGAAAGAUCAGCGAACGGCUG
GUGAUCACUUCGAAAUGAUUGAGAAUUAUCCAGUCAGUCAAGGCGUACUGCUGGGAAAG
GGCUAUGGAAAAGAUGAUUGAAAUCUGAGACAAACCGAGCUGAAGCUGACUCGGAAAG
CGGCCUACGUCAGAUACUCAAUAGCUCAGCUUUCUUUUCUGGGGUUUUCGUCGUGU
UCCUGUCGGUGCUUCCCUAUGCCCUGAUUAAGGGCAUCAUUCUGCGCAAGAUCUUCACUA
40 CGAUCUCAUUCGCAUCGUGCGCAUGGCUGUGACCAAGACAAUUCGUGGGCCGUGC
AAACCGGUACGAUUCACUGGGAGCCAUACAAGAUCCAAGACUUUCUCCAAAAACAGG
AGUAUAAGACCCUGGAGUACAACCUGACUACUACCGAGGUGGUGAUGGAGAACGUGACU
GCGUUUUGGGAAGAAGGGUUCGGCGAACUGUUUGAAAAGGCCAAGCAGAACAUAACAA
45 CAGAAAGACUUCAAACGGAGAUGACUCGUGUUCUUUUCGAACUUCAGCCUUCUGGGUAC
CCCAGUGUUGAAAGAUUCAACUUCAGAUUGAGAGAGGACAGCUGCUGGCUGUGGCGG
GAUCCACCGGAGCAGGAAAAACUUCACUCCUGAUGGUGAUCUUGGAGAACUCGAACCGU
CAGAGGGGAAGAUUAAACACUCGGGAAGAAUCUCAUUUUGCUCCCAUUUUUCAUGGAUU
AUGCCGGGAACCAUUAAGAAAACAUUAUCUUCGGCGUGUCCUACGACGAGUACCGCUAC
50 AGAUCGGUGAUCAAAGCAUGCCAGCUGGAAGAGGACAUCUCGAAAUUCGUGAAAAAGA
CAAUAUCGUGCUCGGGGAAGGCGGCAUCACCCUCAGCGGAGGACAACGGGCACGGAUUUC
GCUCGCACGCGCAGUCUACAAAGACGCCGAUCUCUACCUCUUGGACAGCCCAUUCGGGUA
UCUGGACGUGCUCACCGAGAAAGAGAUCUUCGAAAGCUGCGUCUGCAAGCUCUAGGCCAA
CAAGACCCGCAUCCUCGUGACGUCGAAGAUGGAACAUCUUAAGAAGGCUGACAAGAUCU

5 CAUUCUCCAUGAAGGGAGCUCUAUACUUCUACGGCACCUUUUCCGAGCUCCAGAAUCUGCA
 ACCGGACUUCUCGUCCAAGCUGAUGGGGCGCGAUUCGUUUGAUCAGUUCUCCGCCGAGCG
 GAGAAACAGCAUUCUGACGGAAACCCUGCACCCGGUUCUCGCUGGAAGGCGAUGCACCCGGU
 GUCGUGGACCGAAACUAAGAAGCAAUCGUUCAAGCAGACGGGAGAGUUUGGAGAGAAGC
 10 GGAAAAACUCCAUCUCAACCCGAUCAACAGCAUCCGGAAGUUCAGCAUCGUGCAAAAAGA
 CCCCUCUCCAGAUUGAAUGGCAUUGAAGAGGACUCCGACGAACCUUUGGAACGCAGACUGA
 GCCUCGUGCCGGAUUCAGAACAGGGGAGAAGCCAUUCUGCCACGGAUUCUCCGUGAUCAGCA
 CUGGGCCAACUCUCCAAGCACGGCGGAGGCAGUCCGUGCUGAAUCUUAUGACGCACAGCG
 UGAUCCAAGGGCAGAACAUCCAUAAGAAAAACGACCGCUUCGACCAGGAAAGUCUCCUCG
 15 CCCCACAAGCUAACCCUCACGGAAACUGGAUAUCUACUCCCGCAGACUGUCGCAAGAGACUG
 GCCUUGAGAUUCUCCGAAGAGAUUAACGAAGAAGAUCUCAAAAGAAUGUUUCUUCGAUGAU
 AUGGAAUCAAUCCCGGCAGUGACCACUUGGAACACCUACUUGCGCUAUUAUCACUGUGCAC
 AAAAGCCUUAUCUUCGUCCUCAUCUGGUGCCUCGUAUCUUCUCCUGGCUGAGGUCGCAGCC
 UCGCUGGUCGUGCUCUGGUUGCUCGGAAACACUCCGCUCGAGGAUAAGGGGAAUUCGACU
 CACUCGCGGAACAAUUCGUACGCUGUCAUUAUCACCUCGACGUCGUCAUACUACGUGUUU
 20 UACAUCUACGUGGGAGUGGCUGACACUCUGUUGGCUAUGGGGUUCUUCGCGGCCUGCCA
 CUGGUCCAUAUCUCAUUAUCUGUGUCCAAAUCCUUAUCACAAGAUGUUGCAUUCAGUG
 CUGCAAGCACCGAUUGCCACCCUCAUACCCUUAAGGCUGGCGGGAUUCUCAACCGCUUC
 UCGAAAGACAUCGCCAUCCUCGAUGAUCUUCUGCCUCACCAUCUUGAUUUCAUCCAG
 CUGCUCUUGAUCGUGAUCGGAGCGAUUGCCGUGGGUGGCAGUGUUGCAGCCGUAUCAUUCU
 25 GUCGCAACUGUGCCGGUACAUCGUCGCCUUAUCAUAUCGUCGCGCCUACUUCUUGCAAACG
 UCACAGCAACUGAAGCAGCUUGAAUCCGAGGGGAAGAUACCUAUCUUCACCCACCCUCGUG
 ACUUCGCUGAAGGGGCGUCUUAUCUUCACACUGCCAAUUGGUUCUUGUACCUUGUCAACCGUG
 UUGUUCACAAGGCGCUCAAUCUUCACACUGCCAAUUGGUUCUUGUACCUUGUCAACCGUG
 AGAUGGUUUCAGAUUGCGGAUCGAAAUGAUCUUCGUGAUCUUCUUAUCGCGGUGACUUU
 30 CAUCUCGAUCCUGACUACCGGAGAGGGAGAAGGACGGGUGGGUAUUAUCCUCACUCUGGC
 GAUGAACAUCAUGUCGACGCUUCAGUGGGCGGUGAAUAGCUCAAUCGAUGUCGACUCGC
 UGAUGCGCUCUCCGUGAGCCGGGUGUUUAAGUUAUCGACAUGCCAACUGAAGGGAAGCCG
 ACCAAGUCGACCAAACCGUACAAAAACGGACAGCUCUCCAAGGUGAUGAUUAUCGAGAAU
 35 UCCCACGUGAAAAAGGACGACAUCUGGCCAUCCGGUGGACAGAUAGCCGUGAAGGACCUG
 ACCGCGAAGUACACUGAGGGAGGCAACGCAAUCCUUGAGAACAUCAGCUUCUCCAUCUCG
 CCCGGUCAGAGGGUGGGCCUUCUUGGCCGGACCGGAUCGGGAAAGUCCACUCUUCUGUCG
 GCCUUUCUUCGCCUCUUGAAUACUGAAGGGGAAAUCCAGAUUCGACGGAGUGUCGUGGGA
 UAGCAUCACUCUGCAGCAGUGGCGGAAAGCGUUUGGAGUAAUCCCCAAAAGGUCUUUA
 40 UCUUUAGCGGAACCUUCCGAAAGAAUCUCGAUCCUUAUGAACAGUGGUCAGAUCAAGAG
 AUUUGGAAAGUCGCGGACGAGGUUGGCCUUCGGAGUGUAUUCGAGCAGUUUCCGGGAAA
 ACUCGACUUUGUCCUUGUAGAUGGGGGAUGCGUCCUGUCGAUGGGCACAAGCAGCUCAU
 GUGCCUGGCGCGAUCCGUCCUCUCUAAAGCGAAAAUUCUUCUCUUGGAUGAACCUUCGGC
 45 CCAUCUGGACCCGGUAACGUUAUCAGAUCAUCAGAAGGACACUUAAGCAGGGCGUUUGCCGA
 CUGCACGGUGAUUCUCUGUGAGCAUCGUAUCGAGGCCAUGCUCGAAUGCCAGCAAUUUCU
 UGUCAUCGAAGAGAAUAAGGUCCGCCAGUACGACUCCAUCAGAAAGCUGCUUAAUGAGA
 GAUCAUUGUUCGGCAGGCGAUUUCACCAUCCGAUAGGGUGAAACUUUUUCCACACAGAA
 AUUCGUCGAAGUGCAAGUCCAAACCGCAGAUUCGCGGCCUUGAAAGAAGAGACUGAAGAA
 50 GAAGUUCAAGACACGCGUCUUUAA (SEQ ID NO:14)

SEQ ID NO: 15

[0222]

55

60

65

5 AUGCAGCGGUCCCCGCUCGAAAAGGCCAGUGUCGUGUCCAAACUCUUCUUCUCAUGGACU
 CGGCCUAUCCUUAGAAAAGGGGUAUCGGCAGAGGCCUUGAGUUGUCUGACAUCUACCAGAU
 CCCCUCGGUAGAUUCGGCGGAUAACCUCUCGGAGAAGCUCGAAACGGGAAUGGGACCGCGA
 ACUCGCGUCUAAGAAAAACCCGAAGCUCAUCAACGCACUGAGAAGGUGCUUCUUCUGGCG
 GUUCAUGUUCUACGGUAUCUUCUUGUAUCUCGGGGAGGUCACAAAAGCAGUCCAACCCCU
 GUUGUUGGGUCGCAUUAUCGCCUCGUACGACCCCGAUAACAAAGAAGAACGGAGCAUCGC
 10 GAUCUACCUCGGGAUCGGACUGUGUUUGCUUUUCAUCGUCAGAACACUUUUUGUUGCAUCC
 AGCAAUCUUCGGCCUCCAUCACAUCGGUAUGCAGAUGCAGAACGCUAUGUUUAGCUUGAU
 CUACAAAAGACACUGAAACUCUCGUCGCGGGUGUUGGAUAAGAUUUCCAUCGGUCAGU
 UGGUGUCCUGCUUAGUAAUAACCUCACAAAUAUCGAUGAGGGACUGGGCGUGGCACAU
 UUCGUGUGGAUUGCCCCGUUGCAAGUCGCCCUUUUGAUUGGGCCUUAUUUGGGAGCUGUU
 15 GCAGGCAUCUGCCUUUUGUGGCCUGGGAUUUCUGAUUGUGUUGGCAUUGUUUCAGGCUG
 GGUUUGGGCGGAUGAUGAUGAAGUAUCGCGACCCAGAGAGCGGGUAAAAUCUCGGAAAGA
 CUCGUCACACUUCGGAAAUGAUCGAAAACAUCAGUCGGUCAAGCCUUAUUGCUGGGAA
 GAAGCUAUGGAGAAGAUUGAUUGAAAACCUCCGCCAAACUGAGCUGAAACUGACCCGCAA
 GCGGGCGUAUGUCCGGUAUUUCAAUUCGUCAGCGUUCUUCUUUCCGGGUUCUUCGUUG
 20 UCUUUCUCUCGGUUUUGCCUUAUGCCUUGAUUAAGGGGAUUAUCCUCCGCAAGAUUUUC
 ACCACGAUUUCGUUCUGCAUUGUAUUGCGAUGGCAGUGACACGGCAUUUCCGUGGGCC
 GUGCAGACAUGUAUGACUCGCUUGGAGCGUAACAAAAUCCAAGACUUCUUGCAAAA
 GCAAGAGUACAAGACCCUGGAGUACAAUCUACUACGAGGUAAGUAAUGGAGAUG
 25 UGACGGCUUUUUGGGAAGAGGGUUUUGGAGAACUGUUUGAGAAAGCAAAGCAGAAUAAC
 AACAAACCGCAAGACCUCAAAUGGGGACGAUUCUUCUUUUUCUCGAACUUCUCCUGCUC
 GGAACACCCGUGUUGAAGGACAUCAAUUUCAAGAUUGAGAGGGGACAGCUUCUCGCGGU
 AGCGGGAAGCACUGGUGCGGGAAAAACUAGCCUCUUGAUGGUGAUUAUGGGGGAGCUUG
 AGCCCAGCGAGGGGAAGAUUAAACACUCCGGGCGUAUCUCAUUCUGUAGCCAGUUUCAU
 30 GGAUCAUGCCCAGAACCAUUAAGAGAACAUCAUUUUCGGAGUAUCCUAUGAUGAGUAC
 CGAUACAGAUCCGUAUUAAGGCGUGCCAGUUGGAAGAGGACAUUUCUAAGUUCGCCGA
 GAAGGAUAACAUCGUCUUGGGAGAAGGGGGUAUUACAUUGUCGGGAGGGCAGCGAGCGC
 GGAUCAGCCUCGCGAGAGCGGUAUACAAAGAUGCAGAUUUGUAUCUGCUUGAUUACCCG
 UUUGGAUACCUCGACGUAUUGACAGAAAAAGAAAUCUUCGAGUCGUGUGUUAACU
 35 UAUGGCUAUAAGACGAGAAUCCUGGUGACAUCAAAAUGGAACACCUUAAGAAGGCGG
 ACAAGAUCUGAUCCUCCACGAAGGAUCGUCCUACUUUUACGGCACUUUCUCAGAGUUGC
 AAAACUUGCAGCCGGACUUCUCAAGCAAACUCAUGGGGUGUGACUCAUUCGACCAGUUCA
 GCGCGGAACGGCGGAACUCGAUCUUGACGGAAACGUCGACCCGAUUCUCGCUUGAGGGUG
 AUGCCCCGGUAUCGUGGACCGAGACAAAAGAAGCAGUCGUUAAGCAGACAGGAGAAUUU
 40 GGUGAGAAAAGAAAGAACAGUAUCUUGAAUCCUUAUUAACUCAAUUCGCAAGUUCUCAAU
 CGUCCAGAAAACUCCACUGCAGAUUGAAUUGAAUUGAAGAGGAUUCGGACGAACCCCGG
 AGCGCAGGCUUAGCCUCGUGCCGGAUUCAGAGCAAGGGGAGGCCAUUCUUCUCCCGGAUUU
 CGGUGAUUUCACCCGACCUACACUUCAGGCGAGGCGAAGGCAAUCCGUGUCUACCCUCA
 45 UGACGCAUUCGGUAAACCAGGGGCAAAACAUUCACCGCAAAACGACGGCCUCAACGAGAA
 AAGUGUCACUUGCACCCAGGCGAAUUUGACUGAACUCGACAUCUACAGCCGUAGGCUUU
 CGCAAGAAACCGGACUUGAGAUACAGCGAAGAAUCAAUGAAGAAGAUUUUGAAAGAGUGU
 UUCUUUGAUGACAUGGAAUCAAUCCAGCGGUGACAACGUGGAACACAUAUCUUGCGUUA
 CAUCACGGUGACAAGUCCUUGAUUUUCGUCCUCAUCUGGUGUCUCGUGAUUCUUCUCGC

50

55

60

65

5 UGAGGUCGCAGCGUCACUUGUGGUCCUCUGGCUGCUUGGUAAUACGCCCUUGCAAGACAA
 AGGCAAUUCUACACACUCAAGAAACAAUCCUAUGCCGUGAUUAUCACUUCUACAAGCUC
 GUUUUACGUGUUUUACAUCUACGUAGGAGUGGCCGACACUCUGCUCGCGAUUGGGUUUCU
 UCCGAGGACUCCCACUCGUUCACACGCUUAUCACUGUCUCCAAGAUUCUCCACCAUAAGA
 UGCUUCAUAGCGUACUGCAGGCUCCCAUGUCCACCUUGAAUACGCUCAAGGCCGGGAGGUA
 UUUUGAAUCGCUUCUCAAAAGAUUUUGCAAUUUUGGAUGACCUUCUGCCCCUGACGAUC
 10 UUCGACUUCAUCCAGUUGUUGCUGAUCGUGAUUGGGGCUAUUGCAGUAGUCGUCGUCCU
 CCAGCCUUAACAUUUUUGUCGCGACCGUUCGUGAUCGUGGCCGUUAUCAUGCUCGCGGC
 CUUUUCUUGCAGACGUCACAGCAGCUUAAGCAACUGGAGUCUGAAGGGAGGUCGCCUA
 UCUUUACGCAUCUUGUGACCAGUUUGAAGGGAUUGUGGACGUUGCGCGCCUUUGGCAGG
 CAGCCCUACUUUGAAACACUGUCCACAAAGCGCUGAAUCUCCAUAACGGCAAUUUGGUUU
 15 UUGUAUUUGAGUACCCUCCGAUGGUUUCAGAUUCGCAUUGAGAUGAUUUUUGUGAUCUU
 CUUUUACGCGGUGACUUUUUUCUCCAUCUUGACCACGGGAGAGGGGAGGGACGGGUCG
 GUAUUUACCCUGACACUCGCCAUGAACAUAUUGAGCACUUUGCAGUGGGCAGUGAACAGC
 UCGAUUGAUGUGGAUAGCCUGAUGAGGUCCGUUUCGAGGGUCUUUAAGUUCAUCGACAU
 20 GCCGACGGAGGGAAAGCCACAAAAGUACGAAACCCUAUAAGAAUUGGGCAAUUGAGUA
 AGGUAUUGAUCAUCGAGAACAGUCACGUGAAGAAGGAUGACAUUCUGGCCUAGCGGGGU
 CAGAUGACCGUGAAGGACCUGACGGCAAAAUACACCCGAGGGAGGGAAACGAAUCCUUGA
 AAACAUCUCGUUCAGCAUUAAGCCCCGGUCAGCGUGUGGGGUUGCUCGGGAGGACCGGGUC
 AGGAAAUCGACGUUGCUGUCGGCCUUCUUGAGACUUCUGAAUACAGAGGGGUGAGAUC
 25 AGAUCGACGGCGUUUCGUGGGAUAGCAUCACCUUGCAGCAGUGGCCGAAAGCGUUUGGA
 GUAUUCCCCCAAAAGGUCUUUAUCUUUAGCGGAACCUUCCGAAAGAAUCGCAUCCUUAU
 GAACAGUGGUCAGAUCAAGAGAUUUUGGAAAGUCGCGGACGAGGUUGGCCUUCGGAGUGU
 AAUCGAGCAGUUUCCGGGAAAACUCGACUUUGUCCUUGUAGAUGGGGGAUGCGUCCUGU
 CGCAUGGGCACAAGCAGCUCAUGUGCCUGGCGCGAUCCGUCCUCUCUAAAAGCGAAAAUUC
 30 UUCUCUUGGAUGAACCUUCGGCCCAUCUGGACCCGGUAACGUAUCAGAUCAUCAGAAGGA
 CACUUAAGCAGGCGUUUGCCGACUGCACGGUGAUUCUCUGUGAGCAUCGUAUCGAGGCCA
 UGCUCGAAUGCCAGCAAUUUUCUUGUCAUCGAAGAGAAUAAGGUCCGCCAGUACGACUCCA
 UCCAGAAGCUGCUUUAUGAGAGAUCAUUGUCCGGCAGGCGAUUUCACCAUCCGAUAGG
 35 GUGAAACUUUUUCCACACAGAAUUCGUCGAAGUGCAAGUCCAAACCGCAGAUCCGCGCC
 UUGAAAGAAGAGACUGAAGAAGAAGUUAAGACACGCGUCUUCACCAUCACCAUCACCAU
 CACCAUCACCAUUA (SEQ ID NO:15)

SEQ ID NO: 16

40 [0223]

45 AUGGCCACUGGAUCAAGAACCUCACUGCUCGCUUUUGGACUGCUUUUGCCUGCCCUGGU
UGCAGAAGGAUCGGCUUUCGACCAUCCACUCUCCAUGCAGCGGUCCCCCGUCGAAAA
 GGCCAGUGUCGUGUCCAACUCUUCUUCUCAUGGACUCGGCCUAUCCUUAAGAAAGGGGUA
 UCGGCAGAGGCUUGAGUUGUCUGACAUCUACCAGAUCCCUUCGGUAGAUUCGGCGGAUAA
 CCUCUCGGAGAAGCUCGAACGGGAAUGGGACCGCGAACUCGCGUCUUAAGAAAAACCCGAA
 50 GCUCAUCAACGCACUGAGAAGGUGCUUCUUCUGGCGGUUCAUGUUCUACGGUAUCUUCU
 GUAUCUCGGGGAGGUCACAAAAGCAGUCCAACCCUGUUGUUGGGUCGCAUUAUCGCCUC
 GUACGACCCCGAUAAACAAAGAAGAACGGAGCAUCGCGAUCUACCUCGGGAUCGGACUGUG
 UUUGCUUUUCAUCGUCAGAACACUUUUGUUGCAUCCAGCAAUCUUCGGCCUCCAUCACAU
 55 CGGUAUGCAGAUUCGAAUCGCUAUGUUUAGCUUGAUCUACAAAAAGACACUGAAACUCU

60

65

5 CGUCGCGGGUGUUGGAUAAGAUUCCAUCGGUCAGUUGGUGUCCCUGCUUAGUAAUAAC
 CUCAACAAAUUCGAUGAGGGACUGGCGCUGGCACAUUUCGUGUGGAUUGCCCCGUUGCAA
 GUCGCCCCUUUGAUGGGCCUUUUUUGGGAGCUGUUGCAGGCAUCUGCCUUUUUGGGCCU
 10 GGGAUUUCUGAUUGUGUUGGCAUUGUUUCAGGCUGGGCUUGGGCGGAUGAUGAUGAAGU
 AUCGCGACCAGAGAGCGGGUAAAAUCUCGGAAAAGACUCGUCAUACAUUCGGAAAUGAUC
 GAAAACAUCAGUCGGUCAAGCCUAUUGCUGGGAAGAAGCUAUGGAGAAGAUUGAUGA
 AAACCUCCGCCAAACUGAGCUGAAACUGACCCGCAAGGCGGGCUAUGUCCGGUAUUUCA
 15 UUCGUCAGCGUUCUUCUUUCCGGGUUCUUCGUUGUCUUUCUCUCGGUUUUGCCUUUAGC
 CUUGAUUAAGGGGAUUAUCCUCCGCAAGAUUUUCACCACGAUUUCGUUCUGCAUUGAU
 UGCGCAUGGCAGUGACACGGCAAUUUCCGUGGGCCGUGCAGACAUGGUAUGACUCGCUUG
 GAGCGAUCAACAAAAUCCAAGACUUCUUGCAAAAAGCAAGAGUACAAGACCCUGGAGUAC
 20 AAUCUUACUACUACGGAGGUAGUAAUGGAGAAUGUGACGGCUUUUUGGGAAGAGGGUUU
 UGGAGAACUGUUUGAGAAAAGCAAAGCAGAAUACAACAACCGCAAGACCUCAAAUGGGG
 ACGAUUCCUGUUUUUCUGAACUUCUCCUGCUCGGAACACCCGUGUUGAAGGACAUCA
 AUUCAAGAUUGAGAGGGGACAGCUUCUCGCGUAGCGGGAAGCACUGGUGCGGGAAAA
 ACUAGCCUCUUGAUGGUGAUUAUGGGGGAGCUUGAGCCAGCGAGGGGAAGAUUAAACA
 25 CUCGGGGCGUAUCUCAUUCUGUAGCCAGUUUUAUGGAUCAUGCCCCGGAACCAUAAAAGA
 GAACAUCAUUUUCGGAGUAUCCUAUGAUGAGUACCGAUACAGAUCCGUCAUUAAGGCGU
 GCCAGUUGGAAGGACAUUUUCUUAAGUUCGCCGAGAAGGAUAACAUCGUCUUGGGAGAA
 GGGGUUAUACAUUGUCGGGAGGGCAGCGAGCGGAUCAGCCUCGCGAGAGCGGUUAUA
 30 CAAAGAUGCAGAUUUGUAUCUGCUUGAUUCACCGUUUGGAUACCUCGACGUUUGACAG
 AAAAAGAAUUCUGAGUCGUGCGUGUAAAACUUAUGGCUAAUUAAGACGAGAAUCCUG
 GUGACAUCAAAAUUGAACACCUUAAGAAGGCGGACAAGAUCUUGAUCCUCCACGAAGG
 AUCGUCCUACUUUUACGGCACUUUCUCAGAGUUGCAAACUUGCAGCCGGACUUCUCAAG
 CAAACUCAUGGGGUGUGACUCAUUCGACCAGUUCAGCGCGGAACGGCGGAACUCGAUCU
 35 GACGGAAACCGUCGACCCGAUUCUCGCUUGAGGGUGAUGCCCCGUAUCGUGGACCGAGAC
 AAAGAAGCAGUCGUUUUAGCAGACAGGAGAAUUUGGUGAGAAAAGAAAGAACAGUAUCU
 UGAUCCUAUUAACUCAAUUCGCAAGUUCUCAAUCGUCCAGAAAACUCCACUGCAGAUGA
 AUGGAAUUGAAGAGGAUUCGGACGAACCCUGGAGCGCAGGCUUAGCCUCGUGCCGGAU
 UCAGAGCAAAGGGGAGGCCAUUCUCCCCGGAUUUCGGUGAUUUAACCCGGACCUACACU
 40 CAGGCGAGGCGAAGGCAAUCCGUGCUCACCUCAUGACGCAUUCGGUAAAACAGGGGCAA
 AACAUUCACCCGAAAACGACGGCCUCAACGAGAAAAAGUGUCACUUGCACCCAGGCGAAU
 UUGACUGAACUCGACAUCUACAGCCGUAGGCUUUCGCAAGAAACCGGACUUGAGAUACG
 GAAGAAUCAAUGAAGAAGAUUUGAAAGAGUGUUUCUUGAUGACAUGGAAUCAUCCC
 AGCGGUGACAACGUGGAACACAUAUCUUGCGUUAUCAUCAGGUGCACAAGUCCUUGAUUU
 45 UCGUCCUCAUCUGGUGUCUCGUGAUCUUCUCGCGUAGGUCGCAGCGUCACUUGUGGUCC
 UCUGGCUGCUUGGUAUACGCCUUGCAAGACAAAAGGCAAUUCUACACACUCAAGAAACA
 AUUCCUAUGCCGUGAUUAUCACUUCUACAAGCUCGUUUUACGUGUUUUACAUCUACGUA
 GGAGUGGCCGACACUCUGCUCGCGAUGGGUUUCUCCGAGGACUCCACUCGUUCACACG
 CUUAUCACUGUCUCCAAGAUUCUCCACCAUAAGAUGCUUCAUAGCGUACUCGAGGCUCC
 50 AUGUCCACCUUGAAUACGCUCAAGGGCGGAGGUUUUUGAAUUCGUUCUCAAAAGAUUA
 UGCAUUUUUGGAUGACCUUCUGCCCCUGACGAUCUUCGACUUCAUCCAGUUGUUGCUGAU
 CGUGAUUGGGGCUAUUGCAGUAGUCGCGUCCUCCAGCCUUAUAUUUUUGUCGCGACCGU
 UCCGGUGAUCGUGGCGUUUAUCAUGCUGCGGGCCUAUUUCUUGCAGACGUCACAGCAGCU
 UAAGCAACUGGAGUCUGAAGGGAGGUCGCCUAUCUUUACGCAUCUUGUGACCAGUUUGA

