

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202191148 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.10.07

(51) Int. Cl. C12N 15/62 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.12.18

(54) РНК, КОДИРУЮЩАЯ БЕЛОК

(31) 18214221.6; 19208066.1

(32) 2018.12.19; 2019.11.08

(33) EP

(86) PCT/EP2019/086019

(87) WO 2020/127532 2020.06.25

(88) 2020.09.17

(71) Заявитель:
ВЕРСАМЕБ АГ (CH)

(72) Изобретатель:

Селварадж Джастин Энтони (DE),
Шаффхаузер Эрве (FR), Мецгер
Фридрих (DE)

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к мРНК, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую белок и сигнальный пептид, и единице транскрипции, экспрессирующему вектору или вектору для генной терапии, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую белок и сигнальный пептид. Кроме того, в настоящем документе описаны терапевтическая композиция, содержащая указанную мРНК, единица транскрипции, экспрессирующий вектор или вектор для генной терапии, и применение терапевтической композиции для лечения заболевания или состояния.

A1

202191148

202191148

A1

РНК, КОДИРУЮЩАЯ БЕЛОК

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к мРНК, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую белок и сигнальный пептид, причем аминокислоты

- 5 1-9 с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида характеризуются средним показателем гидрофобности выше 2, причем указанный сигнальный пептид выбран из группы, состоящей из
- i) сигнального пептида, гетерологичного указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, необязательно модифицирован
- 10 путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, при условии, что указанный белок не является оксидоредуктазой;
- ii) сигнального пептида, гомологичного указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты; и
- 15 iii) природной аминокислотной последовательности, не обладающей функцией сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная последовательность необязательно модифицирована путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты.

Кроме того, настоящее изобретение относится к мРНК, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую

- 20 i) белок; и ii) сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, представляет собой сигнальный пептид нейротрофического фактора головного мозга, а указанный белок не является оксидоредуктазой. Кроме того, настоящее изобретение относится к транскрипционной
- 25 единице или экспрессирующему вектору, содержащим нуклеотидную последовательность, кодирующую белок и сигнальный пептид, причем аминокислоты 1-9 с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида характеризуются средним показателем гидрофобности выше 2, причем указанный сигнальный пептид выбран из группы, состоящей из
- 30 i) сигнального пептида, гетерологичного указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, необязательно модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, при условии, что указанный белок не является оксидоредуктазой;

- ii) сигнального пептида, гомологичного указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты; и
- iii) природной аминокислотной последовательности, не обладающей функцией
- 5 сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная последовательность необязательно модифицирована путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты. Кроме того, настоящее изобретение относится к транскрипционной единице или экспрессирующему вектору, содержащим нуклеотидную последовательность, кодирующую белок и сигнальный пептид,
- 10 гетерологичный указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, представляет собой сигнальный пептид нейротрофического фактора головного мозга (BDNF). Кроме того, настоящее изобретение относится к терапевтической композиции и набору, содержащим указанную мРНК и/или транскрипционную единицу или экспрессирующий вектор.
- 15 Кроме того, настоящее изобретение относится к мРНК, транскрипционной единице или экспрессирующему вектору, терапевтической композиции и/или набору для применения в качестве лекарственного средства, в частности, к мРНК, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую i) ИФР1; и ii) сигнальный пептид нейротрофического фактора головного мозга (BDNF), для применения в качестве
- 20 лекарственного средства. Кроме того, настоящее изобретение относится к мРНК и ее терапевтической композиции для применения в способе лечения повреждения скелетных мышц.

Уровень техники

- В прошлом предпринимались различные попытки увеличить выход экспрессии и
- 25 секреции кодируемого белка, в частности, за счет применения усовершенствованных систем экспрессии как *in vitro*, так и *in vivo*. Способы увеличения экспрессии и секреции, описанные в литературе, традиционно основаны на применении экспрессирующих векторов или кассет, содержащих специфические промоторы и соответствующие регуляторные элементы. Поскольку эти экспрессирующие векторы
- 30 или кассеты ограничены конкретными клеточными системами, эти системы экспрессии адаптировали для применения в других клеточных системах. Такие адаптированные экспрессирующие векторы или кассеты обычно трансфицируют в клетки и обрабатывают в зависимости от конкретной линии клеток. Поэтому предпочтение

отдают главным образом таким молекулам нуклеиновой кислоты, как мРНК, которые способны экспрессировать кодируемые белки в клетке-мишени за счет внутренних систем клетки, независимо от промоторов и регуляторных элементов, специфичных по отношению к кодируемым типам клеток. В этом контексте можно различать мРНК-стабилизирующие элементы и элементы, увеличивающие эффективность трансляции мРНК. Например, в заявке WO 02/098443 описаны мРНК, стабилизированные в общей форме и оптимизированные для трансляции кодирующих областей. Кроме того, в WO 02/098443 описан способ определения модификаций последовательностей. Кроме того, в WO 02/098443 описаны возможности замещения адениновых и урациловых нуклеотидов в последовательностях мРНК для увеличения содержания гуанина/цитозина (G/C) в этих последовательностях. В данном контексте в WO 02/098443 в общем случае упоминаются последовательности, используемые в качестве базовых последовательностей для таких модификаций, причем модифицированная мРНК кодирует по меньшей мере один биологически активный пептид или полипептид, трансляция которого в организме пациента, подлежащего лечению, происходит, например, неадекватным образом или с ошибками, или вообще не происходит. В рамках дополнительного подхода к увеличению экспрессии кодируемого белка в заявке WO 2007/036366 описан положительный эффект длинных поли(A)-последовательностей (в частности, длинее 120 п.о.) и комбинации по меньшей мере двух 3'-нетранслируемых областей гена бета-глобина по отношению к стабильности и трансляционной активности мРНК. Несмотря на весь прогресс, достигнутый в данной области техники, и, в частности, эффективную секрецию кодируемого белка в бесклеточных системах, клетки или организмы (рекомбинантная экспрессия) по-прежнему представляют собой существенную проблему.

Сущность изобретения

В настоящем изобретении предложена мРНК, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую белок и сигнальный пептид, причем аминокислоты 1-9 с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида характеризуются средним показателем гидрофобности выше 2, причем указанный сигнальный пептид выбран из группы, состоящей из

i) сигнального пептида, гетерологичного указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, необязательно модифицирован

- путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, при условии, что указанный белок не является оксидоредуктазой;
- ii) сигнального пептида, гомологичного указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты; и
- iii) природной аминокислотной последовательности, не обладающей функцией сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная последовательность необязательно модифицирована путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты.
- 10 Кроме того, в настоящем изобретении предложена мРНК, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую
- i) белок; и
- ii) сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку,
- 15 представляет собой сигнальный пептид нейротрофического фактора головного мозга (BDNF), а указанный белок не является оксидоредуктазой, в частности, в настоящем изобретении предложена мРНК, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую
- i) белок; и
- 20 ii) сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, представляет собой сигнальный пептид нейротрофического фактора головного мозга (BDNF), а указанный белок выбран из группы, состоящей из карбоксипептидаз; цитокинов; внеклеточных лигандов и переносчиков; белков внеклеточного матрикса;
- 25 глюкозидаз; гликозилтрансфераз; факторов роста; белков, связывающих факторы роста; белков, связывающих гепарин; гормонов; гидролаз; иммуноглобулинов; изомераз; киназ; лиаз; ингибиторов металлоферментов; металлопротеаз; белков молока; нейроактивных белков; протеаз; ингибиторов протеаз; протеинфосфатаз; эстераз; трансфераз; и вазоактивных белков.
- 30 Кроме того, в настоящем изобретении дополнительно предложены транскрипционная единица или экспрессирующий вектор, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую белок и сигнальный пептид, причем аминокислоты 1-9 с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида

характеризуются средним показателем гидрофобности выше 2, причем указанный сигнальный пептид выбран из группы, состоящей из

- i) сигнального пептида, гетерологичного указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, необязательно модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, при условии, что указанный белок не является оксидоредуктазой;
- ii) сигнального пептида, гомологичного указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты; и
- iii) природной аминокислотной последовательности, не обладающей функцией сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная последовательность необязательно модифицирована путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты.

Кроме того, в настоящем изобретении дополнительно предложены транскрипционная единица или экспрессирующий вектор, содержащие нуклеотидную

последовательность, кодирующую белок и сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, представляет собой сигнальный пептид нейротрофического фактора головного мозга (BDNF), а указанный белок не является оксидоредуктазой. Кроме того, в

настоящем изобретении предложены транскрипционная единица или экспрессирующий вектор, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую белок; и сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, представляет собой сигнальный пептид нейротрофического фактора головного мозга (BDNF), а указанный белок выбран из

группы, состоящей из карбоксипептидаз; цитокинов; внеклеточных лигандов и переносчиков; белков внеклеточного матрикса; глюкозидаз; гликозилтрансфераз; факторов роста; белков, связывающих факторы роста; белков, связывающих гепарин; гормонов; гидролаз; иммуноглобулинов; изомераз; киназ; лиаз; ингибиторов металлоферментов; металлопротеаз; белков молока; нейроактивных белков; протеаз; ингибиторов протеаз; протеинфосфатаз; эстераз; трансфераз; и вазоактивных белков.

Кроме того, настоящее изобретение дополнительно предложена терапевтическая композиция, содержащая указанную мРНК или вышеупомянутые транскрипционную единицу или экспрессирующий вектор. Кроме того, в настоящем изобретении

- предложен набор, содержащий вышеупомянутые мРНК, транскрипционную единицу или экспрессирующий вектор и/или терапевтическую композицию, а также инструкции, необязательно карту вектора, необязательно клетку-хозяина, необязательно культуральную среду для культивирования клетки-хозяина и/или,
- 5 необязательно, селективную среду для селекции и культивирования трансфицированной клетки-хозяина. Кроме того, в настоящем изобретении предложена вышеупомянутая мРНК, транскрипционная единица или экспрессирующий вектор, терапевтическая композиция или набор для применения в качестве лекарственного средства. Кроме того, в настоящем изобретении предложена мРНК, содержащая
- 10 нуклеотидную последовательность, кодирующую i) ИФР1; и ii) сигнальный пептид нейротрофического фактора головного мозга (BDNF), для применения в качестве лекарственного средства. Кроме того, в настоящем изобретении дополнительно предложена мРНК или терапевтическая композиция, содержащая мРНК, для применения в способе лечения повреждения скелетных мышц.
- 15 Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что мРНК, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую белок и сигнальный пептид, причем аминокислоты 1-9 с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида характеризуются средним показателем гидрофобности выше 2, причем указанный сигнальный пептид выбран из группы, состоящей из
- 20 i) сигнального пептида, гетерологичного указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, необязательно модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, при условии, что указанный белок не является оксидоредуктазой;
- ii) сигнального пептида, гомологичного указанному белку, причем указанный
- 25 сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты; и
- iii) природной аминокислотной последовательности, не обладающей функцией сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная последовательность необязательно модифицирована путем инсерции, делеции и/или
- 30 замены по меньшей мере одной аминокислоты,
- обеспечивает более эффективную секрецию белка клетками, трансфицированными этой мРНК, по сравнению с секрецией белка клетками, трансфицированными мРНК, кодирующей белок и его природный, гомологичный сигнальный пептид. В частности,

авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что мРНКЮ содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую i) белок; и ii) сигнальный пептид BDNF, гетерологичный указанному белку, обеспечивает более эффективную секрецию белка клетками, трансфицированными этой мРНК, по сравнению с природным, 5 гомологичным сигнальным пептидом указанного белка. Количество секретируемого белка до шести раз превосходит выход с мРНК, содержащей тот же белок и природный, гомологичный сигнальный пептид указанного белка. Этот неожиданный результат очень полезен для эффективной доставки и экспрессии мРНК, кодирующей желательный белок, в клетке, и для получения более высокого количества 10 секретируемого белка по сравнению с применением природного, гомологичного сигнального пептида указанного белка. Повышенные количества секретируемого белка, получаемые при том же количестве мРНК, предлагаемые в настоящем изобретении, особенно полезны при снижении терапевтической дозы, которую необходимо местно ввести в ткань, что увеличивает диапазон безопасности в отношении потенциальных 15 побочных эффектов, связанных с мРНК. Кроме того, это делает заявку более подходящей для составов с контролируемым высвобождением и покрытий изделий. Кроме того, это снижает риск иммуногенности, связанный с мРНК, и делает заявку более подходящей для тканей, в которые можно вводить ограниченный объем, или для ранее недоступных тканей. Кроме того, авторы настоящего изобретения обнаружили 20 возможность эффективной доставки и экспрессии мРНК, в частности, мРНК, кодирующей ИФР-1 человека, в скелетных мышцах, что позволяет экспрессировать желательный полипептид в скелетных мышцах для обеспечения значимого функционального благоприятного эффекта по отношению к мышцам. мРНК предпочтительно присутствует в жидкой композиции, предпочтительно в несвязанной 25 форме. Эту жидкую композицию можно доставлять непосредственно в скелетные мышцы, например, путем инъекции, при отсутствии необходимости в каком-либо векторе для переноса генов или носителях для мРНК или способах усиления переноса в ткань, например, электропереносе или обработке ультразвуком. Кроме того, показано, что инъекция мРНК в поврежденные скелетные мышцы усиливает процесс 30 восстановления и приводит к усилению функции скелетных мышц. Неожиданно оказалось, что животные, обработанные мРНК, кодирующей ИФР-1, достигали функциональных уровней здорового диапазона к 16 суткам. В отличие от этого,

контрольные животные, обработанные средой-носителем, не достигали полного функционального восстановления к 28 суткам.

Краткое описание чертежей

На **фигуре 1** показаны последовательности ДНК и РНК Cpд.1. (А) показана

5 последовательность ДНК (SEQ ID NO:1) кодон-оптимизированного ИФР1 человека, содержащая его пре-, про- и кодирующий домены. Последовательность пре-домена (сигнального пептида) обозначена *курсивом*, последовательность про-домена подчеркнута, кодирующий домен ИФР-1 обозначен **полужирным шрифтом**, а стоп-кодон - **полужирным подчеркнутым шрифтом**. (В) изображена последовательность

10 РНК пре-, про- и кодирующего доменов ИФР1 человека (SEQ ID NO:2), где уридин представляет собой N1-метилпсевдоуридин. Пре- и про-домены отщепляются при секреции.

На **фигуре 2** показаны последовательности ДНК и РНК Cpд.2. (А) показана

15 последовательность ДНК (SEQ ID NO:3) кодон-оптимизированного ИФР1 человека, содержащая пре-домен ИФР2 и про- и кодирующий домены ИФР1. Последовательность пре-домена (сигнального пептида) обозначена *курсивом*, последовательность про-домена подчеркнута, кодирующий домен ИФР1 обозначен **полужирным шрифтом**, а стоп-кодон - **полужирным подчеркнутым шрифтом**. (В) изображена последовательность РНК пре-домена ИФР2 и про- и кодирующего доменов

20 ИФР1 (SEQ ID NO:4), где уридин представляет собой N1-метилпсевдоуридин. Пре- и про-домены отщепляются при секреции.

На **фигуре 3** показаны последовательности ДНК и РНК Cpд.2. (А) показана

последовательность ДНК (SEQ ID NO:5) кодон-оптимизированного ИФР1 человека, содержащая пре-домен ALB и про- и кодирующий домены ИФР1. Последовательность

25 пре-домена (сигнального пептида) обозначена *курсивом*, последовательность про-домена подчеркнута, кодирующий домен ИФР1 обозначен **полужирным шрифтом**, а стоп-кодон - **полужирным подчеркнутым шрифтом**. (В) изображена последовательность РНК пре-домена ALB и про- и кодирующего доменов ИФР1 (SEQ ID NO:6), где уридин представляет собой N1-метилпсевдоуридин. Пре- и про-домены

30 отщепляются при секреции.

На **фигуре 4** показаны последовательности ДНК и РНК Cpд.4. (А) показана

последовательность ДНК (SEQ ID NO:7) кодон-оптимизированного ИФР1 человека, содержащая пре-домен BDNF и про- и кодирующий домены ИФР1.

Последовательность пре-домена (сигнального пептида) обозначена *курсивом*, последовательность про-домена подчеркнута, кодирующий домен ИФР1 обозначен **полужирным шрифтом**, а стоп-кодон - **полужирным подчеркнутым шрифтом**. (В) изображена последовательность РНК пре-домена BDNF и про- и кодирующего доменов ИФР1 (SEQ ID NO:8), где уридин представляет собой N1-метилпсевдоуридин. Пре- и про-домены отщепляются при секреции.

На **фигуре 5** показаны последовательности ДНК и РНК Срд.5. (А) показана последовательность ДНК (SEQ ID NO:9) кодон-оптимизированного ИФР1 человека, содержащая пре-домен CXCL12 и про- и кодирующий домены ИФР1.

Последовательность пре-домена (сигнального пептида) обозначена *курсивом*, последовательность про-домена подчеркнута, кодирующий домен ИФР1 обозначен **полужирным шрифтом**, а стоп-кодон - **полужирным подчеркнутым шрифтом**. (В) изображена последовательность РНК пре-домена CXCL12 и про- и кодирующего доменов ИФР1 (SEQ ID NO:10), где уридин представляет собой N1-метилпсевдоуридин. Пре- и про-домены отщепляются при секреции.

На **фигуре 6** показаны последовательности ДНК и РНК Срд.6. (А) показана последовательность ДНК (SEQ ID NO:11) кодон-оптимизированного ИФР1 человека, содержащая пре-домен - синтетический сигнальный пептид 1 и про- и кодирующий домены ИФР1. Последовательность пре-домена (сигнального пептида) обозначена *курсивом*, последовательность про-домена подчеркнута, кодирующий домен ИФР1 обозначен **полужирным шрифтом**, а стоп-кодон - **полужирным подчеркнутым шрифтом**. (В) изображена последовательность РНК пре-домена - синтетического сигнального пептида 1 и про- и кодирующего доменов ИФР1 (SEQ ID NO:12), где уридин представляет собой N1-метилпсевдоуридин. Пре- и про-домены отщепляются при секреции.

На **фигуре 7** показаны последовательности ДНК и РНК Срд.7. (А) показана последовательность ДНК (SEQ ID NO:13) кодон-оптимизированного ИФР1 человека, содержащая пре-домен - синтетический сигнальный пептид 2 и про- и кодирующий домены ИФР1. Последовательность пре-домена (сигнального пептида) обозначена *курсивом*, последовательность про-домена подчеркнута, кодирующий домен ИФР1 обозначен **полужирным шрифтом**, а стоп-кодон - **полужирным подчеркнутым шрифтом**. (В) изображена последовательность РНК пре-домена - синтетического сигнального пептида 2 и про- и кодирующего доменов ИФР1 (SEQ ID NO:14), где

уридин представляет собой N1-метилпсевдоуридин. Пре- и про-домены отщепляются при секреции.

На **фигуре 8** показана последовательность ДНК вектора pVAX.A120 со вставкой Cpd.1, обозначенной полужирным шрифтом (SEQ ID NO: 15). OPC Cpd.1 вырезали из

5 исходной плазмиды и субклонировали в вектор.

На **фигуре 9** показана последовательность ДНК вектора pMA-T со вставкой Cpd.2, обозначенной полужирным шрифтом (SEQ ID NO: 16). OPC Cpd.2 вырезали из исходной плазмиды и субклонировали в вектор.

На **фигуре 10** показана последовательность ДНК вектора pMA-T со вставкой Cpd.3, обозначенной полужирным шрифтом (SEQ ID NO: 17). OPC Cpd.3 вырезали из

10 исходной плазмиды и субклонировали в вектор.

На **фигуре 11** показана последовательность ДНК вектора pMA-T со вставкой Cpd.4, обозначенной полужирным шрифтом (SEQ ID NO: 18). OPC Cpd.4 вырезали из исходной плазмиды и субклонировали в вектор.

На **фигуре 12** показана последовательность ДНК вектора pMA-T со вставкой Cpd.5, обозначенной полужирным шрифтом (SEQ ID NO: 19). OPC Cpd.5 вырезали из

15 исходной плазмиды и субклонировали в вектор.

На **фигуре 13** показана последовательность ДНК вектора pMA-RQ со вставкой Cpd.6, обозначенной полужирным шрифтом (SEQ ID NO: 20). OPC Cpd.6 вырезали из

20 исходной плазмиды и субклонировали в вектор.

На **фигуре 14** показана последовательность ДНК вектора pMA-RQ со вставкой Cpd.7, обозначенной полужирным шрифтом (SEQ ID NO: 21). OPC Cpd.7 вырезали из исходной плазмиды и субклонировали в вектор.

На **фигуре 15** показаны последовательности прямого (SEQ ID NO:22) и обратного праймера (SEQ ID NO:23), использованные для амплификации плазмид pMA-T и pMA-RQ для IVT мРНК.

25

На **фигуре 16** показаны названия генов, номера UniProt, кодон-оптимизированные последовательности ДНК и аминокислотные последовательности сигнальных пептидов Cpd. 1-Cpd.7 (SEQ ID No: 24-37). Учтите, что сигнальные пептиды Cpd.6 и Cpd.7

30 представляют собой синтетические пептиды и не совпадают с последовательностями известных белков в базах данных общего пользования.

На **фигуре 17** показана индукция секреции ИФР1 клетками эмбриональной почки человека (НЕК293Т) путем трансфекции мРНК с Cpd.1-Cpd.7. Клетки НЕК293Т

трансфицировали 2 мкг Ср.1-Срд.7, секретируемый ИФР1 измеряли через 24 часа в супернатанте клеточной культуры с использованием специфичного твердофазного ИФА. Срд.4 индуцировал секрецию ИФР1 в значительно более высокой степени, чем Ср.1 (в 3.3 раза). Данные представляют собой среднее $\pm$ стандартную ошибку среднего по 4 повторностям. Значимость (***, $p < 0,001$) оценивали посредством однофакторного дисперсионного анализа с последующим использованием критерия множественного сравнения Даннетта.

На **фигуре 18** показана зависимость индукции секреции ИФР1 в клетках НЕК293Т от концентрации после трансфекции мРНК с Ср.1 или Срд.4. Клетки трансфицировали Ср.1 или Срд.4 в различных концентрациях (0, 0,02, 0,06, 0,2, 0,6 или 2 мкг), секретируемый ИФР1 измеряли через 24 часа в супернатанте клеточной культуры с использованием специфичного твердофазного ИФА. Срд.4 индуцировал секрецию ИФР1 со значительно большей эффективностью (EC_{50} 0,134 мкг), чем Ср.1 (EC_{50} 0,889 мкг). Данные представляют собой среднее $\pm$ стандартную ошибку среднего по 2 повторностям. Значимость (***, $p < 0,001$) оценивали посредством двухфакторного дисперсионного анализа двух кривых.

На **фигуре 19** показана индукция секреции ИФР1 клетками скелетной мышцы мыши (C2C12) путем трансфекции мРНК с Ср.1-Срд.7. Клетки C2C12 трансфицировали 2 мкг Ср.1-Срд.7, секретируемый ИФР1 измеряли через 24 часа в супернатанте клеточной культуры с использованием специфичного твердофазного ИФА. Срд.4 индуцировал секрецию ИФР1 в значительно более высокой степени, чем Ср.1 (в 6,1 раза). Данные представляют собой среднее $\pm$ стандартную ошибку среднего по 4 повторностям. Значимость (***, $p < 0,001$) оценивали посредством однофакторного дисперсионного анализа с последующим использованием критерия множественного сравнения Даннетта.

На **фигуре 20** показана индукция секреции ИФР1 первичными клетками скелетной мышцы человека (HSkMC) путем трансфекции мРНК с Ср.1 и Срд.4. Клетки HSkMC трансфицировали 2 мкг Ср.1 или Срд.4, секретируемый ИФР1 измеряли через 24 часа в супернатанте клеточной культуры с использованием специфичного твердофазного ИФА. Срд.4 индуцировал секрецию ИФР1 в значительно более высокой степени, чем Ср.1 (в 3,1 раза). Данные представляют собой среднее $\pm$ стандартную ошибку среднего по 3 повторностям. Значимость (**, $p < 0,01$) оценивали посредством однофакторного

дисперсионного анализа с последующим использованием критерия множественного сравнения Даннетта.

На **фигуре 21** показано функциональное восстановление передней большеберцовой мышцы (ТА) после повреждения нотексином. После повреждения в результате

- 5 внутримышечной инъекции нотексина (день 0) выполняли две обработки мРНК ИФР-I (Cpd. 4 (1 мкг)) путем внутримышечной инъекции в день 1 и 4 (см. наконечники стрелок). Контрольная группа получила раствор среды-носителя. Функцию мышцы оценивали в день 1, 4, 7, 10, 14, 21 и 28 после повреждения. Данные представляют собой среднее $\pm$ стандартную ошибку (SEM) по 5 мышам на группу и момент времени.
- 10 Звездочками указано значимое различие в группе, обработанной Cpd. 4, по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$), оцениваемое по критерию Стьюдента.

На **фигуре 22** показана индукция секреции ИФР1 клетками эмбриональной почки человека (НЕК293Т) путем трансфекции мРНК с Cpd.1 в качестве контроля и Cpd.8-Cpd.26. Клетки НЕК293Т трансфицировали 0,3 μ г Cpd.1 и Cpd.8-Cpd.26,

- 15 секретируемый ИФР1 измеряли через 24 часа в супернатанте клеточной культуры с использованием специфичного твердофазного ИФА. Секрецию ИФР1 нормировали по Cpd.1. Секреция ИФР1. Cpd. 8, 9, 10, 11, 12 и 13 демонстрировали пониженную секрецию ИФР1, в то время как Cpd. 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 25 и 26 индуцировали секрецию ИФР1 в более высокой степени, чем Cpd.1 (до 2,6-кратной).
- 20 Данные представляют собой среднее $\pm$ стандартную ошибку среднего по 2- 11 повторностям на Cpd. Значимость (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,001$; ***, $p < 0,001$) оценивали по t-критерию Стьюдента отдельного Cpd. по сравнению с Cpd.1.