55

60

65

AGGGAUUGUGGACGUUGCGCGCCUUGGGCAGGCCAGCCUACUUGAAACACUGUCCACA
AAGCGCUGAAUCUCCAUACGGCAAUUGGUUUUUGUAUUUGAGUACCCUCCGAUGGUUU
5 CAGAUGCGCAUUGAGAUUAUUUGUGAUCUUCUUUAUCGCGGUGACUUUAUCUCCA
CUUGACCACGGGAGAGGGCGAGGGACGGGUCGGUAUUUAUCCUGACACUCGCCAUGAACAU
UAUGAGCACUUUGCAGUGGGCAGUGAACAGCUCGUAUUGAUGUGGAUAGCCUGAUGAGGU
CCGUUUCGAGGGUCUUUAAGUUCAUCGACAUGCCGACGGAGGGAAAGCCACAAAAAGU
ACGAAACCCUAUAAGAAUGGGCAAUUGAGUAAGGUAUUGAUAUCGAGAACAGUCACGU
10 GAAGAAGGAUGACAUCUGGCCUAGCGGGGGUCAGAUGACCGUGAAGGACCUGACGGCAA
AAUACACCGAGGGAGGGAACGCAAUCCUUGAAAACAUCUCGUUCAGCAUUAGCCCGGUC
AGCGUGUGGGGUUGCUCGGGAGGACCGGGUCAGGAAAAUCGACGUUGCUGCGGCCUUC
UUGAGACUUCUGAAUACAGAGGGUGAGAUCAGAUUCGACGGCGUUUCGUGGGAUAGCAU
CACCUUGCAGCAGUGGCGAAAGCGUUUGGAGUAAUCCCCAAAAGGUCUUUAUCUUUA
15 GCGGAACCUUCCGAAAGAAUCUCGAUCCUUAUGAACAGUGGUCAGAUAAGAGAUUUGG
AAAGUCGCGGACGAGGUUGGCCUUCGGAGUGUAAUCGAGCAGUUUCCGGGAAAACUCGA
CUUUGCCUUGAUGAGGGGAGGCCUUCGCAUGGGCACAAGCAGCUCUAGUUGCCU
GGCGGAUCCGUCUCUAAAAGCGAAAUUCUUCUUGGAUGAACCUCGGCCCAUCU
20 GGACCCGGUAACGUAUCAGAUCAGAAAGGACACUUAAGCAGGCGUUUGCCGACUGCAC
GGUGAUUCUCUGAGCAUCGUAUCGAGGCCAUGCUCGAAUGCCAGCAUUUUCUUGUCA
UCGAAGAGAAUAAGGUCCGCCAGUACGACUCCAUCAGAAAGCUGCUUAAUGAGAGAUA
UUGUUCGGCAGGCGAUUUCACCAUCCGAUAGGGUGAAACUUUUUCCACACAGAAAUCG
UCGAAGUGCAAGUCCAAACCGCAGAUCGCGGCCUUGAAAGAAGAGACUGAAGAAGAAGU
25 UCAAGACACGCGUCUUUA (SEQ ID NO:16)

SEQ ID NO: 17

[0224]

30
AUGCAGCGGUCCCCGCUCGAAAAGGCCAGUGUCGUGUCCAAACUCUUCUUCUUAUGGACU
CGGCCUAUCCUUAAGAAAGGGGUAUCGGCAGAGGCUUGAGUUGUCUGACAUCUACCAGAU
35 CCCUCGGUAGAUUCGGCGGAUAACCCUCUCGAGAGCUCGAACGGGAAUGGGACCGCGA
ACUCGCGUCUAAAGAAAACCCGAAGCUCAUCAACGCACUGAGAAGGUGCUUCUUCUGGCG
GUUCAUGUUCUACGGUAUCUUCUUGUAUCUCGGGGAGGUCACAAAAGCAGUCCAACCCU
GUUGUUGGGUCGCAUUAUCGCCUCGUACGACCCCGUAACAAAGAAGACGGAGCAUCGC
40 GAUCUACCUCGGGAUCGGACUGUGUUUGCUUUUCAUCGUCAGAACACUUUUGUUGCAUCC
AGCAAUCUUCGGCCUCCAUCACAUCGGUAUGCAGAUUCGAAUCGCUAUGUUUAGCUUGAU
CUACAAAAGACACUGAAACUCUCGUCGCGGGUGUUGGAUAAGAUUCCAUCGGUCAGU
UGGUGUCCUUGCUUAGUAAUAACCUCAACAAAUUCGAUGAGGGACUGGCGCUGGCACAU
UUCGUGUGGAUUGCCCCGUUGCAAGUCGCCUUUUGAUGGGCCUUAUUUGGGAGCUGUU
45 GCAGGCAUCUGCCUUUUGUGGCCUGGGAUUUCUGAUUGUGUUGGCAUUGUUUCAGGCUG
GGCUUGGGCGGAUGAUGAUGAUGAUCGCGACCAGAGAGCGGGUAAAUCUCGGAAAGA
CUCGUAUCACUUCGGAAAUGAUCGAAAACAUCCAGUCGGUCAAGCCUAUUGCUGGGAA
GAAGCUAUGGAGAAGAUGAUUGAAAACCUCCGCAAACUGAGCUGAAACUGACCCGCAA
GGCGGCGUAUGUCCGGUAUUUCAAUUCGUCAGCGUUCUUCUUUUCGGGUUCUUCGUUG
50 UCUUUCUCUCGGUUUUGCCUUAUGCCUUGAUUAAGGGGAUUAUCCUCCGCAAGAUUUUC
ACCACGAUUUCGUUCUGCAUUGUAUUGCGCAUUGGAGGAGACACGGCAAUUUCCGUGGGCC
GUGCAGACAUGGUAUGACUCGUUUGGAGCGAUCAACAAAUCCAAGACUUCUUGCAAAA
GCAAGAGUACAAGACCCUGGAGUACAAUCUUAUCUACUACGGAGGUAGUAAUGGAGAAUG

55

60

65

5 UGACGGCUUUUUGGGAAGAGGGUUUUGGAGAACUGUUUUGAGAAAGCAAAGCAGAAUAAC
AACAAACCGCAAGACCCUCAAUUGGGGACGAUUECCUGUUUUUCUCGAACUUCUCCUCGUC
GGAACACCCGUGUUGAAGGACAUCAAUUUCAAGAUUGAGAGGGGACAGCUUCUCGCGGU
AGCGGGAAGCACUGGUGCGGGAAAAACUAGCCUCUUGAUGGUGAUUAUGGGGGAGCUUG
AGCCCAGCGAGGGGAAGAUUAAACACUCCGGGCGUAUCUCAUUCUGUAGCCAGUUUUCAU
10 GGAUCAUGCCCAGAACCAUUAAAGAGAACAUCUUUUCGGAGUAUCCUAUGAUGAGUAC
CGAUACAGAUCCGUCAUUAAGGCGUGCCAGUUGGAAGAGGACAUUUCUAAGUUCGCCGA
GAAGGAUAAACAUCGUCUUGGGAGAAGGGGGUAUUACAUUGUCGGGAGGGCAGCGAGCGC
GGAUCAGCCUCGCGAGAGCGGUUAUACAAAGAUGCAGAUUUUGUAUCUGCUUGAUUACCCG
UUUGGAUACCUCGACGUAUUGACAGAAAAAGAAUUCUUCGAGUCGUGCGUGUGUAAACU
UAUGGCUAUUAAGACGAGAAUCCUGGUGACAUCAAAAUUGGAACACCUUAAGAAGGCGG
15 ACAAGAUCCUGAUCCUCCACGAAGGAUCGUCCUACUUUACGGCACUUUCUCAGAGUUGC
AAAACUUCGAGCCGGACUUCUCAAGCAAACUCAUGGGGUGUGACUCAUUCGACCAGUUCA
GCGCGAACGGCGGAACUCGAUCUUGACGGAACCGUCACCCGGAUUCUCGCUUGAGGGUG
AUGCCCCGUUAUCGUGGACCGAGACAAAGAAGCAGUCGUUUAAAGCAGACAGGAGAAUUU
GGUGAGAAAAGAAAGAACAGUAUCUUGAAUCCUAUUAACUCAAUUCGCAAGUUCUCAAU
20 CGUCCAGAAAAUCUCCACUGCAGAUGAAUGGAAUUGAAGAGGAUUCGGACGAACCCUUGG
AGCGCAGGCUUAGCCUCGUGCCGGAUUCAGAGCAAGGGGAGGCCAUUCUCCCCGGAUUU
CGGUGAUUUCAACCGGACCUACACUUCAGGCGAGGGCAAGGCAAUCCGUGCUCAACCUCA
UGACGCAUUCGGUAAACCAGGGGCAAAACAUCACCGCAAACGACGGCCUCAACGAGAA
AAGUGUCACUUGCACCCAGGCGAAUUUGACUGAACUCGACAUCUACAGCCGUAGGCUUU
25 CGCAAGAAACCGGACUUGAGAUACAGCGAAGAAAUCAAUUGAAGAAGAUUUUGAAAGAGUGU
UUCUUUGAUGACAUGGAAUCAUCCACGCGGUGACAACGUGGAACACAUAUCUUGCGUUA
CAUCACGGUGCACAAGUCCUUGAUUUUCGUCCUACUCUGGUGUCUCGUGAUUUUCUCGC
UGAGGUCGACGUCACUUGUGGUCCUCUGGUCUGUAAUACGCCCCUUGCAAGACAA
AGGCAAUUUCACACACUCAAGAAACAUAUCCUAUGCCGUGAUUAUCACUUCUACAAGCUC
30 GUAUUACGUGUUUUACAUCUACGUAGGAGUGGCCGACACUCUGCUCGCGAUGGGUUUCU
UCCGAGGACUCCACUCGUUCACACGCUUAUCACUGUCUCCAAGAUUCUCCACCAUAAGA
UGC UUCAUAGCGUACUGCAGGCUCCCAUGUCCACCUUGAAUACGCUCAAGGCGGGAGGUA
UUUUGAAUCGCUUCUCAAAAGAUUAUUGCAAUUUUGGAUGACCUUCUGCCCCUGACGAUC
35 UUCGACUUCAUCCAGUUGUUGCUGAUCGUGAUUUGGGGCUAUUGCAGUAGUCGUCGUCCU
CCAGCCUUAUAUUUUGUCGCGACCGUUCGGGUGAUUCGUGGGCGUUUAUCAUGCUCGCGGGC
CUAUUUCUUGCAGACGUCACAGCAGCUUAAGCAACUGGAGUCUGAAGGGAGGUCGCCUA
UCUUUACGCAUCUUGUAGACCAGUUUGAAGGGAUUUGGACGUUGCGCCUUUGGCAGG
CAGCCUACUUUGAAACACUGUCCACAAGCGCUGAAUCUCCAACGGCAAUUUGGUUU
40 UUGUAUUUGAGUACCCUCCGAUGGUUUUCAGAUUGCGCAUUGAGAUAUUUUUGUGAUCUU
CUUUUACGCGGUGACUUUUUUCUCCAUCUUGACCACGGGAGAGGGCGAGGGACGGGUCG
GUAUUUACCGUACACUCGCCAUGAACAUAUUGAGCACUUUGCAGUGGGCAGUGAACAGC
UCGAUUGAUGUGGAUAGCCUGAUGAGGUCCGUUUCGAGGGUCUUUAAGUUCAUCGACAU
45 GCCGACGGAGGGAAAGCCCACAAAAGUACGAAACCCUAUAAGAAUGGGCAAUUGAGUA
AGGUAUUGAUCUUCGAGAACAGUCACGUGAAGAAGGAUGACAUCUGGCCUAGCGGGGGU
CAGAUAGCCGUGAAGGACCUGACGGCAAAAUACACCGAGGGAGGGAAACGCAAUCCUUGA
AAACAUCUCGUUCAGCAUUAGCCCCGUCAGCGUGUGGGGUUGCUCGGGAGGACCGGGUC
AGGAAAAUCGACGUUGCUGUCGGCCUUCUUGAGACUUCUGAAUACAGAGGGUGAGAUC
50 AGAUCGACGGCGUUUCGUGGGAUAGCAUCACCUUGCAGCAGUGGCGGAAAGCGUUUGGA

55

60

65

5 GUAUCCCCAAAAGGUCUUUAUCUUUAGCGGAACCUUCCGAAAAGAAUCUCGAUCCUUAU
GAACAGUGGUCAGAUCAAGAGAUUUGGAAAAGUCGCGGACGAGGUUGGCCUUCGGAGUGU
AAUCGAGCAGUUUCCGGGAAAACUCGACUUUGUCCUUGUAGAUGGGGGAUGCGUCCUGU
CGCAUGGGCACAAGCAGCUC AUGUGCCUGGGCGGAUCCGUCCUCUAAAAGCGAAAAUUC
10 UUCUCUUGGAUGAACCUUCGGCCAUUCUGGACCCGGUAACGUAUCAGAUCAUCAGAAGGA
CACUUAAGCAGGCGUUUGCCGACUGCACGGUGAUUCUCUGUGAGCAUCGUAUCGAGGCCA
UGCUCGAAUGCCAGCAAUUUCUUGUCAUCGAAGAGAAUAAGGUCCGCCAGUACGACUCCA
UCCAGAAGCUGCUUAAUGAGAGAUCAUUGUCCGGCAGGCGAUUUCACCAUCCGAUAGG
GUGAAACUUUUUCCACACAGAAAUCGUCGAAGUGCAAGUCCAAACCGCAGAUCGCGGCC
UUGAAAGAAGAGACUGAAGAAGAAGUUCAAGACACGCGUCUUUAA (SEQ ID NO:17)

15 **SEQ ID NO: 18**

[0225]

20 AUGGCCACUGGAUCAAGAACCUCACUGCUGCUCGCUUUUGGACUGCUUUGCCUGC
CCUGGUUGCAAGAAGGAUCGGCUUCCCGACCAUCCACUCUCC (SEQ ID NO:18)

25 **SEQ ID NO: 19**

[0226]

30 AUGGCAACUGGAUCAAGAACCUCUCCUGCUCGCAUUCGGCCUGCUCUGUCUCC
CAUGGCUCCAAGAAGGAAGCGCGUUCUCCACUAUCCCCUCUCG (SEQ ID NO:19)

SEQ ID NO: 20

[0227]

35 CGGGUGGCAUCCUGUGACCCUCCUCCAGUGCCUCUCCUGGCCUUGGAAGUUGCC
ACUCCAGUGCCCACCAGCCUUGUCCUAAUAAAAUUAAGUUGCAUCAAGCU

40 **[0228]** El uso de la palabra "un" o "una" cuando se usa en conjunción con el término "que comprende" en las reivindicaciones y/o la especificación puede significar "uno", pero también es consistente con el significado de "uno o más," "al menos uno" y "uno o más de uno". El uso del término "o" en las reivindicaciones se usa para indicar "y/o" a menos que se indique explícitamente que se refiera solo a alternativas o que las alternativas sean mutuamente excluyentes, aunque la divulgación respalda una definición que se refiere solo a alternativas e "y/o."

45 **[0229]** A menos que se indique lo contrario, debe entenderse que el término "al menos" que precede a una serie de elementos se refiere a cada elemento de la serie.

50 **[0230]** A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención.

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un ARNm transcrito *in vitro* que comprende una secuencia codificante al menos 80% idéntica a la SEQ ID NO: 3 para su uso en el tratamiento de la fibrosis quística en un mamífero.
- 2.** El ARNm para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la secuencia codificante es al menos 90% o es 100% idéntica a SEQ ID NO: 3.
- 10 **3.** El ARNm para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el ARNm comprende una región 5' no traducida (UTR), una 3' UTR, una secuencia codificante de péptido señal, una estructura de tapa y/o una estructura de cola.
- 4.** El ARNm para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el 5'-UTR comprende la SEQ ID NO: 4 y/o el 3'-UTR comprende la SEQ ID NO: 5.
- 15 **5.** El ARNm para su uso de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, en el que la estructura de la cola es una cola de poli A de al menos 70, 100, 120, 150, 200 o 250 residuos de longitud.
- 6.** El ARNm para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3-5, en el que la estructura de tapa es una estructura de tapa.
- 7.** El ARNm para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el ARNm comprende uno o más nucleótidos no estándar, opcionalmente en donde uno o más nucleótidos no estándar se eligen entre 5-metilo-citidina, pseudouridina, y 2-tio-uridina.
- 25 **8.** El ARNm para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la composición se administra al pulmón del mamífero por inhalación, administración intranasal, aerosolización o nebulización.
- 9.** El ARNm para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el ARNm comprende una secuencia codificante que codifica una proteína reguladora de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística humana (CFTR) de la SEQ ID NO: 1, opcionalmente en la que la proteína CFTR humana se expresa en las células epiteliales del pulmón.
- 30 **10.** El ARNm para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el ARNm se administra con un vehículo.
- 11.** Una composición que comprende un ARNm y un vehículo, en donde el ARNm es un ARNm transcrito *in vitro* y tiene una secuencia de codificación al menos 80% idéntica a SEQ ID NO: 3.
- 40 **12.** El ARNm para su uso de acuerdo con la reivindicación 10 o la composición de la reivindicación 11, en el que el vehículo comprende un catión orgánico, tal como un lípido catiónico o un polímero orgánico catiónico.
- 13.** El ARNm para su uso según la reivindicación 12 o la composición de la reivindicación 12, en donde el polímero orgánico catiónico se selecciona del grupo que consiste en polietilenimina (PEI), protamina, protamina PEGilada, poli-L-lisina (PLL) y PLL PEGilada.
- 45 **14.** El ARNm para su uso de acuerdo con la reivindicación 13 o la composición de la reivindicación 13, en el que la PEI es una PEI ramificada con un peso molecular que varía de 10 kDa a 40 kDa.
- 50 **15.** El ARNm para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 y 12 - 14 o la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 11 - 14, en el que el vehículo es un liposoma.

55

60

65

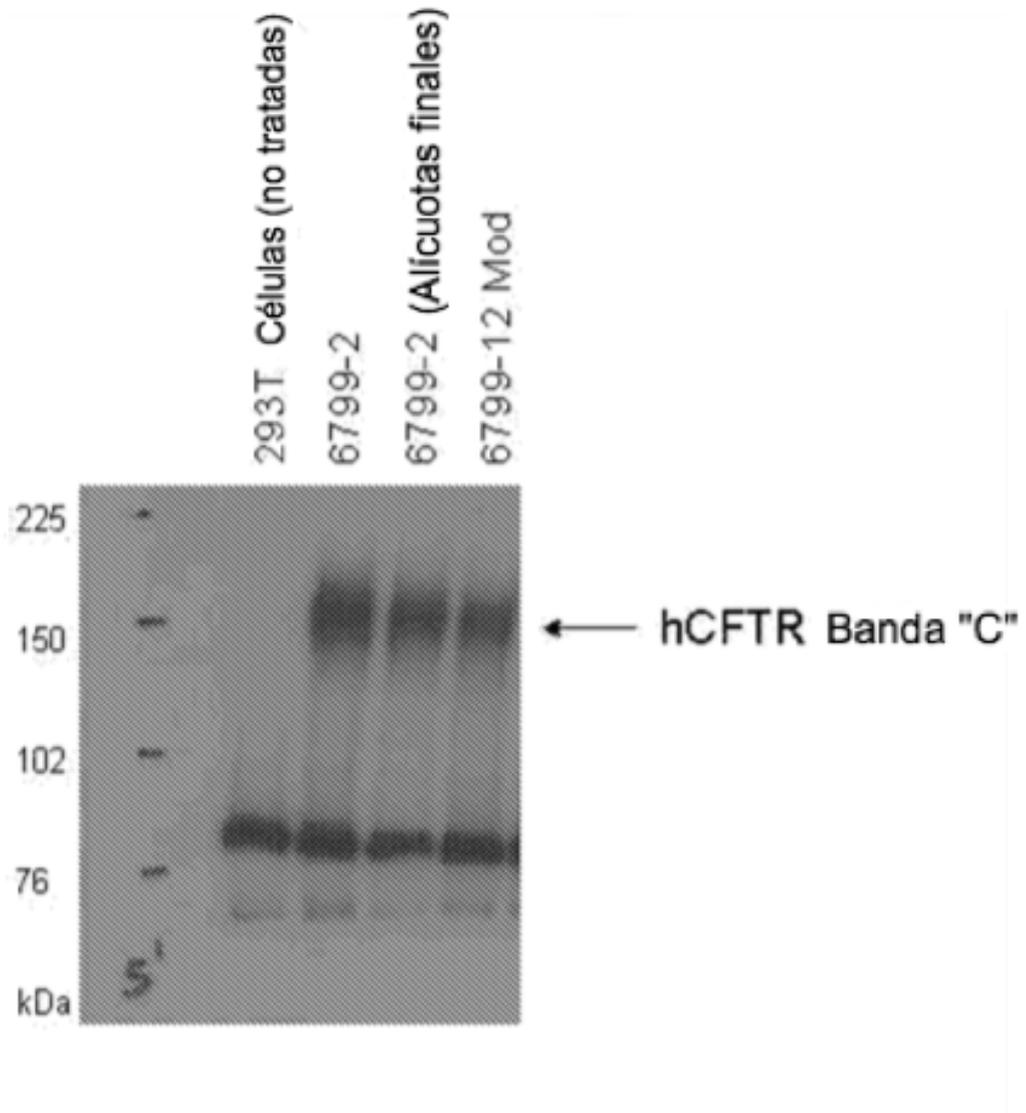


FIGURA 1A

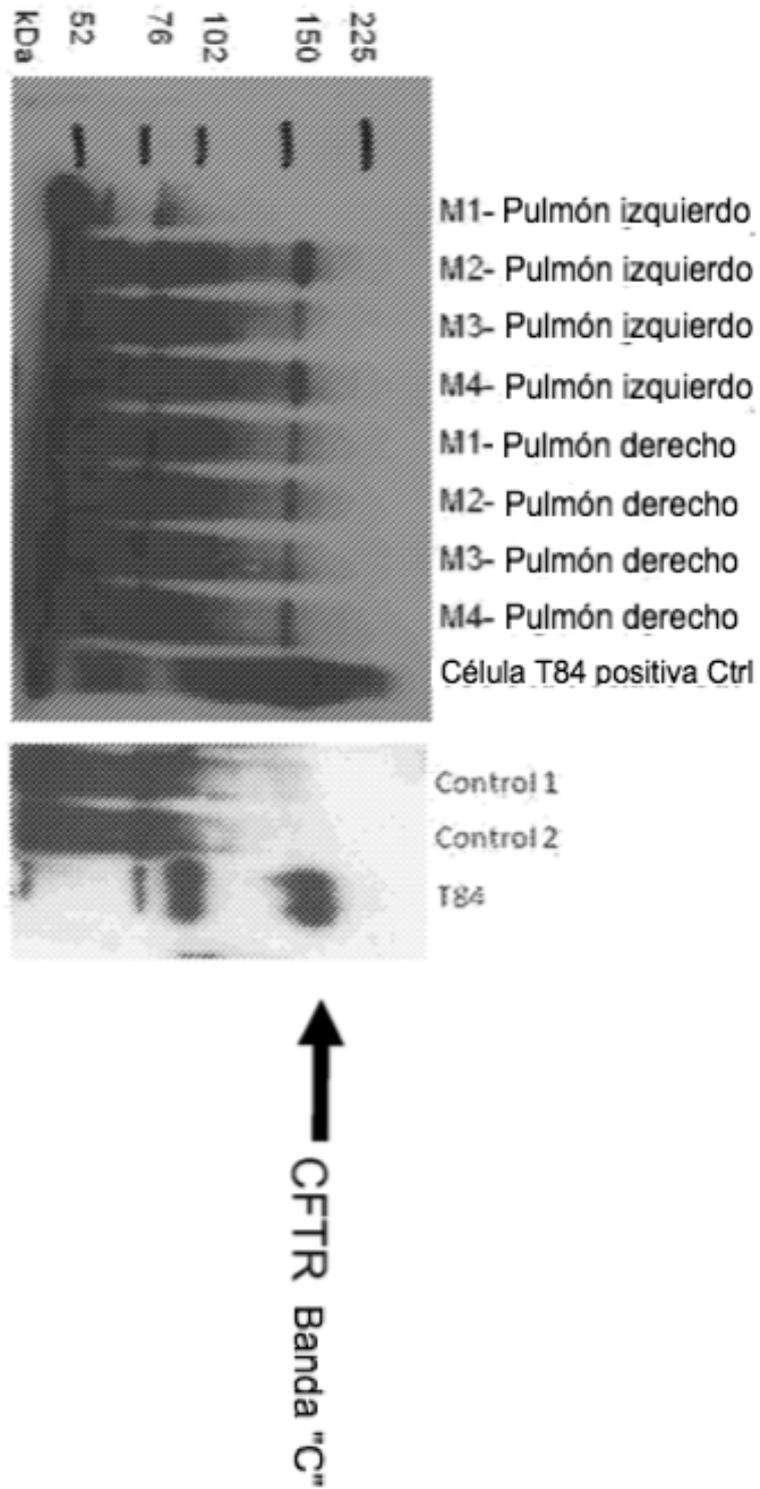


FIGURA 1B

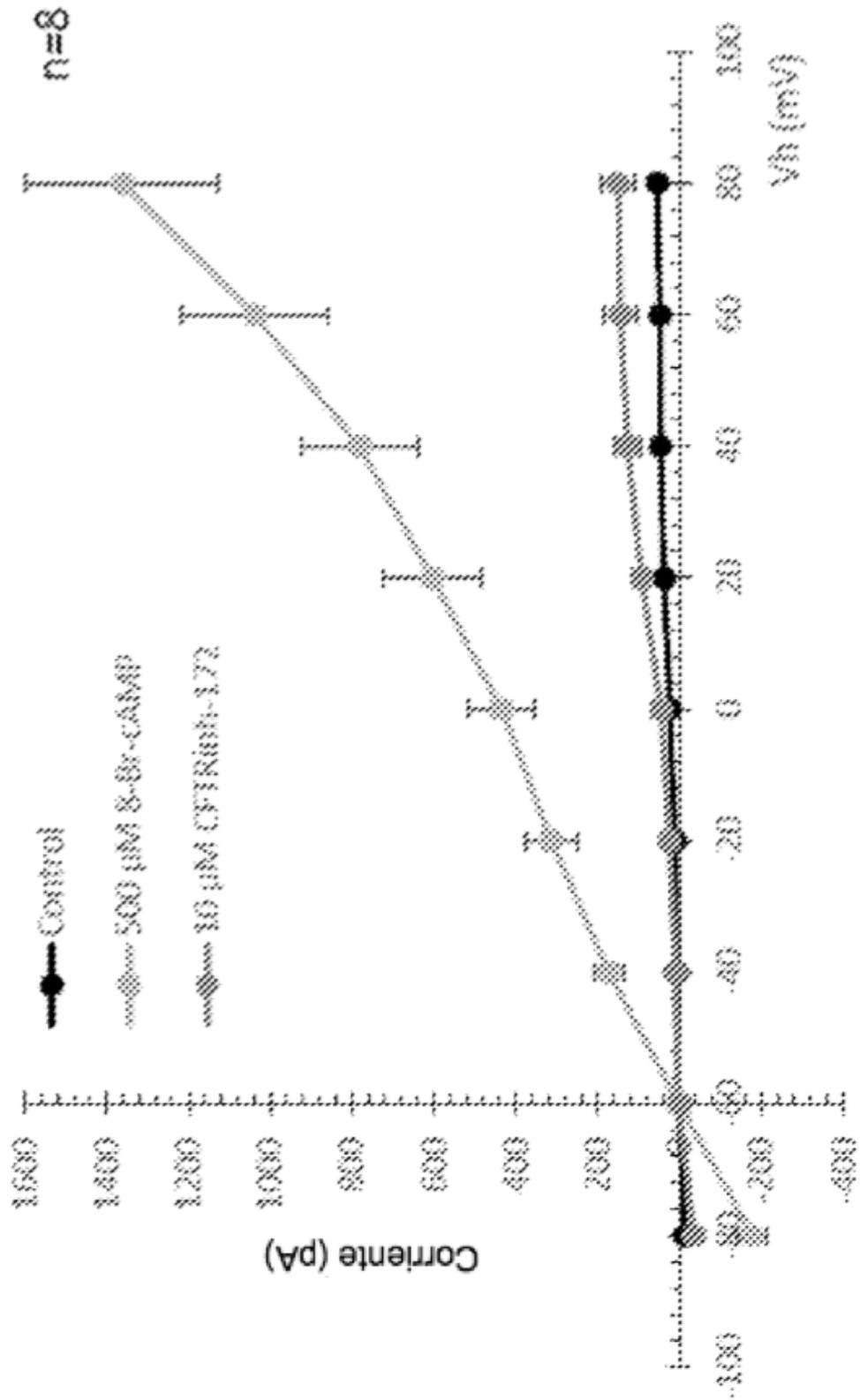


FIGURA 2

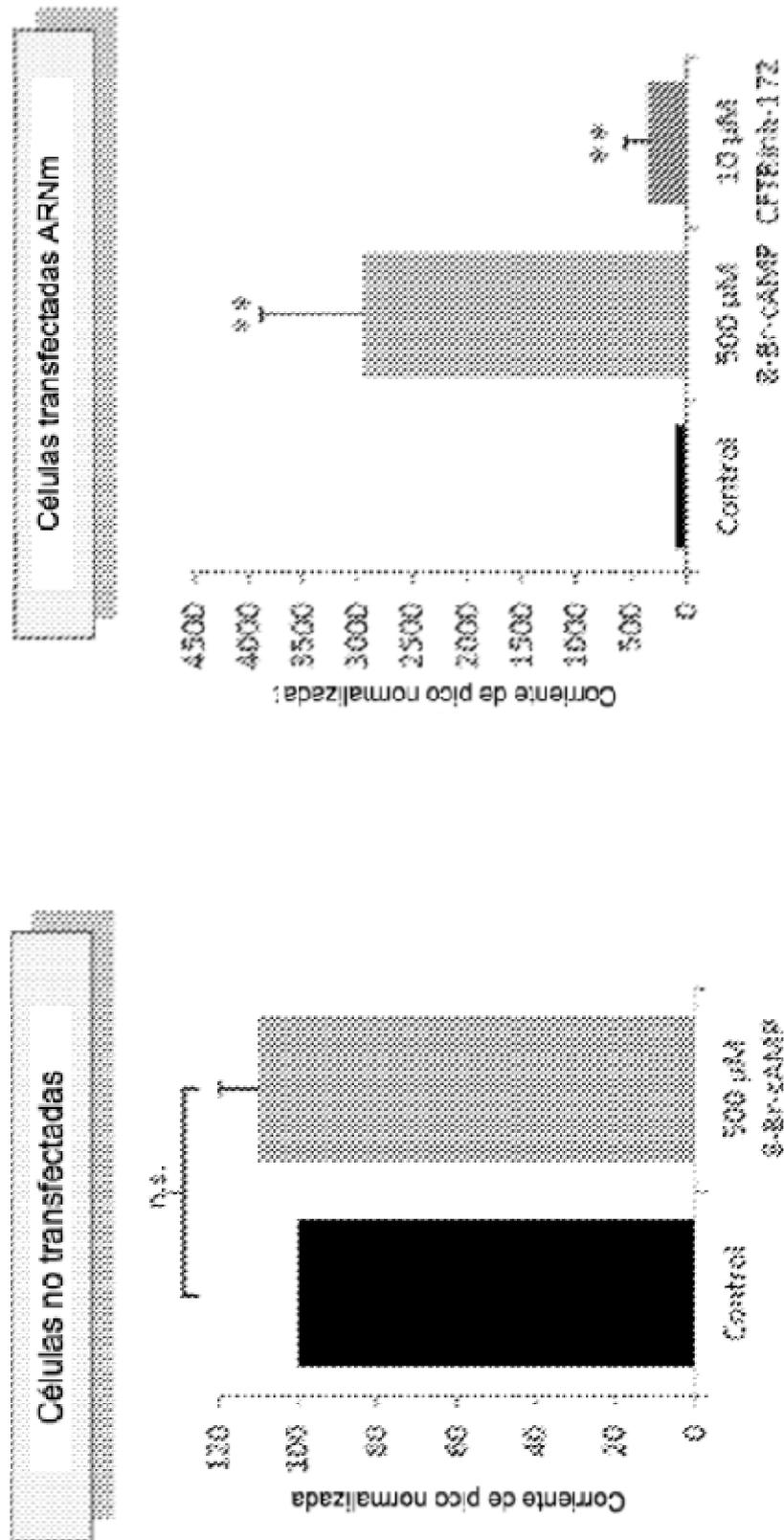


FIGURA 3

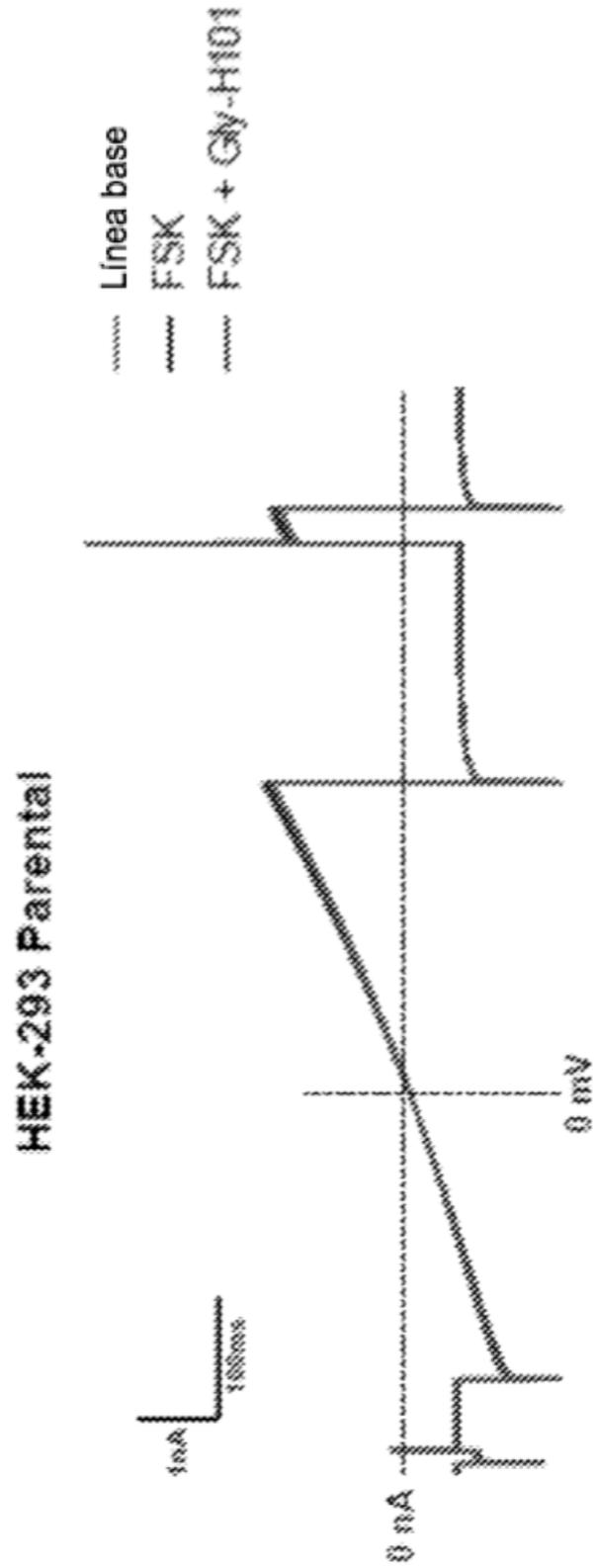


FIGURA 4

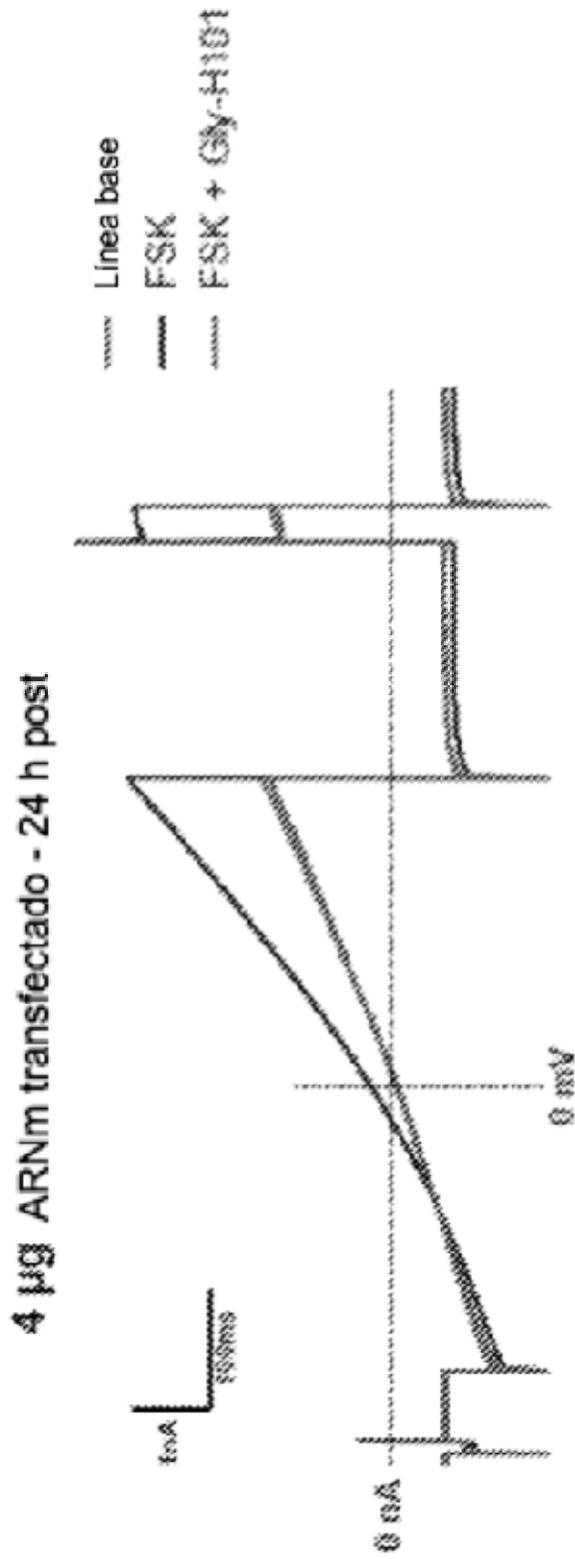


FIGURA 5

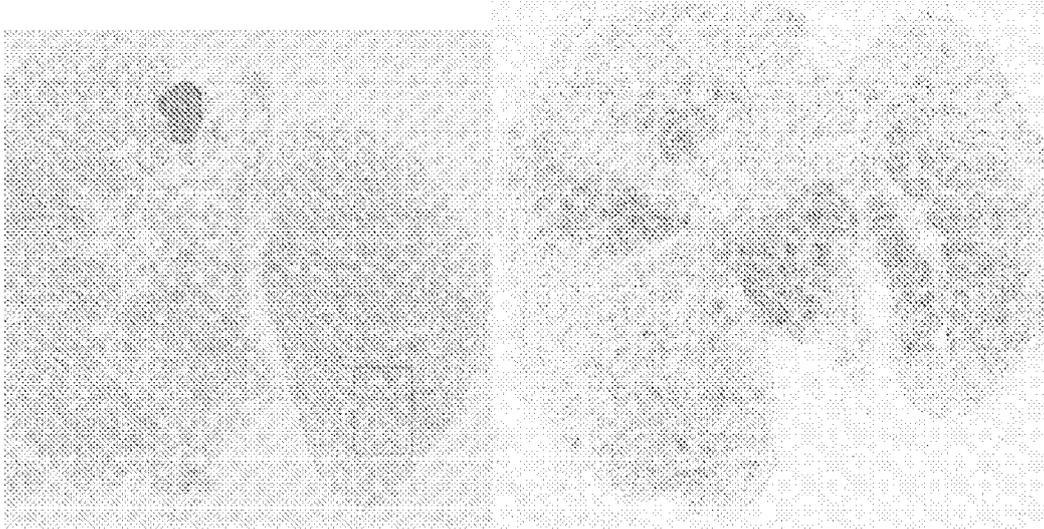


FIGURA 6

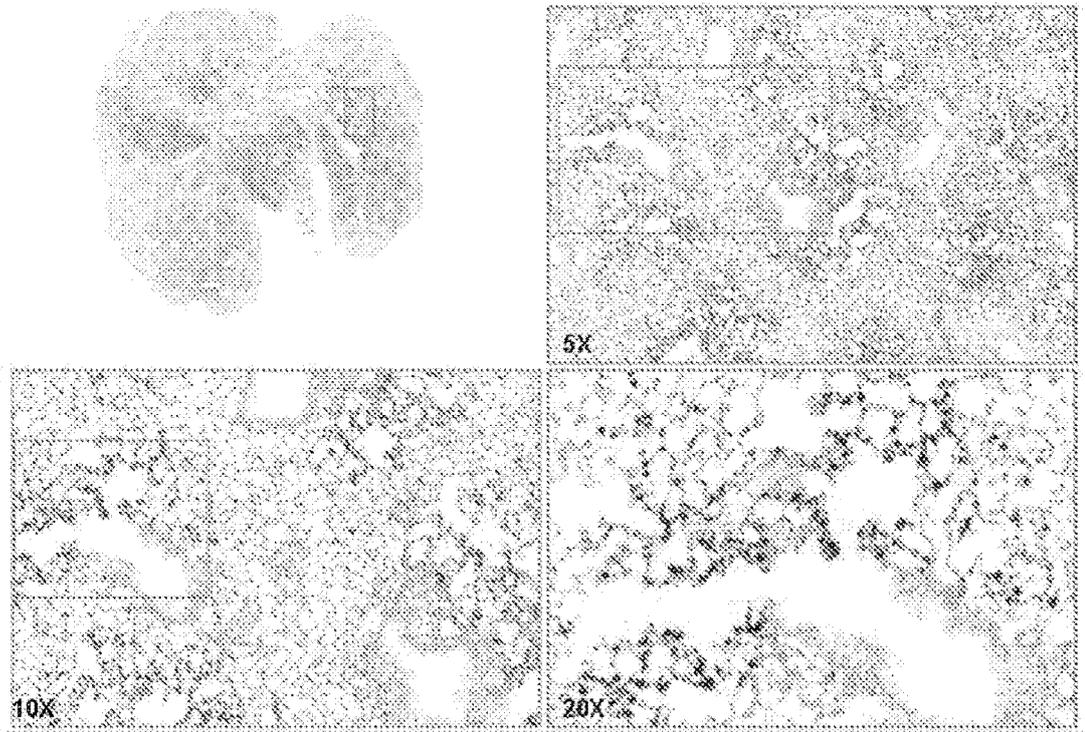


FIGURA 7

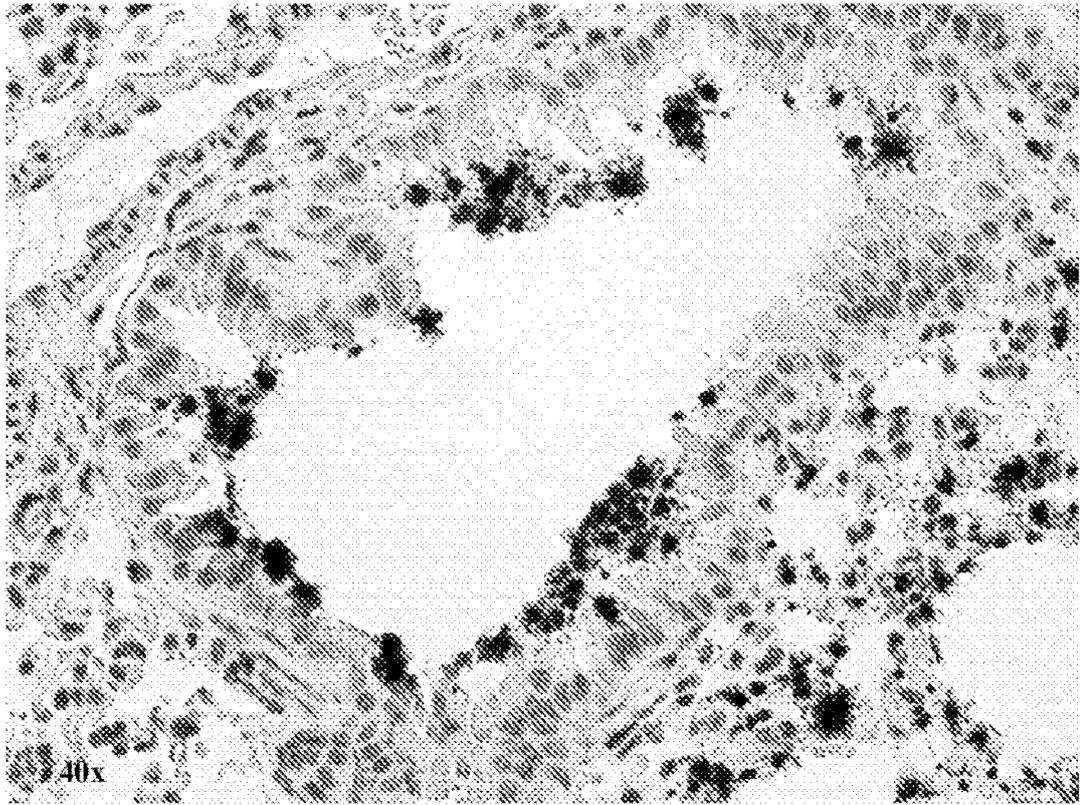


FIGURA 8

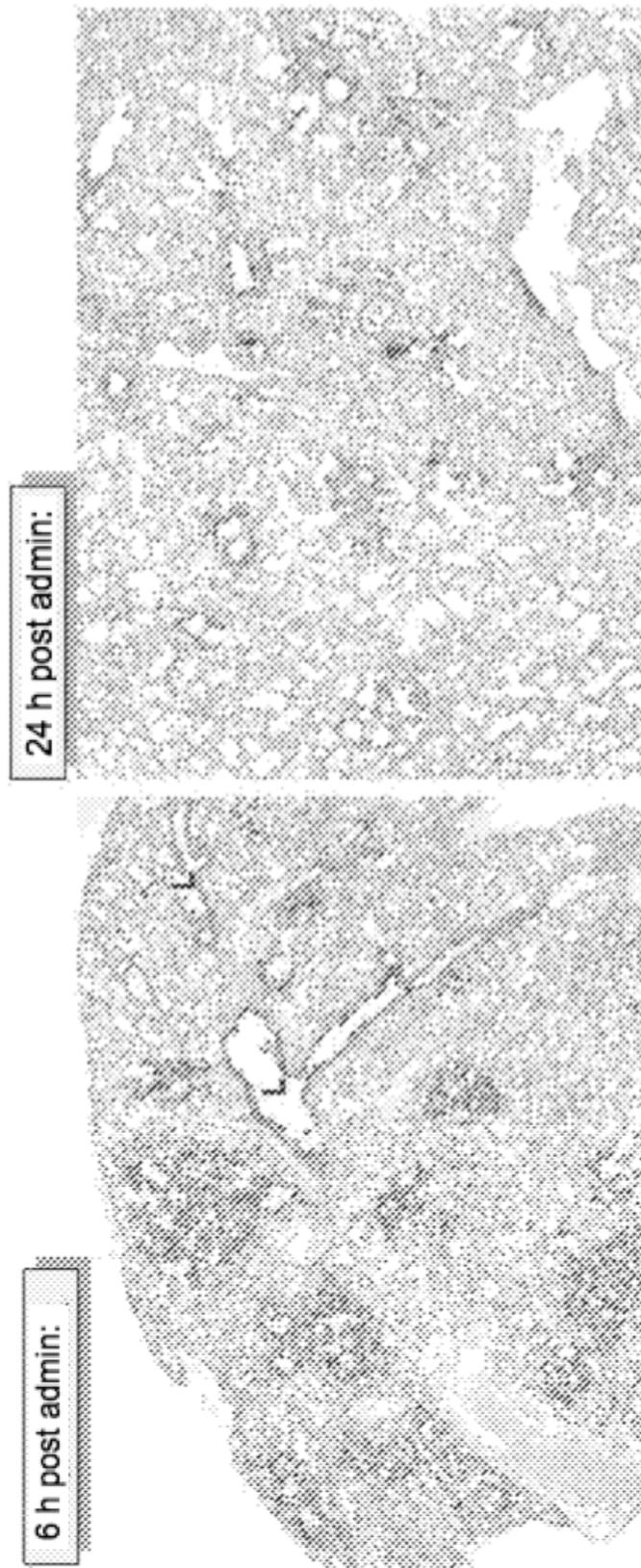


FIGURA 9

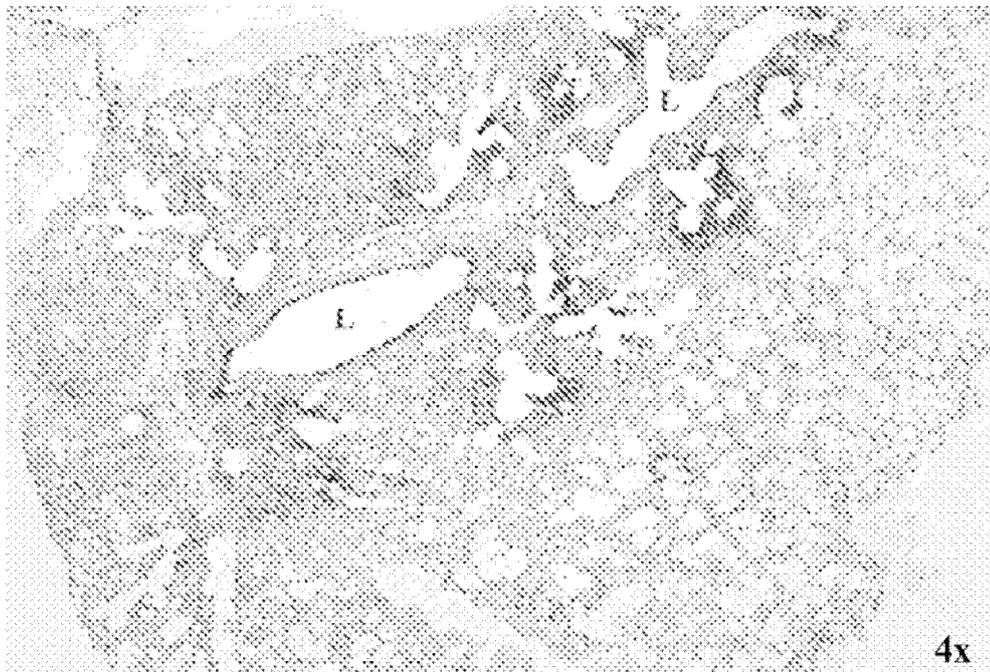
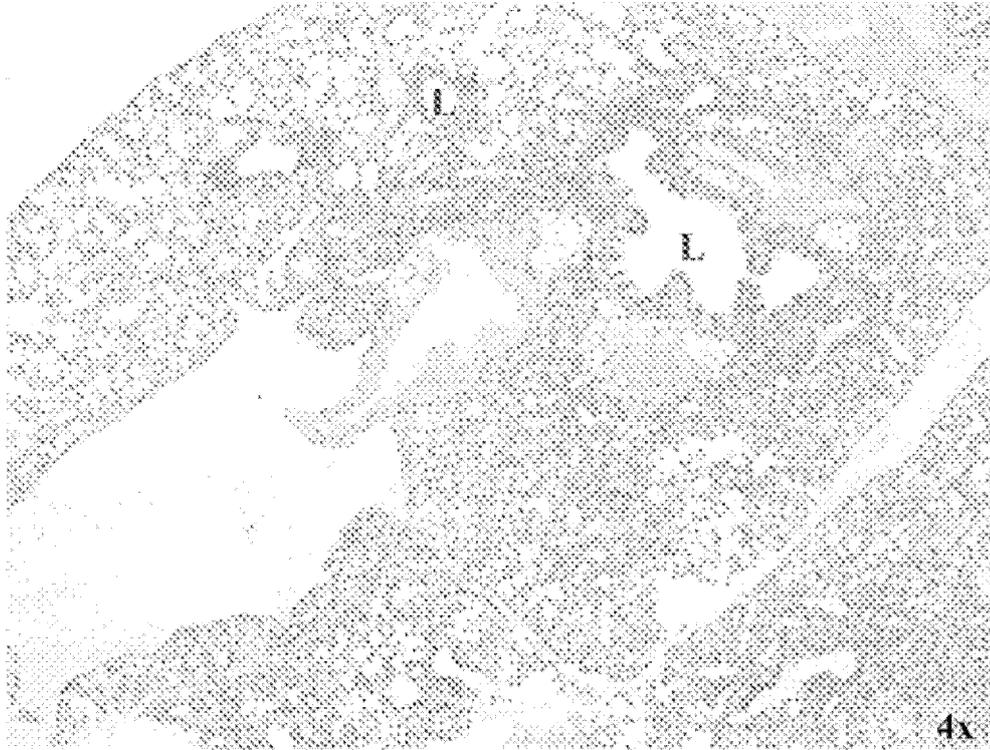