На **фигуре 23** показана индукция секреции ИФР1 клетками печени человека (НерG2) путем трансфекции мРНК с Cpd.1 в качестве контроля и Cpd.4-Cpd.26. Клетки НерG2

- 25 трансфицировали 0,3 μ г Cpd.1 и Cpd.4-Cpd.26, секретируемый ИФР1 измеряли через 24 часа в супернатанте клеточной культуры с использованием специфичного твердофазного ИФА. Секрецию ИФР1 нормировали по Cpd.1. Cpd. 8, 9 и 12 демонстрировали пониженную секрецию ИФР1, в то время как Cpd. 4, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 и 26 индуцировали секрецию ИФР1 в более высокой степени, чем Cpd.1 (до 8,3-кратной). Данные представляют собой среднее $\pm$ стандартную ошибку среднего по 2- 4 повторностям на Cpd. Значимость (**, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$) оценивали по t-критерию Стьюдента отдельного Cpd. по сравнению с Cpd.1.
- 30

На **фигуре 24** показана индукция секреции ИФР1 клетками-нейронами человека (IMR32) путем трансфекции мРНК с Cpd.1 в качестве контроля и Cpd.4-Cpd.24. Клетки IMR32 трансфицировали 0,3 мкг Ср.1 и Cpd.4-Cpd.24, секретируемый ИФР1 измеряли через 24 часа в супернатанте клеточной культуры с использованием специфичного

5 твердофазного ИФА. Секрецию ИФР1 нормировали по Cpd.1. Cpd.4, 14, 15, 16, 17, 20, 22, 23 и 24 индуцировали секрецию ИФР1 в более высокой степени, чем Cpd.1 (до 2,6-кратной). Данные представляют собой среднее $\pm$ стандартную ошибку среднего по 2-6 повторностям на Cpd. Значимость (*, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$) оценивали по t-критерию Стьюдента отдельного Cpd. по сравнению с Cpd.1.

10 На **фигуре 25** показана индукция секреции ИФР1 первичными хондроцитами человека путем трансфекции мРНК с Cpd.1 в качестве контроля и Cpd.4-Cpd.25. Хондроциты трансфицировали 0,6 мкг Ср.1 и Cpd.4-Cpd.25, секретируемый ИФР1 измеряли через 24 часа в супернатанте клеточной культуры с использованием специфичного

15 твердофазного ИФА. Секрецию ИФР1 нормировали по Cpd.1. Cpd. 4, 14, 15, 16, 20, 21, 22, 24 и 25 индуцировали секрецию ИФР1 в более высокой степени, чем Cpd.1 (до 1,9-кратной). Данные представляют собой среднее $\pm$ стандартную ошибку среднего по 1-2 повторностям на Cpd. Значимость (*, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$) оценивали по t-критерию Стьюдента отдельного Cpd. по сравнению с Cpd.1.

На **фигуре 26** показана индукция секреции ИФР1 первичными мотонейронами крысы дикого типа (A) или SOD1G^{S93A} (B) путем трансфекции мРНК с Cpd.1 в качестве

20 контроля и Cpd.4-Cpd.17. Первичные мотонейроны крысы дикого типа трансфицировали 0,3 мкг Ср.1, Cpd.4, Cpd. 4 и Cpd.17, а первичные мотонейроны крысы SOD1G^{S93A} трансфицировали 0,3 мкг Ср.1, Cpd. 14 и Cpd.17, секретируемый ИФР1 измеряли через 48 часа в супернатанте клеточной культуры с использованием

25 специфичного твердофазного ИФА. Секрецию ИФР1 нормировали по Cpd.1. Cpd. 4, 14 и 17 индуцировали секрецию ИФР1 в более высокой степени, чем Cpd.1 (до 4,3-кратной в клетках дикого типа или 9,3-кратной в клетках SOD1^{S93A}). Данные представляют собой среднее $\pm$ стандартную ошибку среднего по 2 повторностям на Cpd. Значимость оценивали по t-критерию Стьюдента отдельного Cpd. по сравнению с Cpd.1,

30 статистических различий не выявлено.

На **фигуре 27** показана индукция секреции ЕРО клетками эмбриональной почки человека (НЕК293Т, A), клетками печени человека (НepG2, B) и клетками карциномы легких человека (A549, C) путем трансфекции мРНК с Cpd.27, Cpd.28 или Cpd.29.

Клетки трансфицировали 0,3- 0,9 мкг Cpд.27, Cpд.28 или Cpд.29, секретируемый ЕРО измеряли через 24 часа в супернатанте клеточной культуры с использованием специфичного твердофазного ИФА. Секрецию ЕРО нормировали по Cpд.27. Cpд. 28 и 29 индуцировали секрецию ЕРО в более высокой степени, чем Cpд.27, во всех трех проанализированных типах клеток (до 1,8-кратной). Данные представляют собой среднее $\pm$ стандартную ошибку среднего по 3- 8 повторностям на Cpд. Значимость (*, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$) оценивали по t-критерию Стьюдента отдельного Cpд. по сравнению с Cpд.27.

На **фигуре 28** показана индукция секреции INS клетками эмбриональной почки человека (НЕК293Т) путем трансфекции мРНК с Cpд.30, Cpд.31 или Cpд.32. Клетки трансфицировали 0,6 мкг Cpд.30, Cpд.31 или Cpд.32, секретируемый INS измеряли через 24 часа в супернатанте клеточной культуры с использованием специфичного твердофазного ИФА. Секрецию INS нормировали по Cpд.30. Cpд. 31 и 32 индуцировали секрецию INS в более высокой степени, чем Cpд.30 (до 3,9-кратной). Данные представляют собой среднее $\pm$ стандартную ошибку среднего по 3- 5 повторностям на Cpд. Значимость (*, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$) оценивали по t-критерию Стьюдента отдельного Cpд. по сравнению с Cpд.30.

На **фигуре 29** показана индукция секреции ИЛ-4 клетками эмбриональной почки человека (НЕК293Т, **A**), клетками печени человека (НерG2, **B**), моноцитами человека (THP-1, **C**) и клетками карциномы легких человека (A549, **D**) путем трансфекции мРНК с Cpд.33, Cpд.34 или Cpд.35. Клетки трансфицировали 0,5- 0,6 мкг Cpд.33, Cpд.34 или Cpд.35, секретируемый ИЛ-4 измеряли через 24 часа в супернатанте клеточной культуры с использованием специфичного твердофазного ИФА. Секрецию ИЛ-4 нормировали по Cpд.33. Cpд.34 и 35 индуцировали секрецию ИЛ-4 в более высокой степени, чем Cpд.33, во всех трех проанализированных типах клеток (до 2,2-кратной). Данные представляют собой среднее $\pm$ стандартную ошибку среднего по 3- 8 повторностям на Cpд. Значимость (*, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$) оценивали по t-критерию Стьюдента отдельного Cpд. по сравнению с Cpд.33.

На **фигуре 30** показана индукция секреции ИЛ-10 клетками эмбриональной почки человека (НЕК293Т, **A**), клетками печени человека (НерG2, **B**) или моноцитами человека (THP-1, **C**) путем трансфекции мРНК с Cpд.36, Cpд.37 или Cpд.38. Клетки трансфицировали 0,3- 0,6 мкг Cpд.36, Cpд.37 или Cpд.38, секретируемый ИЛ-10 измеряли через 24 часа в супернатанте клеточной культуры с использованием

специфичного твердофазного ИФА. Секрецию ИЛ-10 нормировали по Cpd.36. Cpd. 37 и 38 индуцировали секрецию ИЛ-10 в более высокой степени, чем Cpd.36, во всех трех проанализированных типах клеток (до 2,2-кратной). Данные представляют собой среднее $\pm$ стандартную ошибку среднего по 4- 8 повторностям на Cpd. Значимость (**, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$) оценивали по t-критерию Стьюдента отдельного Cpd. по сравнению с Cpd.36.

На **фигуре 31** показана индукция секреции ИФР-1 клетками печени человека (HepG2, A) и первичными хондроцитами человека (B) путем трансфекции мРНК с Cpd.39. Клетки трансфицировали 0,3- 0,6 мкг Cpd.39, секретлируемый ИФР-1 измеряли через 24 часа в супернатанте клеточной культуры с использованием специфичного твердофазного ИФА. Секрецию ИФР1 нормировали по Cpd.1. Cpd.39 индуцировал секрецию ИФР-1 в более высокой степени, чем Cpd.1, во всех двух проанализированных типах клеток (до 1,4-кратной). Данные представляют собой среднее $\pm$ стандартную ошибку среднего по 4-7 повторностям. Значимость (**, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$) оценивали по t-критерию Стьюдента отдельного Cpd.1 по сравнению с Cpd.39.

Подробное описание изобретения

В настоящем документе термин “РНК” включает РНК, кодирующую аминокислотную последовательность, а также РНК, не кодирующую аминокислотную последовательность. Обычно в настоящем документе РНК представляет собой кодирующую РНК, т.е. РНК, кодирующую аминокислотную последовательность. Такие молекулы РНК также называются мРНК (матричная РНК) и представляют собой одноцепочечные молекулы РНК. Таким образом, в настоящем документе термин «РНК» предпочтительно относится к мРНК. РНК можно получить с использованием методологии химического или ферментативного синтеза, известной специалистам в данной области техники, или с использованием рекомбинантной технологии, или выделить из природных источников, или с помощью комбинации этих подходов. РНК необязательно может содержать неприродные и встречающиеся в природе модификация нуклеозидов, например, N¹-метилпсевдоуридин, также называемый в настоящем документе метилпсевдоуридином.

В настоящем документе термин «мРНК» (т.е. матричная РНК) относится к полимерам, составленным из нуклеозидфосфатных блоков, главным образом включающих аденозин, цитидин, уридин и гуанозин в качестве нуклеозидов, содержащим область,

кодирующую белок. В контексте настоящего изобретения следует понимать, что мРНК обозначает любую молекулу полирибонуклеотида, которая при поступлении в клетку подходит для экспрессии белка или его фрагмента или может транслироваться в белок или его фрагмент. Следует понимать, что мРНК согласно настоящему изобретению, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую белок и сигнальный пептид, обозначает молекулу полирибонуклеотида, которая при поступлении в клетку подходит для экспрессии указанного белка или его фрагмента. мРНК согласно настоящему изобретению представляет собой искусственную молекулу нуклеиновой кислоты, т.е. искусственную мРНК. Под искусственной молекулой нуклеиновой кислоты, например, искусственной мРНК обычно можно понимать молекулу нуклеиновой кислоты, которая не встречается в природе, например, рекомбинантную мРНК. Рекомбинантная мРНК представляет собой предпочтительную мРНК согласно настоящему изобретению. мРНК содержит рибонуклеотидную последовательность, кодирующую белок или его фрагмент, функция которого в клетке или в непосредственной близости от клетки обычно является необходимой или благоприятной, в частности, в контексте лечения повреждений скелетных мышц. мРНК может содержать последовательность целого белка или его функционального варианта. Так, нуклеотидная последовательность мРНК для целого белка обычно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальный пептид, и нуклеотидную последовательность, кодирующую белок. мРНК согласно настоящему изобретению содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую белок и сигнальный пептид. Нуклеотидная последовательность, кодирующая белок, может необязательно содержать про-домен белка, обычно расположенный на N-конце белка. Нуклеотидная последовательность мРНК согласно настоящему изобретению обычно кодирует белок и сигнальный пептид в следующем порядке от 5'-конца к 3'-концу: i) сигнальный пептид и ii) белок, т.е. за последним нуклеотидом кодирующей области сигнального пептида следует первый нуклеотид кодирующей области белка или, если белок содержит про-домен, первый нуклеотид кодирующей области пробелка. Рибонуклеотидная последовательность может кодировать белок, действующий как фактор, индуктор, регулятор, стимулятор или фермент, или его функциональный фрагмент, причем данный белок обычно представляет собой белок, функция которого необходима для устранения расстройства, в частности, повреждения скелетной мышцы. В настоящем документе под функциональным вариантом понимают фрагмент, который в клетке

может выполнять функцию белка, необходимую для клетки. Кроме того, мРНК может дополнительно содержать функциональные области и/или 3'- или 5'-некодирующие области. 3'- и/или 5'-некодирующие области могут представлять собой области, в естественных условиях фланкирующие последовательность, кодирующую белок, или искусственные последовательности, участвующие в стабилизации РНК, например, кэп на 5'-конце и/или полиА-хвост на 3'-конце. Специалист в данной области техники в каждом случае может определить последовательности, подходящие для этого, с помощью обычных экспериментов. мРНК или ДНК, используемая для транскрипции мРНК, может быть кодон-оптимизированной. ДНК, используемая в настоящем изобретении для транскрипции мРНК согласно настоящему изобретению, и мРНК согласно настоящему изобретению предпочтительно являются кодон-оптимизированными. В общем случае оптимизация кодонов относится к процессу модификации нуклеотидной последовательности для экспрессии в клетке-хозяине, представляющей интерес, путем замены по меньшей мере одного кодона (например, более чем 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 50 или более кодонов) нативной последовательности кодонами, чаще или наиболее часто используемыми в генах указанной клетки-хозяина, при сохранении нативной аминокислотной последовательности. Таблицы использования кодонов легкодоступны, например, в «базе данных использования кодонов», и эти таблицы можно адаптировать посредством ряда способов. Кроме того, доступны компьютерные алгоритмы оптимизации кодонов определенной последовательности для экспрессии в определенной клетке-хозяине, например, Gene Forge[®] (Aptagen, PA) и GeneOptimizer[®] (ThermoFischer, MA), которая является предпочтительной.

В настоящем документе термин «несвязанная РНК» относится к РНК, не находящейся в комплексе с любыми другими соединениями, в частности, белками, пептидами, полимерами, например, катионными полимерами, липидами, липосомами, вирусными векторами и т.п. Таким образом, термин «несвязанная РНК» означает, что РНК присутствует, например, в жидкой композиции в свободной форме или не находится в комплексе, а присутствует в растворе в состоянии молекулярной дисперсии. Например, термин «несвязанная РНК» не предполагает, что РНК находится в комплексе с системой липидного и/или полимерного носителя (например, липидных наночастиц и мицелл) реагента для трансфекции, например, DreamFect[™] Gold или (разветвленного) ПЭИ. Следовательно, композиция, содержащая РНК, например, терапевтическая

композиция согласно настоящему изобретению не содержит, например, системы липидного или полимерного носителя реагента для трансфекции, например, DreamFect™ Gold или (разветвленного) ПЭИ.

В настоящем документе термины «последовательность нуклеиновой кислоты»,

- 5 «нуклеотидная последовательность» или «последовательность нуклеотидной кислоты» являются взаимозаменяемыми, имеют одинаковое значение и предпочтительно относятся к ДНК или РНК. Термины «последовательность нуклеиновой кислоты», «нуклеотидная последовательность» или «последовательность нуклеотидной кислоты» предпочтительно используются в качестве синонимов термина «полинуклеотидная
- 10 последовательность». Нуклеотидная последовательность предпочтительно представляет собой полимер, содержащий или состоящий из нуклеотидных мономеров, ковалентно связанных друг с другом фосфодиэфирными связями сахарофосфатного каркаса. Термин «нуклеотидная последовательность» также охватывает модифицированные нуклеотидные последовательности, например, ДНК или РНК,
- 15 модифицированные по основанию, по углеводу или по каркасу, и т. д.

В настоящем документе термин «открытая рамка считывания» относится к последовательности нескольких нуклеотидных триплетов, которые можно транслировать в пептид или белок. Открытая рамка считывания (ОРС)

- 20 предпочтительно содержит стартовый кодон, т.е. комбинацию трех последовательных нуклеотидов, обычно кодирующих аминокислоту метионин (ATG), на 5'-конце и последующую область, длина которой в нуклеотидах кратна трем. ОРС обычно заканчивается стоп-кодоном (например, TAA, TAG, TGA). Обычно это единственный стоп-кодон в открытой рамке считывания. Таким образом, открытая рамка считывания
- 25 в контексте настоящего изобретения предпочтительно представляет собой нуклеотидную последовательность, количество нуклеотидов в которой делится на три, которая начинается со стартового кодона (например, ATG) и предпочтительно заканчивается стоп-кодоном (например, TAA, TGA или TAG). Открытая рамка считывания может быть выделенной или может быть встроена в более длинную
- 30 нуклеотидную последовательность, например, в вектор или мРНК. Открытую рамку считывания также можно называть «областью, кодирующей (белок)» или, предпочтительно, «кодирующей последовательностью».

В настоящем документе термин “сигнальный пептид” также называют пептидом, используемым в сигнальном пути, пре-доменом, сигнальной последовательностью, сигналом адресного воздействия, сигналом локализации, пептидом для переноса, лидерной последовательностью или лидерным пептидом и представляет собой

5 короткий пептид (обычно 16-40 аминокислот длиной), находящийся на N-конце вновь синтезированных белков, предназначенных для выведения посредством секреторного пути. Длина сигнального пептида согласно настоящему изобретению предпочтительно составляет 10-50, более предпочтительно - 11-45, еще более предпочтительно - 12-45, наиболее предпочтительно - 13-45, в частности, 14-45, конкретнее - 15-45, еще

10 конкретнее - 16-40 аминокислот. Сигнальный пептид согласно настоящему изобретению находится на N-конце белка, представляющего интерес, или на N-конце пробелка, представляющего интерес. При использовании сигнального пептида согласно настоящему изобретению белок, представляющий интерес, может секретироваться в количестве, по меньшей мере равном, предпочтительно в количестве, превышающем

15 количество указанного белка, секретируемого с использованием природного (гомологичного) сигнального пептида. Сигнальный пептид согласно настоящему изобретению обычно имеет эукариотическое происхождение, например, представляет собой сигнальный пептид эукариотического белка, предпочтительно получен из организма млекопитающего, например, представляет собой сигнальный пептид белка

20 млекопитающего, более предпочтительно получен из организма человека, например, представляет собой сигнальный пептид белка млекопитающего. В некоторых вариантах реализации гетерологичный сигнальный пептид и/или гомологичный сигнальный пептид, подлежащий модификации, представляет собой природный сигнальный пептид эукариотического белка, предпочтительно природный сигнальный пептид белка

25 млекопитающего, более предпочтительно - природный сигнальный пептид белка человека.

В настоящем документе термин "белок" относится к молекулам, обычно включающим один или более из пептидов или полипептидов. Пептид или полипептид обычно представляет собой цепь аминокислотных остатков, соединенных пептидными связями.

30 Пептид обычно содержит от 2 до 50 аминокислотных остатков. Полипептид предпочтительно содержит более 50 аминокислотных остатков. Белок обычно подвергается фолдингу в 3-мерную форму, что может быть необходимо для проявления биологической функции белка. В настоящем документе термин «белок» включает

фрагмент белка и гибридные белки. Белок предпочтительно представляет собой белок млекопитающего, более предпочтительно - имеет человеческое происхождение, т.е. представляет собой белок человека. Белок предпочтительно представляет собой белок, в норме секретируемый из клетки, т.е. белок, секретируемый из клетки в естественных условиях. В настоящем документе белки обычно выбраны из группы, состоящей из карбоксипептидаз; цитокинов; внеклеточных лигандов и переносчиков; белков внеклеточного матрикса; глюкозидаз; гликозилтрансфераз; факторов роста; белков, связывающих факторы роста; белков, связывающих гепарин; гормонов; гидролаз; иммуноглобулинов; изомераз; киназ; лиаз; ингибиторов металлоферментов; металлопротеаз; белков молока; нейроактивных белков; протеаз; ингибиторов протеаз; протеинфосфатаз; эстераз; трансфераз; и вазоактивных белков.

Карбоксипептидазы представляют собой белки, являющиеся ферментами-протеазами, гидролизующими (расщепляющими) пептидную связь на карбоксильном конце (С-конце) белка; цитокины представляют собой секретируемые белки, действующие как локальные или системные модуляторы сигнального пути клетки-мишени через рецепторы на их поверхности и часто вовлекаемые в иммунологические реакции; внеклеточные лиганды и переносчики представляют собой секретируемые белки, действующие за счет связывания с другими белками или переноса других белков или других молекул, проявляющих определенную биологическую функцию; белки внеклеточного матрикса представляют собой группу белков, секретируемых поддерживающими клетками и обеспечивающих структурную и биохимическую поддержку окружающих клеток; глюкозидазы представляют собой ферменты, вовлеченные в разрушение сложных углеводов, например, крахмала и гликогена на мономеры; гликозилтрансферазы представляют собой ферменты, образующие природные гликозидные связи; факторы роста представляют собой секретируемые белки, способные стимулировать рост, пролиферацию клеток, заживление и дифференцировку клеток, действуя как местные или системные модуляторы сигнальных путей клетки-мишени через рецепторы на их поверхности, часто вовлекаемые в трофические реакции и выживаемость или сигнальные пути клеточного гомеостаза; белки, связывающие факторы роста, представляют собой секретируемые белки, связывающиеся с факторами роста и таким образом модулирующие их биологическую активность; белки, связывающие гепарин, представляют собой секретируемые белки, взаимодействующие с гепарином и модулирующие его

биологическую функцию, часто в сочетании со связыванием с фактором роста или гормоном; гормоны представляют собой члены класса молекул, участвующих в сигнальных путях, продуцируемые железами в многоклеточных организмах, секретируемые и транспортируемые кровеносной системой к удаленным органам-мишеням с целью регуляции физиологии и поведения за счет связывания со специфическими рецепторами на клетках-мишенях; гидролазы представляют собой класс ферментов, биохимически катализирующих расщепление молекул с использованием воды для разрушения химических связей, что приводит к разделению крупной молекулы на более мелкие; иммуноглобулины представляют собой крупные Y-образные секретируемые белки, продуцируемые главным образом плазматическими клетками, которые использует иммунная система для нейтрализации патогенных бактерий и вирусов; изомеразы представляют собой общий класс ферментов, преобразующих молекулу одного изомера в другой, тем самым облегчая внутримолекулярные перестройки, сопровождающиеся разрывом и образованием связей; киназы представляют собой ферменты, катализирующие перенос фосфатных групп с высокоэнергетических молекул - доноров фосфата на специфичные субстраты; лиазы представляют собой ферменты, катализирующие разрыв различных химических связей без использования гидролиза и окисления, что часто приводит к образованию новой двойной связи или новой кольцевой структуры; ингибиторы металлоферментов являются клеточными ингибиторами металлопротеаз матрикса (ММП); металлопротеазы представляют собой ферменты-протеазы, механизм катализа которых включает использование иона металла; белки молока представляют собой белки, секретируемые в молоко; нейроактивные белки представляют собой секретируемые белки, локально или дистанционно поддерживающие функционирование, выживание и физиологию нейронов; протеазы (также называемые пептидазами или протеиназами) представляют собой ферменты, выполняющие протеолиз посредством гидролиза пептидных связей; ингибиторы протеаз представляют собой белки, ингибирующие функцию протеаз; протеинфосфатазы представляют собой ферменты, удаляющие фосфатные группы с фосфорилированных аминокислотных остатков белка-субстрата; эстеразы представляют собой ферменты, расщепляющие сложные эфиры на кислоту и спирт в ходе химической реакции с водой при аминокислотном остатке; трансферазы представляют собой класс ферментов, катализирующих перенос специфических функциональных групп (например, метильной или гликозильной группы) с одной

молекулы (называемой донором) на другую (называемую акцептором); вазоактивные белки представляют собой секретируемые белки, оказывающие биологическое влияние на функцию кровеносных сосудов. Карбоксипептидазы; цитокины; внеклеточные лиганды и переносчики; белки внеклеточного матрикса; глюкозидазы;

5 гликозилтрансферазы; факторы роста; белки, связывающие факторы роста; белки, связывающие гепарин; гормоны; гидролазы; иммуноглобулины; изомеразы; киназы; лиазы; ингибиторы металлоферментов; металлопротеазы; белки молока; нейтроактивные белки; протеазы; ингибиторы протеаз; протеинфосфатазы; эстеразы; трансферазы; и вазоактивные белки, упомянутые в настоящем документе, можно найти
10 в базе данных UniProt.

Термины «фрагмент» или «фрагмент последовательности», которые имеют одинаковое значение, представляют собой короткую часть полноразмерной последовательности, например, молекулы нуклеиновой кислоты, например, ДНК или РНК, или белка.

Соответственно, фрагмент обычно содержит или состоит из последовательности,
15 идентичной соответствующему участку полноразмерной последовательности.

Предпочтительный фрагмент последовательности в контексте настоящего изобретения содержит или состоит из непрерывного отрезка, составленного из объектов, например, нуклеотидов или аминокислот, соответствующий непрерывному отрезку из объектов в составе молекулы, от которой происходит указанный фрагмент, который составляет по
20 меньшей мере 5%, обычно по меньшей мере 20%, предпочтительно по меньшей мере 30%, более предпочтительно по меньшей мере 40%, более предпочтительно по меньшей мере 50%, еще более предпочтительно по меньшей мере 60%, еще более предпочтительно по меньшей мере 70%, и наиболее предпочтительно - по меньшей мере 80% от всей (т.е. полноразмерной) молекулы, от которой происходит указанный
25 фрагмент.

В настоящем документе термин “сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку” относится к природному сигнальному пептиду, отличающемуся от природного сигнального пептида указанного белка, т.е. сигнальному пептиду, полученному не из того же гена, что и указанный белок. Обычно сигнальный пептид, гетерологичный
30 данному белку, представляет собой сигнальный пептид другого белка, не имеющий отношения к данному белку, т.е. пептид, аминокислотная последовательность которого отличается от последовательности сигнального пептида данного белка, например, пептид, аминокислотная последовательность которого отличается от

последовательности сигнального пептида данного белка более чем на 50%,
 предпочтительно - более чем на 60%, более предпочтительно - более чем на 70%, еще
 более предпочтительно - более чем на 80%, наиболее предпочтительно - более чем на
 90%, в частности, более чем на 95%. Сигнальный пептид, гетерологичный данному
 5 белку, предпочтительно характеризуется идентичностью последовательности по
 отношению к аминокислотной последовательности природного (гомологичного)
 сигнального пептида данного белка менее 95%, предпочтительно менее 90%, более
 предпочтительно - менее 80%, еще более предпочтительно - менее 70%, наиболее
 предпочтительно - менее 60%, в частности, менее 50%. Хотя гетерологичные
 10 последовательности можно получать из того же организма, в естественных условиях
 они не встречаются в одной и той же молекуле нуклеиновой кислоты, например, в
 одной и той же мРНК. Сигнальный пептид, гетерологичный белку, и белок, которому
 гетерологичен сигнальный пептид, могут иметь одно и то же или различное
 происхождение, и обычно имеют одно и то же происхождение, предпочтительно
 15 эукариотическое происхождение, более предпочтительно - эукариотическое
 происхождение из одного и того же эукариотического организма, еще более
 предпочтительно - происхождение из организма млекопитающего, в частности, из
 одного и того же организма млекопитающего, конкретнее - человеческое
 происхождение. В примере 1 описана мРНК, содержащая нуклеотидную
 20 последовательность, кодирующую сигнальный пептид BDNF человека и ИФР1
 человека, т.е. сигнальный пептид, гетерологичный белку, причем указанные
 сигнальный пептид и белок имеют одно и то же происхождение, а именно,
 человеческое происхождение.