FIGURA 10

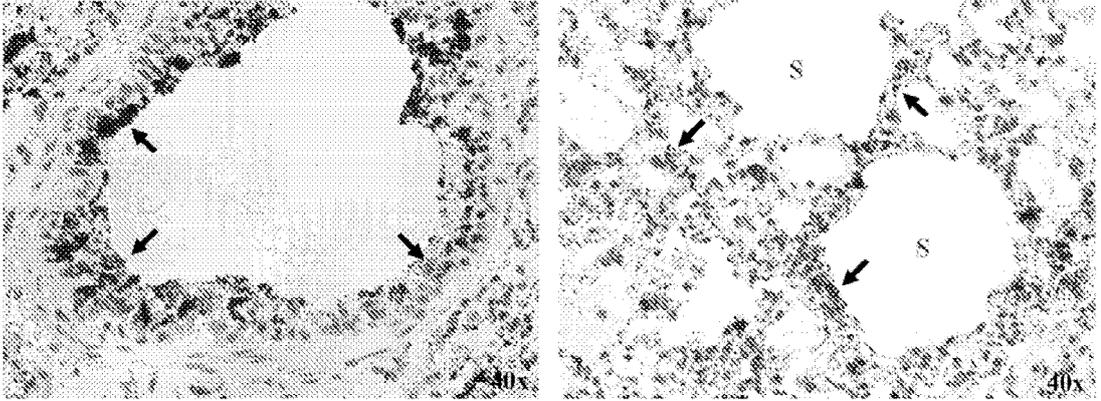


FIGURA 11

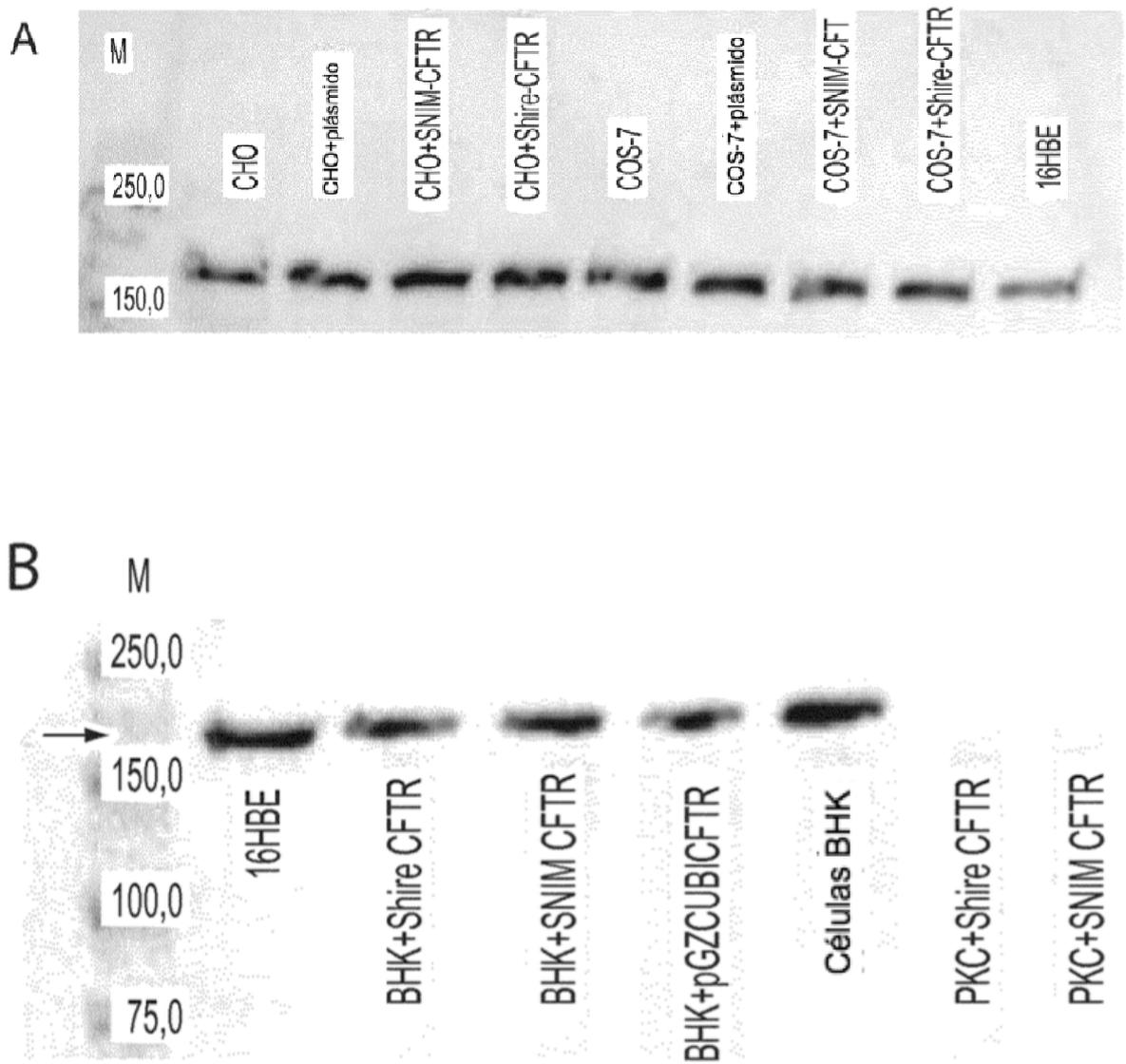


FIGURA 12 A y B

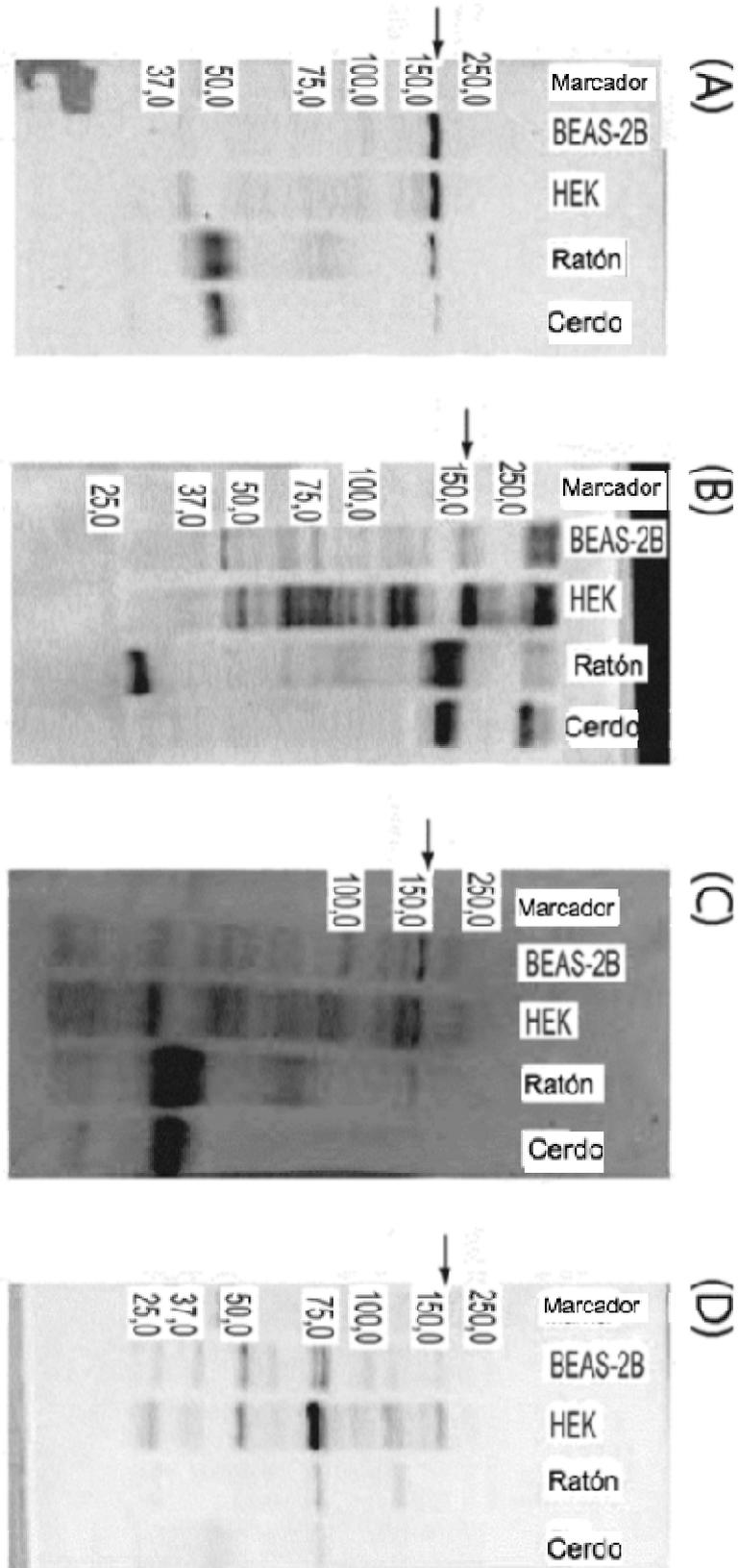


FIGURA 13 A-D

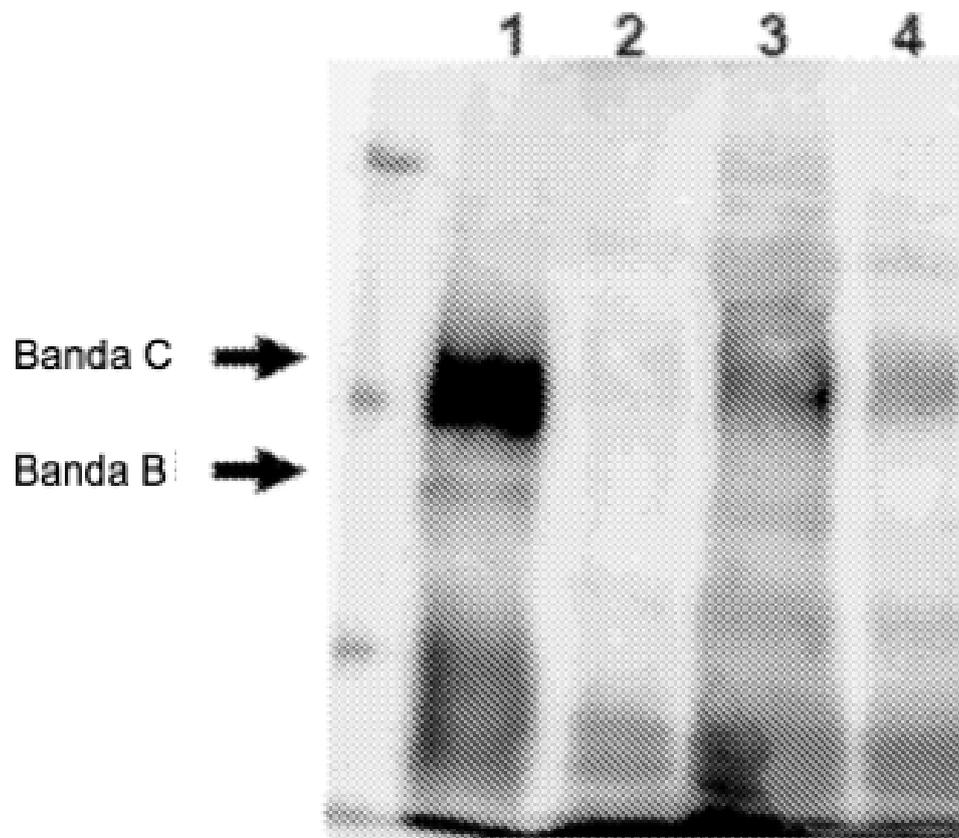


FIGURA 14

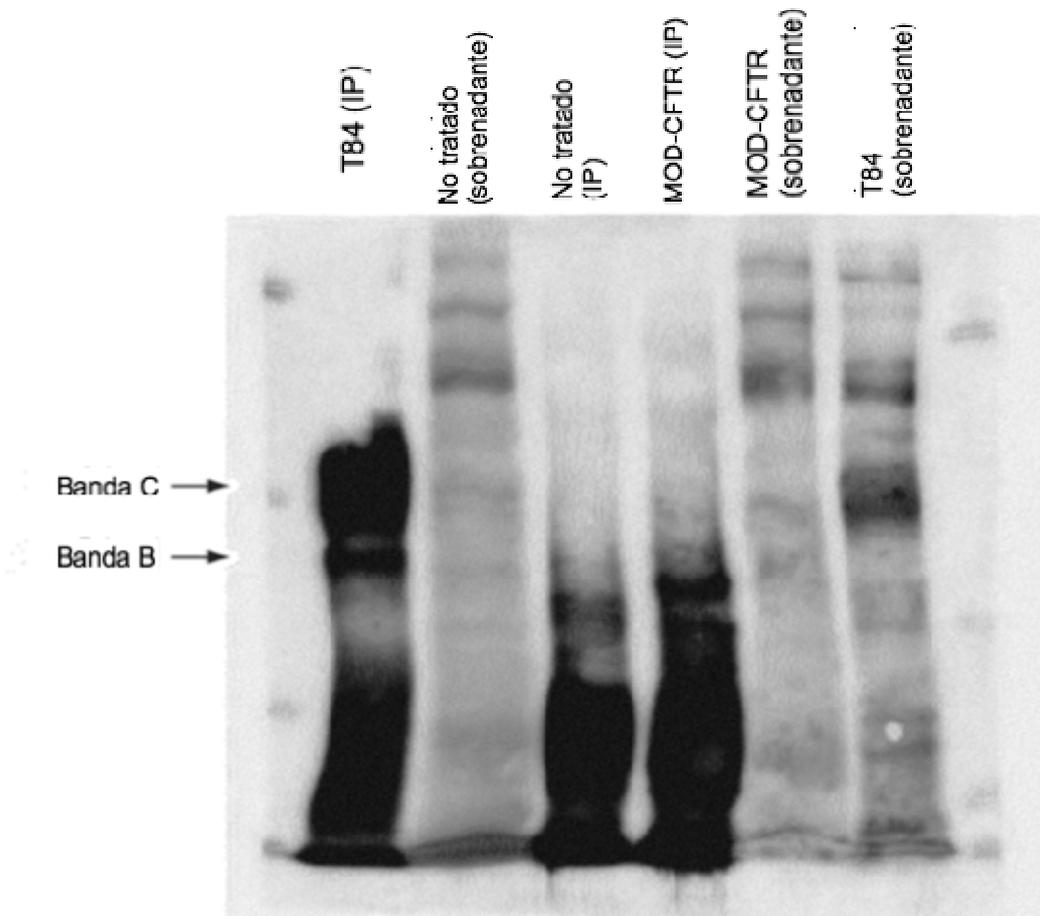


FIGURA 15

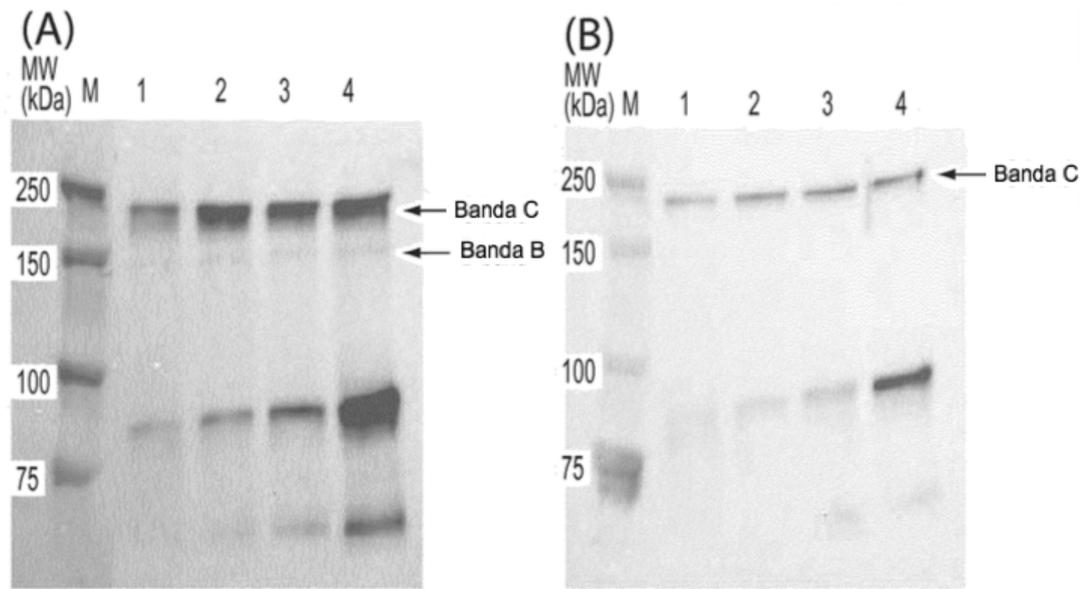


FIGURA 16 A Y B

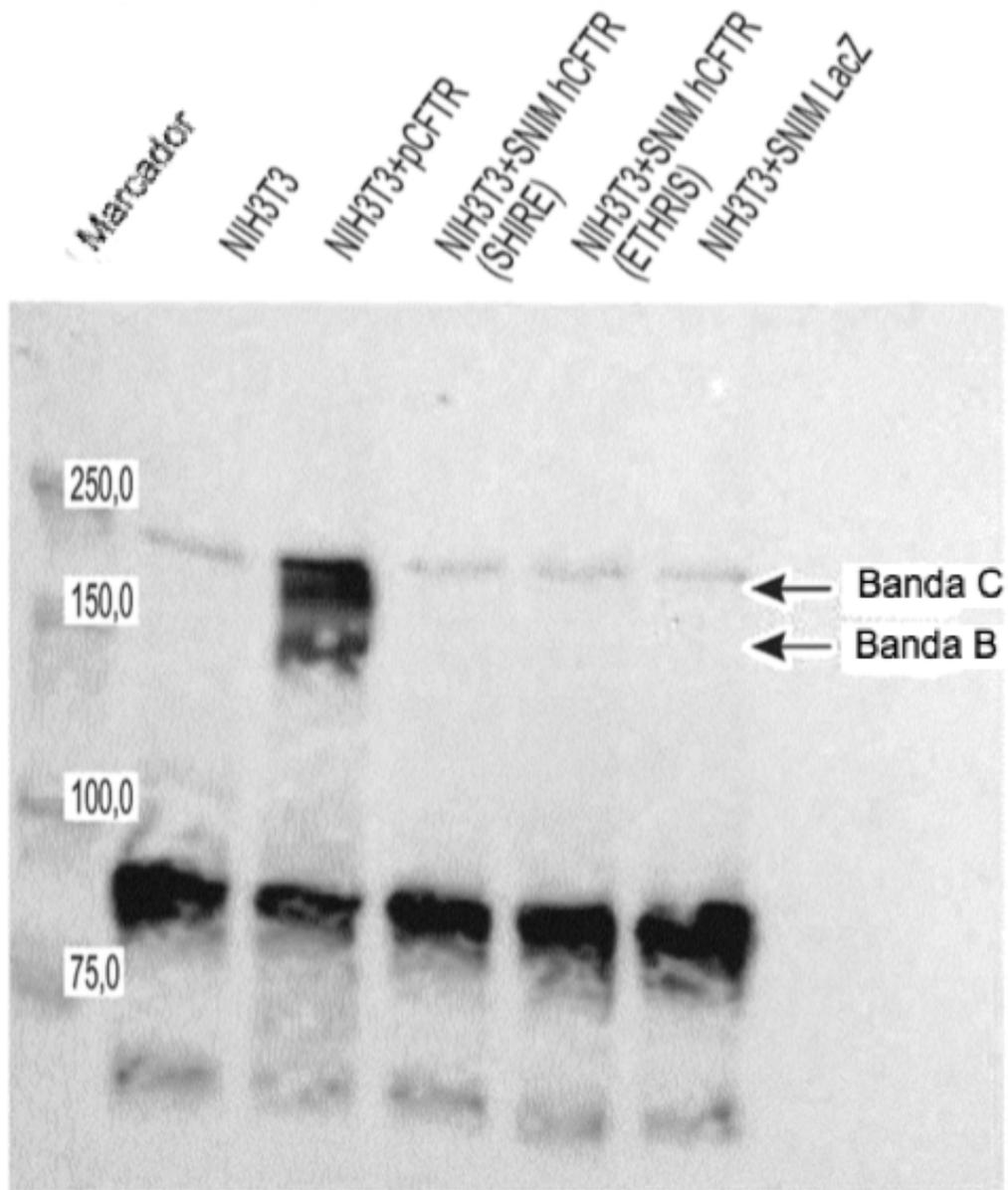


FIGURA 17

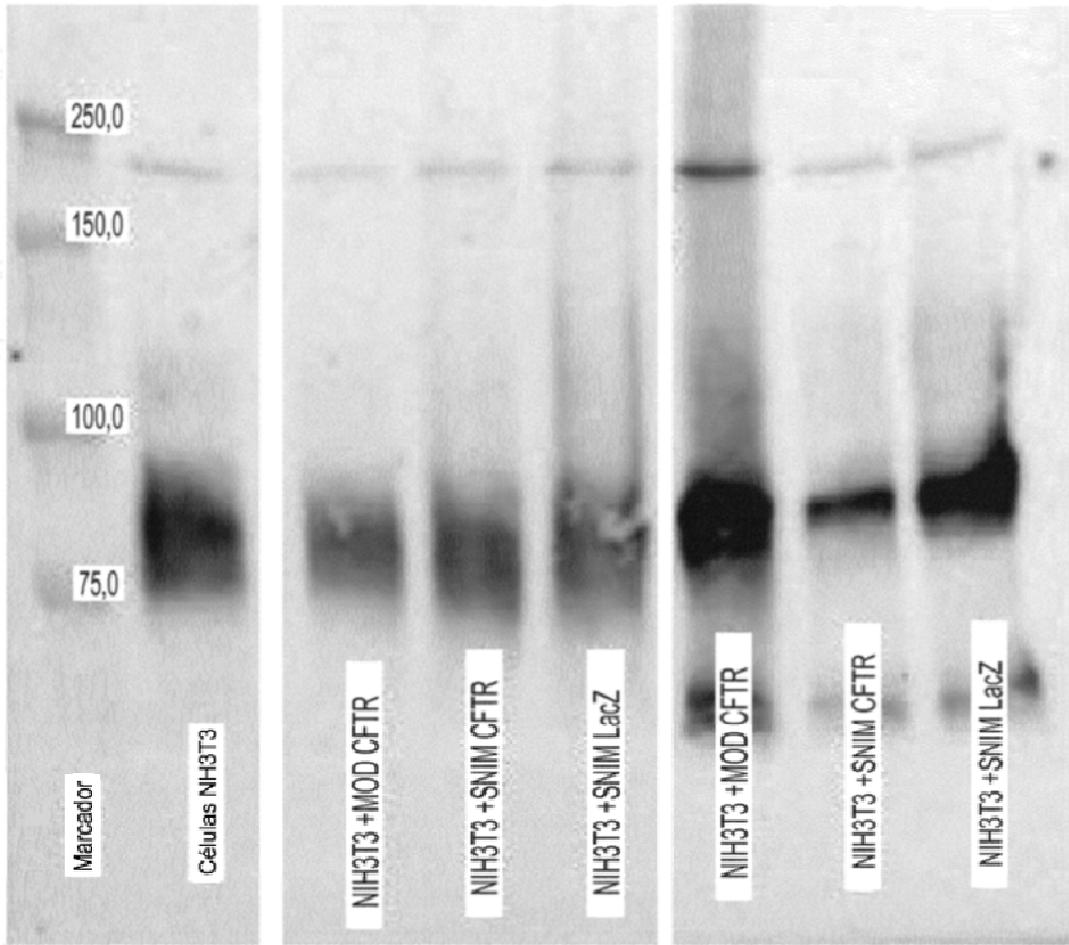


FIGURA 18

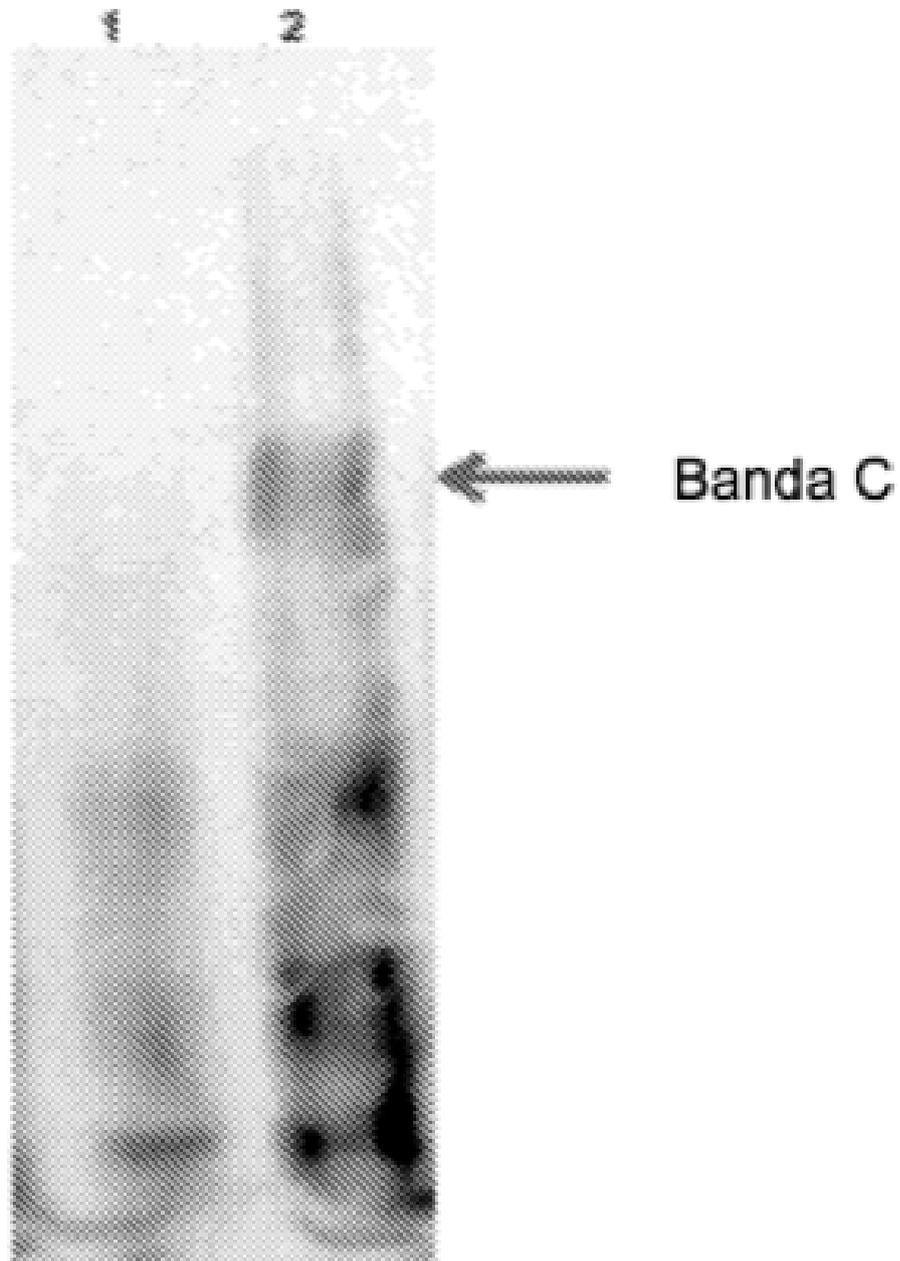


FIGURA 19

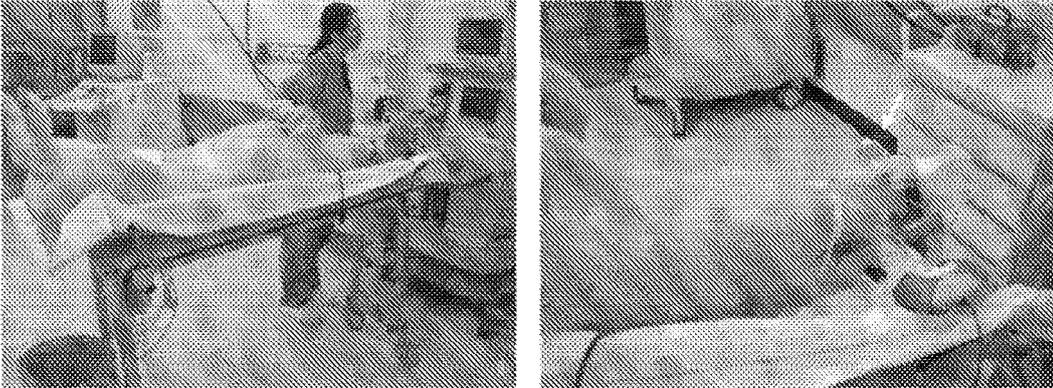
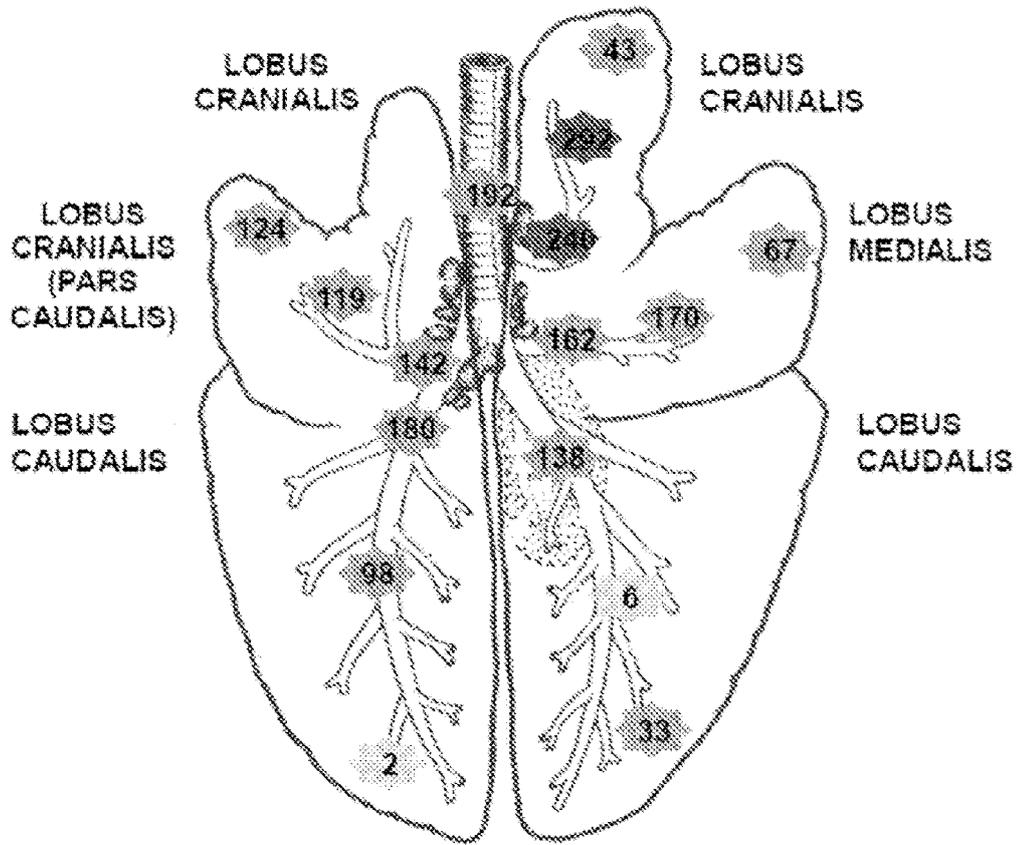