В настоящем документе термин «сигнальный пептид, гомологичный указанному
 25 белку», относится к природному сигнальному пептиду белка. Сигнальный пептид,
 гомологичный белку, представляет собой сигнальный пептид, кодируемый тем же
 геном, что и белок, как происходит в естественных условиях. Сигнальный пептид,
 гомологичный белку, обычно имеет эукариотическое происхождение, например,
 представляет собой природный сигнальный пептид эукариотического белка,
 30 предпочтительно полученный из организма млекопитающего, например, природный
 сигнальный пептид белка млекопитающего, более предпочтительно получен из
 организма человека, например, представляет собой природный сигнальный пептид
 белка человека.

В настоящем документе термин «природная аминокислотная последовательность, не обладающая функцией сигнального пептида в природе» относится к аминокислотной последовательности, встречающейся в природе и не идентичной аминокислотной последовательности какого-либо сигнального пептида, встречающегося в природе.

- 5 Длина природной аминокислотной последовательности, не обладающей функцией сигнального пептида в природе, упоминаемой в настоящем изобретении, предпочтительно составляет от 10 до 50, более предпочтительно - 11-45, еще более предпочтительно - 12-45, наиболее предпочтительно - 13-45, в частности, 14-45, конкретнее - 15-45, еще конкретнее - 16-40 аминокислот. Природная аминокислотная
- 10 последовательность, не обладающая функцией сигнального пептида в природе, согласно настоящему изобретению имеет эукариотическое происхождение и не идентична какому-либо сигнальному пептиду эукариотического происхождения, более предпочтительно - получена из организма млекопитающего и не идентична какому-либо сигнальному пептиду, полученному из организма млекопитающего, более
- 15 предпочтительно - имеет человеческое происхождение и не идентична какому-либо природному сигнальному пептиду человеческого происхождения. Природная аминокислотная последовательность, не обладающая функцией сигнального пептида в природе, обычно представляет собой аминокислотную последовательность кодирующей последовательности белка. Природная аминокислотная
- 20 последовательность, не обладающая функцией сигнального пептида в природе, согласно настоящему изобретению обычно имеет эукариотическое происхождение, предпочтительно получена из организма млекопитающего, более предпочтительно - имеет человеческое происхождение.

- 25 В настоящем документе термины «встречающийся в природе», «природный» и «в естественных условиях» имеют эквивалентное значение.

- В настоящем документе термин “аминокислоты 1-9 с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида” относятся к первым девяти аминокислотам с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида. Аналогичным образом, в настоящем документе термины “аминокислоты 1-7 с N-конца
- 30 аминокислотной последовательности сигнального пептида” относятся к первым семи аминокислотам с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида, а термин “аминокислоты 1-5 с N-конца аминокислотной последовательности

сигнального пептида” относятся к первым пяти аминокислотам с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида.

В настоящем документе термин “аминокислотная последовательность, модифицированная посредством инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты” относится к аминокислотной последовательности, включающей аминокислотную замену, инсерцию и/или делецию по меньшей мере одной аминокислоты в пределах аминокислотной последовательности. В настоящем документе термин “сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, модифицированный посредством инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты” относится к аминокислотной последовательности природного сигнального пептида, гетерологичного белку, включающей аминокислотную замену, инсерцию и/или делецию по меньшей мере одной аминокислоты в пределах природной аминокислотной последовательности. В настоящем документе термин “сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, модифицированный посредством инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты” относится к природному сигнальному пептиду, гомологичному белку, включающему аминокислотную замену, инсерцию и/или делецию по меньшей мере одной аминокислоты в пределах природной аминокислотной последовательности. Термин “природная аминокислотная последовательность, модифицированная посредством инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты” относится к природной аминокислотной последовательности, включающей аминокислотную замену, инсерцию и/или делецию по меньшей мере одной аминокислоты в пределах природной аминокислотной последовательности. В настоящем документе под «аминокислотной заменой» или «заменой» подразумевают замену аминокислоты в конкретном положении последовательности исходного белка другой аминокислотой. Например, замена R34K относится к полипептиду, в котором аргинин в положении 34 заменен лизином. В предыдущем примере 34K указывает на замену положения 34 лизином. Для целей настоящей заявки множественные замены обычно разделяют косой чертой. Например, R34K/L78V относится к двойному варианту, включающему замены R34K и L78V. В настоящем документе под «инсерцией аминокислоты» или «инсерцией» подразумевают добавление аминокислоты в конкретном положении последовательности исходного белка. Например, инсерция -34 обозначает инсерцию в

положении 34. В настоящем документе под «делецией аминокислоты» или «делецией» подразумевают удаление аминокислоты в конкретном положении последовательности исходного белка. Например, R34- обозначает делецию аргинина в положении 34.

Удаленная аминокислота предпочтительно представляет собой аминокислоту с показателем гидрофобности ниже -0,8, предпочтительно ниже 1,9. Замещающая аминокислота предпочтительно представляет собой аминокислоту с показателем гидрофобности, превышающим гидрофобный показатель замещаемой аминокислоты, более предпочтительно замещающая аминокислота представляет собой аминокислоту с показателем гидрофобности, равным 2,8 и выше, более предпочтительно - с показателем гидрофобности, равным 3,8 и выше. Вставляемая аминокислота предпочтительно представляет собой аминокислоту с показателем гидрофобности, равным 2,8 и выше, более предпочтительно - с показателем гидрофобности, равным 3,8 и выше.

Обычно инсерции, делеции или замене подвергают от 1 до 15, предпочтительно от 1 до 11 аминокислот, более предпочтительно - от 1 до 10 аминокислот, еще более предпочтительно - от 1 до 9 аминокислот, в частности, от 1 до 8 аминокислот, конкретнее - от 1 до 7 аминокислот, еще конкретнее - от 1 до 6 аминокислот, в особенности предпочтительно - от 1 до 5 аминокислот, еще предпочтительнее - от 1 до 4 аминокислот, еще предпочтительнее - от 1 до 2 аминокислот заданной аминокислотной последовательности. Обычно инсерции, делеции или замене подвергают от 1 до 15, предпочтительно от 1 до 11 аминокислот, более предпочтительно - от 1 до 10 аминокислот, еще более предпочтительно - от 1 до 9 аминокислот, в частности, от 1 до 8 аминокислот, конкретнее - от 1 до 7 аминокислот, еще конкретнее - от 1 до 6 аминокислот, в особенности предпочтительно - от 1 до 5 аминокислот, еще предпочтительнее - от 1 до 4 аминокислот, еще предпочтительнее - от 1 до 2 аминокислот заданной аминокислотной последовательности, обычно в пределах 1-11 аминокислот, предпочтительно в пределах 1-10 аминокислот, более предпочтительно - в пределах 1-9 аминокислот, еще более предпочтительно - в пределах 1-8 аминокислот, в частности, в пределах 1-7 аминокислот, конкретнее - в пределах 1-6 аминокислот, еще конкретнее - в пределах 1-5 аминокислот, в особенности предпочтительно - в пределах 1-4 аминокислот, еще предпочтительнее - в пределах 1-3 аминокислот, еще предпочтительнее - в пределах 1-2 аминокислот от N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида.

Аминокислотная последовательность предпочтительно необязательно модифицирована посредством делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты.

Средний показатель гидрофобности первых девяти аминокислот с N-конца аминокислотной последовательности модифицированного сигнального пептида

5 предпочтительно увеличен на 1,0 единицу или более по сравнению с сигнальным пептидом, не содержащим модификаций.

В настоящем документе термин "инсулиноподобный фактор роста 1",

"инсулиноподобный фактор роста 1 (ИФР1)" или "ИФР1" обычно относится к

10 пропептид и/или Е-пептид и предпочтительно относится к природной

последовательности белка ИФР1 без сигнального пептида и без Е-пептида. В

настоящем документе термин "инсулиноподобный фактор роста 1 человека (ИФР1)"

относится к природной последовательности ИФР1 человека (про-ИФР1, которая в базе данных Uniprot называется UniProtKB - P05019, а в базе данных Genbank -

15 NM_000618.4, NM_001111285.2 и NM_001111283.2, или к ее фрагменту. Природная

последовательность ДНК, кодирующая инсулиноподобный фактор роста 1 человека,

может быть кодон-оптимизирована. Природная последовательность ИФР1 человека

содержит или состоит из сигнального пептида человека, содержащего 21 аминокислоту (нуклеотиды 1-63), пропептида человека (также называемого про-доменом),

20 содержащего 27 аминокислот (нуклеотиды 64-144), зрелого ИФР1 человека,

содержащего 70 аминокислот (нуклеотиды 145-354), и С-концевого домена ИФР1

человека, который представляет собой так называемый Е-пептид (или Е-домен). С-

концевой домен ИФР1 человека (так называемый Е-пептид или Е-домен) содержит Еа-,

Еb- или Ес-домен, получаемые посредством альтернативного сплайсинга. Еа-домен

25 содержит или состоит из 35 аминокислот (105 нуклеотидов), Еb-домен содержит или

состоит из 77 аминокислот (231 нуклеотида), а Ес-домен содержит или состоит из 40

аминокислот (120 нуклеотидов) (см., например, Wallis M (2009) New insulin-like growth factor (IGF)-precursor sequences from mammalian genomes: the molecular evolution of IGFs and associated peptides in primates. Growth Horm IGF Res 19(1):12-23. doi:

30 10.1016/j.ghir.2008.05.001). В настоящем документе термин «инсулиноподобный фактор

роста 1 человека (ИФР)" обычно относится к природной последовательности белка

ИФР1 человека без сигнального пептида и может включать пропептид и/или Е-пептид и

предпочтительно относится к природной последовательности белка ИФР1 человека без

сигнального пептида и без Е-пептида. В настоящем документе термин “инсулиноподобный фактор роста 1 человека (ИФР)” обычно включает зрелый ИФР1 человека. Термин “зрелый белок” относится к белку, синтезированному в эндоплазматическом ретикулуме и секретируемому с помощью аппарата Гольджи в клетке, экспрессирующей и секретирующей указанный белок. Термин “зрелый ИФР1” относится к белку, синтезированному в эндоплазматическом ретикулуме и секретируемому с помощью аппарата Гольджи в клетке, экспрессирующей и секретирующей ИФР1. Термин “зрелый ИФР1 человека” относится к белку, синтезированному в эндоплазматическом ретикулуме и секретируемому с помощью аппарата Гольджи в клетке человека, экспрессирующей и секретирующей ИФР1 человека, и обычно содержащему аминокислоты, кодируемые нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO:39.

В настоящем документе термин «инсулин» или “INS” обычно относится к природной последовательности инсулина без сигнального пептида. В настоящем документе термин «инсулин человека» или «INS человека» относится к природной последовательности инсулина человека, которая в базе данных Uniprot называется UniProtKB - P01308, а в базе данных Genbank - NM_000207.2, NM_001185097.1, NM_001185098.1 и NM_001291897.1, или к ее фрагменту. Природная последовательность ДНК, кодирующая инсулин человека, может быть кодон-оптимизирована. Природная последовательность инсулина человека содержит или состоит из сигнального пептида человека, содержащего 24 аминокислоты (нуклеотиды 1-72), В-цепи инсулина человека, содержащей 30 аминокислот (нуклеотиды 73-163), пропептида инсулина человека (также называемого соединяющим пептидом, С-пептидом), содержащего 31 аминокислоту (нуклеотиды 64-144), и С-концевого домена А-цепи инсулина человека, содержащего или состоящего из 21 аминокислоты (нуклеотиды 64-144). В настоящем документе термин «инсулин человека» обычно включает инсулин человека без сигнального пептида.

В настоящем документе термин «эритропоэтин», «ЕРО» или “Еро” обычно относится к природной последовательности ЕРО без сигнального пептида. В настоящем документе термин «эритропоэтин человека», «ЕРО человека» или «Еро человека» относится к природной последовательности эритропоэтина человека, которая в базе данных Uniprot называется UniProtKB - P01588, а в базе данных Genbank - NM_000799.2, или к ее

фрагменту. Природная последовательность ДНК, кодирующая эритропоэтин человека, может быть кодон-оптимизирована. Природная последовательность эритропоэтина человека содержит или состоит из сигнального пептида человека, содержащего 27 аминокислот (нуклеотиды 1-81), кодирующей цепи Еро человека, содержащей 166 аминокислот (нуклеотиды 82-579). В настоящем документе термин «эритропоэтин человека» обычно включает ЕРО человека без сигнального пептида.

В настоящем документе термин «интерлейкин-4» или «ИЛ-4» обычно относится к природной последовательности ИЛ-4 без сигнального пептида. В настоящем документе термин «интерлейкин-4 человека» или «ИЛ-4 человека» относится к природной последовательности ИЛ-4 человека, которая в базе данных Uniprot называется UniProtKB - P05112, а в базе данных Genbank - NM_000589.3 и NM_172348.2, или к ее фрагменту. Природная последовательность ДНК, кодирующая ИЛ-4 человека, может быть кодон-оптимизирована. Природная последовательность ИЛ-4 человека содержит или состоит из сигнального пептида человека, содержащего 24 аминокислоты (нуклеотиды 1-72), кодирующей цепи ИЛ-4 человека, содержащей 129 аминокислот (нуклеотиды 73-387). В настоящем документе термин «ИЛ-4 человека» обычно включает ИЛ-4 человека без сигнального пептида.

В настоящем документе термин «интерлейкин-10» или «ИЛ-10» обычно относится к природной последовательности ИЛ-10 без сигнального пептида. В настоящем документе термин «интерлейкин-10 человека» или «ИЛ-10 человека» относится к природной последовательности ИЛ-10 человека, которая в базе данных Uniprot называется UniProtKB – P22301, а в базе данных Genbank - NM_000572.2, или к ее фрагменту. Природная последовательность ДНК, кодирующая ИЛ-10 человека, может быть кодон-оптимизирована. Природная последовательность ИЛ-10 человека содержит или состоит из сигнального пептида человека, содержащего 18 аминокислот (нуклеотиды 1-54), кодирующей цепи ИЛ-10 человека, содержащей 160 аминокислот (нуклеотиды 55-534). В настоящем документе термин «ИЛ-10 человека» обычно включает ИЛ-10 человека без сигнального пептида.

В настоящем документе термин “сигнальный пептид инсулиноподобного фактора роста 1 человека (ИФР1)” или «сигнальный пептид ИФР1» относится к природному

сигнальному пептиду ИФР1, который в базе данных Uniprot называется P05019, а в базе данных Genbank - NM_000618.4, NM_001111284.1 и NM_001111285.2 и

предпочтительно содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24, и/или предпочтительно кодируется последовательностью ДНК,

5 представленной в SEQ ID NO: 25.

В настоящем документе термин “сигнальный пептид инсулиноподобного фактора роста 2 человека (ИФР2)” или «сигнальный пептид ИФР2» относится к природному

сигнальному пептиду ИФР2, который в базе данных Uniprot называется P01344, а в базе данных Genbank - NM_000612.5, NM_001007139.5, NM_001127598.2, NM_001291861.2

10 и NM_001291862.2 и предпочтительно содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 26, и/или предпочтительно кодируется

последовательностью ДНК, представленной в SEQ ID NO: 27.

В настоящем документе термин “сигнальный пептид сывороточного альбумина (ALB)”

или «сигнальный пептид ALB» относится к природному сигнальному пептиду ALB,

15 который в базе данных Uniprot называется P02768, а в базе данных Genbank -

NM_000477.6 и предпочтительно содержит аминокислотную последовательность,

представленную в SEQ ID NO: 28, и/или предпочтительно кодируется

последовательностью ДНК, представленной в SEQ ID NO: 29.

В настоящем документе термин “нейротрофический фактор головного мозга (BDNF)”

20 или «сигнальный пептид BDNF» относится к природному сигнальному пептиду BDNF,

который в базе данных Uniprot называется P23560, а в базе данных Genbank -

NM_001143805.1, NM_170731.4, NM_170734.3, NM_001143810.1 и NM_001143809.1 и

предпочтительно содержит аминокислотную последовательность, представленную в

SEQ ID NO: 30, и/или предпочтительно кодируется последовательностью ДНК,

25 представленной в SEQ ID NO: 31.

В настоящем документе термин “сигнальный пептид фактора клеток стромы-1

(CXCL12)” или «сигнальный пептид CXCL12» относится к природному сигнальному

пептиду CXCL12, который в базе данных Uniprot называется P48061, а в базе данных

Genbank - NM_000609.6, NM_001033886.2, NM_001178134.1, NM_001277990.1 и

30 NM_199168.3 и предпочтительно содержит аминокислотную последовательность,

представленную в SEQ ID NO: 32, и/или предпочтительно кодируется

последовательностью ДНК, представленной в SEQ ID NO: 33.

В настоящем документе термин “сигнальный пептид синтетического сигнального

пептида 1 (синтетического seq1)” или «сигнальный пептид синтетического seq1» относится к синтетическому сигнальному пептиду 1, который содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 34, и/или кодируется последовательностью ДНК, представленной в SEQ ID NO: 35.

5 В настоящем документе термин “сигнальный пептид синтетического сигнального пептида 2 (синтетического seq2)” или «сигнальный пептид синтетического seq1» относится к синтетическому сигнальному пептиду 1, который содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 36, и/или кодируется последовательностью ДНК, представленной в SEQ ID NO: 37.

10 В настоящем документе термин “сигнальный пептид белка 2, связывающего латентный трансформирующий фактор роста бета (LTBP2)” или «сигнальный пептид LTBP2» относится к природному сигнальному пептиду LTBP2, который в базе данных Uniprot называется Q14767, а в базе данных Genbank - NM_000428.2 и предпочтительно содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 41,
15 и/или предпочтительно кодируется последовательностью ДНК, представленной в SEQ ID NO: 42.

В настоящем документе термин “сигнальный пептид кислой лабильной субъединицы белкового комплекса, связывающего инсулиноподобный фактор роста (IGFALS)” или «сигнальный пептид IGFALS» относится к природному сигнальному пептиду IGFALS,
20 который в базе данных Uniprot называется P35858, а в базе данных Genbank - NM_001146006.1 и NM_004970.2 и предпочтительно содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 46, и/или предпочтительно кодируется последовательностью ДНК, представленной в SEQ ID NO: 47.

В настоящем документе термин “сигнальный пептид инсулина (INS)” или «сигнальный
25 пептид INS» относится к природному сигнальному пептиду INS, который в базе данных Uniprot называется P1308, а в базе данных Genbank - NM_001185097.1, NM_000207.2, NM_001185098.1 и NM_001291897.1, и предпочтительно содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 51, и/или предпочтительно кодируется последовательностью ДНК, представленной в SEQ ID NO: 52.

30 В настоящем документе термин “сигнальный пептид эритропоэтина (Еро)” или «сигнальный пептид Еро» относится к природному сигнальному пептиду Еро, который в базе данных Uniprot называется P01588, а в базе данных Genbank - NM_000799.2 и предпочтительно содержит аминокислотную последовательность, представленную в

SEQ ID NO: 56, и/или предпочтительно кодируется последовательностью ДНК, представленной в SEQ ID NO: 57.

В настоящем документе термин “сигнальный пептид гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (CSF3)” или «сигнальный пептид CSF3» относится к природному сигнальному пептиду CSF3, который в базе данных Uniprot называется P09919, а в базе данных Genbank - NM_000759.3, NM_001178147.1, NM_172219.2 и NM_172220.2 и предпочтительно содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 61, и/или предпочтительно кодируется последовательностью ДНК, представленной в SEQ ID NO: 62.

В настоящем документе термин “сигнальный пептид бета-фактора роста нервов (ФРН)” или «сигнальный пептид ФРН» относится к природному сигнальному пептиду ФРН, который в базе данных Uniprot называется P01138, а в базе данных Genbank - NM_002506.2 и XM_006710663.3 и предпочтительно содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 66, и/или предпочтительно кодируется последовательностью ДНК, представленной в SEQ ID NO: 67.

В настоящем документе термин “сигнальный пептид интерлейкина-4 (ИЛ-4)” или «сигнальный пептид ИЛ-4» относится к природному сигнальному пептиду ИЛ-4, который в базе данных Uniprot называется P05112, а в базе данных Genbank - NM_000589.3 и NM_172348.2 и предпочтительно содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 77, и/или предпочтительно кодируется последовательностью ДНК, представленной в SEQ ID NO: 78.

В настоящем документе термин “сигнальный пептид интерлейкина-10 (ИЛ-10)” или «сигнальный пептид ИЛ-10» относится к природному сигнальному пептиду ИЛ-10, который в базе данных Uniprot называется P22301 а в базе данных Genbank - NM_000572.2 и предпочтительно содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 82, и/или предпочтительно кодируется последовательностью ДНК, представленной в SEQ ID NO: 83.

В настоящем документе термин “сигнальный пептид фактора роста фибробластов (FGF5)” или «сигнальный пептид FGF5» относится к природному сигнальному пептиду FGF5, который в базе данных Uniprot называется P12034, а в базе данных Genbank - NM_004464.3 и NM_033143.2 и предпочтительно содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 87, и/или предпочтительно

кодируется последовательностью ДНК, представленной в SEQ ID NO: 88 или SEQ ID NO: 183.

В настоящем документе термин “сигнальный пептид белка 2, родственного фактору комплемента H (FHR2)” или «сигнальный пептид FHR2» относится к природному сигнальному пептиду FHR2, который в базе данных Uniprot называется P36980, а в базе данных Genbank - NM_001312672.1 и NM_005666.3 и предпочтительно содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 92, и/или предпочтительно кодируется последовательностью ДНК, представленной в SEQ ID NO: 93.

В настоящем документе термин «сигнальный пептид белка 5, связывающего инсулиноподобный фактор роста (IBP5)” или «сигнальный пептид IBP5» относится к природному сигнальному пептиду IBP5, который в базе данных Uniprot называется P24593, а в базе данных Genbank - NM_001312672.1 и NM_000599.3 и предпочтительно содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 97, и/или предпочтительно кодируется последовательностью ДНК, представленной в SEQ ID NO: 98.

В настоящем документе термин “сигнальный пептид нейротрофина-3 (NTF3)” или «сигнальный пептид NTF3» относится к природному сигнальному пептиду NTF3, который в базе данных Uniprot называется P20783, а в базе данных Genbank - NM_002527.4, XM_011520963.2 и NM_001102654.1 и предпочтительно содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 102, и/или предпочтительно кодируется последовательностью ДНК, представленной в SEQ ID NO: 103.

В настоящем документе термин “сигнальный пептид белка 2, экспрессируемого предстательной железой и яичками (PATE2)” или «сигнальный пептид PATE2» относится к природному сигнальному пептиду PATE2, который в базе данных Uniprot называется Q6UY27, а в базе данных Genbank - NM_212555.2 и предпочтительно содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 107, и/или предпочтительно кодируется последовательностью ДНК, представленной в SEQ ID NO: 108.

В настоящем документе термин “сигнальный пептид внеклеточной супероксиддисмутазы (SOD3)” или «сигнальный пептид SOD3» относится к природному сигнальному пептиду SOD3, который в базе данных Uniprot называется

P08294, а в базе данных Genbank - NM_003102.2 и предпочтительно содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 112, и/или предпочтительно кодируется последовательностью ДНК, представленной в SEQ ID NO: 113.

- 5 В настоящем документе термин “кодирующая последовательность рецептора глюкагона (GL-R)” или «кодирующая последовательность GL-R» относится к кодирующей цепи GL-R, которая представляет собой природную аминокислотную последовательность, не обладающую функцией сигнального пептида в природе и в базе данных Uniprot называется P47871, а в базе данных Genbank - NM_000160.4 и
- 10 предпочтительно содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 117, и/или предпочтительно кодируется последовательностью ДНК, представленной в SEQ ID NO: 118.

- В настоящем документе термин “сигнальный пептид инсулиноподобного фактора роста 1 (ИФР1), модифицированный”, «модифицированный сигнальный пептид ИФР1» или
- 15 «сигнальный пептид ИФР1, модифицированный» относится к модифицированному сигнальному пептиду ИФР1, причем природный сигнальный пептид ИФР1, который в базе данных Uniprot называется P05019, а в базе данных Genbank - NM_000618.4, NM_001111284.1 и NM_001111285.2, модифицирован посредством замен G2L/S5L/T9L/Q10L и делеций K3- и C15- и предпочтительно содержит
- 20 аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 122, и/или предпочтительно кодируется последовательностью ДНК, представленной в SEQ ID NO: 123.

- В настоящем документе термин “сигнальный пептид инсулиноподобного фактора роста 2 (ИФР2), модифицированный”, «модифицированный сигнальный пептид ИФР2» или
- 25 «сигнальный пептид ИФР2, модифицированный» относится к модифицированному природному сигнальному пептиду ИФР2, причем природный сигнальный пептид ИФР2, который в базе данных Uniprot называется P01344, а в базе данных Genbank - NM_000612.5, NM_001007139.5, NM_001127598.2, NM_001291861.2 и NM_001291862.2, модифицирован посредством замен G2L/G6L/K7L/S8L и делеций P4-,
- 30 M5-, I23- и A24- и предпочтительно содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 127, и/или предпочтительно кодируется последовательностью ДНК, представленной в SEQ ID NO: 128.

В настоящем документе термин “сигнальный пептид фактора клеток стромы-1 (CXCL12), модифицированный”, «модифицированный сигнальный пептид CXCL12» или «сигнальный пептид CXCL12, модифицированный» относится к модифицированному сигнальному пептиду CXCL12, причем природный сигнальный пептид CXCL12, который в базе данных Uniprot называется P48061, а в базе данных Genbank - NM_000609.6, NM_001033886.2, NM_001178134.1, NM_001277990.1 и NM_199168.3, модифицирован посредством делеций N3- и K5- и предпочтительно содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 132, и/или предпочтительно кодируется последовательностью ДНК, представленной в SEQ ID NO: 133.

В настоящем документе термин “сигнальный пептид интерлейкина-4 (ИЛ-4), модифицированный”, «модифицированный сигнальный пептид ИЛ-4» или «сигнальный пептид ИЛ-4, модифицированный» относится к модифицированному сигнальному пептиду ИЛ-4, причем природный сигнальный пептид ИЛ-4, который в базе данных Uniprot называется P05112, а в базе данных Genbank - NM_000589.3 и NM_172348.2, модифицирован посредством делеций G2-, T4-, S5- и Q6- и предпочтительно содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 166, и/или предпочтительно кодируется последовательностью ДНК, представленной в SEQ ID NO: 167.

В настоящем документе термин “сигнальный пептид интерлейкина-10 (ИЛ-10), модифицированный”, «модифицированный сигнальный пептид ИЛ-10» или «сигнальный пептид ИЛ-10, модифицированный» относится к модифицированному сигнальному пептиду ИЛ-10, причем природный сигнальный пептид ИЛ-10, который в базе данных Uniprot называется P22301, а в базе данных Genbank - NM_000572.2, модифицирован посредством замен H2V/S3L/S4L и S8L и предпочтительно содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 174, и/или предпочтительно кодируется последовательностью ДНК, представленной в SEQ ID NO: 175.

В настоящем документе термин “сигнальный пептид инсулина (INS), модифицированный”, «модифицированный сигнальный пептид INS» или «сигнальный пептид INS, модифицированный» относится к модифицированному сигнальному пептиду INS, причем природный сигнальный пептид INS, который в базе данных Uniprot называется P1308, а в базе данных Genbank - NM_001185097.1, NM_000207.2,

NM_001185098.1 и NM_001291897.1, модифицирован посредством делеций M5- и R6- и предпочтительно содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 147, и/или предпочтительно кодируется последовательностью ДНК, представленной в SEQ ID NO: 148 или SEQ ID NO: 182.

- 5 В настоящем документе термин “сигнальный пептид нейротрофического фактора головного мозга (BDNF), модифицированный”, «модифицированный сигнальный пептид BDNF» или «сигнальный пептид BDNF, модифицированный» относится к модифицированному сигнальному пептиду BDNF, причем природный сигнальный пептид BDNF, который в базе данных Uniprot называется P23560, а в базе данных
- 10 Genbank - NM_001143805.1, NM_170731.4, NM_170734.3, NM_001143810.1 и NM_001143809.1, модифицирован посредством замен T2L/T7L и S11L и предпочтительно содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 137, и/или предпочтительно кодируется последовательностью ДНК, представленной в SEQ ID NO: 138.
- 15 В настоящем документе термин “сигнальный пептид эритропоэтина (Еро), модифицированный”, «модифицированный сигнальный пептид Еро» или «сигнальный пептид Еро, модифицированный» относится к модифицированному сигнальному пептиду Еро, причем природный сигнальный пептид Еро, который в базе данных Uniprot называется P01588, а в базе данных Genbank - NM_000799.2, модифицирован
- 20 посредством замен G2L/P7L/W9L и делеций H4-, E5- и W11- и предпочтительно содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 152, и/или предпочтительно кодируется последовательностью ДНК, представленной в SEQ ID NO: 153.

- В настоящем документе термин “про-домен инсулиноподобного фактора роста 1
- 25 (ИФР1), модифицированный”, «модифицированный про-домен ИФР1» или «про-ИФР1, модифицированный» относится к пропептиду ИФР1, который представляет собой природную аминокислотную последовательность, не обладающую функцией сигнального пептида в природе, которая в базе данных Uniprot называется P05019, а в базе данных Genbank - NM_000618.4, NM_001111284.1 и NM_001111285.2, и которая
- 30 модифицирована посредством делеции десяти аминокислотных остатков (VKMHTMSSSH), фланкированных аминокислотами 22-31 на N-конце пропептида и предпочтительно содержит аминокислотную последовательность, представленную в

SEQ ID NO: 142, и/или предпочтительно кодируется последовательностью ДНК, представленной в SEQ ID NO: 143.

В настоящем документе термин “про-домен кишечной щелочной фосфатазы (ALPI), модифицированный”, «модифицированный про-домен ALPI» или «про-ALPI, модифицированный» относится к пропептиду ALPI, который представляет собой природную аминокислотную последовательность, не обладающую функцией сигнального пептида в природе и в базе данных Uniprot называется P09923, а в базе данных Genbank - NM_001631.4, которая модифицирована посредством замен A504L/A505L/S511L/G517L/T518L и делеций H506-, P507-, A509-, A510- и P513- и предпочтительно содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 189, и/или предпочтительно кодируется последовательностью ДНК, представленной в SEQ ID NO: 190.

В настоящем документе термин “мРНК содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую пропептид ИФР1, и нуклеотидную последовательность, кодирующую зрелый ИФР1, и не содержит нуклеотидной последовательности, кодирующей Е-пептид ИФР1” обычно относится к мРНК, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую пропептид (также называемый про-доменом) ИФР1 человека, содержащий 27 аминокислот, и нуклеотидную последовательность, кодирующую зрелый ИФР1 человека, содержащий 70 аминокислот, и не содержащей нуклеотидной последовательности, кодирующей Е-пептид (также называемый Е-доменом) ИФР1 человека, т.е. не содержащей нуклеотидной последовательности, кодирующей Ea-, Eb- или Ec-домен. Нуклеотидная последовательность, кодирующая пропептид (также называемый про-доменом) ИФР1 человека, содержащий 27 аминокислот, и нуклеотидная последовательность, кодирующая зрелый ИФР1 человека, содержащий 70 аминокислот, могут быть кодон-оптимизированными.

В настоящем документе термин “вектор” или “экспрессирующий вектор” относится к природным или синтетически полученным конструктам для поглощения, пролиферации, экспрессии или передачи нуклеиновых кислот в клетку, например, плазмидам, мини-кольцам, фагидам, космидам, искусственным хромосомам/мини-хромосомам, бактериофагам, вирусам, например, бакуловирусау, ретровирусу, аденовирусу, аденоассоциированному вирусу, вирусу простого герпеса, бактериофагам. Векторы могут встраиваться в геном клетки-хозяина или оставаться автономно реплицирующимися конструктами в клетке-хозяине. Способы, используемые для

конструирования векторов, хорошо известны специалистам в данной области техники и описаны в различных публикациях. Различные методики конструирования подходящих векторов, включающие описание функциональных и регуляторных компонентов, например, промоторов, энхансеров, сигналов терминации и полиаденилирования, маркеров селекции, сайтов инициации репликации и сигналов сплайсинга, известны специалисту в данной области техники. Эукариотические экспрессирующие векторы обычно также содержат прокариотические последовательности, облегчающие распространение вектора в бактериях, например, сайт инициации репликации и гены устойчивости к антибиотикам для селекции бактерий, которые можно удалять перед трансфекцией эукариотических клеток. Разнообразные эукариотические экспрессирующие векторы, содержащие сайт клонирования, с которым можно функционально связать полинуклеотид, хорошо известны в данной области техники, и некоторые из них доступны для приобретения в таких компаниях, как Agilent Technologies, Санта-Клара, штат Калифорния, США; Invitrogen, Карлсбад, штат Калифорния, США; Promega, Мэдисон, штат Висконсин, США, или Invivogen, Сан-Диего, штат Калифорния, США.

В настоящем документе термин «вектор для генной терапии» относится к любому вектору, используемому для доставки нуклеотидной последовательности, например, нуклеотидной последовательности, кодирующей ген, в клетки. Векторы для генной терапии и способы доставки гена хорошо известны в данной области техники. Неограничивающие примеры этих способов включают системы доставки на основе вирусных векторов, включая ДНК- или РНК-вирусы, геномы которых после доставки в клетку существуют в виде эписомы или встраиваются в геном клетки, системы доставки на основе невирусных векторов, включая ДНК-плазмиды, несвязанные нуклеиновые кислоты и нуклеиновые кислоты в комплексе со средством доставки, транспозонную систему (для доставки и встраивания в геномы хозяев; Moriarity, et al. (2013) *Nucleic Acids Res* 41(8), e92, Aronovich, et al., (2011) *Hum. Mol. Genet.* 20(R1), R14-R20), транспорт ДНК, опосредованный ретровирусами (например, вирусом лейкоза мышей Молоуни, вирусом некроза селезенки, ретровирусами, например, вирусом саркомы Рауса, вирусом саркомы Харви, вирусом лейкоза птиц, вирусом лейкоза гиббонов, вирусом иммунодефицита человека, аденовирусом, миелопролиферативным вирусом саркомы мышей и вирусом опухолей молочной железы; см., например, Kay et

al. (1993) Science 262, 117-119, Anderson (1992) Science 256, 808-813), и транспорт ДНК, опосредованный ДНК-содержащими вирусами, в том числе аденовирусом, герпесвирусом, парвовирусом и аденоассоциированным вирусом (например, Ali et al. (1994) Gene Therapy 1, 367-384). Вирусные векторы также включают векторы на основе аденоассоциированного вируса, веновируса, лентивируса, ретровирусов и вируса простого герпеса, но не ограничиваются ими. Векторы, способные встраиваться в геном хозяина, включают ретровирус или лентивирус, но не ограничиваются ими.

В настоящем документе термин «единица транскрипции», «единица экспрессии» или «экспрессирующая кассета» относится к области в пределах вектора, контрукта или полинуклеотидной последовательности, содержащей один или более из генов, подлежащих транскрипции, причем гены, содержащиеся в указанном сегменте, функционально связаны друг с другом. Они транскрибируются с одного промотора, и терминация транскрипции происходит за счет одного сигнала полиаденилирования. В результате различные гены по меньшей мере транскрипционно связаны. С каждой единице транскрипции можно транскрибировать и экспрессировать более одного белка или продукта (мультицистронная единица транскрипции). Каждая единица транскрипции содержит регуляторные элементы, необходимые для транскрипции и трансляции любой выбранной последовательности, содержащейся в составе единицы, и каждая единица транскрипции может содержать одни и те же или различные регуляторные элементы. Например, каждая единица транскрипции может содержать один и тот же терминатор. Для функционального связывания генов в единице транскрипции можно использовать IRES-элемент или интроны. Вектор или полинуклеотидная последовательность могут содержать более одной единицы транскрипции.

В настоящем документе термин “повреждение скелетной мышцы” относится к любым повреждениям и разрывам скелетных мышц, предпочтительно разрывам скелетных мышц, вызванным эксцентричными сокращениями, растяжениями и избыточной нагрузкой на мышцы. В принципе, любая скелетная мышца может быть подвержена такому повреждению или разрыву. Повреждение скелетных мышц предпочтительно представляют собой повреждения и разрывы скелетных мышц, причем скелетные мышцы выбраны из групп мышц головы, шеи, грудной клетки, спины, живота, таза, рук, ног и бедра.

- Более предпочтительные повреждения скелетных мышц представляют собой повреждения и разрывы, причем скелетные мышцы выбраны из группы, состоящей из подошвенной, височной, сосочковой, большой грудной, задней большеберцовой, передней большеберцовой, икроножной, клювовидно-плечевой мышцы, диафрагмы, длинной ладонной мышцы, прямой мышцы живота, наружного сфинктера прямой кишки, внутреннего сфинктера прямой кишки, подлопаточной, двуглавой, трехглавой, четырехглавой, икроножной, паховых мышц, задних мышц бедра, дельтовидной, большой круглой, надостной, подостной, малой круглой, подлопаточной мышц, прямой мышцы бедра, прямой мышцы живота, наружной косой мышцы живота, жевательной, трапециевидной мышц, широчайшей мышцы спины, грудной мышцы, мышцы, разгибающей позвоночник, подвздошно-реберной, длинной, остистой мышц, широчайшей мышцы спины, поперечно-остистой мышцы, полуостистой мышцы спины, полуостистой мышцы шеи, полуостистой мышцы головы, многораздельной мышцы, вращательных мышц, межостистых мышц, межпоперечных мышц, ременной мышцы головы, ременной мышцы шеи, межреберных мышц, подреберных мышц, поперечной мышцы груди, мышц, поднимающих ребра, задней нижней лестничной, задней верхней лестничной мышц, поперечной мышцы живота, прямой мышцы живота, пирамидальной мышцы, мышцы, поддерживающей яичко, квадратной мышцы поясницы, наружной косой, внутренней косой мышц.
- Еще более предпочтительные повреждения скелетных мышц представляют собой повреждения и разрывы, причем скелетные мышцы выбраны из группы, состоящей из подошвенной, височной, сосочковой, большой грудной, задней большеберцовой, передней большеберцовой, икроножной, клювовидно-плечевой мышцы, диафрагмы, длинной ладонной мышцы, прямой мышцы живота, наружного сфинктера прямой кишки, внутреннего сфинктера прямой кишки, подлопаточной, двуглавой, трехглавой, четырехглавой, икроножной, паховых мышц, задних мышц бедра, дельтовидной, большой круглой, надостной, подостной, малой круглой, подлопаточной мышц, прямой мышцы бедра, прямой мышцы живота, наружной косой мышцы живота, жевательной, трапециевидной мышц, широчайшей мышцы спины, грудной мышцы.
- Предпочтительно любые повреждения и разрывы скелетной мышцы, предпочтительно разрывы скелетных мышц, вызванные эксцентрическим сокращением, растяжением и избыточной нагрузкой на мышцы, лечат с использованием способа согласно настоящему изобретению.

В первом аспекте настоящего изобретения предложена мРНК, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую белок и сигнальный пептид, причем аминокислоты 1-9 с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида характеризуются средним показателем гидрофобности выше 2, причем указанный

5 сигнальный пептид выбран из группы, состоящей из

i) сигнального пептида, гетерологичного указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, необязательно модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, при условии, что указанный белок не является оксидоредуктазой;

10 ii) сигнального пептида, гомологичного указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты; и

iii) природной аминокислотной последовательности, не обладающей функцией сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная

15 последовательность необязательно модифицирована путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты.

В одном варианте реализации мРНК содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую белок и сигнальный пептид, причем аминокислоты 1-9 с N-конца

аминокислотной последовательности сигнального пептида характеризуются средним

20 показателем гидрофобности выше 2, причем указанный сигнальный пептид выбран из группы, состоящей из

i) сигнального пептида, гетерологичного указанному белку, при условии, что указанный белок не является оксидоредуктазой, или сигнального пептида,

гетерологичного указанному белку, модифицированного путем инсерции, делеции

25 и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, при условии, что указанный белок не является ;

ii) сигнального пептида, гомологичного указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты; и

30 iii) природной аминокислотной последовательности, не обладающей функцией сигнального пептида в природе, или природной аминокислотной последовательности, не обладающей функцией сигнального пептида в природе, модифицированной путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты.

В дополнительном варианте реализации мРНК содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую белок и сигнальный пептид, причем аминокислоты 1-9 с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида характеризуются средним показателем гидрофобности выше 2, причем указанный

5 сигнальный пептид выбран из группы, состоящей из

i) сигнального пептида, гетерологичного указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, при условии, что указанный белок не является оксидоредуктазой;

10 ii) сигнального пептида, гомологичного указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты; и

iii) природной аминокислотной последовательности, не обладающей функцией сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная

15 последовательность необязательно модифицирована путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты.

В дополнительном варианте реализации мРНК содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую белок и сигнальный пептид, причем аминокислоты 1-9 с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида

20 характеризуются средним показателем гидрофобности выше 2, причем указанный сигнальный пептид выбран из группы, состоящей из

i) сигнального пептида, гетерологичного указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, необязательно модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, при

25 условии, что указанный белок не является оксидоредуктазой;

ii) сигнального пептида, гомологичного указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты; и

iii) природной аминокислотной последовательности, не обладающей функцией сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная

30 последовательность модифицирована путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты.

В дополнительном варианте реализации мРНК содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую белок и сигнальный пептид, причем аминокислоты 1-9 с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида характеризуются средним показателем гидрофобности выше 2, причем указанный

5 сигнальный пептид выбран из группы, состоящей из

i) сигнального пептида, гетерологичного указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, при условии, что указанный белок не является оксидоредуктазой;

10 ii) сигнального пептида, гомологичного указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты; и

iii) природной аминокислотной последовательности, не обладающей функцией сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная

15 последовательность модифицирована путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты.

В дополнительном варианте реализации мРНК содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую белок и сигнальный пептид, причем аминокислоты 1-9 с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида

20 характеризуются средним показателем гидрофобности выше 2, причем указанный сигнальный пептид выбран из группы, состоящей из

i) сигнального пептида, гетерологичного указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, необязательно модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, при

25 условии, что указанный белок не является оксидоредуктазой; и

ii) сигнального пептида, гомологичного указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты.

В дополнительном варианте реализации мРНК содержит нуклеотидную

30 последовательность, кодирующую белок и сигнальный пептид, причем аминокислоты 1-9 с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида

характеризуются средним показателем гидрофобности выше 2, причем указанный сигнальный пептид выбран из группы, состоящей из

i) сигнального пептида, гетерологичного указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, необязательно модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, при условии, что указанный белок не является оксидоредуктазой; и

- 5 iii) природной аминокислотной последовательности, не обладающей функцией сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная последовательность необязательно модифицирована путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты.

В дополнительном варианте реализации мРНК содержит нуклеотидную

- 10 последовательность, кодирующую белок и сигнальный пептид, причем аминокислоты 1-9 с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида характеризуются средним показателем гидрофобности выше 2, причем указанный сигнальный пептид выбран из группы, состоящей из

- ii) сигнального пептида, гомологичного указанному белку, причем указанный
15 сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты; и
iii) природной аминокислотной последовательности, не обладающей функцией
сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная
последовательность необязательно модифицирована путем инсерции, делеции и/или
20 замены по меньшей мере одной аминокислоты.

В дополнительном варианте реализации мРНК содержит нуклеотидную

- последовательность, кодирующую белок и сигнальный пептид, причем аминокислоты
1-9 с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида
характеризуются средним показателем гидрофобности выше 2, причем указанный
25 сигнальный пептид представляет собой сигнальный пептид, гетерологичный
указанному белку, причем сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку,
необязательно модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей
мере одной аминокислоты, при условии, что указанный белок не является
оксидоредуктазой.

- 30 В дополнительном варианте реализации мРНК содержит нуклеотидную
последовательность, кодирующую белок и сигнальный пептид, причем аминокислоты
1-9 с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида
характеризуются средним показателем гидрофобности выше 2, причем указанный

сигнальный пептид представляет собой сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, причем сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты.

- В дополнительном варианте реализации мРНК содержит нуклеотидную
- 5 последовательность, кодирующую белок и сигнальный пептид, причем аминокислоты 1-9 с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида характеризуются средним показателем гидрофобности выше 2, причем указанный
- сигнальный пептид представляет собой природную аминокислотную
- 10 последовательность, не обладающую функцией сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная последовательность необязательно модифицирована путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты.

- В дополнительном варианте реализации мРНК содержит нуклеотидную
- 15 последовательность, кодирующую белок и сигнальный пептид, причем аминокислоты 1-7 с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида характеризуются средним показателем гидрофобности выше 1,5, причем указанный
- сигнальный пептид выбран из группы, состоящей из
- i) сигнального пептида, гетерологичного указанному белку, причем указанный
- 20 сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, необязательно модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, при условии, что указанный белок не является оксидоредуктазой;
- ii) сигнального пептида, гомологичного указанному белку, причем указанный
- сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, модифицирован путем инсерции,
- 25 делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты; и
- iii) природной аминокислотной последовательности, не обладающей функцией сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная последовательность необязательно модифицирована путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты.
- 30 В одном варианте реализации мРНК содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую белок и сигнальный пептид, причем аминокислоты 1-7 с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида характеризуются средним

показателем гидрофобности выше 1,5, причем указанный сигнальный пептид выбран из группы, состоящей из

i) сигнального пептида, гетерологичного указанному белку, при условии, что указанный белок не является оксидоредуктазой, или сигнального пептида,

5 гетерологичного указанному белку, модифицированного путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, при условии, что указанный белок не является ;

ii) сигнального пептида, гомологичного указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, модифицирован путем инсерции,

10 делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты; и

iii) природной аминокислотной последовательности, не обладающей функцией сигнального пептида в природе, или природной аминокислотной последовательности, не обладающей функцией сигнального пептида в природе, модифицированной путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты.

15 В дополнительном варианте реализации мРНК содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую белок и сигнальный пептид, причем аминокислоты 1-7 с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида характеризуются средним показателем гидрофобности выше 1,5, причем указанный сигнальный пептид выбран из группы, состоящей из

20 i) сигнального пептида, гетерологичного указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, при условии, что указанный белок не является оксидоредуктазой;

ii) сигнального пептида, гомологичного указанному белку, причем указанный

25 сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты; и

iii) природной аминокислотной последовательности, не обладающей функцией сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная последовательность необязательно модифицирована путем инсерции, делеции и/или

30 замены по меньшей мере одной аминокислоты.

В дополнительном варианте реализации мРНК содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую белок и сигнальный пептид, причем аминокислоты 1-7 с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида

характеризуются средним показателем гидрофобности выше 1,5, причем указанный сигнальный пептид выбран из группы, состоящей из

- i) сигнального пептида, гетерологичного указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, необязательно модифицирован
- 5 путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, при условии, что указанный белок не является оксидоредуктазой;
- ii) сигнального пептида, гомологичного указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты; и
- 10 iii) природной аминокислотной последовательности, не обладающей функцией сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная последовательность модифицирована путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты.

В дополнительном варианте реализации мРНК содержит нуклеотидную

15 последовательность, кодирующую белок и сигнальный пептид, причем аминокислоты 1-7 с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида характеризуются средним показателем гидрофобности выше 1,5, причем указанный сигнальный пептид выбран из группы, состоящей из

- i) сигнального пептида, гетерологичного указанному белку, причем указанный
- 20 сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, при условии, что указанный белок не является оксидоредуктазой;
- ii) сигнального пептида, гомологичного указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, модифицирован путем инсерции,
- 25 делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты; и
- iii) природной аминокислотной последовательности, не обладающей функцией сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная последовательность модифицирована путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты.

30 В дополнительном варианте реализации мРНК содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую белок и сигнальный пептид, причем аминокислоты 1-7 с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида

характеризуются средним показателем гидрофобности выше 1,5, причем указанный сигнальный пептид выбран из группы, состоящей из

- i) сигнального пептида, гетерологичного указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, необязательно модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, при условии, что указанный белок не является оксидоредуктазой; и
- ii) сигнального пептида, гомологичного указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты.

10 В дополнительном варианте реализации мРНК содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую белок и сигнальный пептид, причем аминокислоты 1-7 с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида характеризуются средним показателем гидрофобности выше 1,5, причем указанный сигнальный пептид выбран из группы, состоящей из

- 15 i) сигнального пептида, гетерологичного указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, необязательно модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, при условии, что указанный белок не является оксидоредуктазой; и
 - iii) природной аминокислотной последовательности, не обладающей функцией
- 20 сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная последовательность необязательно модифицирована путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты.

В дополнительном варианте реализации мРНК содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую белок и сигнальный пептид, причем аминокислоты

25 1-7 с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида характеризуются средним показателем гидрофобности выше 1,5, причем указанный сигнальный пептид выбран из группы, состоящей из

- ii) сигнального пептида, гомологичного указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты; и
 - 30 iii) природной аминокислотной последовательности, не обладающей функцией
- сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная

последовательность необязательно модифицирована путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты.

В дополнительном варианте реализации мРНК содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую белок и сигнальный пептид, причем аминокислоты 1-7 с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида характеризуются средним показателем гидрофобности выше 1,5, причем указанный сигнальный пептид представляет собой сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, причем сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, необязательно модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, при условии, что указанный белок не является оксидоредуктазой.

В дополнительном варианте реализации мРНК содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую белок и сигнальный пептид, причем аминокислоты 1-7 с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида характеризуются средним показателем гидрофобности выше 1,5, причем указанный сигнальный пептид представляет собой сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, причем сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты.

В дополнительном варианте реализации мРНК содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую белок и сигнальный пептид, причем аминокислоты 1-7 с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида характеризуются средним показателем гидрофобности выше 1,5, причем указанный сигнальный пептид представляет собой природную аминокислотную последовательность, не обладающую функцией сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная последовательность необязательно модифицирована путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты.

В дополнительном варианте реализации мРНК содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую белок и сигнальный пептид, причем аминокислоты 1-5 с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида характеризуются средним показателем гидрофобности выше 1,3, причем указанный сигнальный пептид выбран из группы, состоящей из

- i) сигнального пептида, гетерологичного указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, необязательно модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, при условии, что указанный белок не является оксидоредуктазой;
- 5 ii) сигнального пептида, гомологичного указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты; и
- iii) природной аминокислотной последовательности, не обладающей функцией сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная
- 10 последовательность необязательно модифицирована путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты.

В одном варианте реализации мРНК содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую белок и сигнальный пептид, причем аминокислоты 1-5 с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида характеризуются средним

15 показателем гидрофобности выше 1,3, причем указанный сигнальный пептид выбран из группы, состоящей из

- i) сигнального пептида, гетерологичного указанному белку, при условии, что указанный белок не является оксидоредуктазой, или сигнального пептида, гетерологичного указанному белку, модифицированного путем инсерции, делеции
- 20 и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, при условии, что указанный белок не является ;
- ii) сигнального пептида, гомологичного указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты; и
- 25 iii) природной аминокислотной последовательности, не обладающей функцией сигнального пептида в природе, или природной аминокислотной последовательности, не обладающей функцией сигнального пептида в природе, модифицированной путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты.

В дополнительном варианте реализации мРНК содержит нуклеотидную

30 последовательность, кодирующую белок и сигнальный пептид, причем аминокислоты 1-5 с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида характеризуются средним показателем гидрофобности выше 1,3, причем указанный сигнальный пептид выбран из группы, состоящей из

- i) сигнального пептида, гетерологичного указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, при условии, что указанный белок не является оксидоредуктазой;
- 5 ii) сигнального пептида, гомологичного указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты; и
- iii) природной аминокислотной последовательности, не обладающей функцией
- 10 сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная последовательность необязательно модифицирована путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты.