FIGURA 20



VISTA DORSAL DEL CERDO

FIGURA 21

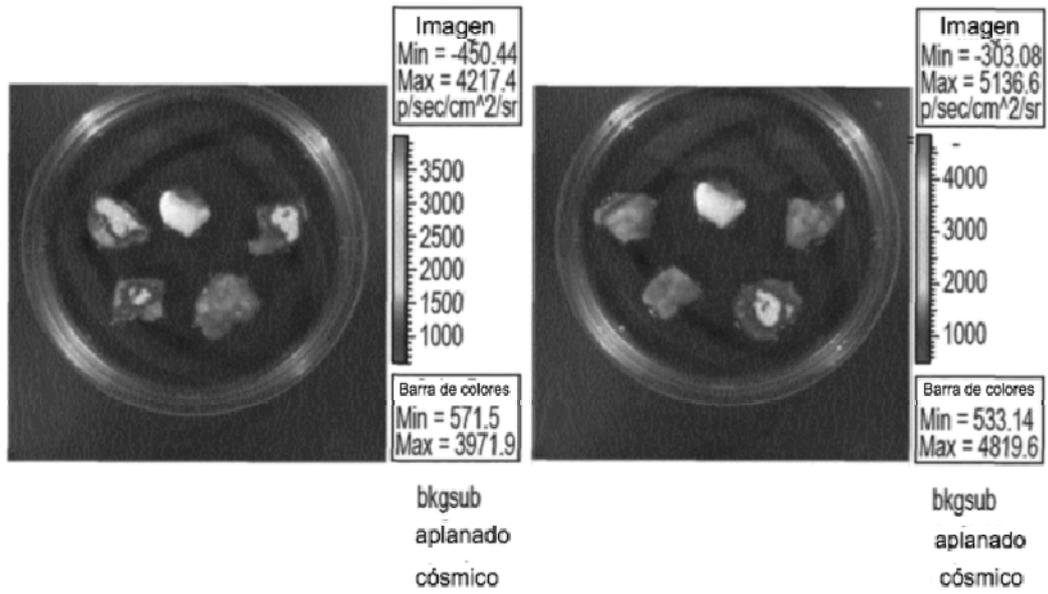


FIGURA 22

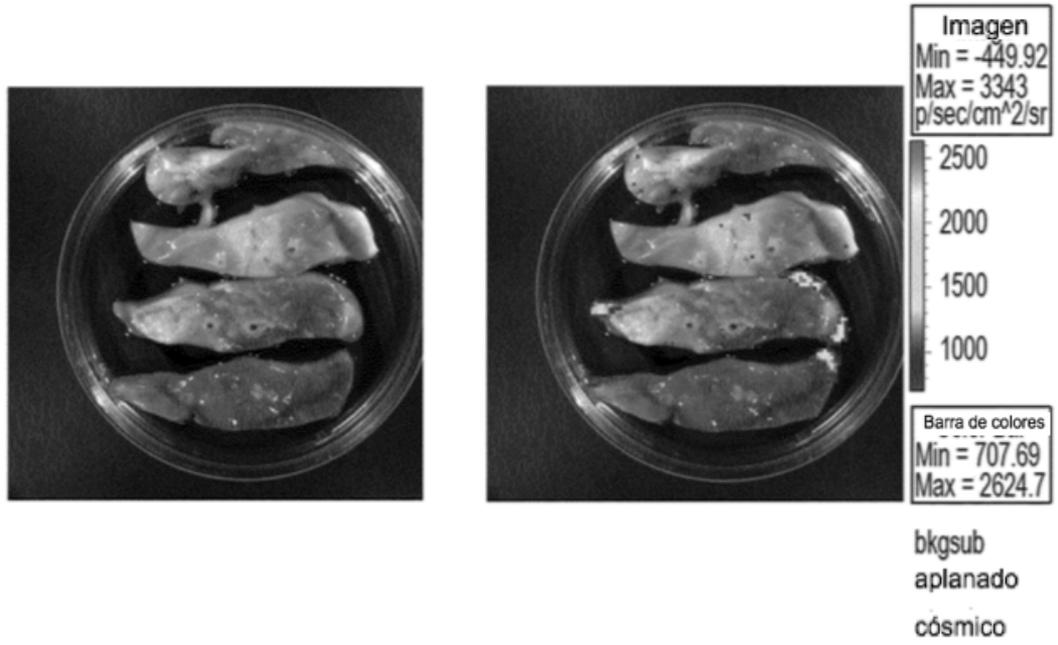


FIGURA 23

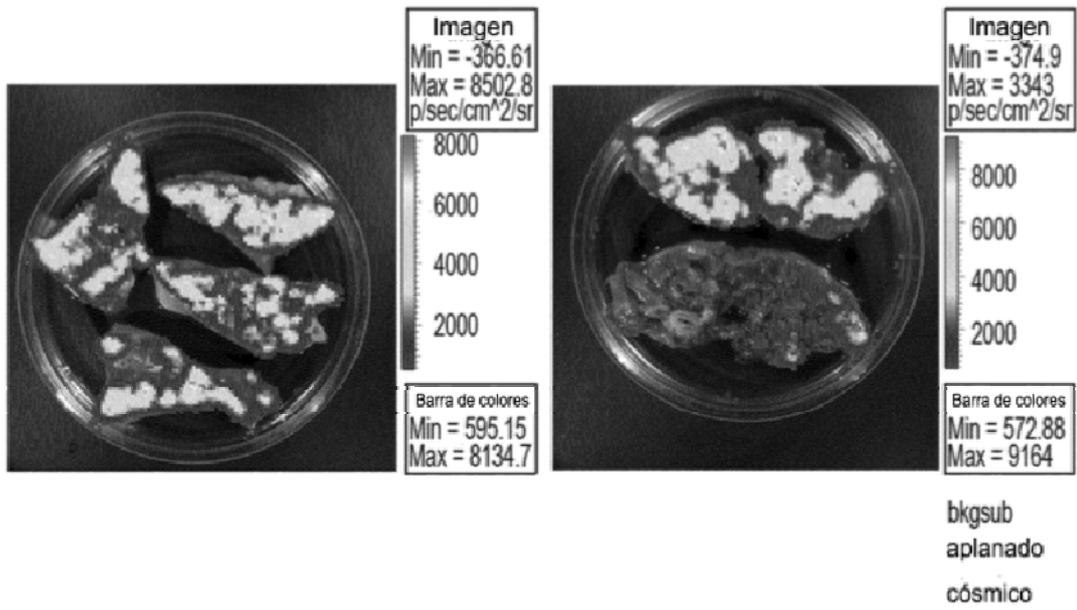


FIGURA 24

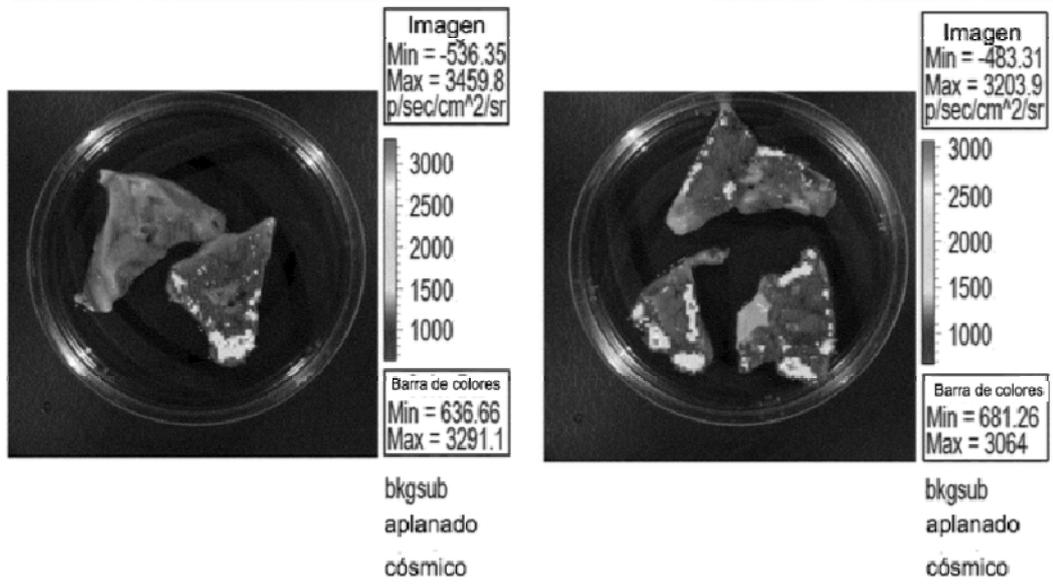


FIGURA 25

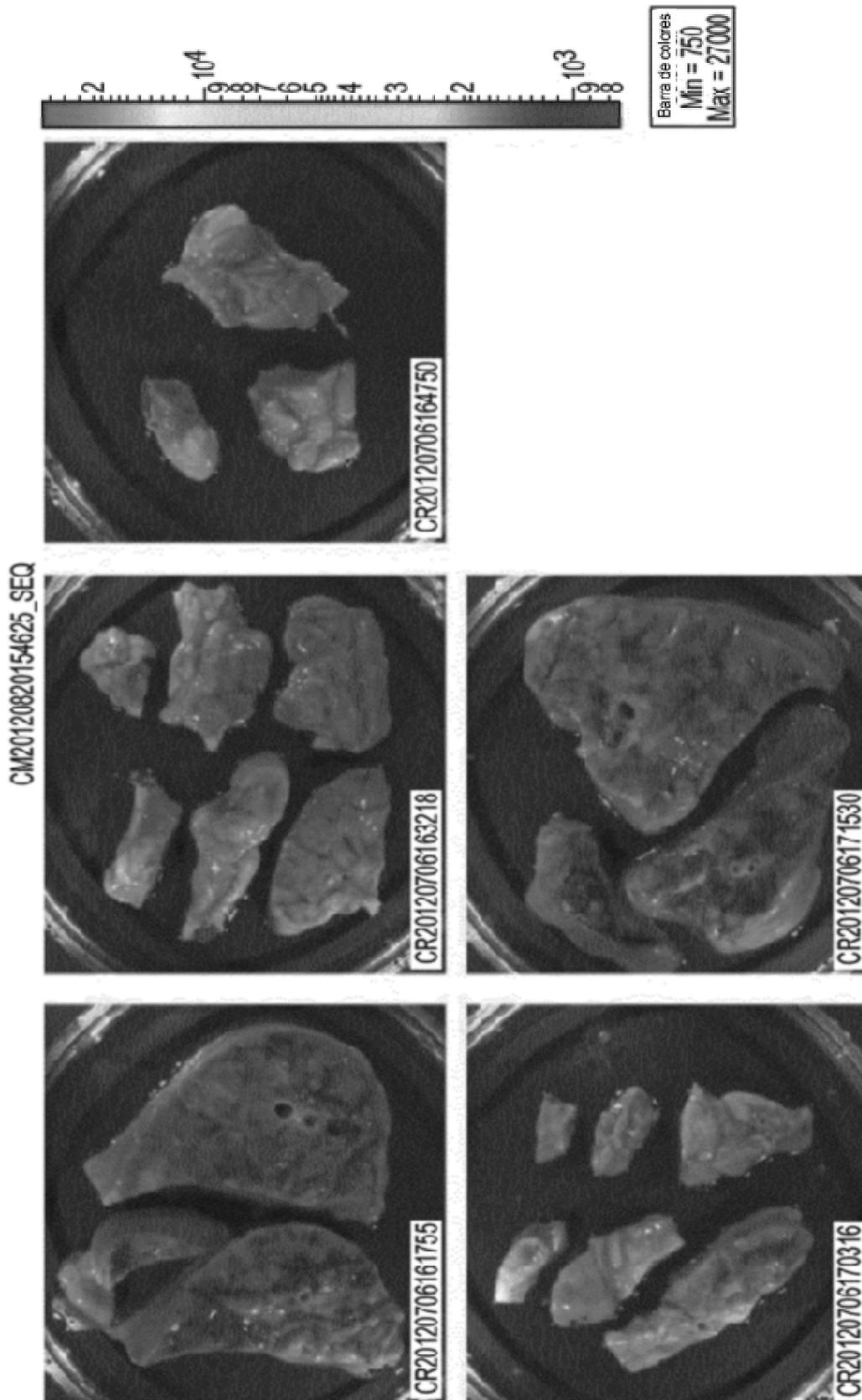


FIGURA 26

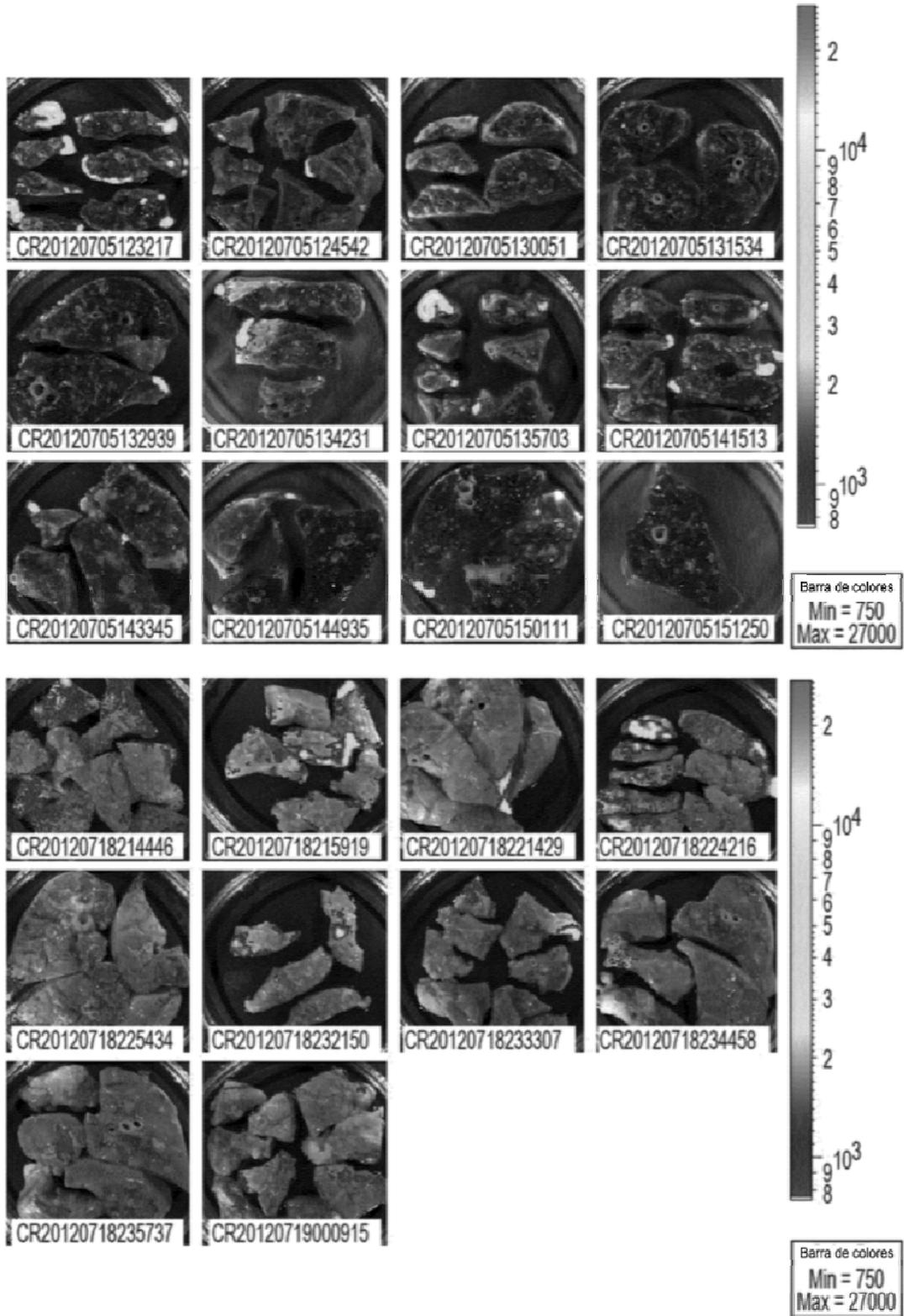


FIGURA 27

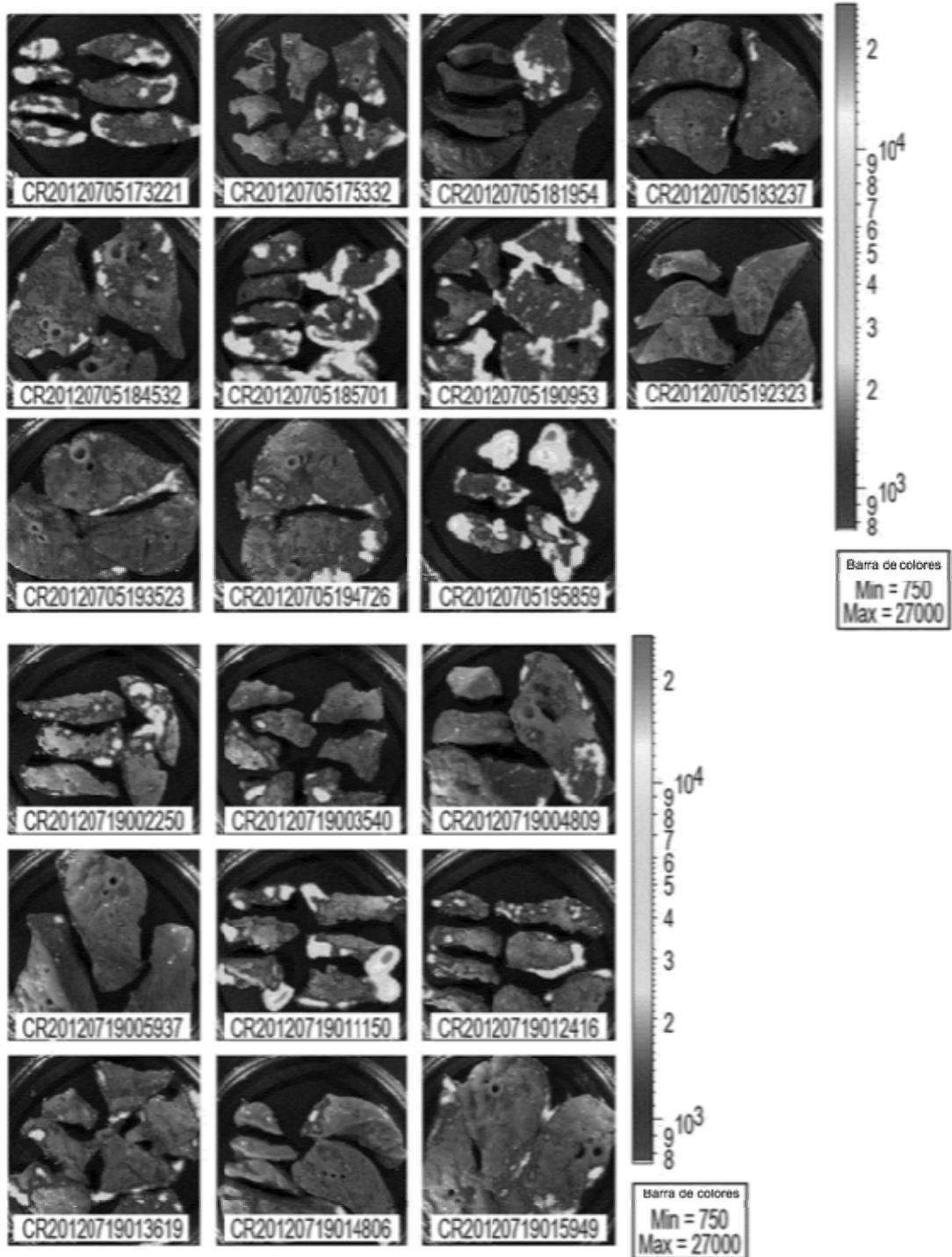


FIGURA 28

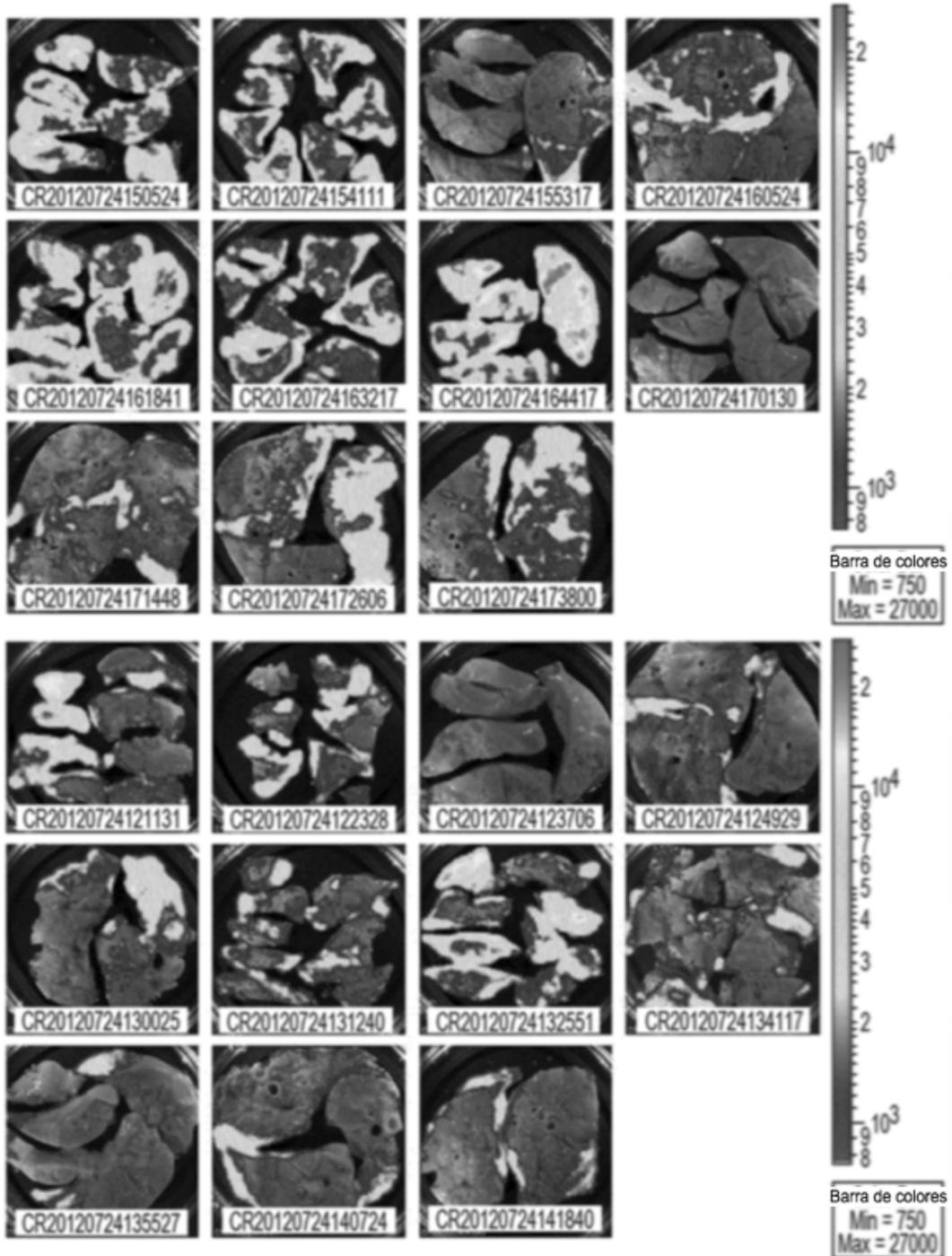


FIGURA 29

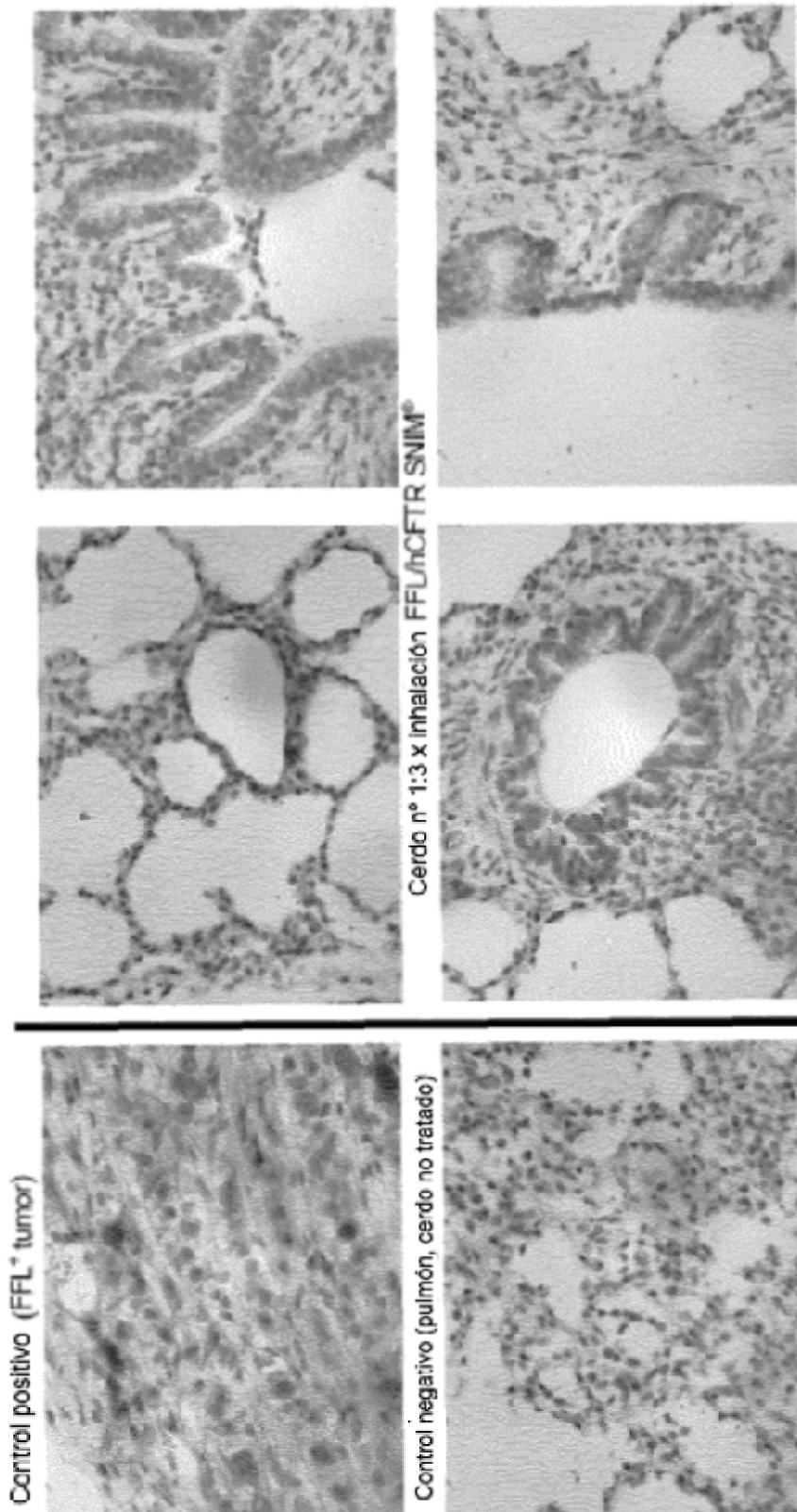


FIGURA 30

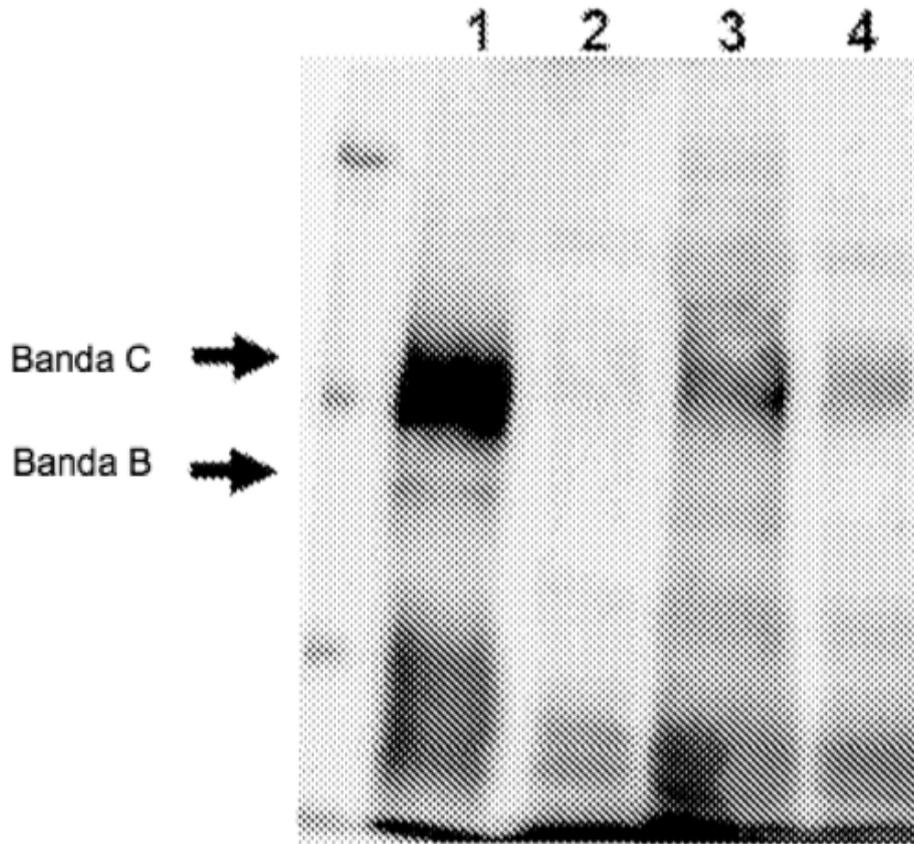


FIGURA 31

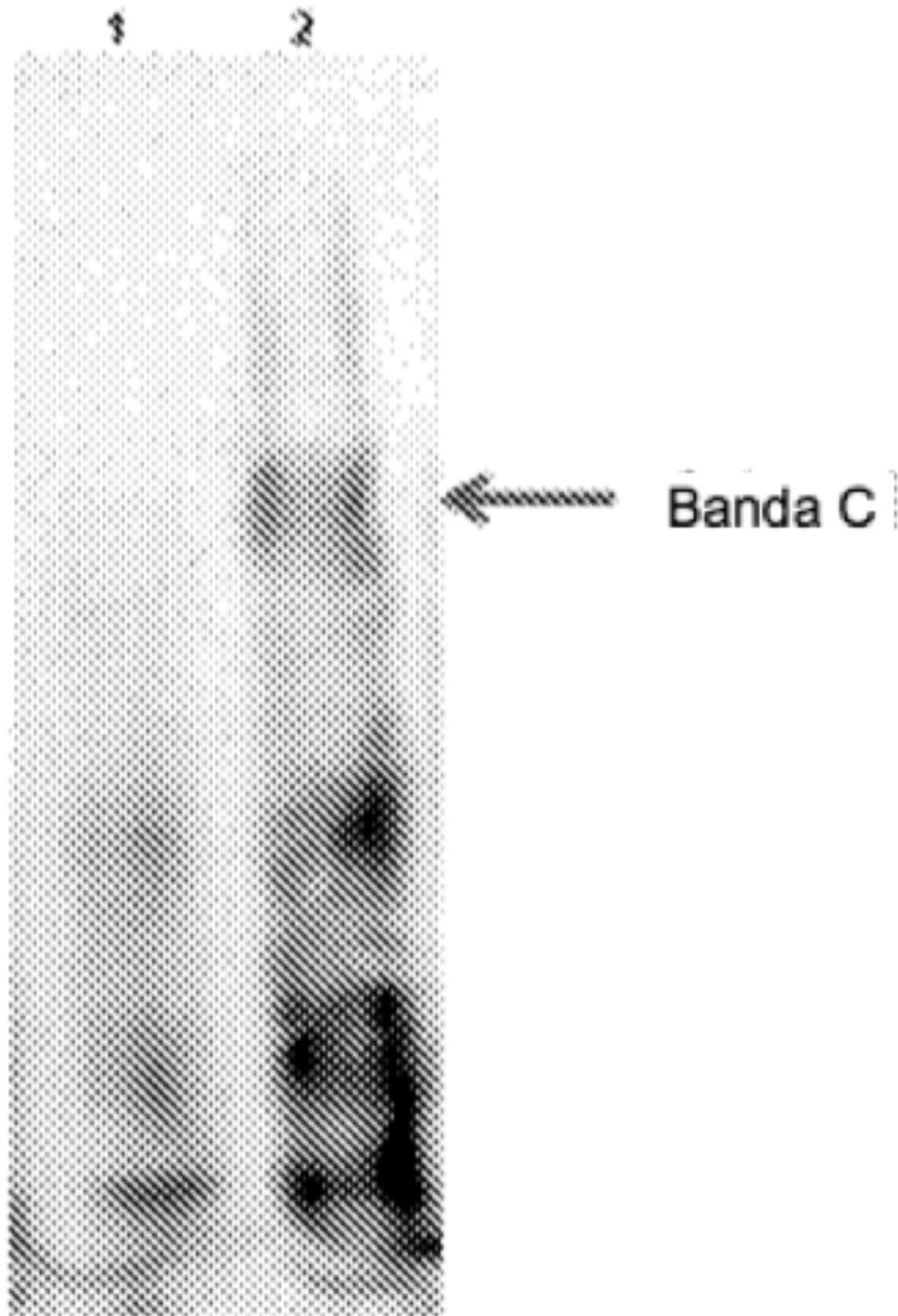


FIGURA 32

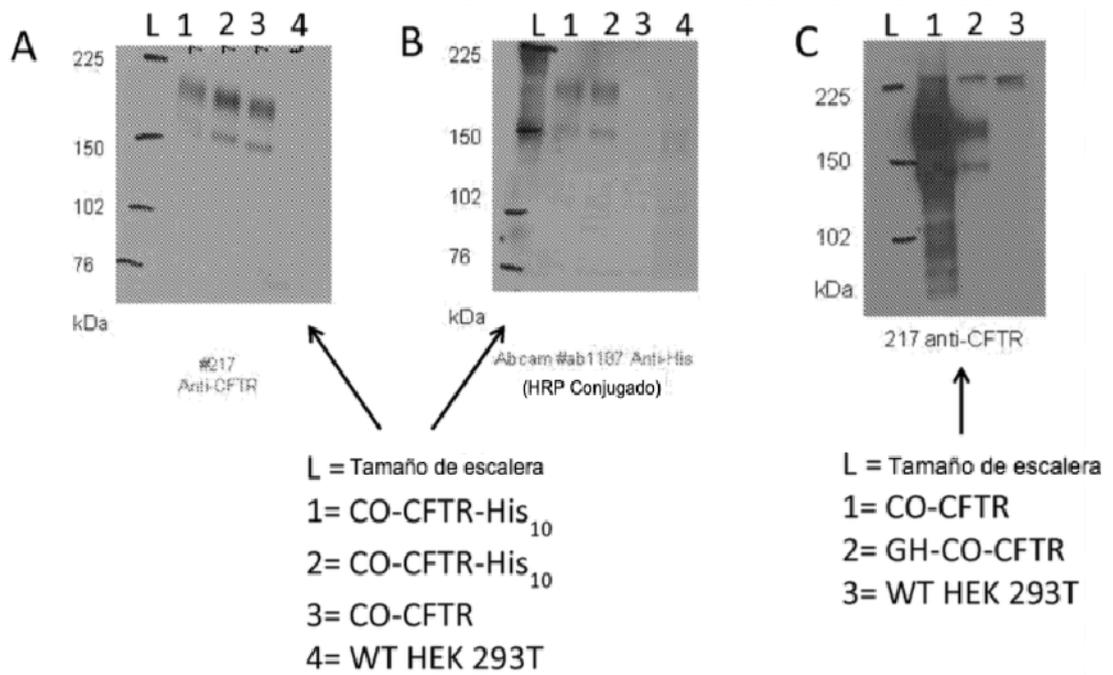


FIGURA 33

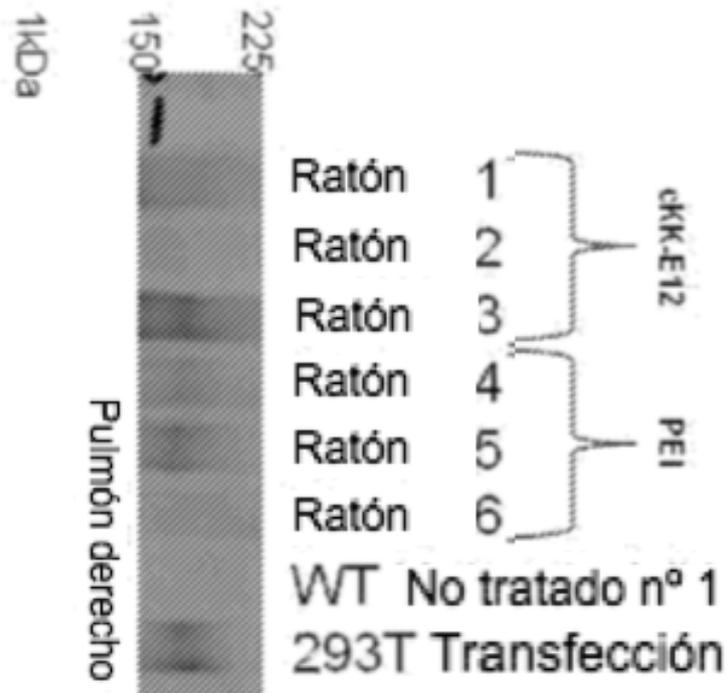
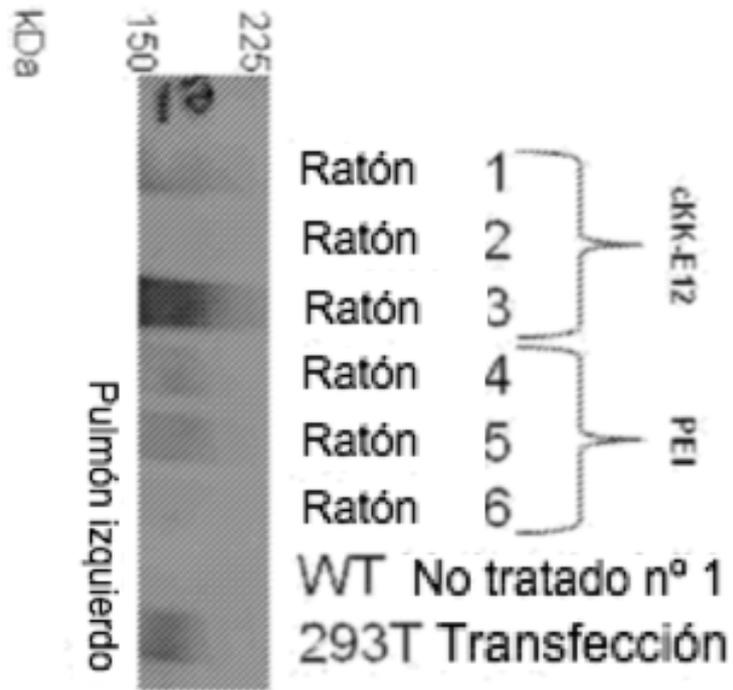