- В дополнительном варианте реализации мРНК содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую белок и сигнальный пептид, причем аминокислоты 1-5 с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида
- 15 характеризуются средним показателем гидрофобности выше 1,3, причем указанный сигнальный пептид выбран из группы, состоящей из
- i) сигнального пептида, гетерологичного указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, необязательно модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, при
- 20 условии, что указанный белок не является оксидоредуктазой;
- ii) сигнального пептида, гомологичного указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты; и
- iii) природной аминокислотной последовательности, не обладающей функцией
- 25 сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная последовательность модифицирована путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты.
- В дополнительном варианте реализации мРНК содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую белок и сигнальный пептид, причем аминокислоты
- 30 1-5 с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида характеризуются средним показателем гидрофобности выше 1,3, причем указанный сигнальный пептид выбран из группы, состоящей из

i) сигнального пептида, гетерологичного указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, при условии, что указанный белок не является оксидоредуктазой;

5 ii) сигнального пептида, гомологичного указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты; и

10 iii) природной аминокислотной последовательности, не обладающей функцией сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная последовательность модифицирована путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты.

В одном варианте реализации мРНК содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую белок и сигнальный пептид, причем аминокислоты 1-5 с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида характеризуются средним показателем гидрофобности выше 1,3, причем указанный сигнальный пептид выбран из группы, состоящей из

15 i) сигнального пептида, гетерологичного указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, необязательно модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, при условии, что указанный белок не является оксидоредуктазой; и

20 ii) сигнального пептида, гомологичного указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты.

В дополнительном варианте реализации мРНК содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую белок и сигнальный пептид, причем аминокислоты 1-5 с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида характеризуются средним показателем гидрофобности выше 1,3, причем указанный сигнальный пептид выбран из группы, состоящей из

25 i) сигнального пептида, гетерологичного указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, необязательно модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, при условии, что указанный белок не является оксидоредуктазой; и

30 ii) сигнального пептида, гомологичного указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты.

iii) природной аминокислотной последовательности, не обладающей функцией сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная последовательность необязательно модифицирована путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты.

- 5 В дополнительном варианте реализации мРНК содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую белок и сигнальный пептид, причем аминокислоты 1-5 с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида характеризуются средним показателем гидрофобности выше 1,3, причем указанный сигнальный пептид выбран из группы, состоящей из
- 10 ii) сигнального пептида, гомологичного указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты; и
- iii) природной аминокислотной последовательности, не обладающей функцией сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная
- 15 последовательность необязательно модифицирована путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты.
- В дополнительном варианте реализации мРНК содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую белок и сигнальный пептид, причем аминокислоты 1-5 с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида
- 20 характеризуются средним показателем гидрофобности выше 1,3, причем указанный сигнальный пептид представляет собой сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, причем сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, необязательно модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, при условии, что указанный белок не является
- 25 оксидоредуктазой.
- В дополнительном варианте реализации мРНК содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую белок и сигнальный пептид, причем аминокислоты 1-5 с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида
- 30 характеризуются средним показателем гидрофобности выше 1,3, причем указанный сигнальный пептид представляет собой сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, причем сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты.

В дополнительном варианте реализации мРНК содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую белок и сигнальный пептид, причем аминокислоты 1-5 с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида характеризуются средним показателем гидрофобности выше 1,3, причем указанный

5 сигнальный пептид представляет собой природную аминокислотную последовательность, не обладающую функцией сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная последовательность необязательно модифицирована путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты.

- 10 В предпочтительном варианте реализации мРНК содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую белок и сигнальный пептид, причем сигнальный пептид содержит или состоит из аминокислотной последовательности длиной 16 - 40 аминокислот, причем аминокислоты 1-9 с N-конца указанной аминокислотной последовательности характеризуются средним показателем гидрофобности выше 2,
- 15 причем указанный сигнальный пептид выбран из группы, состоящей из
- i) сигнального пептида, гетерологичного указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, необязательно модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, при условии, что указанный белок не является оксидоредуктазой;
 - 20 ii) сигнального пептида, гомологичного указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты; и
 - iii) природной аминокислотной последовательности, не обладающей функцией сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная
 - 25 последовательность необязательно модифицирована путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты.

В дополнительном предпочтительном варианте реализации мРНК содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую белок и сигнальный пептид, причем сигнальный пептид содержит или состоит из аминокислотной последовательности

30 длиной 16 - 40 аминокислот, причем аминокислоты 1-9 с N-конца указанной аминокислотной последовательности характеризуются средним показателем гидрофобности выше 2, причем указанный сигнальный пептид выбран из группы, состоящей из

i) сигнального пептида, гетерологичного указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, необязательно модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, при условии, что указанный белок не является оксидоредуктазой; и

- 5 ii) сигнального пептида, гомологичного указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты.

В дополнительном предпочтительном варианте реализации мРНК содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую белок и сигнальный пептид, причем
10 сигнальный пептид содержит или состоит из аминокислотной последовательности длиной 16 - 40 аминокислот, причем аминокислоты 1-9 с N-конца указанной аминокислотной последовательности характеризуются средним показателем гидрофобности выше 2, причем указанный сигнальный пептид выбран из группы, состоящей из

- 15 i) сигнального пептида, гетерологичного указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, необязательно модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, при условии, что указанный белок не является оксидоредуктазой; и

- iii) природной аминокислотной последовательности, не обладающей функцией
20 сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная последовательность необязательно модифицирована путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты.

В дополнительном предпочтительном варианте реализации мРНК содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую белок и сигнальный пептид, причем
25 сигнальный пептид содержит или состоит из аминокислотной последовательности длиной 16 - 40 аминокислот, причем аминокислоты 1-9 с N-конца указанной аминокислотной последовательности характеризуются средним показателем гидрофобности выше 2, причем указанный сигнальный пептид выбран из группы, состоящей из

- 30 ii) сигнального пептида, гомологичного указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты; и

iii) природной аминокислотной последовательности, не обладающей функцией сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная последовательность необязательно модифицирована путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты.

- 5 В дополнительном предпочтительном варианте реализации мРНК содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую белок и сигнальный пептид, причем сигнальный пептид содержит или состоит из аминокислотной последовательности длиной 16 - 40 аминокислот, причем аминокислоты 1-9 с N-конца указанной аминокислотной последовательности характеризуются средним показателем
- 10 гидрофобности выше 2, причем указанный сигнальный пептид представляет собой сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, необязательно модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, при условии, что указанный белок не является оксидоредуктазой.
- 15 В дополнительном предпочтительном варианте реализации мРНК содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую белок и сигнальный пептид, причем сигнальный пептид содержит или состоит из аминокислотной последовательности длиной 16 - 40 аминокислот, причем аминокислоты 1-9 с N-конца указанной аминокислотной последовательности характеризуются средним показателем
- 20 гидрофобности выше 2, причем указанный сигнальный пептид представляет собой сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты.
- В дополнительном предпочтительном варианте реализации мРНК содержит
- 25 нуклеотидную последовательность, кодирующую белок и сигнальный пептид, причем сигнальный пептид содержит или состоит из аминокислотной последовательности длиной 16 - 40 аминокислот, причем аминокислоты 1-16 с N-конца указанной аминокислотной последовательности характеризуются средним показателем гидрофобности выше 2, причем указанный сигнальный пептид представляет собой
- 30 природную аминокислотную последовательность, не обладающую функцией сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная последовательность необязательно модифицирована путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты.

- В еще одном варианте реализации сигнальный пептид выбран из группы, состоящей из
- i) сигнального пептида, гетерологичного указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, необязательно модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, при условии, что указанный белок не является оксидоредуктазой;
 - ii) сигнального пептида, гомологичного указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты; и
 - iii) природной аминокислотной последовательности, не обладающей функцией
- сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная последовательность необязательно модифицирована путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, причем указанную модификацию путем инсерции, делеции или замены по меньшей мере одной аминокислоты получают в пределах 1-11 аминокислот, предпочтительно в пределах 1-10 аминокислот, более предпочтительно - в пределах 1-9 аминокислот, еще более предпочтительно - в пределах 1-8 аминокислот, в частности, в пределах 1-7 аминокислот, конкретнее - в пределах 1-6 аминокислот, еще конкретнее - в пределах 1-5 аминокислот, в особенности предпочтительно - в пределах 1-4 аминокислот, еще предпочтительнее - в пределах 1-3 аминокислот, еще предпочтительнее - в пределах 1-2 аминокислот от N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида.
- В настоящем документе термины “гидрофобный показатель” или “показатель гидрофобности” используются в качестве синонимов термина “индекс гидрофобности” и относятся к степени гидрофобности аминокислоты, рассчитанной по шкале Кайта-Дулитла (Kyte J., Doolittle R.F.; J. Mol. Biol. 157:105-132(1982)). Показатели гидрофобности аминокислот по шкале Кайта-Дулитла составляют:

Аминокислота	Однобуквенный код	Показатель гидрофобности
Изолейцин	I	4,5
Валин	V	4,2
Лейцин	L	3,8
Фенилаланин	F	2,8
Цистеин	C	2,5
Метионин	M	1,9
Аланин	A	1,8
Глицин	G	-0,4

Треонин	T	-0,7
Серин	S	-0,8
Триптофан	W	-0,9
Тирозин	Da	-1,3
Пролин	P	-1,6
Гистидин	H	-3,2
Глутаминовая кислота	E	-3,5
Глутамин	Q	-3,5
Аспарагиновая кислота	D	-3,5
Аспарагин	N	-3,5
Лизин	K	-3,9
Аргинин	R	-4,5

”Средний показатель гидрофобности” аминокислотной последовательности, например, средний показатель гидрофобности 1-9 аминокислот с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида рассчитывают путем сложения показателя гидрофобности каждой аминокислоты аминокислотной последовательности по шкале Кайта-Дулитла, например, показателя гидрофобности каждой из девяти аминокислот из 1-9 аминокислот с N-конца, и деления на количество аминокислот, например, деления на девять.

- 5 В одном варианте реализации настоящего изобретения 1-9 аминокислоты с N-конца аминокислотной последовательности характеризуются средним показателем гидрофобности, равным или превышающим 2,05, предпочтительно равным или превышающим 2,1, более предпочтительно - равным или превышающим 2,15, еще более предпочтительно - равным или превышающим 2,2, в частности, равным или
- 10 превышающим 2,25, конкретнее, равным или превышающим 2,3, еще конкретнее - равным или превышающим 2,35. В дополнительном варианте реализации 1-9 аминокислоты с N-конца аминокислотной последовательности характеризуются средним показателем гидрофобности между 2,05 и 4,5, предпочтительно между 2,1 и 4,5, более предпочтительно - между 2,15 и 4,5, еще более предпочтительно - между 2,2
- 15 и 4,5, в частности, между 2,25 и 4,5, конкретнее, между 2,3 и 4,5, еще конкретнее - между 2,35 и 4,5. В дополнительном варианте реализации 1-9 аминокислоты с N-конца аминокислотной последовательности характеризуются средним показателем гидрофобности между 2,05 и 4,0, предпочтительно между 2,1 и 4,0, более
- 20

предпочтительно - между 2,15 и 4,0, еще более предпочтительно - между 2,2 и 4,0, в частности, между 2,25 и 4,0, конкретнее, между 2,3 и 4,0, еще конкретнее - между 2,35 и 4,0.

В одном варианте реализации настоящего изобретения средний показатель гидрофобности последних девяти аминокислот с С-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида по меньшей мере на 1,0 единицу ниже, предпочтительно по меньшей мере на 1,1 единицы ниже, более предпочтительно - по меньшей мере на 1,2 единицы ниже, еще более предпочтительно - по меньшей мере на 1,3 единицы ниже, в частности, на 1,0 - 4 единицы ниже, конкретнее - на 1,1 - 4 единицы ниже, еще конкретнее - на 1,2 - 4 единицы ниже, наиболее конкретно - на 1,3 - 4 единицы ниже среднего показателя гидрофобности 1-9 аминокислот с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида.

В одном варианте реализации настоящего изобретения каждая из 1-9 аминокислот, 2-10 аминокислот, 3-11 аминокислот, 4-12 аминокислот и 5-13 аминокислот с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида характеризуется средним показателем гидрофобности более 1,5, предпочтительно средним показателем гидрофобности более 1,6, более предпочтительно - средним показателем гидрофобности более 1,7, еще более предпочтительно - средним показателем гидрофобности более 1,8, еще более предпочтительно - средним показателем гидрофобности более 1,9, в частности, средним показателем гидрофобности между 1,5 и 4,5, конкретнее - средним показателем гидрофобности между 1,6 и 4,5, еще конкретнее - средним показателем гидрофобности между 1,7 и 4,5, еще конкретнее - средним показателем гидрофобности между 1,8 и 4,5, наиболее конкретно - средним показателем гидрофобности между 1,9 и 4,5.

В одном варианте реализации настоящего изобретения средний показатель гидрофобности 8-16 аминокислот с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида по меньшей мере равен или ниже, предпочтительно по меньшей мере на 0,4 единицы ниже, более предпочтительно - на 0,4 - 2,0 единицы ниже среднего показателя гидрофобности 3-11 аминокислот с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида.

В одном варианте реализации настоящего изобретения сигнальный пептид содержит или состоит из аминокислотной последовательности длиной 18 - 40 аминокислот, причем средний показатель гидрофобности 10-18 аминокислот с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида по меньшей мере на 0,5 единицы, предпочтительно - на 0,5 - 3,0 единицы ниже среднего показателя гидрофобности 3-11 аминокислот с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида.

В одном варианте реализации настоящего изобретения средний показатель гидрофобности последних девяти аминокислот с C-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида по меньшей мере на 1,5 единицы, предпочтительно - на 1,5 - 3,5 единицы ниже среднего показателя гидрофобности 3-11 аминокислот с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида.

В одном варианте реализации настоящего изобретения средний показатель гидрофобности любых 9 следующих друг за другом аминокислот в аминокислотной последовательности сигнального пептида не превышает 4,1.

В одном варианте реализации настоящего изобретения последние девять аминокислот с C-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида содержат по меньшей мере одну аминокислоту с отрицательным показателем гидрофобности, предпочтительно последние девять аминокислот с C-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида содержат аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из G, Q, N, T, S, R, K, H, D, E, P, Y и W.

В одном варианте реализации настоящего изобретения вторая аминокислота из 1-9 аминокислот с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида выбрана из группы, состоящей из P, Y, W, S, T, G, A, M, C, F, L, V и I.

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения вторая аминокислота из 1-9 аминокислот с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида выбрана из группы, состоящей из A, L, S, T, V и W.

В одном варианте реализации настоящего изобретения 1-9 аминокислоты с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида характеризуются средней

полярностью, равной 6,1 или ниже, предпочтительно средней полярностью ниже 6,1, более предпочтительно - средней полярностью ниже 4, еще более предпочтительно - средней полярностью ниже 2, в частности, средней полярностью между 6,1 и 0, конкретнее - средней полярностью между 4 и 0, еще конкретнее - средней полярностью между 2 и 0, наиболее конкретно - средней полярностью между 1 и 0,2.

В одном варианте реализации настоящего изобретения 1-7 аминокислоты с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида характеризуется средней полярностью, равной 6,1 или ниже, предпочтительно средней полярностью ниже 6,1, более предпочтительно - средней полярностью ниже 4, еще более предпочтительно - средней полярностью ниже 2, в частности, средней полярностью между 6,1 и 0, конкретнее - средней полярностью между 4 и 0, еще конкретнее - средней полярностью между 2 и 0, наиболее конкретно - средней полярностью между 1 и 0,2.

В одном варианте реализации настоящего изобретения 1-5 аминокислоты с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида характеризуется средней полярностью, равной 6,1 или ниже, предпочтительно средней полярностью ниже 6,1, более предпочтительно - средней полярностью ниже 4, еще более предпочтительно - средней полярностью ниже 2, в частности, средней полярностью между 6,1 и 0, конкретнее - средней полярностью между 4 и 0, еще конкретнее - средней полярностью между 2 и 0, наиболее конкретно - средней полярностью между 1,1 и 0,2.

Полярность рассчитывают согласно индексу полярности Циммермана (Zimmerman J.M., Eliezer N., Simha R.; J. Theor. Biol. 21:170-201(1968)). "Среднюю полярность" аминокислотной последовательности, например, среднюю полярность 1-9 аминокислот с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида рассчитывают путем сложения значения полярности каждой аминокислоты аминокислотной последовательности, рассчитанного согласно индексу полярности Циммермана, например, средней полярности каждой из девяти аминокислот из 1-9 аминокислот с N-конца, и деления на количество аминокислот, например, деления на девять. Полярность аминокислот согласно индексу полярности Циммермана приведена ниже:

Аминокислота	Однобуквенный код	Полярность
Изолейцин	I	0,13

Валин	V	0,13
Лейцин	L	0,13
Фенилаланин	F	0,35
Цистеин	C	1,48
Метионин	M	1,43
Аланин	A	0
Глицин	G	0
Треонин	T	1,66
Серин	S	1,67
Триптофан	W	2,1
Тирозин	Да	1,61
Пролин	P	1,58
Гистидин	H	51,6
Глутаминовая кислота	E	49,9
Глутамин	Q	3,53
Аспарагиновая кислота	D	49,7
Аспарагин	N	3,38
Лизин	K	49,5
Аргинин	R	52

Вышеупомянутый средний показатель гидрофобности или среднюю полярность аминокислотной последовательности сигнального пептида можно рассчитать, используя общедоступную сетевую базу данных **ProtScale**

- 5 (<http://www.expasy.org/tools/protscale.html>), ссылка на которую приведена в справочнике Gasteiger E. et al. (Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A.; Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server; (In) John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press (2005).pp. 571-607) вместе с выбором гидрофобности по шкале Кайта и Дулитла (“Hphob. / Kyte &
- 10 Doolittle”) или полярности по шкале Циммермана (“Polarity / Zimmerman”) и настроек, соответствующих конкретному размеру окна (например, размеру окна в 9 аминокислот) сигнального пептида, причем относительное весовое значение границы окна задано равным 100%, и без нормировки шкалы. Соответствующее численное значение можно получить, открыв ссылку ‘Numerical format (verbose)’ (Численный формат (подробно))
- 15 на странице результатов.

В одном варианте реализации настоящего изобретения мРНК содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую белок и сигнальный пептид, причем 1-7 аминокислоты с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида характеризуются средним показателем гидрофобности выше 1,7. В одном варианте реализации мРНК содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую белок и сигнальный пептид, причем 1-7 аминокислоты с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида характеризуются средним показателем гидрофобности выше 1,7, а указанный сигнальный пептид содержит или состоит из аминокислотной последовательности длиной от 14 до 40 аминокислот.

10

В одном варианте реализации настоящего изобретения 1-7 аминокислоты с N-конца аминокислотной последовательности характеризуются средним показателем гидрофобности, равным или превышающим 1,6, предпочтительно равным или превышающим 1,7, более предпочтительно - равным или превышающим 1,75, еще более предпочтительно - равным или превышающим 1,8, в частности, равным или превышающим 2,0, конкретнее, равным или превышающим 2,1, еще конкретнее - равным или превышающим 2,2. В дополнительном варианте реализации 1-7 аминокислоты с N-конца аминокислотной последовательности характеризуются средним показателем гидрофобности между 1,6 и 4,5, предпочтительно между 1,7 и 4,5, более предпочтительно - между 1,75 и 4,5, еще более предпочтительно - между 1,8 и 4,5, в частности, между 2,0 и 4,5, конкретнее, между 2,1 и 4,5, еще конкретнее - между 2,2 и 4,5. В дополнительном варианте реализации 1-7 аминокислоты с N-конца аминокислотной последовательности характеризуются средним показателем гидрофобности между 1,6 и 4,0, предпочтительно между 1,7 и 4,0, более предпочтительно - между 1,75 и 4,0, еще более предпочтительно - между 1,8 и 4,0, в частности, между 2,0 и 4,0, конкретнее, между 2,1 и 4,0, еще конкретнее - между 2,2 и 4,0.

20

25

В одном варианте реализации настоящего изобретения средний показатель гидрофобности последних семи аминокислот с C-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида равен или уступает среднему показателю гидрофобности 1-7 аминокислот с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида, предпочтительно по меньшей мере на 0,06 единицы ниже, более предпочтительно - по меньшей мере на 1,0 единицы ниже, еще более предпочтительно -

30

по меньшей мере на 1,1 единицы ниже, в частности, по меньшей мере на 1,2 единицы ниже, конкретнее - на 1,0 - 4 единицы ниже, еще конкретнее - на 1,0 - 4 единицы ниже, наиболее конкретно - на 1,2 - 4 единицы ниже.

В одном варианте реализации настоящего изобретения каждая из 1-7 аминокислот, 2-8
 5 аминокислот, 3-9 аминокислот, 4-10 аминокислот и 5-11 аминокислот с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида характеризуется средним показателем гидрофобности более 1,4, предпочтительно средним показателем гидрофобности более 1,5, более предпочтительно - средним показателем гидрофобности более 1,6, еще более предпочтительно - средним показателем
 10 гидрофобности более 1,7, еще более предпочтительно - средним показателем гидрофобности более 1,75, в частности, средним показателем гидрофобности между 1,4 и 4,5, конкретнее - средним показателем гидрофобности между 1,5 и 4,5, еще конкретнее - средним показателем гидрофобности между 1,6 и 4,5, еще конкретнее - средним показателем гидрофобности между 1,7 и 4,5, наиболее конкретно - средним
 15 показателем гидрофобности между 1,75 и 4,5.

В одном варианте реализации настоящего изобретения средний показатель гидрофобности последних семи аминокислот с C-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида по меньшей мере на 1,0 единицы, предпочтительно - на 1,0 - 3,6 единицы ниже среднего показателя гидрофобности 3-9
 20 аминокислот с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида.

В одном варианте реализации настоящего изобретения средний показатель гидрофобности любых 7 следующих друг за другом аминокислот в аминокислотной последовательности сигнального пептида не превышает 4,1.

В одном варианте реализации настоящего изобретения последние семь аминокислот с
 25 C-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида содержат по меньшей мере одну аминокислоту с отрицательным показателем гидрофобности, предпочтительно последние семь аминокислот с C-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида содержат аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из G, Q, N, T, S, R, K, H, D, E, P, Y и W.

В одном варианте реализации настоящего изобретения вторая аминокислота из 1-7
 30 аминокислот с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида выбрана из группы, состоящей из P, Y, W, S, T, G, A, M, C, F, L, V и I.

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения вторая

аминокислота из 1-7 аминокислот с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида выбрана из группы, состоящей из A, L, S, T, V и W.

В одном варианте реализации настоящего изобретения мРНК содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую белок и сигнальный пептид, причем 1-5

- 5 аминокислоты с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида характеризуются средним показателем гидрофобности выше 1,3 единицы. В одном варианте реализации мРНК содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую белок и сигнальный пептид, причем 1-5 аминокислоты с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида характеризуются средним показателем
- 10 гидрофобности выше 1,3, а указанный сигнальный пептид содержит или состоит из аминокислотной последовательности длиной от 12 до 40 аминокислот.

В одном варианте реализации настоящего изобретения 1-5 аминокислоты с N-конца аминокислотной последовательности характеризуются средним показателем гидрофобности, равным или превышающим 1,0, предпочтительно равным или

- 15 превышающим 1,1, более предпочтительно - равным или превышающим 1,2, еще более предпочтительно - равным или превышающим 1,25, в частности, равным или превышающим 1,3, конкретнее, равным или превышающим 1,35, еще конкретнее - равным или превышающим 1,38. В дополнительном варианте реализации 1-5 аминокислоты с N-конца аминокислотной последовательности характеризуются
- 20 средним показателем гидрофобности между 1 и 4,5, предпочтительно между 1,1 и 4,5, более предпочтительно - между 1,2 и 4,5, еще более предпочтительно - между 1,25 и 4,5, в частности, между 1,3 и 4,5, конкретнее, между 1,35 и 4,5, еще конкретнее - между 1,38 и 4,5. В дополнительном варианте реализации 1-5 аминокислоты с N-конца аминокислотной последовательности характеризуются средним показателем
- 25 гидрофобности между 1,0 и 4,0, предпочтительно между 1,1 и 4,0, более предпочтительно - между 1,2 и 4,0, еще более предпочтительно - между 1,25 и 4,0, в частности, между 1,3 и 4,0, конкретнее, между 1,35 и 4,0, еще конкретнее - между 1,38 и 4,0.

В одном варианте реализации настоящего изобретения средний показатель

- 30 гидрофобности последних пяти аминокислот с C-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида по меньшей мере на 0,2 единицу ниже, предпочтительно по меньшей мере на 0,24 единицы ниже, более предпочтительно - по меньшей мере на 1,0 единицы ниже, еще более предпочтительно - по меньшей мере на

1,2 единицы ниже, в частности, на 0,2 - 4 единицы ниже, конкретнее - на 0,24 - 4 единицы ниже, еще конкретнее - на 1,0 - 4 единицы ниже, наиболее конкретно - на 1,2 - 4 единицы ниже среднего показателя гидрофобности 1-5 аминокислот с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида.

- 5 В одном варианте реализации настоящего изобретения каждая из 1-5 аминокислот, 2-6 аминокислот, 3-7 аминокислот, 4-8 аминокислот и 5-9 аминокислот с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида характеризуется средним показателем гидрофобности более 1,0, предпочтительно средним показателем гидрофобности более 1,15, более предпочтительно - средним показателем гидрофобности более 1,2, еще более предпочтительно - средним показателем гидрофобности более 1,21, еще более предпочтительно - средним показателем гидрофобности более 1,23, в частности, средним показателем гидрофобности между 1,0 и 4,5, конкретнее - средним показателем гидрофобности между 1,15 и 4,5, еще конкретнее - средним показателем гидрофобности между 1,2 и 4,5, еще конкретнее - средним показателем гидрофобности между 1,21 и 4,5, наиболее конкретно - средним показателем гидрофобности между 1,23 и 4,5.

- В одном варианте реализации настоящего изобретения средний показатель гидрофобности последних пяти аминокислот с C-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида по меньшей мере на 1,2 единицы, предпочтительно - на 1,2 - 3,0 единицы, более предпочтительно - на 1,2 - 4,3 единицы ниже среднего показателя гидрофобности 3-7 аминокислот с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида.