FIGURA 34

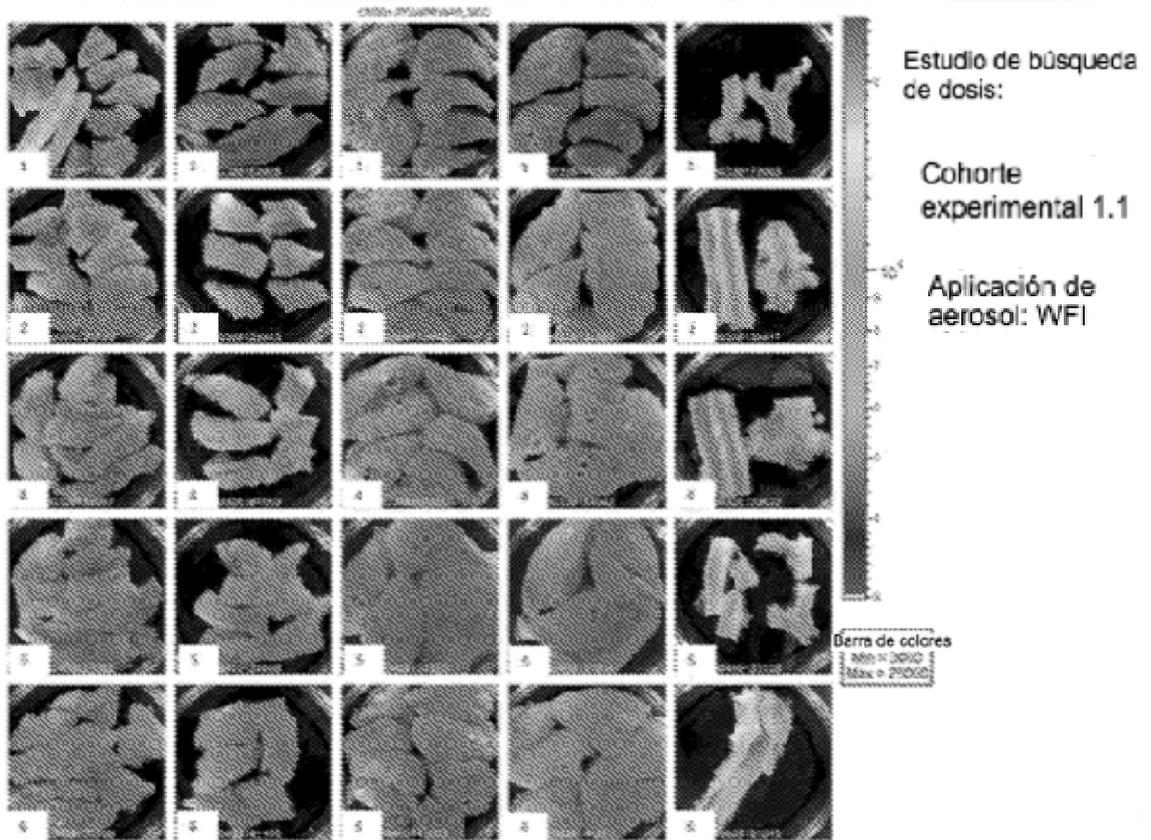


FIGURA 35

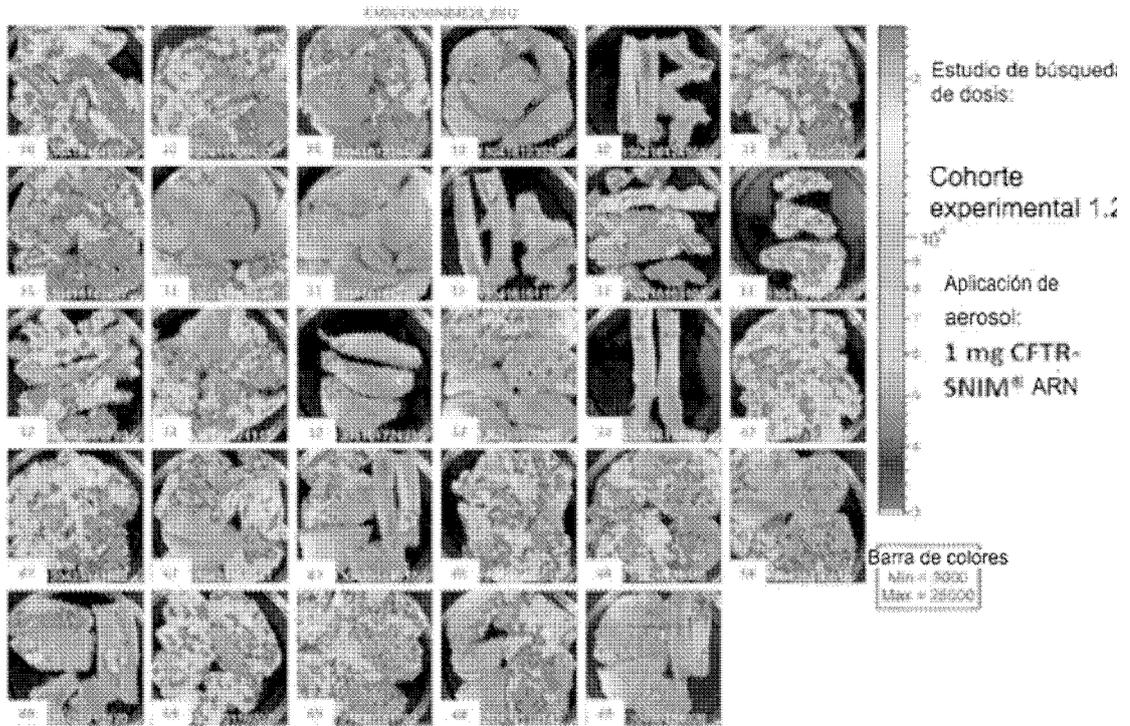


FIGURA 36

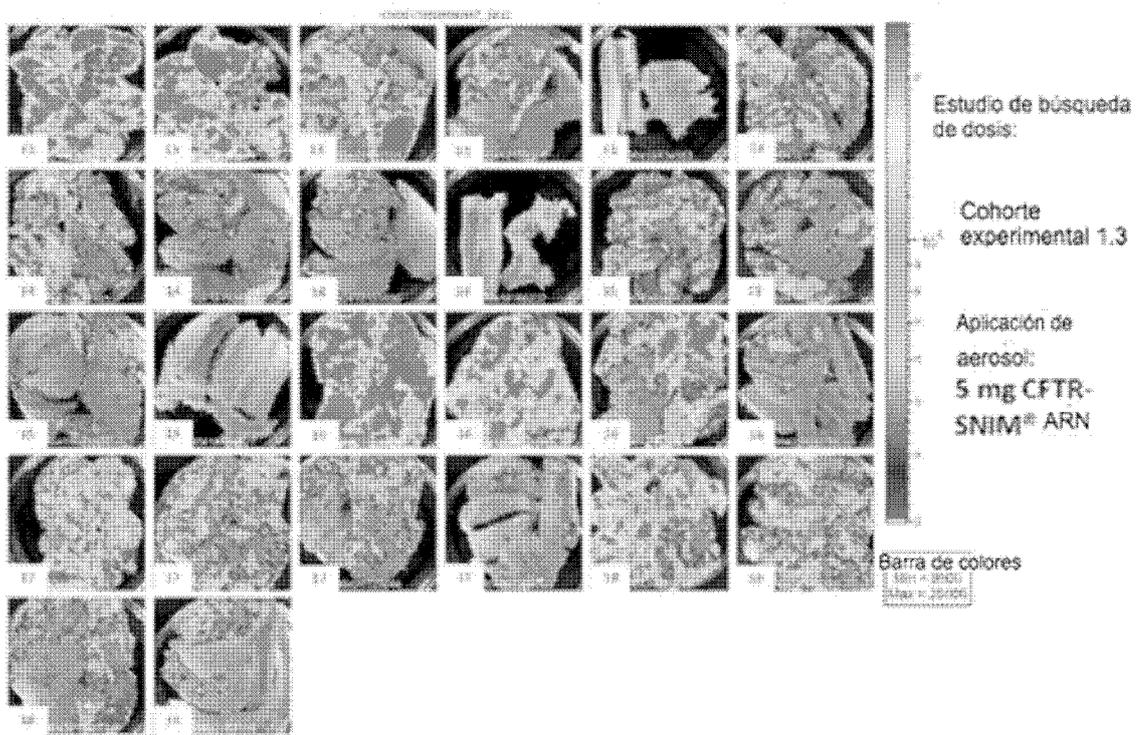


FIGURA 37

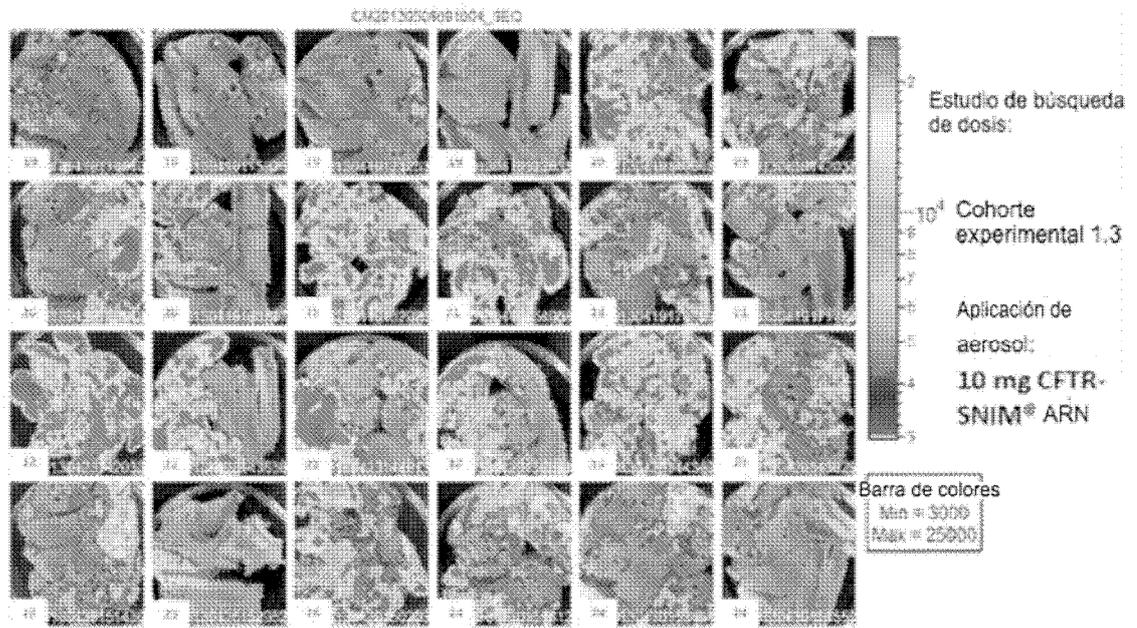


FIGURA 38

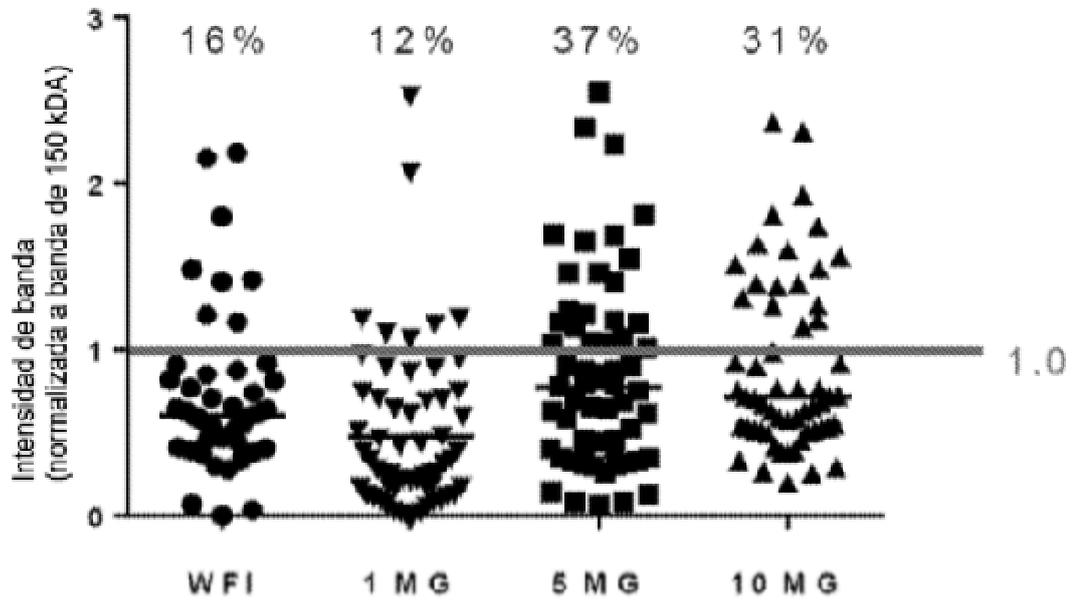


FIGURA 39

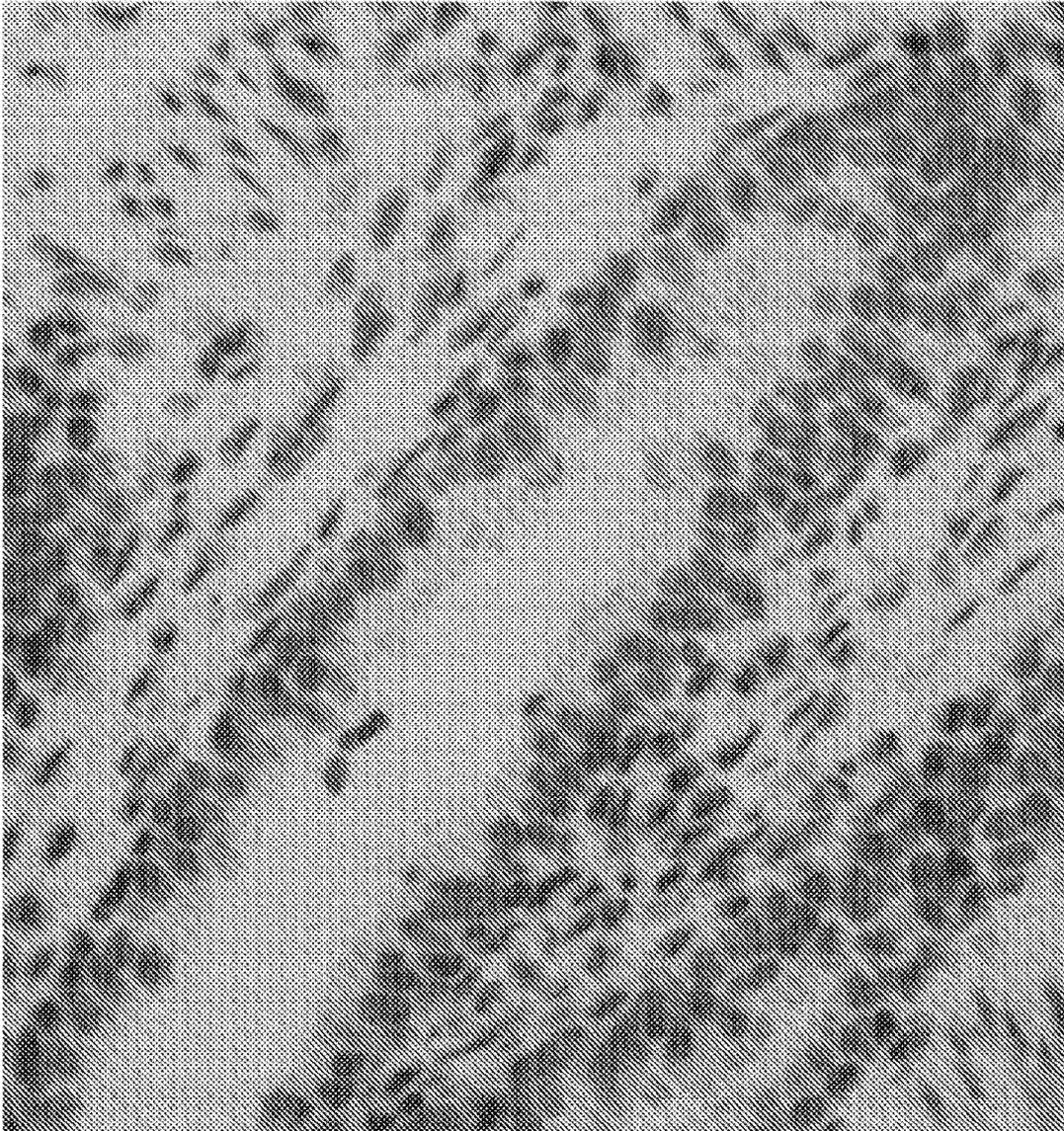


FIGURA 40

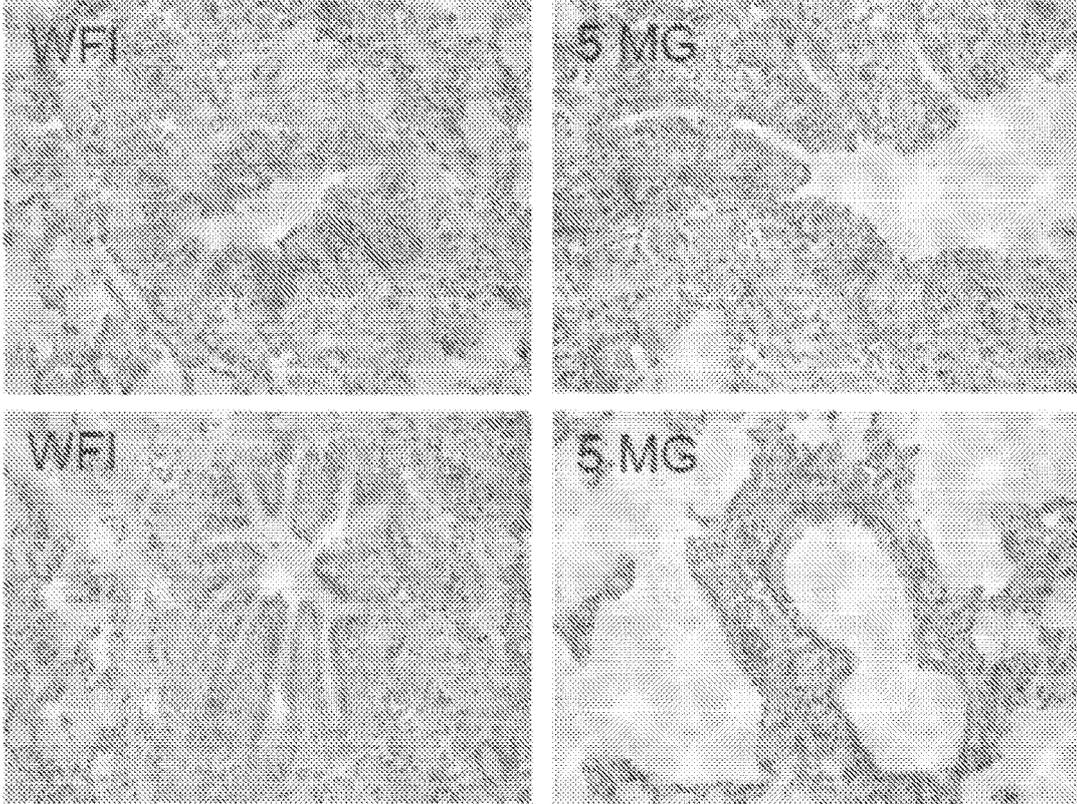


FIGURA 41

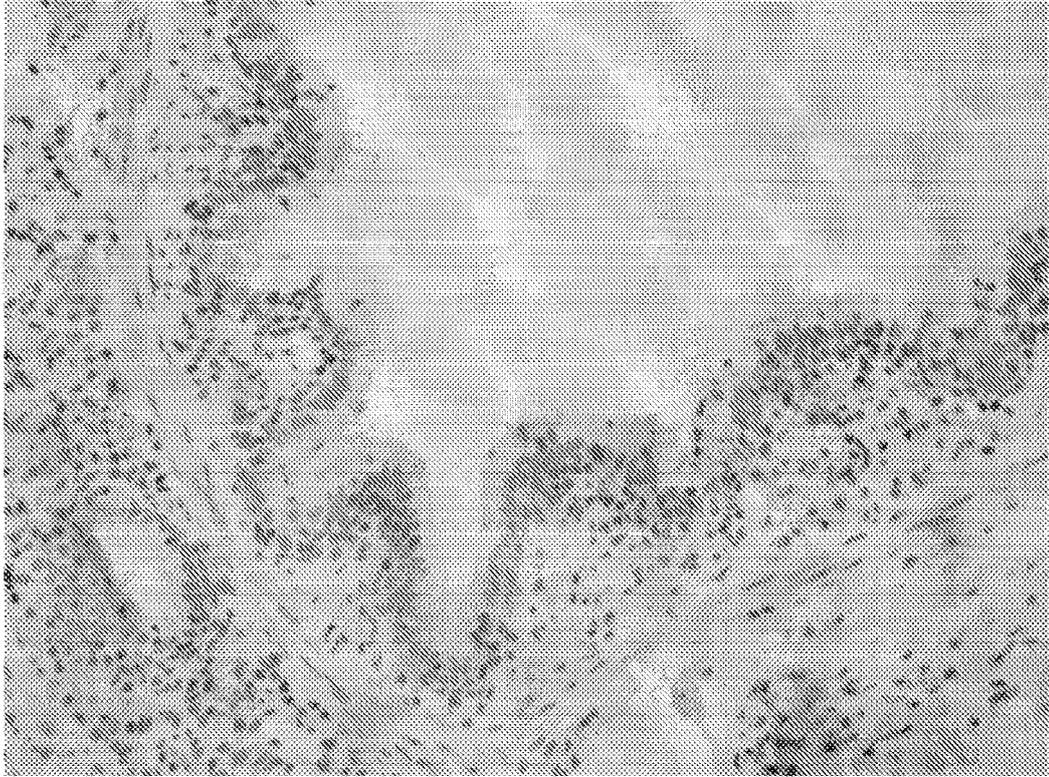