- В одном варианте реализации настоящего изобретения средний показатель гидрофобности любых 5 следующих друг за другом аминокислот в аминокислотной последовательности сигнального пептида не превышает 4,2, предпочтительно не превышает 4,3.

- В одном варианте реализации настоящего изобретения пять девять аминокислот с C-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида содержат по меньшей мере одну аминокислоту с отрицательным показателем гидрофобности, предпочтительно последние пять аминокислот с C-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида содержат аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из G, Q, N, T, S, R, K, H, D, E, P, Y и W.

В одном варианте реализации настоящего изобретения вторая аминокислота из 1-9 аминокислот с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида выбрана из группы, состоящей из P, Y, W, S, T, G, A, M, C, F, L, V и I.

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения вторая
5 аминокислота из 1-9 аминокислот с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида выбрана из группы, состоящей из A, L, S, T, V и W.

В одном варианте реализации настоящего изобретения сигнальный пептид представляет собой i) сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, необязательно
10 модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены менее чем 50% от количества аминокислот в аминокислотной последовательности сигнального пептида, гетерологичного указанному белку.

В одном варианте реализации настоящего изобретения сигнальный пептид представляет собой i) сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, причем
15 указанный сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, необязательно модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, причем модифицированный сигнальный пептид содержит аминокислотную последовательность, отличающуюся от аминокислотной последовательности сигнального пептида, гетерологичного указанному белку, не
20 содержащей модификации, на одну, предпочтительно на две, более предпочтительно на три, еще более предпочтительно на четыре, наиболее предпочтительно на пять, в частности, на шесть, конкретнее, на семь, еще конкретнее, на восемь, наиболее конкретно - на девять или десять аминокислот.

В одном варианте реализации модифицированный сигнальный пептид содержит
25 аминокислотную последовательность, отличающуюся от аминокислотной последовательности сигнального пептида, гетерологичного указанному белку, не содержащей модификации, на 1-2 аминокислоты, предпочтительно на 1-3 аминокислоты, более предпочтительно на 1-4 аминокислоты, еще более предпочтительно на 1-5 аминокислот, наиболее предпочтительно на 1-6 аминокислот, в
30 частности, на 1-7 аминокислот, конкретнее, на 1-10 аминокислот, еще конкретнее на 1-12 аминокислот, наиболее конкретно - на 1-15 аминокислот.

В одном варианте реализации модифицированный сигнальный пептид характеризуется идентичностью последовательности между 95% и 50%, предпочтительно между 95% и

60%, более предпочтительно между 95% и 70%, еще более предпочтительно между 95% и 80%, наиболее предпочтительно между 95% и 90% по отношению к аминокислотной последовательности сигнального пептида, гетерологичного указанному белку, не содержащей модификации.

- 5 В одном варианте реализации настоящего изобретения сигнальный пептид представляет собой i) сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, при условии, что модифицированный сигнальный пептид содержит аминокислотную
- 10 последовательность, отличающуюся от аминокислотной последовательности природного (гомологичного) сигнального пептида указанного белка, по меньшей мере на одну, предпочтительно по меньшей мере на две, более предпочтительно по меньшей мере на три, еще более предпочтительно по меньшей мере на четыре, наиболее предпочтительно по меньшей мере на пять, в частности, по меньшей мере на шесть,
- 15 конкретнее, по меньшей мере на семь, еще конкретнее, по меньшей мере на восемь, наиболее конкретно - по меньшей мере на девять или десять аминокислот. В одном варианте реализации модифицированный сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, предпочтительно характеризуется идентичностью последовательности по отношению к аминокислотной последовательности природного
- 20 (гомологичного) сигнального пептида указанного белка менее 95%, предпочтительно менее 90%, более предпочтительно - менее 80%, еще более предпочтительно - менее 70%, наиболее предпочтительно - менее 60%, в частности, менее 50%.

В одном варианте реализации настоящего изобретения сигнальный пептид представляет собой ii) сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, причем

25 сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, причем 1-9 аминокислоты с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида, гомологичного указанному белку, не содержащей модификации, характеризуются средним показателем гидрофобности, равным 2 и ниже, предпочтительно ниже 2.

30

В одном варианте реализации настоящего изобретения сигнальный пептид представляет собой ii) сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, причем сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, модифицирован путем инсерции,

делеции и/или замены менее чем 50% от количества аминокислот в аминокислотной последовательности сигнального пептида, гомологичного указанному белку.

В одном варианте реализации настоящего изобретения сигнальный пептид

представляет собой i) сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, причем

- 5 указанный сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, причем модифицированный сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, отличается от аминокислотной последовательности сигнального пептида, гомологичного
10 указанному белку, не содержащей модификации, на одну, предпочтительно на две, более предпочтительно на три, еще более предпочтительно на четыре, наиболее предпочтительно на пять, в частности, на шесть, конкретнее, на семь, еще конкретнее, на восемь - 12, наиболее конкретно - на девять - пятнадцать аминокислот. В одном варианте реализации модифицированный сигнальный пептид, гомологичный
15 указанному белку, отличается от аминокислотной последовательности сигнального пептида, гомологичного указанному белку, не содержащей модификации, на 1-2 аминокислоты, предпочтительно на 1-3 аминокислоты, более предпочтительно на 1-4 аминокислоты, еще более предпочтительно на 1-5 аминокислот, наиболее предпочтительно на 1-6 аминокислот, в частности, на 1-7 аминокислот, конкретнее, на 1- 1-10 аминокислот, еще конкретнее на 1-12 аминокислот, наиболее конкретно - на 1-
20 15 аминокислот.

В одном варианте реализации модифицированный сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, характеризуется идентичностью последовательности менее 95%,

предпочтительно менее 90%, более предпочтительно менее 80%, еще более

предпочтительно менее 70%, наиболее предпочтительно менее 60%, в частности, менее

- 25 50% по отношению к аминокислотной последовательности сигнального пептида, гомологичного указанному белку, не содержащей модификации.

В одном варианте реализации настоящего изобретения сигнальный пептид

представляет собой iii) природную аминокислотную последовательность, не

- 30 обладающую функцией сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная последовательность необязательно модифицирована путем инсерции, делеции и/или замены менее чем 50% от количества аминокислот в указанной природной аминокислотной последовательности.

В одном варианте реализации настоящего изобретения сигнальный пептид представляет собой iii) природную аминокислотную последовательность, не обладающую функцией сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная последовательность модифицирована путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, причем модифицированная природная аминокислотная последовательность отличается от природной аминокислотной последовательности, не содержащей модификации, на одну, предпочтительно на две, более предпочтительно на три, еще более предпочтительно на четыре, наиболее предпочтительно на пять, в частности, на шесть, конкретнее, на семь, еще конкретнее, на восемь - двенадцать, наиболее конкретно - на девять - пятнадцать аминокислот.

В одном варианте реализации модифицированная природная аминокислотная последовательность отличается от природной аминокислотной последовательности, не содержащей модификации, на 1-2 аминокислоты, предпочтительно на 1-3 аминокислоты, более предпочтительно на 1-4 аминокислоты, еще более предпочтительно на 1-5 аминокислот, наиболее предпочтительно на 1-6 аминокислот, в частности, на 1-7 аминокислот, конкретнее, на 1-10 аминокислот, еще конкретнее на 1-12 аминокислот, наиболее конкретно - на 1-15 аминокислот.

В одном варианте реализации модифицированная природная аминокислотная последовательность характеризуется идентичностью последовательности менее 95%, предпочтительно менее 90%, более предпочтительно менее 80%, еще более предпочтительно менее 70%, наиболее предпочтительно менее 60%, в частности, менее 50% по отношению к природной аминокислотной последовательности, не содержащей модификации.

В одном варианте реализации настоящего изобретения модифицированная природная аминокислотная последовательность, не обладающая функцией сигнального пептида в природе, содержит аминокислотную последовательность, отличающуюся от аминокислотной последовательности природного сигнального пептида более чем на 50%, предпочтительно более чем на 60%, более предпочтительно - более чем на 70%, еще более предпочтительно - более чем на 80%, наиболее предпочтительно - более чем на 90%, в частности, более чем на 95%. В одном варианте реализации модифицированная природная аминокислотная последовательность, не обладающая функцией сигнального пептида в природе, характеризуется идентичностью последовательности менее 100%, предпочтительно менее 95%, более предпочтительно

менее 90%, еще более предпочтительно менее 80%, наиболее предпочтительно менее 70%, в частности, менее 60%, конкретнее, менее 50% по отношению к аминокислотной последовательности природного сигнального пептида.

- 5 В одном варианте реализации настоящего изобретения сигнальный пептид представляет собой i) сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, причем сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, выбран из группы, состоящей из сигнального пептида нейротрофического фактора головного мозга (BDNF),
- 10 сигнального пептида нейротрофина-3 (NTF-3), сигнального пептида фактора роста фибробластов 5 (FGF5), сигнального пептида белка 5, связывающего инсулиноподобный фактор роста (IBP5), сигнального пептида белка 2, экспрессируемого предстательной железой и яичками (PATE2), сигнального пептида
- 15 внеклеточной супероксиддисмутазы (SOD3) и сигнального пептида белка 2, родственного фактору комплемента H (FHR2), или представляет собой i) сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, модифицированный путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, причем сигнальный
- 20 пептид, гетерологичный указанному белку, выбран из группы, состоящей из сигнального пептида лиганда 12 хемокина с C-X-C-мотивом (CXCL12), сигнального пептида инсулиноподобного фактора роста 2 (ИФР2), сигнального пептида инсулина (INS) и сигнального пептида нейротрофического фактора головного мозга (BDNF).
- В одном варианте реализации настоящего изобретения сигнальный пептид представляет собой i) сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, причем
- 25 сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, выбран из группы, состоящей из сигнального пептида нейротрофического фактора головного мозга (BDNF), представленного в SEQ ID NO: 30, сигнального пептида нейротрофина-3 (NTF-3), представленного в SEQ ID NO: 102, сигнального пептида фактора роста фибробластов 5 (FGF5), представленного в SEQ ID NO: 87, сигнального пептида белка 5, связывающего
- 30 инсулиноподобный фактор роста (IBP5), представленного в SEQ ID NO: 97, сигнального пептида белка 2, экспрессируемого предстательной железой и яичками (PATE2), представленного в SEQ ID NO: 107, сигнального пептида внеклеточной супероксиддисмутазы (SOD3), представленного в SEQ ID NO: 112, и сигнального пептида белка 2, родственного фактору комплемента H (FHR2), представленного в SEQ ID NO: 92, или представляет собой i) сигнальный пептид, гетерологичный указанному

белку, модифицированный путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, причем модифицированный сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, выбран из группы, состоящей из модифицированного сигнального пептида лиганда 12 хемокина с C-X-C-мотивом (CXCL12), представленного в SEQ ID NO: 132, модифицированного сигнального пептида инсулиноподобного фактора роста 2 (ИФР2), представленного в SEQ ID NO: 127, модифицированного сигнального пептида инсулина (INS), представленного в SEQ ID NO: 147, и модифицированного сигнального пептида нейротрофического фактора головного мозга (BDNF), представленного в SEQ ID NO: 137.

10

В одном варианте реализации настоящего изобретения сигнальный пептид представляет собой i) сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, причем сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, выбран из группы, состоящей из сигнального пептида нейротрофического фактора головного мозга (BDNF),

15

сигнального пептида нейротрофина-3 (NTF-3), сигнального пептида фактора роста фибробластов 5 (FGF5), сигнального пептида белка 5, связывающего инсулиноподобный фактор роста (IBP5), сигнального пептида белка 2, экспрессируемого предстательной железой и яичками (PATE2), сигнального пептида внеклеточной супероксиддисмутазы (SOD3) и сигнального пептида белка 2,

20

родственного фактору комплемента Н (FHR2). Сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, предпочтительно выбран из группы, состоящей из сигнального пептида нейротрофического фактора головного мозга (BDNF), представленного в SEQ ID NO: 30, сигнального пептида нейротрофина-3 (NTF-3), представленного в SEQ ID NO: 102, сигнального пептида фактора роста фибробластов 5 (FGF5), представленного в SEQ ID NO: 87, сигнального пептида белка 5, связывающего инсулиноподобный фактор роста (IBP5), представленного в SEQ ID NO: 97, сигнального пептида белка 2, экспрессируемого предстательной железой и яичками (PATE2), представленного в SEQ ID NO: 107, сигнального пептида внеклеточной супероксиддисмутазы (SOD3), представленного в SEQ ID NO: 112, и сигнального пептида белка 2, родственного фактору комплемента Н (FHR2), представленного в SEQ ID NO: 92

30

В одном варианте реализации настоящего изобретения сигнальный пептид представляет собой i) сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, модифицированный путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной

аминокислоты, причем сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, выбран из группы, состоящей из сигнального пептида лиганда 12 хемокина с C-X-C-мотивом (CXCL12), сигнального пептида инсулиноподобного фактора роста 2 (ИФР2), сигнального пептида инсулина (INS) и сигнального пептида нейротрофического фактора головного мозга (BDNF).

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, модифицированный путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, выбран из группы, состоящей из модифицированного сигнального пептида лиганда 12 хемокина с C-X-C-мотивом (CXCL12), представленного в SEQ ID NO: 132, модифицированного сигнального пептида инсулиноподобного фактора роста 2 (ИФР2), представленного в SEQ ID NO: 127, модифицированного сигнального пептида инсулина (INS), представленного в SEQ ID NO: 147, и модифицированного сигнального пептида нейротрофического фактора головного мозга (BDNF), представленного в SEQ ID NO: 137.

В одном варианте реализации настоящего изобретения сигнальный пептид представляет собой ii) сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, причем сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, причем сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, и указанный белок выбраны из группы, состоящей из сигнального пептида инсулиноподобного фактора роста 1 (ИФР1) и ИФР1, сигнального пептида инсулина (INS) и INS, сигнального пептида эритропоэтина (ЕРО) и ЕРО, сигнального пептида интерлейкина-4 (ИЛ-4) и ИЛ-4 и сигнального пептида интерлейкина-10 (ИЛ-10) и ИЛ-10.

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, модифицированный путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, выбран из группы, состоящей из модифицированного сигнального пептида инсулиноподобного фактора роста 1 (ИФР1), представленного в SEQ ID NO: 122, модифицированного сигнального пептида инсулина (INS), представленного в SEQ ID NO: 147, модифицированного сигнального пептида эритропоэтина (ЕРО), представленного в SEQ ID NO: 152, сигнального пептида интерлейкина-4 (ИЛ-4), представленного в SEQ ID NO: 166, и сигнального пептида интерлейкина-10 (ИЛ-10), представленного в SEQ ID NO: 174.

В одном варианте реализации настоящего изобретения сигнальный пептид представляет собой iii) природную аминокислотную последовательность, не обладающую функцией сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная последовательность необязательно модифицирована путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, причем природная аминокислотная последовательность выбрана из группы, состоящей из пропептида инсулиноподобного фактора роста 1 (ИФР1), кодирующей последовательности рецептора глюкагона (GL-R) и пропептида кишечной щелочной фосфатазы (ALPI).

В одном варианте реализации настоящего изобретения сигнальный пептид представляет собой iii) природную аминокислотную последовательность, не обладающую функцией сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная последовательность представляет собой кодирующую последовательность рецептора глюкагона (GL-R), iii) природную аминокислотную последовательность, не обладающую функцией сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная последовательность модифицирована путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, причем природная аминокислотная последовательность представляет собой пропептид инсулиноподобного фактора роста 1 (ИФР1), или iii) природную аминокислотную последовательность, не обладающую функцией сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная последовательность модифицирована путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, причем природная аминокислотная последовательность представляет собой пропептид щелочной фосфатазы (ALPI).

В одном варианте реализации настоящего изобретения сигнальный пептид представляет собой iii) природную аминокислотную последовательность, не обладающую функцией сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная последовательность представляет собой кодирующую последовательность рецептора глюкагона (GL-R)

В одном варианте реализации настоящего изобретения сигнальный пептид представляет собой iii) природную аминокислотную последовательность, не обладающую функцией сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная последовательность модифицирована путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, причем природная аминокислотная

последовательность представляет собой пропептид инсулиноподобного фактора роста 1 (ИФР1).

В одном варианте реализации настоящего изобретения сигнальный пептид представляет собой iii) природную аминокислотную последовательность, не

5 обладающую функцией сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная последовательность модифицирована путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, причем природная аминокислотная последовательность представляет собой пропептид кишечной щелочной фосфатазы (ALPI).

10 В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения сигнальный пептид представляет собой iii) природную аминокислотную последовательность, не обладающую функцией сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная последовательность представляет собой кодирующую последовательность рецептора глюкагона (GL-R), представленную в SEQ ID NO: 117,

15 iii) природную аминокислотную последовательность, не обладающую функцией сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная последовательность модифицирована путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, причем модифицированная природная аминокислотная последовательность представляет собой модифицированный

20 пропептид инсулиноподобного фактора роста 1 (ИФР1), представленный в SEQ ID NO: 142, или iii) природную аминокислотную последовательность, не обладающую функцией сигнального пептида в природе, причем указанная природная

аминокислотная последовательность модифицирована путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, причем модифицированная природная аминокислотная последовательность представляет собой модифицированный

25 пропептид щелочной фосфатазы (ALPI), представленный в SEQ ID NO: 189.

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения сигнальный пептид представляет собой iii) природную аминокислотную последовательность, не

30 обладающую функцией сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная последовательность представляет собой кодирующую последовательность рецептора глюкагона (GL-R), представленную в SEQ ID NO: 117.

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения сигнальный пептид представляет собой iii) природную аминокислотную последовательность, не

обладающую функцией сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная последовательность модифицирована путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, причем модифицированная природная аминокислотная последовательность представляет собой модифицированный

5 пропептид инсулиноподобного фактора роста 1 (ИФР1), представленный в SEQ ID NO:142.

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения сигнальный пептид представляет собой iii) природную аминокислотную последовательность, не

10 обладающую функцией сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная последовательность модифицирована путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, причем модифицированная природная аминокислотная последовательность представляет собой модифицированный пропептид кишечной щелочной фосфатазы (ALPI), представленный в SEQ ID NO:189.

В одном варианте реализации настоящего изобретения сигнальный пептид

15 представляет собой i) сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, причем сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, необязательно модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, и количество белка, секретируемого с использованием сигнального пептида, гетерологичного указанному белку, превышает количество указанного белка, секретируемого с использованием сигнального пептида, гомологичного указанному белку. Количество белка, секретируемого с использованием сигнального пептида, гетерологичного указанному белку, превышает, предпочтительно по меньшей мере в 1,4 раза превышает количество указанного белка, секретируемого с использованием

25 В одном варианте реализации настоящего изобретения сигнальный пептид представляет собой ii) сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, причем сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, и количество белка, секретируемого с использованием модифицированного сигнального пептида, гомологичного указанному белку, превышает количество указанного белка, секретируемого с использованием сигнального пептида, гомологичного указанному белку, не содержащего модификации. Количество белка, секретируемого с

использованием модифицированного сигнального пептида, гомологичного указанному белку, превышает, предпочтительно по меньшей мере в 1,4 раза превышает количество указанного белка, секретируемого с использованием немодифицированного сигнального пептида, гомологичного указанному белку.

- 5 В одном варианте реализации настоящего изобретения сигнальный пептид представляет собой iii) природную аминокислотную последовательность, не обладающую функцией сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная последовательность необязательно модифицирована путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, причем количество
- 10 белка, секретируемого с использованием природной аминокислотной последовательности, не обладающей функцией сигнального пептида в природе, превышает количество указанного белка, секретируемого с использованием сигнального пептида, гомологичного указанному белку. Количество белка, секретируемого с использованием необязательно модифицированной природной
- 15 аминокислотной последовательности, превышает, предпочтительно по меньшей мере в 1,4 раза превышает количество указанного белка, секретируемого с использованием сигнального пептида, гомологичного указанному белку.

- В одном варианте реализации настоящего изобретения сигнальный пептид
- 20 представляет собой i) сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, причем сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, необязательно модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, при условии, что указанный белок не является тиоредоксином, конкретнее, указанный белок не является фактором выживаемости колбочек, продуцируемым палочками.

- 25 В одном варианте реализации настоящего изобретения сигнальный пептид выбран из i) сигнального пептида, гетерологичного указанному белку, а белок выбран из группы, состоящей из инсулиноподобного фактора роста 1 (ИФР1), инсулина (INS), эритропоэтина (ЕРО), интерлейкина-4 (ИЛ-4) и интерлейкина-10 (ИЛ-10).
- 30 i) сигнального пептида, гетерологичного указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, а белок представляет собой ИФР1.

ii) сигнального пептида, гомологичного указанному белку, причем сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, а белок выбран из группы, состоящей из инсулиноподобного фактора роста 1 (ИФР1), инсулина (INS), эритропоэтина (ЕРО), интерлейкина-4 (ИЛ-4) и интерлейкина-10 (ИЛ-10);

iii) природной аминокислотной последовательности, не обладающей функцией сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная последовательность представляет собой кодирующую последовательность рецептора глюкагона (GL-R), а белок представляет собой инсулиноподобный фактор роста 1

(ИФР1); и

iii) природной аминокислотной последовательности, не обладающей функцией сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная последовательность модифицирована путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, причем природная аминокислотная

последовательность представляет собой пропептид инсулиноподобного фактора роста 1 (ИФР1), а белок представляет собой инсулиноподобный фактор роста 1 (ИФР1).

В одном варианте реализации настоящего изобретения сигнальный пептид представляет собой i) сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, а белок выбран из группы, состоящей из инсулиноподобного фактора роста 1 (ИФР1), инсулина (INS), эритропоэтина (ЕРО), интерлейкина-4 (ИЛ-4) и интерлейкина-10 (ИЛ-10).

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения сигнальный пептид представляет собой i) сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, а белок выбран из группы, состоящей из инсулиноподобного фактора роста 1 (ИФР1), представленного в SEQ ID NO: 188, инсулина (INS), представленного в SEQ ID NO: 185, эритропоэтина (ЕРО), представленного в SEQ ID NO: 184, интерлейкина-4 (ИЛ-4), представленного в SEQ ID NO: 186, и интерлейкина-10 (ИЛ-10), представленного в SEQ ID NO: 187.

В одном варианте реализации настоящего изобретения сигнальный пептид представляет собой i) сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, а белок представляет собой ИФР1.

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения сигнальный пептид

представляет собой i) сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, а белок представляет собой ИФР1, представленный в SEQ ID NO:188.

- 5 В одном варианте реализации настоящего изобретения сигнальный пептид представляет собой ii) сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, причем сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, а белок выбран из группы, состоящей из инсулиноподобного фактора роста 1 (ИФР1), инсулина (INS), эритропоэтина (ЕРО), интерлейкина-4 (ИЛ-4) и интерлейкина-10 (ИЛ-10).

- 10 В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения сигнальный пептид представляет собой ii) сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, причем сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, а белок выбран из группы, состоящей из инсулиноподобного фактора роста 1 (ИФР1), представленного в SEQ ID NO: 188, инсулина (INS), представленного в SEQ ID NO: 185, эритропоэтина (ЕРО), представленного в SEQ ID NO: 184, интерлейкина-4 (ИЛ-4), представленного в SEQ ID NO: 186, и интерлейкина-10 (ИЛ-10), представленного в SEQ ID NO: 187.

- 15 В одном варианте реализации настоящего изобретения сигнальный пептид представляет собой iii) природную аминокислотную последовательность, не обладающую функцией сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная последовательность представляет собой кодирующую последовательность рецептора глюкагона (GL-R), а белок представляет собой инсулиноподобный фактор роста 1 (ИФР1).

- 20 В одном варианте реализации настоящего изобретения сигнальный пептид представляет собой iii) природную аминокислотную последовательность, не обладающую функцией сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная последовательность модифицирована путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, причем природная аминокислотная последовательность представляет собой пропептид инсулиноподобного фактора роста 1 (ИФР1), а белок представляет собой инсулиноподобный фактор роста 1 (ИФР1).

25 В одном варианте реализации настоящего изобретения сигнальный пептид представляет собой iii) природную аминокислотную последовательность, не

обладающую функцией сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная последовательность модифицирована путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, причем природная аминокислотная последовательность представляет собой пропептид кишечной щелочной фосфатазы (ALPI), а белок представляет собой инсулиноподобный фактор роста 1 (ИФР1).

В одном варианте реализации настоящего изобретения сигнальный пептид представляет собой iii) природную аминокислотную последовательность, не обладающую функцией сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная последовательность представляет собой кодирующую

последовательность рецептора глюкагона (GL-R), а белок представляет собой инсулиноподобный фактор роста 1 (ИФР1), представленный в SEQ ID NO:188.

В одном варианте реализации настоящего изобретения сигнальный пептид представляет собой iii) природную аминокислотную последовательность, не обладающую функцией сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная последовательность модифицирована путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, причем модифицированная природная аминокислотная последовательность представляет собой модифицированный пропептид инсулиноподобного фактора роста 1 (ИФР1), а белок представляет собой инсулиноподобный фактор роста 1 (ИФР1), представленный в SEQ ID NO:188.

В одном варианте реализации настоящего изобретения сигнальный пептид представляет собой iii) природную аминокислотную последовательность, не обладающую функцией сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная последовательность модифицирована путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, причем модифицированная природная аминокислотная последовательность представляет собой модифицированный пропептид кишечной щелочной фосфатазы (ALPI), а белок представляет собой инсулиноподобный фактор роста 1 (ИФР1) представленный в SEQ ID NO:188.

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения сигнальный пептид выбран из группы, состоящей из

i) сигнального пептида, гетерологичного указанному белку, причем сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, выбран из группы, состоящей из сигнального пептида нейротрофического фактора головного мозга (BDNF), сигнального пептида нейротрофина-3 (NTF-3), сигнального пептида фактора роста фибробластов 5 (FGF5),

- сигнального пептида белка 5, связывающего инсулиноподобный фактор роста (IBP5),
сигнального пептида белка 2, экспрессируемого предстательной железой и яичками
(PATE2), сигнального пептида внеклеточной супероксиддисмутазы (SOD3) и
сигнального пептида белка 2, родственного фактору комплемента H (FHR2), при
5 условию, что указанный белок не является оксидоредуктазой,
- i) сигнального пептида, гетерологичного указанному белку, причем сигнальный пептид,
гетерологичный указанному белку, модифицирован путем инсерции, делеции и/или
замены по меньшей мере одной аминокислоты, причем сигнальный пептид,
гетерологичный указанному белку, выбран из группы, состоящей из сигнального
10 пептида лиганда 12 хемокина с C-X-C-мотивом (CXCL12), сигнального пептида
инсулиноподобного фактора роста 2 (ИФР2), сигнального пептида инсулина (INS) и
сигнального пептида нейротрофического фактора головного мозга (BDNF), при
условии, что указанный белок не является оксидоредуктазой.
- ii) сигнального пептида, гомологичного указанному белку, причем сигнальный пептид,
15 гомологичный указанному белку, модифицирован путем инсерции, делеции и/или
замены по меньшей мере одной аминокислоты, причем сигнальный пептид,
гетерологичный указанному белку, выбран из группы, состоящей из сигнального
пептида инсулиноподобного фактора роста 1 (ИФР1), сигнального пептида инсулина
(INS), сигнального пептида эритропоэтина (ЕРО), сигнального пептида интерлейкина-4
20 (ИЛ-4) и сигнального пептида интерлейкина-10 (ИЛ-10).
- iii) природной аминокислотной последовательности, не обладающей функцией
сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная
последовательность представляет собой кодирующую последовательность рецептора
глюкагона (GL-R);
- 25 iii) природной аминокислотной последовательности, не обладающей функцией
сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная
последовательность модифицирована путем инсерции, делеции и/или замены по
меньшей мере одной аминокислоты, причем природная аминокислотная
последовательность представляет собой пропептид инсулиноподобного фактора роста 1
30 (ИФР1); и
- iii) природной аминокислотной последовательности, не обладающей функцией
сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная
последовательность модифицирована путем инсерции, делеции и/или замены по

меньшей мере одной аминокислоты, причем природная аминокислотная последовательность представляет собой пропептид кишечной щелочной фосфатазы (ALPI).

- 5 В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения сигнальный пептид выбран из группы, состоящей из
- i) сигнального пептида, гетерологичного указанному белку, причем сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, выбран из группы, состоящей из сигнального пептида нейротрофического фактора головного мозга (BDNF), сигнального пептида
- 10 нейротрофина-3 (NTF-3), сигнального пептида фактора роста фибробластов 5 (FGF5), сигнального пептида белка 5, связывающего инсулиноподобный фактор роста (IBP5), сигнального пептида белка 2, экспрессируемого предстательной железой и яичками (PATE2), сигнального пептида внеклеточной супероксиддисмутазы (SOD3) и сигнального пептида белка 2, родственного фактору комплемента H (FHR2), и
- 15 указанный белок выбран из группы, состоящей из цитокинов, факторов роста и гормонов;
- i) сигнального пептида, гетерологичного указанному белку, причем сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, причем сигнальный пептид,
- 20 гетерологичный указанному белку, выбран из группы, состоящей из сигнального пептида лиганда 12 хемокина с C-X-C-мотивом (CXCL12), сигнального пептида инсулиноподобного фактора роста 2 (ИФР2), сигнального пептида инсулина (INS) и сигнального пептида нейротрофического фактора головного мозга (BDNF), и указанный белок выбран из группы, состоящей из цитокинов, факторов роста и
- 25 гормонов;
- ii) сигнального пептида, гомологичного указанному белку, причем сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, причем сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, и указанный белок выбраны из группы, состоящей
- 30 из сигнального пептида инсулиноподобного фактора роста 1 (ИФР1) и ИФР1, сигнального пептида инсулина (INS) и INS, сигнального пептида эритропоэтина (EPO) и EPO, сигнального пептида интерлейкина-4 (ИЛ-4) и ИЛ-4, сигнального пептида интерлейкина-10 (ИЛ-10) и ИЛ-10;

- iii) природной аминокислотной последовательности, не обладающей функцией сигнального пептида в природе, причем указанный сигнальный пептид представляет собой кодирующую последовательность рецептора глюкагона (GL-R), а указанный белок выбран из группы, состоящей из цитокинов, факторов роста и гормонов и предпочтительно представляет собой фактор роста;
- iii) природной аминокислотной последовательности, не обладающей функцией сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная последовательность модифицирована путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, причем природная аминокислотная последовательность представляет собой пропептид инсулиноподобного фактора роста 1 (ИФР1), а указанный белок выбран из группы, состоящей из цитокинов, факторов роста и гормонов и предпочтительно представляет собой фактор роста, и
- iii) природной аминокислотной последовательности, не обладающей функцией сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная последовательность модифицирована путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, причем природная аминокислотная последовательность представляет собой пропептид щелочной фосфатазы (ALPI), а указанный белок выбран из группы, состоящей из цитокинов, факторов роста и гормонов и предпочтительно представляет собой фактор роста.
- В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения сигнальный пептид выбран из группы, состоящей из
- i) сигнального пептида, гетерологичного указанному белку, причем сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, выбран из группы, состоящей из сигнального пептида нейротрофического фактора головного мозга (BDNF), сигнального пептида нейротрофина-3 (NTF-3), сигнального пептида фактора роста фибробластов 5 (FGF5), сигнального пептида белка 5, связывающего инсулиноподобный фактор роста (IBP5), сигнального пептида белка 2, экспрессируемого предстательной железой и яичками (PATE2), сигнального пептида внеклеточной супероксиддисмутазы (SOD3) и сигнального пептида белка 2, родственного фактору комплемента H (FHR2), и
- указанный белок выбран из группы, состоящей из инсулиноподобного фактора роста 1 (ИФР1), инсулина (INS), эритропоэтина (ЕРО), интерлейкина-4 (ИЛ-4) и интерлейкина-10 (ИЛ-10);
- i) сигнального пептида, гетерологичного указанному белку, причем сигнальный пептид,

- гетерологичный указанному белку, модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, причем сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, выбран из группы, состоящей из сигнального пептида лиганда 12 хемокина с C-X-C-мотивом (CXCL12), сигнального пептида инсулиноподобного фактора роста 2 (ИФР2), сигнального пептида инсулина (INS) и сигнального пептида нейротрофического фактора головного мозга (BDNF), и указанный белок представляет собой инсулиноподобный фактор роста 1 (ИФР1);
- ii) сигнального пептида, гомологичного указанному белку, причем сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, причем сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, и указанный белок выбраны из группы, состоящей из сигнального пептида инсулиноподобного фактора роста 1 (ИФР1) и ИФР1, сигнального пептида инсулина (INS) и INS, сигнального пептида эритропоэтина (ЕРО) и ЕРО, сигнального пептида интерлейкина-4 (ИЛ-4) и ИЛ-4, сигнального пептида интерлейкина-10 (ИЛ-10) и ИЛ-10;
- iii) природной аминокислотной последовательности, не обладающей функцией сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная последовательность представляет собой кодирующую последовательность рецептора глюкагона (GL-R), а указанный белок представляет собой инсулиноподобный фактор роста 1 (ИФР1);
- iii) природной аминокислотной последовательности, не обладающей функцией сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная последовательность модифицирована путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, причем природная аминокислотная последовательность представляет собой пропептид инсулиноподобного фактора роста 1 (ИФР1), а указанный белок представляет собой инсулиноподобный фактор роста 1 (ИФР1); и
- iii) природной аминокислотной последовательности, не обладающей функцией сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная последовательность модифицирована путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, причем природная аминокислотная последовательность представляет собой пропептид кишечной щелочной фосфатазы

(ALPI), а указанный белок представляет собой инсулиноподобный фактор роста 1 (ИФР1).

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения сигнальный пептид выбран из группы, состоящей из

- 5 i) сигнального пептида, гетерологичного указанному белку, причем сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, и указанный белок выбраны из группы, состоящей из сигнального пептида нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) и ИФР1, инсулина, ЕРО или ИЛ-10, сигнального пептида нейротрофина-3 (NTF-3) и ИФР1, сигнального пептида фактора роста фибробластов 5 (FGF5) и ИФР1 или ИЛ-4,
10 сигнального пептида белка 5, связывающего инсулиноподобный фактор роста (IBP5), и ИФР1, сигнального пептида белка 2, экспрессируемого предстательной железой и яичками (PATE2), и ИФР1, сигнального пептида внеклеточной супероксиддисмутазы (SOD3) и ИФР1, сигнального пептида белка 2, родственного фактору комплемента Н (FHR2), и ИФР1;
- 15 i) сигнального пептида, гетерологичного указанному белку, причем сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, причем сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, и указанный белок выбраны из группы, состоящей из сигнального пептида лиганда 12 хемокина с С-Х-С-мотивом (CXCL12) и ИФР1,
20 сигнального пептида инсулиноподобного фактора роста 2 (ИФР2) и ИФР1, сигнального пептида инсулина (INS) и ИФР1 и сигнального пептида нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) и ИФР1;
- 25 ii) сигнального пептида, гомологичного указанному белку, причем сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, причем сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, и белок выбраны из группы, состоящей из
сигнального пептида инсулиноподобного фактора роста 1 (ИФР1) и ИФР1, сигнального пептида инсулина (INS) и INS, сигнального пептида эритропоэтина (ЕРО) и ЕРО, сигнального пептида интерлейкина-4 (ИЛ-4) и ИЛ-4, сигнального пептида
30 интерлейкина-10 (ИЛ-10) и ИЛ-10;
- iii) природной аминокислотной последовательности, не обладающей функцией сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная последовательность представляет собой кодирующую последовательность рецептора

глюкагона (GL-R), а указанный белок представляет собой инсулиноподобный фактор роста 1 (ИФР1);

iii) природной аминокислотной последовательности, не обладающей функцией сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная

5 последовательность модифицирована путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, причем природная аминокислотная последовательность представляет собой пропептид инсулиноподобного фактора роста 1 (ИФР1), а указанный белок представляет собой инсулиноподобный фактор роста 1 (ИФР1); и

10 iii) природной аминокислотной последовательности, не обладающей функцией сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная последовательность модифицирована путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, причем природная аминокислотная последовательность представляет собой пропептид кишечной щелочной фосфатазы (ALPI), а указанный белок представляет собой инсулиноподобный фактор роста 1 (ИФР1).

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения сигнальный пептид выбран из группы, состоящей из

i) сигнального пептида, гетерологичного указанному белку, причем сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, выбран из группы, состоящей из сигнального пептида нейротрофического фактора головного мозга (BDNF), представленного в SEQ ID NO: 30, сигнального пептида нейротрофина-3 (NTF-3), представленного в SEQ ID NO: 102, сигнального пептида фактора роста фибробластов 5 (FGF5), представленного в SEQ ID NO: 87, сигнального пептида белка 5, связывающего инсулиноподобный фактор роста (IBP5), представленного в SEQ ID NO: 97, сигнального пептида белка 2, экспрессируемого предстательной железой и яичками (PATE2), представленного в SEQ ID NO: 107, сигнального пептида внеклеточной супероксиддисмутазы (SOD3), представленного в SEQ ID NO: 112, и сигнального пептида белка 2, родственного фактору комплемента H (FHR2), представленного в SEQ ID NO: 92, при условии, что указанный белок не является оксидоредуктазой;

i) сигнального пептида, гетерологичного указанному белку, причем сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, причем сигнальный пептид,

- гетерологичный указанному белку, выбран из группы, состоящей из сигнального пептида лиганда 12 хемокина с C-X-C-мотивом (CXCL12), представленного в SEQ ID NO: 132, сигнального пептида инсулиноподобного фактора роста 2 (ИФР2), представленного в SEQ ID NO: 127, сигнального пептида инсулина (INS),
- 5 представленного в SEQ ID NO: 147, и сигнального пептида нейротрофического фактора головного мозга (BDNF), представленного в SEQ ID NO: 137, при условии, что указанный белок не является оксидоредуктазой;
- ii) сигнального пептида, гомологичного указанному белку, причем сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, модифицирован путем инсерции, делеции и/или
- 10 замены по меньшей мере одной аминокислоты, причем сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, выбран из группы, состоящей из модифицированного сигнального пептида инсулиноподобного фактора роста 1 (ИФР1), представленного в SEQ ID NO: 122, модифицированного сигнального пептида инсулина (INS),
- представленного в SEQ ID NO: 147, модифицированного сигнального пептида
- 15 эритропоэтина (EPO), представленного в SEQ ID NO: 152, сигнального пептида интерлейкина-4 (ИЛ-4), представленного в SEQ ID NO: 166, и сигнального пептида интерлейкина-10 (ИЛ-10), представленного в SEQ ID NO: 174.
- iii) природной аминокислотной последовательности, не обладающей функцией сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная
- 20 последовательность представляет собой кодирующую последовательность рецептора глюкагона (GL-R), представленную в SEQ ID NO: 117;
- iii) природной аминокислотной последовательности, не обладающей функцией сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная последовательность модифицирована путем инсерции, делеции и/или замены по
- 25 меньшей мере одной аминокислоты, причем модифицированная природная аминокислотная последовательность представляет собой модифицированный пропептид инсулиноподобного фактора роста 1 (ИФР1), представленный в SEQ ID NO: 142, и
- iii) природной аминокислотной последовательности, не обладающей функцией
- 30 сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная последовательность модифицирована путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, причем модифицированная природная

аминокислотная последовательность представляет собой модифицированный пропептид щелочной фосфатазы (ALPI), представленный в SEQ ID NO: 189.

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения сигнальный пептид выбран из группы, состоящей из

- 5 i) сигнального пептида, гетерологичного указанному белку, причем сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, выбран из группы, состоящей из сигнального пептида нейротрофического фактора головного мозга (BDNF), представленного в SEQ ID NO: 30, сигнального пептида нейротрофина-3 (NTF-3), представленного в SEQ ID NO: 102, сигнального пептида фактора роста фибробластов 5 (FGF5), представленного в SEQ ID NO: 87, сигнального пептида белка 5, связывающего инсулиноподобный фактор роста (IBP5), представленного в SEQ ID NO: 97, сигнального пептида белка 2, экспрессируемого предстательной железой и яичками (PATE2), представленного в SEQ ID NO: 107, сигнального пептида внеклеточной супероксиддисмутазы (SOD3), представленного в SEQ ID NO: 112, и сигнального пептида белка 2, родственного фактору комплемента Н (FHR2), представленного в SEQ ID NO: 92, а указанный белок
- 10 выбран из цитокинов, факторов роста и гормонов;
- i) сигнального пептида, гетерологичного указанному белку, причем сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, причем модифицированный
- 20 сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, выбран из группы, состоящей из модифицированного сигнального пептида лиганда 12 хемокина с C-X-C-мотивом (CXCL12), представленного в SEQ ID NO: 132, модифицированного сигнального пептида инсулиноподобного фактора роста 2 (ИФР2), представленного в SEQ ID NO: 127, модифицированного сигнального пептида инсулина (INS), представленного в SEQ ID NO: 147, и модифицированного сигнального пептида нейротрофического фактора
- 25 головного мозга (BDNF), представленного в SEQ ID NO: 137, а указанный белок выбран из цитокинов, факторов роста и гормонов;
- ii) сигнального пептида, гомологичного указанному белку, причем сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, модифицирован путем инсерции, делеции и/или
- 30 замены по меньшей мере одной аминокислоты, причем модифицированный сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, и указанный белок выбраны из группы, состоящей из модифицированного сигнального пептида инсулиноподобного фактора роста 1 (ИФР1), представленного в SEQ ID NO: 122, и ИФР1, представленного

- в SEQ ID NO: 188, модифицированного сигнального пептида инсулина (INS), представленного в SEQ ID NO: 147, и инсулина (INS), представленного в SEQ ID NO: 185, модифицированного сигнального пептида эритропоэтина (EPO), представленного в SEQ ID NO: 152, и EPO, представленного в SEQ ID NO: 184, модифицированного
- 5 сигнального пептида интерлейкина-4 (ИЛ-4), представленного в SEQ ID NO: 166, и ИЛ-4, представленного в SEQ ID NO: 186, модифицированного сигнального пептида интерлейкина-10 (ИЛ-10), представленного в SEQ ID NO: 174, и ИЛ-10, представленного в SEQ ID NO: 187;
- 10 iii) природной аминокислотной последовательности, не обладающей функцией сигнального пептида в природе, причем природная аминокислотная последовательность представляет собой кодирующую последовательность рецептора глюкагона (GL-R), представленную в SEQ ID NO: 117, а указанный белок выбран из группы, состоящей из цитокинов, факторов роста и гормонов и предпочтительно представляет собой фактор роста;
- 15 iii) природной аминокислотной последовательности, не обладающей функцией сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная последовательность модифицирована путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, причем модифицированная природная аминокислотная последовательность представляет собой модифицированный
- 20 пропептид инсулиноподобного фактора роста 1 (ИФР1), представленный в SEQ ID NO: 142, а указанный белок выбран из группы, состоящей из цитокинов, факторов роста и гормонов и предпочтительно представляет собой фактор роста, и
- 25 iii) природной аминокислотной последовательности, не обладающей функцией сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная последовательность модифицирована путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, причем модифицированная природная аминокислотная последовательность представляет собой модифицированный
- 30 пропептид щелочной фосфатазы (ALPI), представленный в SEQ ID NO: 189, а указанный белок выбран из группы, состоящей из цитокинов, факторов роста и гормонов и предпочтительно представляет собой фактор роста.
- В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения сигнальный пептид выбран из группы, состоящей из

- i) сигнального пептида, гетерологичного указанному белку, причем сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, выбран из группы, состоящей из сигнального пептида нейротрофического фактора головного мозга (BDNF), представленного в SEQ ID NO: 30, сигнального пептида нейротрофина-3 (NTF-3), представленного в SEQ ID NO: 102, сигнального пептида фактора роста фибробластов 5 (FGF5), представленного в SEQ ID NO: 87, сигнального пептида белка 5, связывающего инсулиноподобный фактор роста (IBP5), представленного в SEQ ID NO: 97, сигнального пептида белка 2, экспрессируемого предстательной железой и яичками (PATE2), представленного в SEQ ID NO: 107, сигнального пептида внеклеточной супероксиддисмутазы (SOD3), представленного в SEQ ID NO: 112, и сигнального пептида белка 2, родственного фактору комплемента H (FHR2), представленного в SEQ ID NO: 92, а указанный белок выбран из инсулиноподобного фактора роста 1 (ИФР1), представленного в SEQ ID NO: 188, инсулина, представленного в SEQ ID NO: 185, эритропоэтина (EPO), представленного в SEQ ID NO: 184, интерлейкина-4 (ИЛ-4), представленного в SEQ ID NO: 186, и интерлейкина-10 (ИЛ-10), представленного в SEQ ID NO: 187;
- i) сигнального пептида, гетерологичного указанному белку, причем сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, причем модифицированный сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, выбран из группы, состоящей из модифицированного сигнального пептида лиганда 12 хемокина с C-X-C-мотивом (CXCL12), представленного в SEQ ID NO: 132, модифицированного сигнального пептида инсулиноподобного фактора роста 2 (ИФР2), представленного в SEQ ID NO: 127, модифицированного сигнального пептида инсулина (INS), представленного в SEQ ID NO: 147, и модифицированного сигнального пептида нейротрофического фактора головного мозга (BDNF), представленного в SEQ ID NO: 137, а указанный белок представляет собой инсулиноподобный фактор роста 1 (ИФР1), представленный в SEQ ID NO: 188;
- ii) сигнального пептида, гомологичного указанному белку, причем сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, причем модифицированный сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, и указанный белок выбраны из группы, состоящей из модифицированного сигнального пептида инсулиноподобного фактора роста 1 (ИФР1), представленного в SEQ ID NO: 122, и ИФР1, представленного

- в SEQ ID NO: 188, модифицированного сигнального пептида инсулина (INS), представленного в SEQ ID NO: 147, и инсулина (INS), представленного в SEQ ID NO: 185, модифицированного сигнального пептида эритропоэтина (EPO), представленного в SEQ ID NO: 152, и EPO, представленного в SEQ ID NO: 184, модифицированного
- 5 сигнального пептида интерлейкина-4 (ИЛ-4), представленного в SEQ ID NO: 166, и ИЛ-4, представленного в SEQ ID NO: 186, модифицированного сигнального пептида интерлейкина-10 (ИЛ-10), представленного в SEQ ID NO: 174, и ИЛ-10, представленного в SEQ ID NO: 187;
- 10 iii) природной аминокислотной последовательности, не обладающей функцией сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная последовательность представляет собой кодирующую последовательность рецептора глюкагона (GL-R), представленного в SEQ ID NO: 117, а указанный белок представляет собой инсулиноподобный фактор роста 1 (ИФР1), представленный в SEQ ID NO: 188;
- 15 iii) природной аминокислотной последовательности, не обладающей функцией сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная последовательность модифицирована путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, причем модифицированная природная аминокислотная последовательность представляет собой модифицированный
- 20 пропептид инсулиноподобного фактора роста 1 (ИФР1), представленный в SEQ ID NO: 142, а указанный белок представляет собой инсулиноподобный фактор роста 1 (ИФР1), представленный в SEQ ID NO: 188, и
- 25 iii) природной аминокислотной последовательности, не обладающей функцией сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная последовательность модифицирована путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, причем модифицированная природная аминокислотная последовательность представляет собой модифицированный
- пропептид кишечной щелочной фосфатазы (ALPI), представленный в SEQ ID NO: 189, а указанный белок представляет собой инсулиноподобный фактор роста 1 (ИФР1), представленный в SEQ ID NO: 188.
- 30 В особо предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения мРНК, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую белок и сигнальный пептид, выбрана из группы, состоящей из последовательности мРНК, представленной в SEQ ID NO: 8, последовательности мРНК, представленной в SEQ ID NO: 105,

последовательности мРНК, представленной в SEQ ID NO:90, последовательности мРНК, представленной в SEQ ID NO:100, последовательности мРНК, представленной в SEQ ID NO:110, последовательности мРНК, представленной в SEQ ID NO:115, последовательности мРНК, представленной в SEQ ID NO:95, последовательности мРНК, представленной в SEQ ID NO:135, последовательности мРНК, представленной в SEQ ID NO:130, последовательности мРНК, представленной в SEQ ID NO:150, последовательности мРНК, представленной в SEQ ID NO:140, последовательности мРНК, представленной в SEQ ID NO:125, последовательности мРНК, представленной в SEQ ID NO:161, последовательности мРНК, представленной в SEQ ID NO:155, последовательности мРНК, представленной в SEQ ID NO:169, последовательности мРНК, представленной в SEQ ID NO:177, последовательности мРНК, представленной в SEQ ID NO:120, последовательности мРНК, представленной в SEQ ID NO:145, и последовательности мРНК, представленной в SEQ ID NO:192.

В дополнительном аспекте настоящего изобретения предложена мРНК, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую

- i) белок; и
 - ii) сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку,
- причем сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, представляет собой сигнальный пептид нейротрофического фактора головного мозга, а указанный белок не является оксидоредуктазой,
- в частности, мРНК, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую
- i) белок; и
 - ii) сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку,
- причем указанный сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, представляет собой сигнальный пептид нейротрофического фактора головного мозга (BDNF), а указанный белок выбран из группы, состоящей из карбоксипептидаз; цитокинов; внеклеточных лигандов и переносчиков; белков внеклеточного матрикса; глюкозидаз; гликозилтрансфераз; факторов роста; белков, связывающих факторы роста; белков, связывающих гепарин; гормонов; гидролаз; иммуноглобулинов; изомераз; киназ; лиаз; ингибиторов металлоферментов; металлопротеаз; белков молока; нейроактивных белков; протеаз; ингибиторов протеаз; протеинфосфатаз; эстераз; трансфераз; и вазоактивных белков.

В одном варианте реализации настоящего изобретения белок представляет собой терапевтический белок. В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения белок имеет человеческое происхождение, т.е. является белком человека.

В дополнительном предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения

- 5 белок выбран из группы, состоящей из карбоксипептидаз; цитокинов; внеклеточных лигандов и переносчиков; белков внеклеточного матрикса; глюкозидаз; гликозилтрансфераз; факторов роста; белков, связывающих факторы роста; белков, связывающих гепарин; гормонов; гидролаз; иммуноглобулинов; изомераз; киназ; лиаз; ингибиторов металлоферментов; металлопротеаз; белков молока; нейроактивных
- 10 белков; протеаз; ингибиторов протеаз; протеинфосфатаз; эстераз; трансфераз; и вазоактивных белков, все из которых имеют человеческое происхождение. В более предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения белок согласно настоящему изобретению представляет собой белок человека, выбранный из группы, состоящей из карбоксипептидаз человека; цитокинов человека; внеклеточных лигандов
- 15 и переносчиков человека; белков внеклеточного матрикса человека; глюкозидаз человека; гликозилтрансфераз человека; факторов роста человека; белков, связывающих факторы роста человека; белков, связывающих гепарин человека; гормонов человека; гидролаз человека; иммуноглобулинов человека; изомераз человека; киназ человека; лиаз человека; ингибиторов металлоферментов человека;
- 20 металлопротеаз человека; белков молока человека; нейроактивных белков человека; протеаз человека; ингибиторов протеаз человека; протеинфосфатаз человека; эстераз человека; трансфераз человека; и вазоактивных белков человека.