FIGURA 42

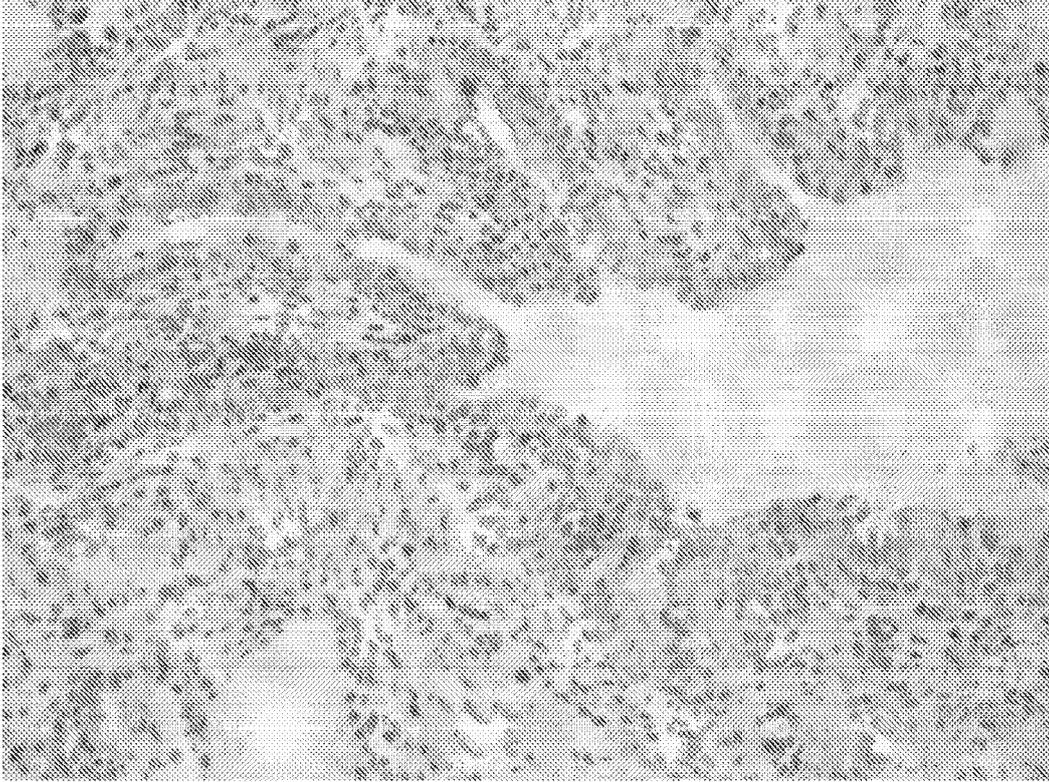


FIGURA 43

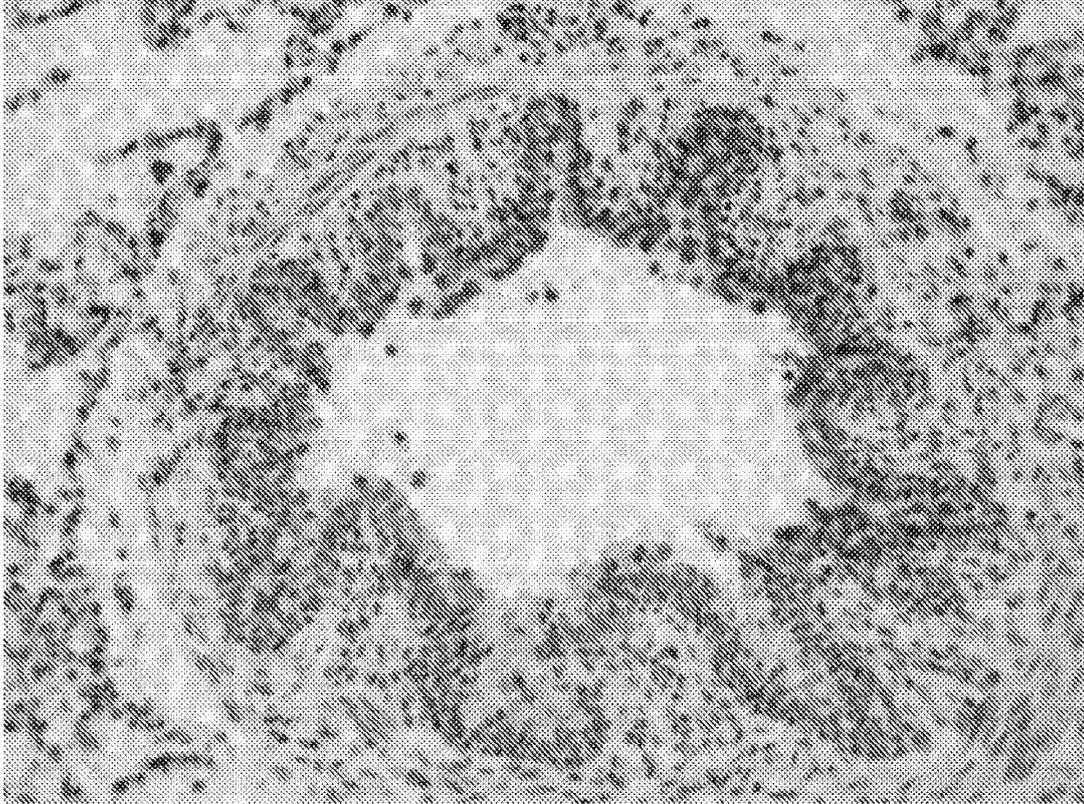


FIGURA 44

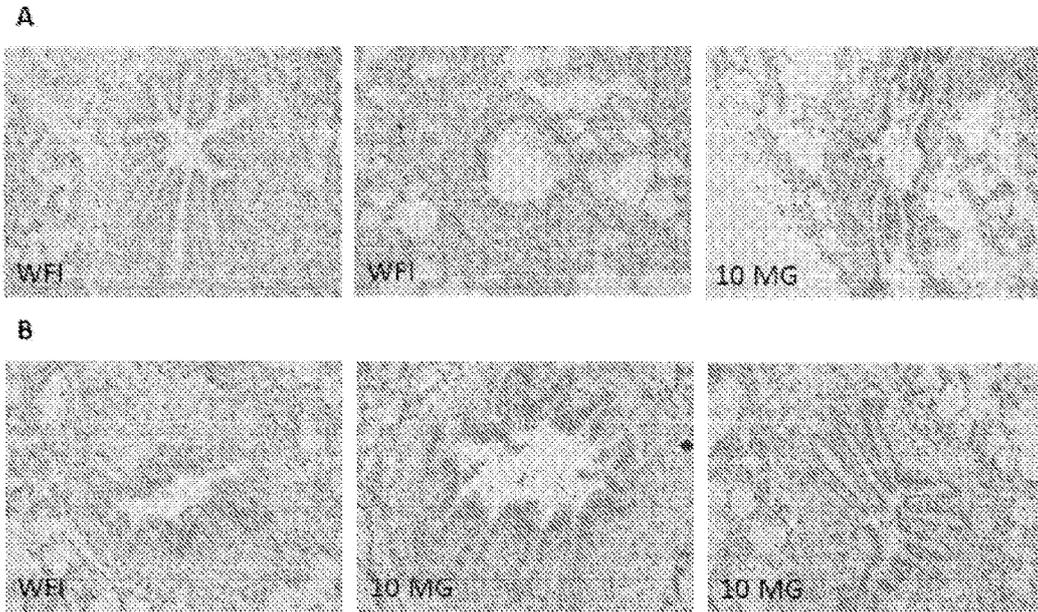


FIGURA 45

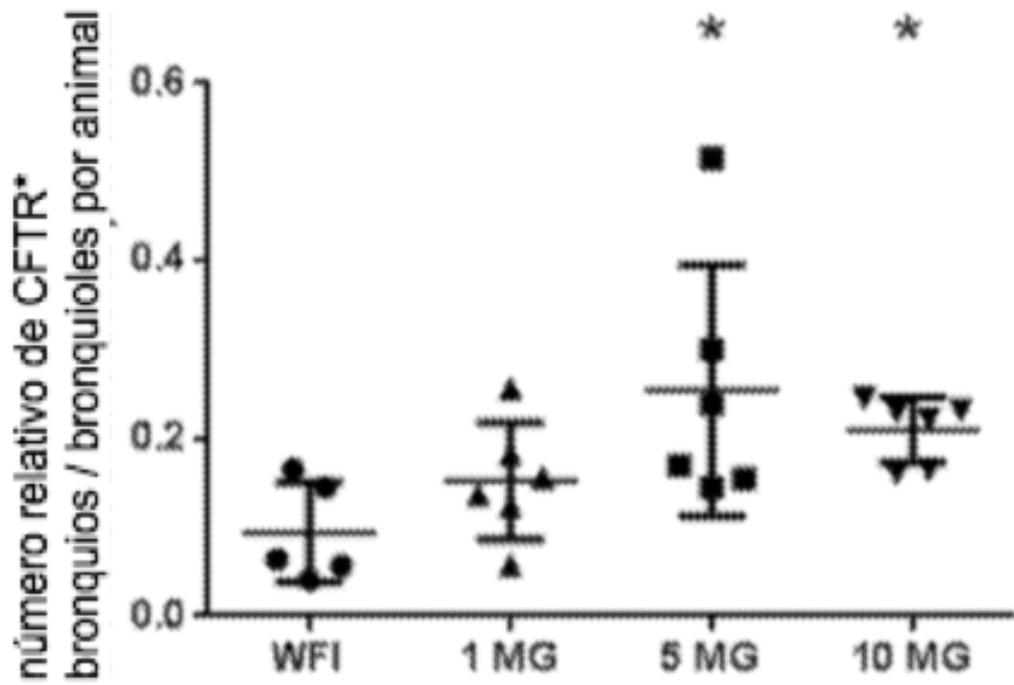
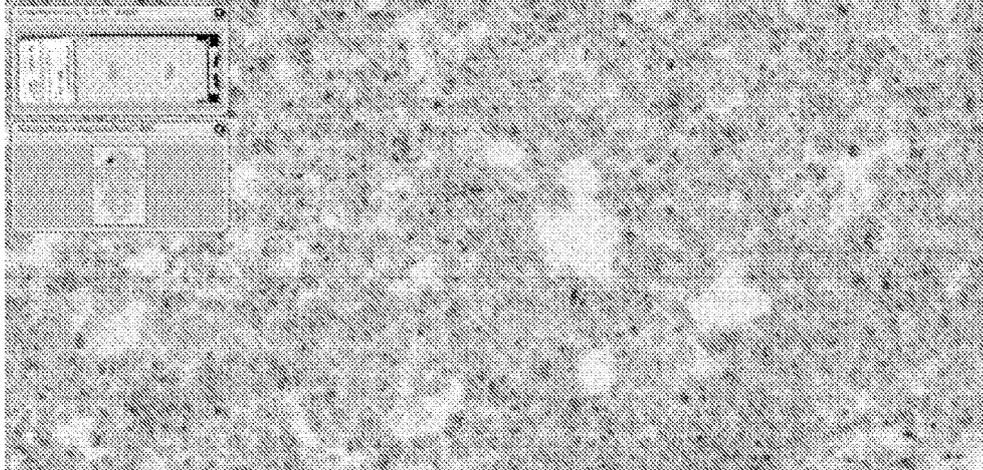


FIGURA 46

A



B



FIGURA 47 A Y B

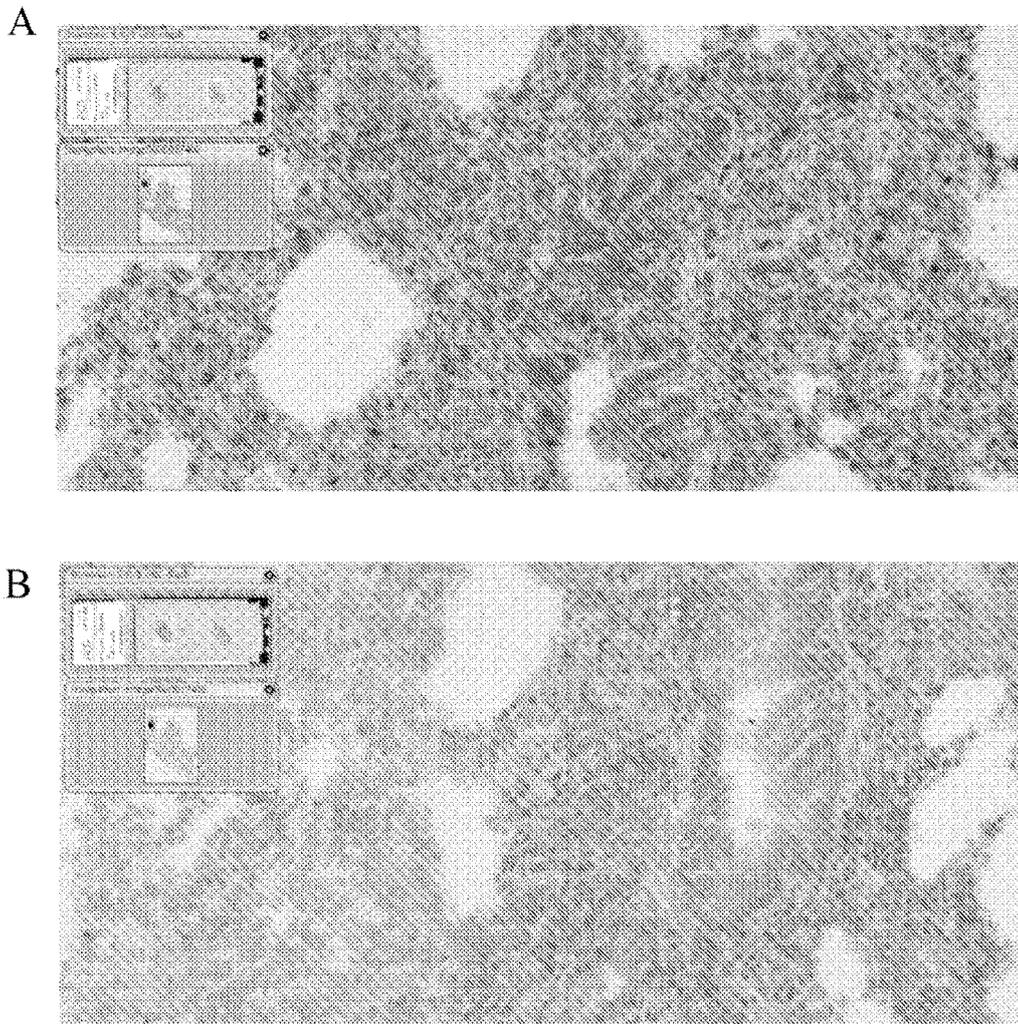


FIGURA 48 A Y B

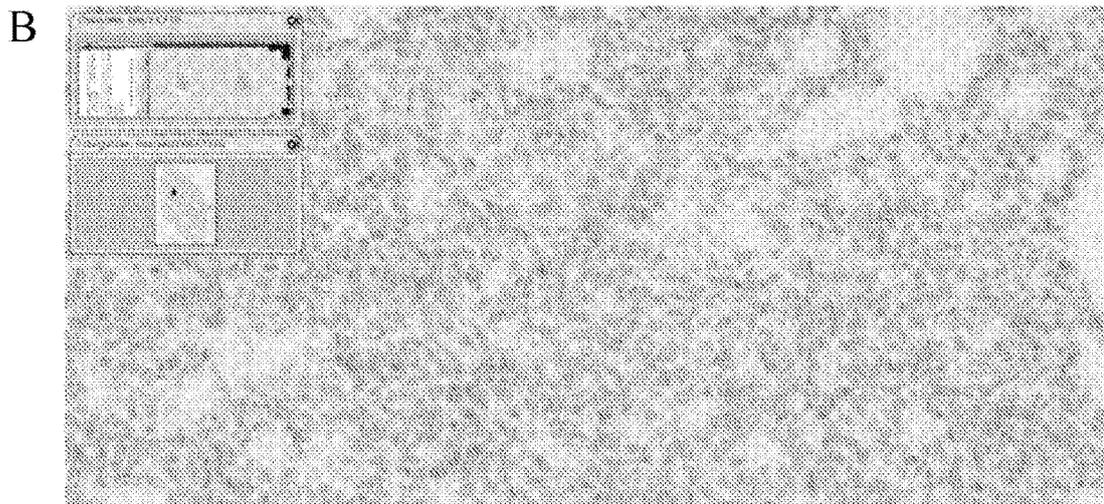
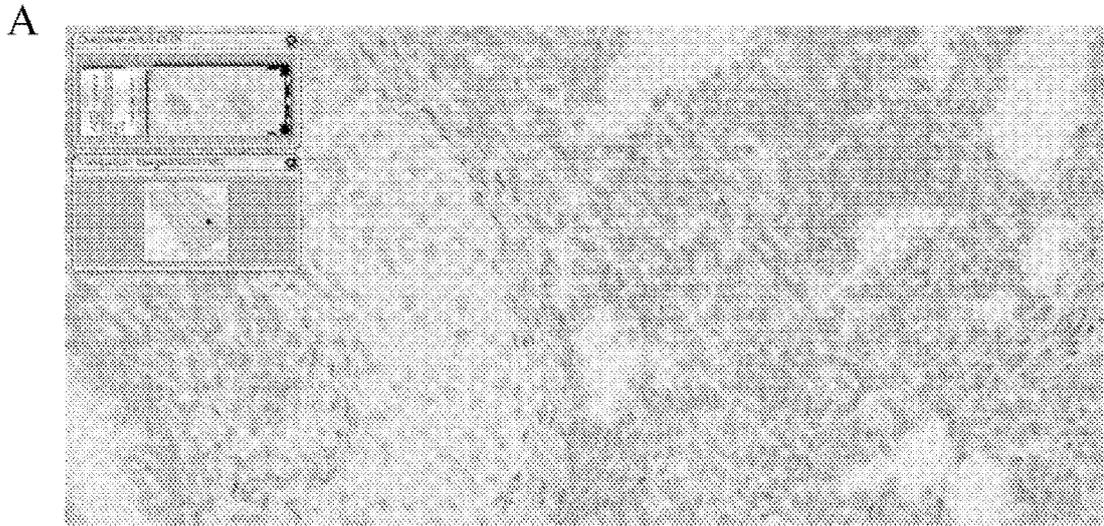


FIGURA 49 A Y B

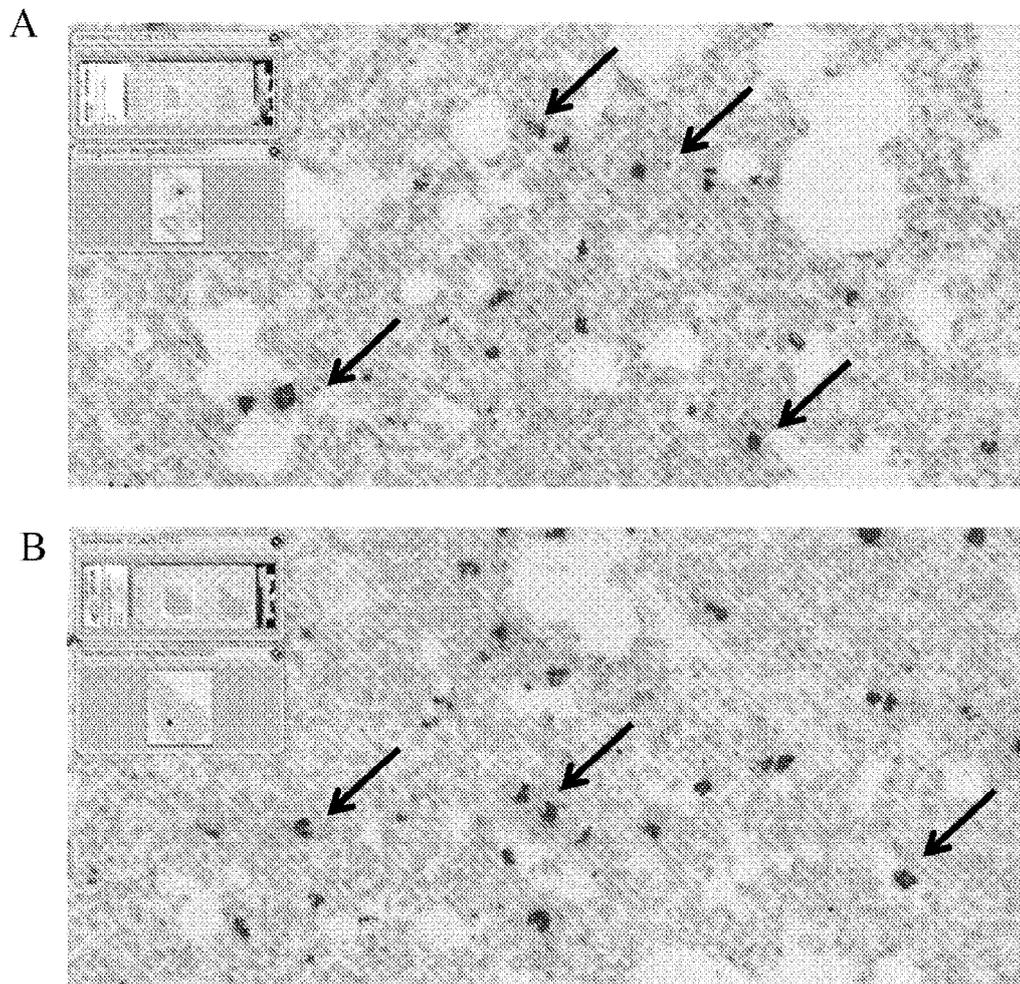


FIGURA 50 A Y B

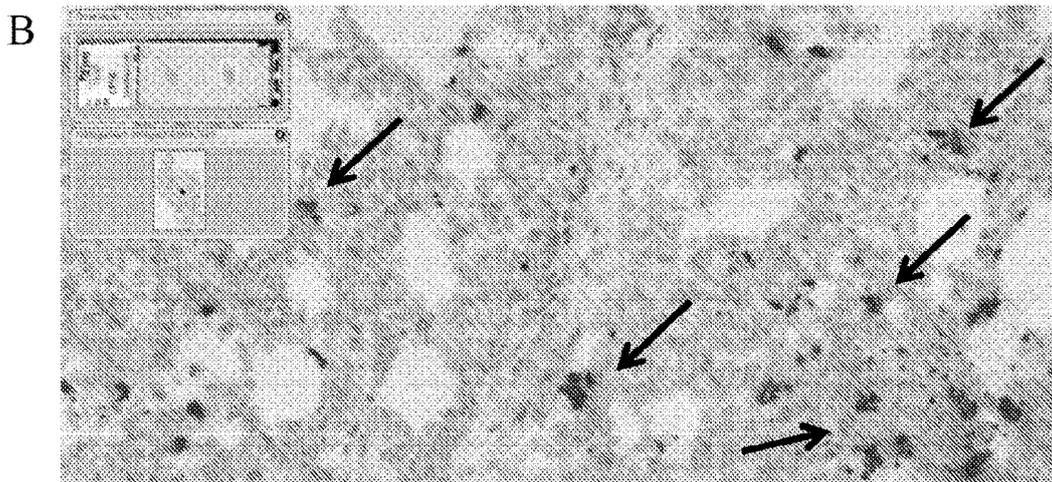
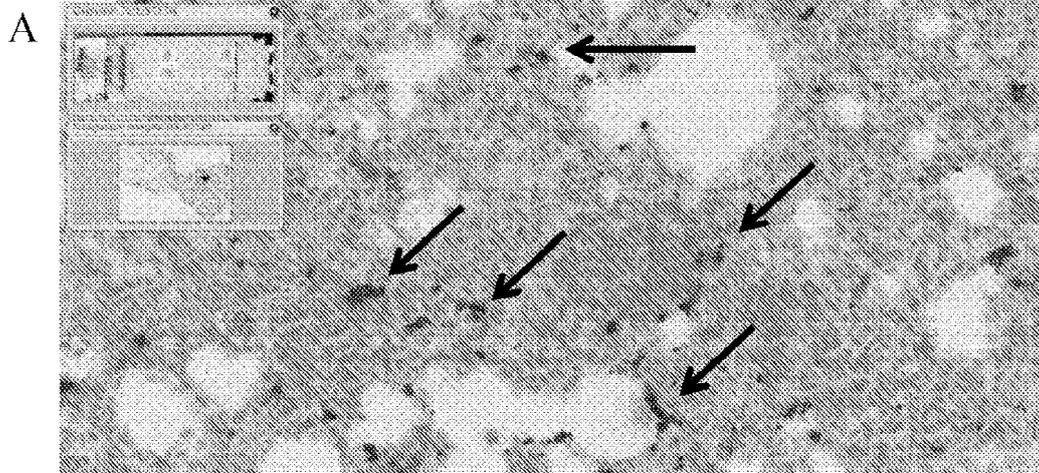


FIGURA 51 A Y B

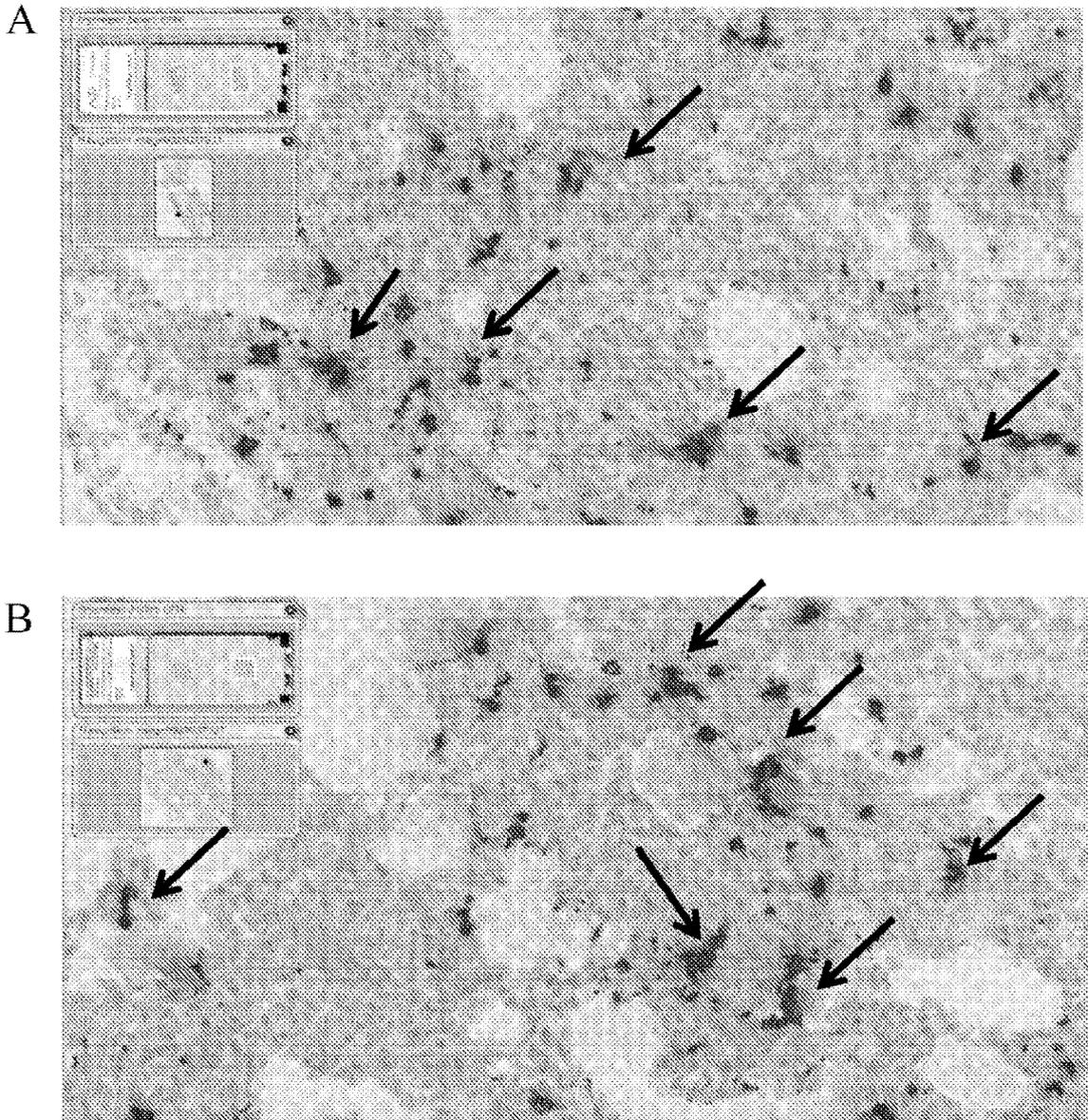


FIGURA 52 A Y B

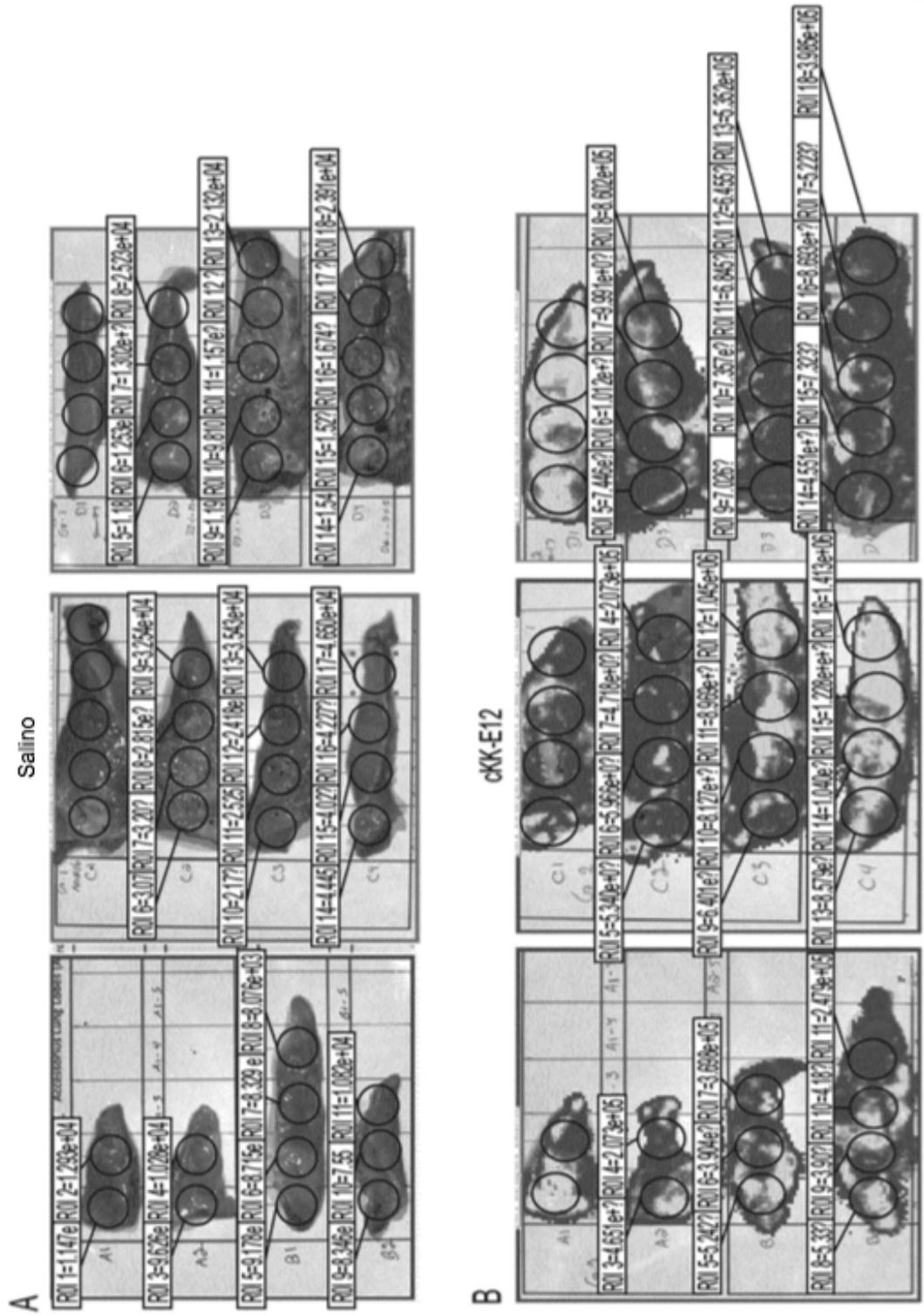


FIGURA 53 A Y B

Células HEK transfectadas utilizando complejos dados a Cerdos 10, 11 y 12 (dosis de 1mg).

HEK-UT - células HEK transfectadas

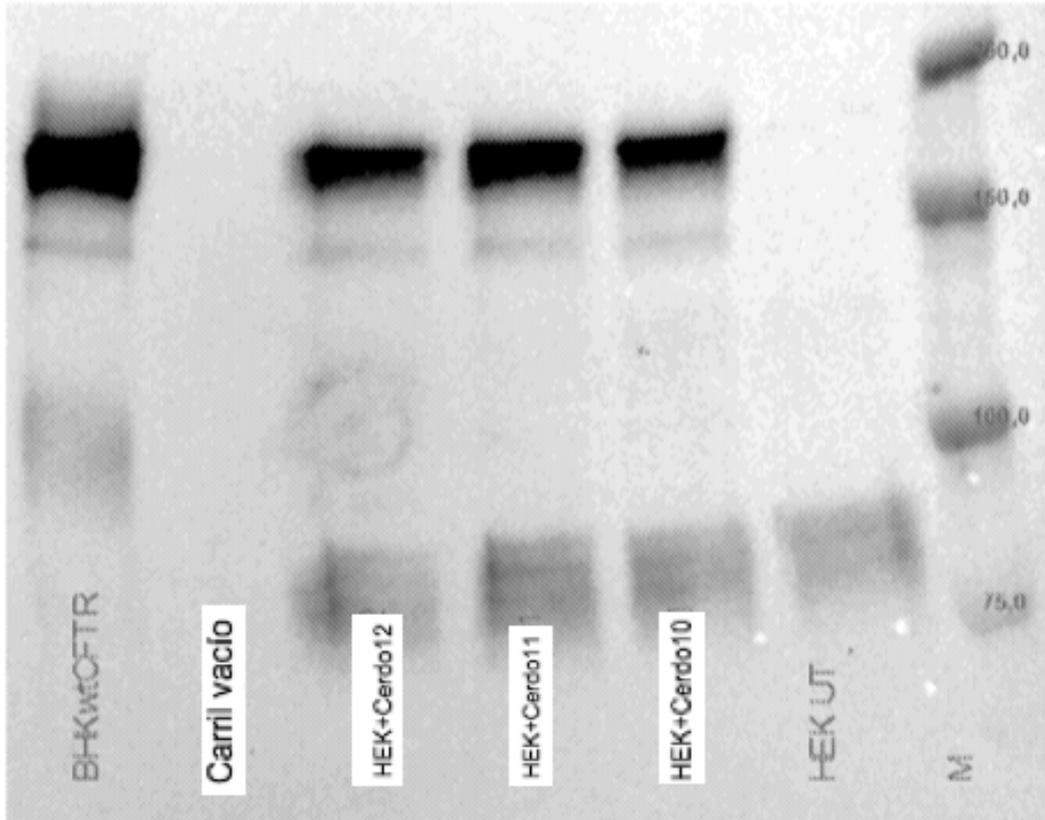


FIGURA 54

Células HEK transfectadas utilizando complejos dados a Cerdos 13, 14 y 15 (Dosis de 5mg)

Células HEK transfectadas utilizando complejos dados a Cerdos 19, 20 y 21 (Dosis de 10mg)

HEK-UT - Células HEK no transfectadas utilizados para complejos de Cerdos 19-21

HEK-UT - Células HEK no transfectadas utilizados para complejos de Cerdos 13-15

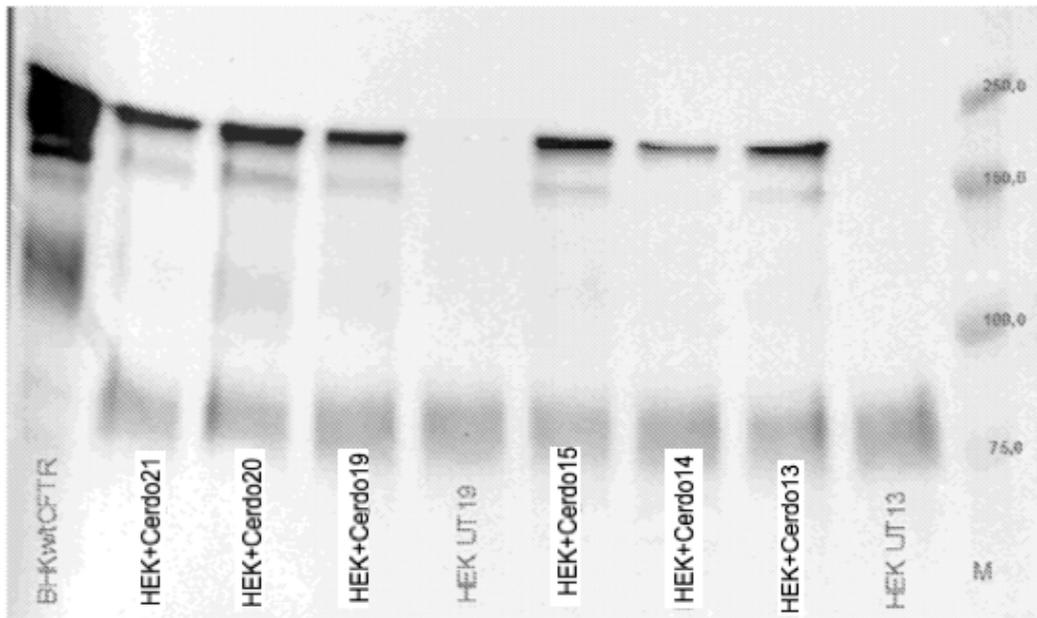


FIGURA 55

Células HEK transfectadas utilizando complejos dados a Cerdos 16 (Dosis de 5mg), 22 (Dosis de 10mg) y 67 (Dosis de 1mg)

HEK-UT 16- Células HEK no transfectadas utilizando complejos de Cerdos 16, 22 y 67

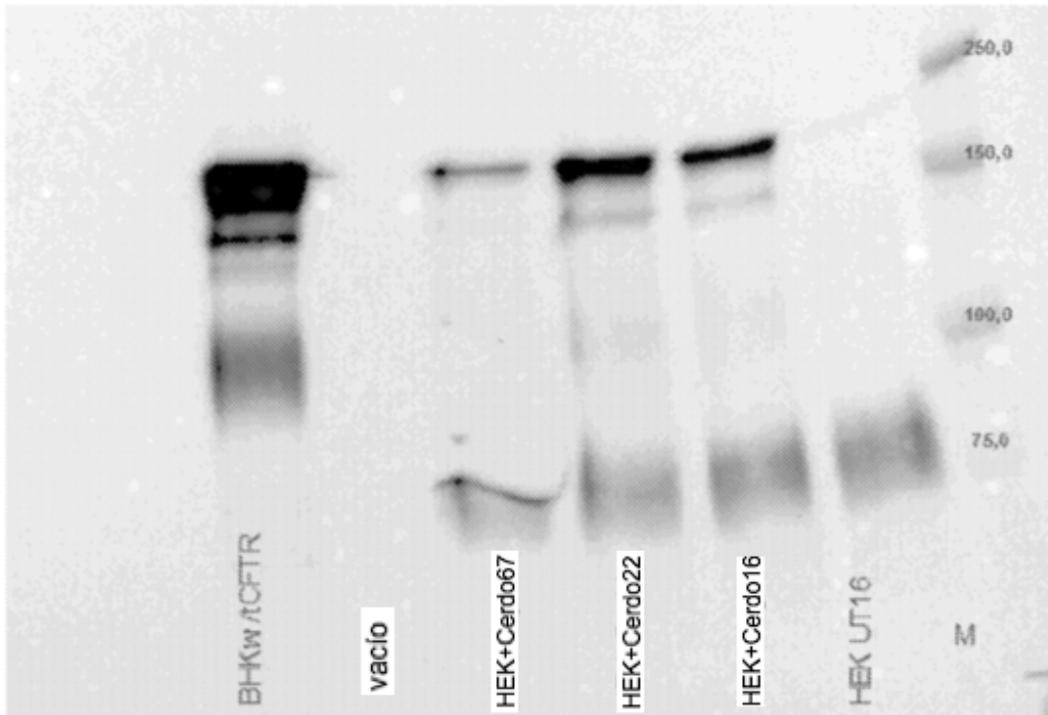


FIGURA 56

Células HEK transfectadas utilizando complejos dados a Cerdos 18-18 (Dosis de 5mg), 23-24 (Dosis de 10mg) y 68-69 (Dosis de 1mg)

HEK-UT - Células HEK no transfectadas

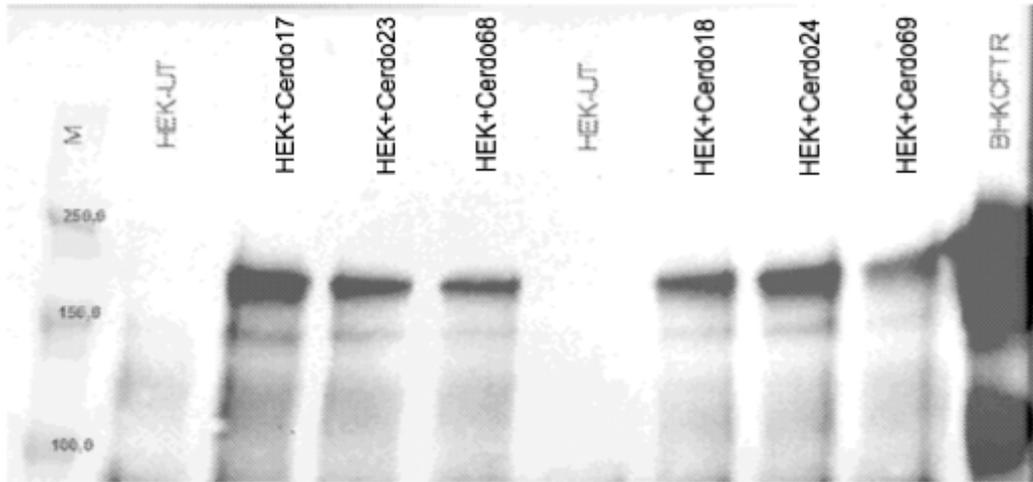


FIGURA 57