В одном варианте реализации белок выбран из группы, состоящей из

- 25 карбоксипептидаз, причем карбоксипептидазы выбраны из группы, состоящей из ACE, ACE2, CNDP1, CPA1, CPA2, CPA4, CPA5, CPA6, CPB1, CPB2, CPE, CPN1, CPQ, CPXM1, CPZ и SCPEP1; цитокинов, причем цитокины выбраны из группы, состоящей из BMP1, BMP10, BMP15, BMP2, BMP3, BMP4, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8A, BMP8B, C1QTNF4, CCL1, CCL11, CCL13, CCL14, CCL15, CCL16, CCL17, CCL18, CCL19, CCL2, CCL21, CCL22, CCL23, CCL24, CCL25, CCL26, CCL27, CCL28, CCL3, CCL3L1,
- 30 CCL3L3, CCL4, CCL4L, CCL4L2, CCL5, CCL7, CCL8, CD40LG, CER1, CKLF, CLCF1, CNTF, CSF1, CSF2, CSF3, CTF1, CX3CL1, CXCL1, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL14, CXCL16, CXCL17, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL8, CXCL9, DKK1, DKK2, DKK3, DKK4, EDA, EBI3, FAM3B, FAM3C, FASLG, FLT3LG, GDF1,

GDF10, GDF11, GDF15, GDF2, GDF3, GDF5, GDF6, GDF7, GDF9, GPI, GREM1,
 GREM2, GRN, ИФНА1, ИФНА13, ИФНА10, ИФНА14, ИФНА16, ИФНА17, ИФНА2,
 ИФНА21, ИФНА4, ИФНА5, ИФНА6, ИФНА7, ИФНА8, ИФНВ1, ИФНЕ, ИФНГ,
 ИФНК, ИФНЛ1, ИФНЛ2, ИФНЛ3, ИФНЛ4, ИФНВ1, ИЛ-10, ИЛ-11, ИЛ-12А, ИЛ-12В,
 5 ИЛ-13, ИЛ-15, ИЛ-16, ИЛ-17А, ИЛ-17В, ИЛ-17С, ИЛ-17D, ИЛ-17F, ИЛ-18, ИЛ-19, ИЛ-
 1А, ИЛ-1В, ИЛ-1F10, ИЛ-2, ИЛ-20, ИЛ-21, ИЛ-22, ИЛ-23А, ИЛ-24, ИЛ-25, ИЛ-26, ИЛ-
 27, ИЛ-3, ИЛ-31, ИЛ-32, ИЛ-33, ИЛ-34, ИЛ-36А, ИЛ-36В, ИЛ-36G, ИЛ-36RN, ИЛ-37,
 ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-7, ИЛ-9, LEFTY1, LEFTY2, LIF, LTA, MIF, MSTN, NAMPT,
 NODAL, OSM, PF4, PF4V1, SCGB3A1, SECTM1, SLURP1, SPP1, THNSL2, THPO,
 10 ФНО, ФНОSF10, ФНОSF11, ФНОSF12, ФНОSF13, ФНОSF13В, ФНОSF14, ФНОSF15,
 TSLP, VSTM1, WNT1, WNT10A, WNT10B, WNT11, WNT16, WNT2, WNT2B, WNT3,
 WNT3A, WNT4, WNT5A, WNT5B, WNT6, WNT7A, WNT7B, WNT8A, WNT8B,
 WNT9A, WNT9B, XCL1 и XCL2; внеклеточных лигандов и переносчиков, причем
 внеклеточные лиганды и переносчики выбраны из группы, состоящей из APCs,
 15 CHI3L1, CHI3L2, CLEC3B, DMBT1, DMKN, EDDM3A, EDDM3B, EFNA4, EMC10,
 ENAM, EPYC, ERVH48-1, F13B, FCN1, FCN2, GLDN, GPLD1, HEG1, ITFG1,
 KAZALD1, KCP, LACRT, LEG1, METRN, NOTCH2NL, NPNT, OLFM1, OLFML3,
 PRB2, PSAP, PSAPL1, PSG1, PSG6, PSG9, PTX3, PTX4, RBP4, RNASE10, RNASE12,
 RNASE13, RNASE9, RSPRY1, RTBDN, S100A12, S100A13, S100A7, S100A8, SAA2,
 20 SAA4, SCG1, SCG2, SCG3, SCGB1C1, SCGB1C2, SCGB1D1, SCGB1D2, SCGB1D4,
 SCGB2B2, SCGB3A2, SCGN, SCRG1, SCUBE1, SCUBE2, SCUBE3, SDCBP, SELENOP,
 SFTA2, SFTA3, SFTPA1, SFTPA2, SFTPC, SFTPD, SHBG, SLURP2, SMOC1, SMOC2,
 SMR3A, SMR3B, SNCA, SPATA20, SPATA6, SOGA1, SPARC, SPARCL1, SPATA20,
 SPATA6, SRPX2, SSC4D, STX1A, SUSL4, SVBP, TCN1, TCN2, TCTN1, TF, TULP3,
 25 TFF2, TFF3, THSD7A, TINAG, TINAGL1, TMEFF2, TMEM25 и VWC2L; белков
 внеклеточного матрикса, причем белки внеклеточного матрикса выбраны из группы,
 состоящей из ABI3BP, AGRN, CCBE1, CHL1, COL15A1, COL19A1, COLEC11, DMBT1,
 DRAXIN, EDIL3, ELN, EMID1, EMILIN1, EMILIN2, EMILIN3, EPDR1, FBLN1, FBLN2,
 FBLN5, FLRT1, FLRT2, FLRT3, FREM1, GLDN, IBSP, KERA, KIAA0100, KIRREL3,
 30 KRT10, LAMB2, MGP, RPTN, SBSPON, SDC1, SDC4, SEMA3A, SEMA3B, SEMA3C,
 SEMA3D, SEMA3E, SEMA3F, SEMA3G, SIGLEC1, SIGLEC10, SIGLEC6, SLIT1, SLIT2,
 SLIT3, SLITRK1, SNED1, SNORC, SPACA3, SPACA7, SPON1, SPON2, STATH, SVEP1,
 ТЕСТА, ТЕСТВ, TNC, TNN, TNR и TNXB; глюкозидаз, причем глюкозидазы выбраны

из группы, состоящей из AMY1A, AMY1B, AMY1C, AMY2A, AMY2B, CEMIP, CHIA, CHIT1, FUCA2, GLB1L, GLB1L2, HPSE, HYAL1, HYAL3, KL, LYG1, LYG2, LYZL1, LYZL2, MAN2B2, SMPD1, SMPDL3B, SPACA5 и SPACA5B; гликозилтрансфераз, причем гликозилтрансферазы выбраны из группы, состоящей из ART5, B4GALT1, EXTL2, GALNT1, GALNT2, GLT1D1, MGAT4A, ST3GAL1, ST3GAL2, ST3GAL3, ST3GAL4, ST6GAL1 и XYL1; факторов роста, причем факторы роста выбраны из группы, состоящей из AMH, ARTN, BTC, CDNF, CFC1, CFC1B, CHRDL1, CHRDL2, CLEC11A, CNMD, EFEMP1, EGF, EGFL6, EGFL7, EGFL8, EPGN, EREG, EYS, FGF1, FGF10, FGF16, FGF17, FGF18, FGF19, FGF2, FGF20, FGF21, FGF22, FGF23, FGF3, FGF4, FGF5, FGF6, FGF7, FGF8, FGF9, FRZB, GDNF, GFER, GKN1, HBEGF, HGF, ИФР1, ИФР2, INHA, INHBA, INHBB, INHBC, INHBE, INS, KITLG, MANF, MDK, MIA, NGF, NOV, NRG1, NRG2, NRG3, NRG4, NRTN, NTF3, NTF4, OGN, PDGFA, PDGFB, PDGFC, PDGFD, PGF, PROK1, PSPN, PTN, SDF1, SDF2, SFRP1, SFRP2, SFRP3, SFRP4, SFRP5, TDGF1, TFF1, TGFA, TGFB1, TGFB2, TGFB3, THBS4, TIMP1, VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD и WISP3; белков, связывающих факторы роста, причем белки, связывающие факторы роста, выбраны из группы, состоящей из CHRDL1, CYR61, ESM1, FGFBP1, FGFBP2, FGFBP3, HTRA1, GHBP, IGFALS, IGFBP1, IGFBP2, IGFBP3, IGFBP4, IGFBP5, IGFBP6, IGFBP7, LTBP1, LTBP2, LTBP3, LTBP4, SOSTDC1, NOG, TWSG1 и WIF1; белков, связывающих гепарин, причем белки, связывающие гепарин, выбраны из группы, состоящей из ADA2, ADAMTSL5, ANGPTL3, APOB, APOE, APOH, COL5A1, COMP, CTGF, FBLN7, FN1, FSTL1, HRG, LAMC2, LIPC, LIPG, LIPI, LPL, PCOLCE2, POSTN, RSPO1, RSPO2, RSPO3, RSPO4, SAA1, SLIT2, SOST, THBS1 и VTN; гормонов, причем гормоны выбраны из группы, состоящей из ADCYAP1, ADIPOQ, ADM, ADM2, ANGPTL8, APELA, APLN, AVP, C1QTNF12, C1QTNF9, CALCA, CALCB, CCK, CGA, CGB1, CGB2, CGB3, CGB5, CGB8, COPA, CORT, CRH, CSH1, CSH2, CSHL1, ENHO, EPO, ERFE, FBN1, FNDC5, FSHB, GAL, GAST, GCG, GH, GH1, GH2, GHRH, GHRL, GIP, GNRH1, GNRH2, GPHA2, GPHB5, IAPP, INS, INSL3, INSL4, INSL5, INSL6, LHB, METRNL, MLN, NPPA, NPPB, NPPC, OSTN, OXT, PMCH, PPY, PRL, PRLH, PTH, PTHLH, PYY, RETN, RETNLB, RLN1, RLN2, RLN3, SCT, SPX, SST, STC1, STC2, TG, TOR2A, TRH, TSHB, TTR, UCN, UCN2, UCN3, UTS2, UTS2B и VIP; гидролаз, причем гидролазы выбраны из группы, состоящей из AADACL2, ABHD15, ACP7, ACP7, ADA2, ADAMTSL1, AOA1, ARSF, ARSI, ARSJ, ARSK, BTBD, CHI3L2, ENPP1, ENPP2, ENPP3, ENPP5, ENTPD5, ENTPD6,

GBP1, GGH, GPLD1, HPSE, LIPC, LIPF, LIPG, LIPH, LIPI, LIPK, LIPM, LIPN, LPL, PGLYRP2, PLA1A, PLA2G10, PLA2G12A, PLA2G1B, PLA2G2A, PLA2G2D, PLA2G2E, PLA2G2F, PLA2G3, PLA2G5, PLA2G7, PNLIP, PNLIPRP2, PNLIPRP3, PON1, PON3, PPT1, SMPDL3A, THEM6, THSD1 и THSD4; иммуноглобулинов, причем

5 иммуноглобулины выбраны из группы, состоящей из IGSF10, IGKV1-12, IGKV1-16, IGKV1-33, IGKV1-6, IGKV1D-12, IGKV1D-39, IGKV1D-8, IGKV2-30, IGKV2D-30, IGKV3-11, IGKV3D-20, IGKV5-2, IGLC1, IGLC2 и IGLC3; изомераз, причем изомеразы выбраны из группы, состоящей из NAXE, PPIA и PTGDS; киназ, причем киназы выбраны из группы, состоящей из ADCK1, ADPGK, FAM20C, ICOS и PKDCC; лиаз,

10 причем лиазы выбраны из группы, состоящей из PM20D1, PAM и CA6; ингибиторов металлоферментов, причем ингибиторы металлоферментов выбраны из группы, состоящей из FETUB, SPOCK3, TIMP2, TIMP3, TIMP4, WFIKKN1 и WFIKKN2; металлопротеаз, причем металлопротеазы выбраны из группы, состоящей из ADAM12, ADAM28, ADAM9, ADAMDEC1, ADAMTS1, ADAMTS10, ADAMTS12, ADAMTS13,

15 ADAMTS14, ADAMTS15, ADAMTS16, ADAMTS17, ADAMTS18, ADAMTS19, ADAMTS2, ADAMTS20, ADAMTS3, ADAMTS4, ADAMTS5, ADAMTS6, ADAMTS7, ADAMTS8, ADAMTS9, CLCA1, CLCA2, CLCA4, IDE, MEP1B, MMEL1, MMP1, MMP10, MMP11, MMP12, MMP13, MMP16, MMP17, MMP19, MMP2, MMP20, MMP21, MMP24, MMP25, MMP26, MMP28, MMP3, MMP7, MMP8, MMP9, PAPPA, PAPPA2,

20 TLL1 и TLL2; белков молока, причем белки молока выбраны из группы, состоящей из CSN1S1, CSN2, CSN3 и LALBA; нейроактивных белков, причем нейроактивные белки выбраны из группы, состоящей из CARTPT, NMS, NMU, NPB, NPFF, NPS, NPVF, NPW, NPY, PCSK1N, PDYN, PENK, PNOC, POMC, PROK2, PTH2, PYY2, PYY3, QRFP, TAC1 и TAC3; протеаз, причем протеазы выбраны из группы, состоящей из ADAMTS6,

25 C1R, C1RL, C2, CASP4, CELA1, CELA2A, CELA2B, CFB, CFD, CFI, CMA1, CORIN, CTRB1, CTRB2, CTSB, CTSD, DHH, F10, F11, F12, F2, F3, F7, F8, F9, FAP, FURIN, GZMA, GZMK, GZMM, HABP2, HGFAC, HTRA3, HTRA4, IHH, KLK10, KLK11, KLK12, KLK13, KLK14, KLK15, KLK3, KLK4, KLK5, KLK6, KLK7, KLK8, KLK9, KLKB1, MASP1, MASP2, MST1L, NAPSA, OVCH1, OVCH2, PCSK2, PCSK5, PCSK6,

30 PCSK9, PGA3, PGA4, PGA5, PGC, PLAT, PLAU, PLG, PROC, PRSS1, PRSS12, PRSS2, PRSS22, PRSS23, PRSS27, PRSS29P, PRSS3, PRSS33, PRSS36, PRSS38, PRSS3P2, PRSS42, PRSS44, PRSS47, PRSS48, PRSS53, PRSS57, PRSS58, PRSS8, PRTN3, RELN, REN, TMPRSS11D, TMPRSS11E, TMPRSS2, TPSAB1, TPSB2 и TPSD1; ингибиторов

протеаз, причем ингибиторы протеаз выбраны из группы, состоящей из A2M, A2ML1, AMBP, ANOS1, COL28A1, COL6A3, COL7A1, CPAMD8, CST1, CST2, CST3, CST4, CST5, CST6, CST7, CST8, CST9, CST9L, CST9LP1, CSTL1, EPPIN, GPC3, HMSD, ITIH1, ITIH2, ITIH3, ITIH4, ITIH5, ITIH6, KNG1, OPRPN, OVOS1, OVOS2, PAPLN, PI15, PI16, PI3, PZP, R3HDML, SERPINA1, SERPINA10, SERPINA11, SERPINA12, SERPINA13P, SERPINA3, SERPINA4, SERPINA5, SERPINA7, SERPINA9, SERPINB2, SERPINB5, SERPINC1, SERPINE1, SERPINE2, SERPINE3, SERPINF2, SERPING1, SERPINI1, SERPINI2, SPINK1, SPINK13, SPINK14, SPINK2, SPINK4, SPINK5, SPINK6, SPINK7, SPINK8, SPINK9, SPINT1, SPINT3, SPINT4, SPOCK1, SPOCK2, SPP2, SSPO, TFPI, TFPI2, WFDC1, WFDC10A, WFDC13, WFDC2, WFDC3, WFDC5, WFDC6 и WFDC8; протеинфосфатаз, причем протеинфосфатазы выбраны из группы, состоящей из ACP7, ACPP, PTEN и PTPRZ1; эстераз, причем эстеразы выбраны из группы, состоящей из BCHE, CEL, CES4A, CES5A, NOTUM и SIAE; трансфераз, причем трансферазы выбраны из группы, состоящей из METTL24, FKRP, CHSY1, CHST9 и B3GAT1; и вазоактивных белков, причем вазоактивные белки выбраны из группы, состоящей из AGGF1, AGT, ANGPT1, ANGPT2, ANGPTL4, ANGPTL6, EDN1, EDN2, EDN3 и NTS.

В предпочтительном варианте реализации белок выбран из группы, состоящей из цитокинов; факторов роста; белков, связывающих факторы роста; белков, связывающих гепарин; гормонов; нейроактивных белков; и вазоактивных белков.

В более предпочтительном варианте реализации белок выбран из группы, состоящей из цитокинов, причем цитокины выбраны из группы, состоящей из BMP1, BMP10, BMP15, BMP2, BMP3, BMP4, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8A, BMP8B, C1QTNF4, CCL1, CCL11, CCL13, CCL14, CCL15, CCL16, CCL17, CCL18, CCL19, CCL2, CCL21, CCL22, CCL23, CCL24, CCL25, CCL26, CCL27, CCL28, CCL3, CCL3L1, CCL3L3, CCL4, CCL4L, CCL4L2, CCL5, CCL7, CCL8, CD40LG, CER1, CKLF, CLCF1, CNTF, CSF1, CSF2, CSF3, CTF1, CX3CL1, CXCL1, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL14, CXCL16, CXCL17, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL8, CXCL9, DKK1, DKK2, DKK3, DKK4, EDA, EBI3, FAM3B, FAM3C, FASLG, FLT3LG, GDF1, GDF10, GDF11, GDF15, GDF2, GDF3, GDF5, GDF6, GDF7, GDF9, GPI, GREM1, GREM2, GRN, ИФНА1, ИФНА13, ИФНА10, ИФНА14, ИФНА16, ИФНА17, ИФНА2, ИФНА21, ИФНА4, ИФНА5, ИФНА6, ИФНА7, ИФНА8, ИФНВ1, ИФНЕ, ИФНГ, ИФНК, ИФНЛ1, ИФНЛ2, ИФНЛ3, ИФНЛ4, ИФНВ1, ИЛ-10, ИЛ-11, ИЛ-12А, ИЛ-12В, ИЛ-13, ИЛ-15, ИЛ-16, ИЛ-

17A, ИЛ-17B, ИЛ-17C, ИЛ-17D, ИЛ-17F, ИЛ-18, ИЛ-19, ИЛ-1A, ИЛ-1B, ИЛ-1F10, ИЛ-
 2, ИЛ-20, ИЛ-21, ИЛ-22, ИЛ-23A, ИЛ-24, ИЛ-25, ИЛ-26, ИЛ-27, ИЛ-3, ИЛ-31, ИЛ-32,
 ИЛ-33, ИЛ-34, ИЛ-36A, ИЛ-36B, ИЛ-36G, ИЛ-36RN, ИЛ-37, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-7,
 ИЛ-9, LEFTY1, LEFTY2, LIF, LTA, MIF, MSTN, NAMPT, NODAL, OSM, PF4, PF4V1,
 5 SCGB3A1, SECTM1, SLURP1, SPP1, THNSL2, THPO, ФНО, ФНОSF10, ФНОSF11,
 ФНОSF12, ФНОSF13, ФНОSF13B, ФНОSF14, ФНОSF15, TSLP, VSTM1, WNT1,
 WNT10A, WNT10B, WNT11, WNT16, WNT2, WNT2B, WNT3, WNT3A, WNT4,
 WNT5A, WNT5B, WNT6, WNT7A, WNT7B, WNT8A, WNT8B, WNT9A, WNT9B, XCL1
 и XCL2; факторов роста, причем факторы роста выбраны из группы, состоящей из
 10 AMH, ARTN, BTC, CDNF, CFC1, CFC1B, CHRDL1, CHRDL2, CLEC11A, CNMD,
 EFEMP1, EGF, EGFL6, EGFL7, EGFL8, EPGN, EREG, EYS, FGF1, FGF10, FGF16,
 FGF17, FGF18, FGF19, FGF2, FGF20, FGF21, FGF22, FGF23, FGF3, FGF4, FGF5, FGF6,
 FGF7, FGF8, FGF9, FRZB, GDNF, GFER, GKN1, HBEGF, HGF, ИФP1, ИФP2, INHA,
 INHBA, INHBB, INHBC, INHBE, INS, KITLG, MANF, MDK, MIA, NGF, NOV, NRG1,
 15 NRG2, NRG3, NRG4, NRTN, NTF3, NTF4, OGN, PDGFA, PDGFB, PDGFC, PDGFD,
 PGF, PROK1, PSPN, PTN, SDF1, SDF2, SFRP1, SFRP2, SFRP3, SFRP4, SFRP5, TDGF1,
 TFF1, TGFA, TGFB1, TGFB2, TGFB3, THBS4, TIMP1, VEGFA, VEGFB, VEGFC,
 VEGFD и WISP3; белков, связывающих факторы роста, причем белки, связывающие
 факторы роста, выбраны из группы, состоящей из CHRD, CYR61, ESM1, FGFBP1,
 20 FGFBP2, FGFBP3, HTRA1, GHBP, IGFALS, IGFBP1, IGFBP2, IGFBP3, IGFBP4,
 IGFBP5, IGFBP6, IGFBP7, LTBP1, LTBP2, LTBP3, LTBP4, SOSTDC1, NOG, TWSG1 и
 WIF1; белков, связывающих гепарин, причем белки, связывающие гепарин, выбраны из
 группы, состоящей из ADA2, ADAMTSL5, ANGPTL3, APOB, APOE, APOH, COL5A1,
 COMP, CTGF, FBLN7, FN1, FSTL1, HRG, LAMC2, LPC, LIPG, LIPH, LIPI, LPL,
 25 PCOLCE2, POSTN, RSPO1, RSPO2, RSPO3, RSPO4, SAA1, SLIT2, SOST, THBS1 и
 VTN; гормонов, причем гормоны выбраны из группы, состоящей из ADCYAP1,
 ADIPOQ, ADM, ADM2, ANGPTL8, APELA, APLN, AVP, C1QTNF12, C1QTNF9,
 CALCA, CALCB, CCK, CGA, CGB1, CGB2, CGB3, CGB5, CGB8, COPA, CORT, CRH,
 CSH1, CSH2, CSHL1, ENHO, EPO, ERFE, FBN1, FNDC5, FSHB, GAL, GAST, GCG, GH,
 30 GH1, GH2, GHRH, GHRL, GIP, GNRH1, GNRH2, GPHA2, GPHB5, IAPP, INS, INSL3,
 INSL4, INSL5, INSL6, LHB, METRNL, MLN, NPPA, NPPB, NPPC, OSTN, OXT, PMCH,
 PPY, PRL, PRLH, PTH, PTHLH, PYY, RETN, RETNLB, RLN1, RLN2, RLN3, SCT, SPX,
 SST, STC1, STC2, TG, TOR2A, TRH, TSHB, TTR, UCN, UCN2, UCN3, UTS2, UTS2B и

VIP; нейроактивных белков, причем нейроактивные белки выбраны из группы, состоящей из CARTPT, NMS, NMU, NPB, NPFF, NPS, NPVF, NPW, NPY, PCSK1N, PDYN, PENK, PNOC, POMC, PROK2, PTH2, PYY2, PYY3, QRFP, TAC1 и TAC3; и вазоактивных белков, причем вазоактивные белки выбраны из группы, состоящей из

5 AGGF1, AGT, ANGPT1, ANGPT2, ANGPTL4, ANGPTL6, EDN1, EDN2, EDN3 и NTS. В еще более предпочтительном варианте реализации белок выбран из группы, состоящей из цитокинов, факторов роста, гормонов и нейроактивных белков.

В конкретном варианте реализации настоящего изобретения белок выбран из группы, состоящей из цитокинов, причем цитокины выбраны из группы, состоящей из BMP1,

10 BMP10, BMP15, BMP2, BMP3, BMP4, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8A, BMP8B, C1QTNF4, CCL1, CCL11, CCL13, CCL14, CCL15, CCL16, CCL17, CCL18, CCL19, CCL2, CCL21, CCL22, CCL23, CCL24, CCL25, CCL26, CCL27, CCL28, CCL3, CCL3L1, CCL3L3, CCL4, CCL4L, CCL4L2, CCL5, CCL7, CCL8, CD40LG, CER1, CKLF, CLCF1, CNTF, CSF1, CSF2, CSF3, CTF1, CX3CL1, CXCL1, CXCL10, CXCL11, CXCL12,

15 CXCL13, CXCL14, CXCL16, CXCL17, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL8, CXCL9, DKK1, DKK2, DKK3, DKK4, EDA, EBI3, FAM3B, FAM3C, FASLG, FLT3LG, GDF1, GDF10, GDF11, GDF15, GDF2, GDF3, GDF5, GDF6, GDF7, GDF9, GPI, GREM1, GREM2, GRN, ИФНА1, ИФНА13, ИФНА10, ИФНА14, ИФНА16, ИФНА17, ИФНА2, ИФНА21, ИФНА4, ИФНА5, ИФНА6, ИФНА7, ИФНА8, ИФНВ1, ИФНЕ, ИФНГ,

20 ИФНК, ИФНЛ1, ИФНЛ2, ИФНЛ3, ИФНЛ4, ИФНВ1, ИЛ-10, ИЛ-11, ИЛ-12А, ИЛ-12В, ИЛ-13, ИЛ-15, ИЛ-16, ИЛ-17А, ИЛ-17В, ИЛ-17С, ИЛ-17D, ИЛ-17F, ИЛ-18, ИЛ-19, ИЛ-1А, ИЛ-1В, ИЛ-1F10, ИЛ-2, ИЛ-20, ИЛ-21, ИЛ-22, ИЛ-23А, ИЛ-24, ИЛ-25, ИЛ-26, ИЛ-27, ИЛ-3, ИЛ-31, ИЛ-32, ИЛ-33, ИЛ-34, ИЛ-36А, ИЛ-36В, ИЛ-36G, ИЛ-36RN, ИЛ-37, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-7, ИЛ-9, LEFTY1, LEFTY2, LIF, LTA, MIF, MSTN, NAMPT,

25 NODAL, OSM, PF4, PF4V1, SCGB3A1, SECTM1, SLURP1, SPP1, THNSL2, THPO, ФНО, ФНОSF10, ФНОSF11, ФНОSF12, ФНОSF13, ФНОSF13B, ФНОSF14, ФНОSF15, TSLP, VSTM1, WNT1, WNT10A, WNT10B, WNT11, WNT16, WNT2, WNT2B, WNT3, WNT3A, WNT4, WNT5A, WNT5B, WNT6, WNT7A, WNT7B, WNT8A, WNT8B, WNT9A, WNT9B, XCL1 и XCL2; факторов роста, причем факторы роста выбраны из

30 группы, состоящей из AMH, ARTN, BTC, CDNF, CFC1, CFC1B, CHRDL1, CHRDL2, CLEC11A, CNMD, EFEMP1, EGF, EGFL6, EGFL7, EGFL8, EPGN, EREG, EYS, FGF1, FGF10, FGF16, FGF17, FGF18, FGF19, FGF2, FGF20, FGF21, FGF22, FGF23, FGF3, FGF4, FGF5, FGF6, FGF7, FGF8, FGF9, FRZB, GDNF, GFER, GKN1, HBEGF, HGF,

ИФР1, ИФР2, INHA, INHBA, INHBB, INHBC, INHBE, INS, KITLG, MANF, MDK, MIA, NGF, NOV, NRG1, NRG2, NRG3, NRG4, NRTN, NTF3, NTF4, OGN, PDGFA, PDGFB, PDGFC, PDGFD, PGF, PROK1, PSPN, PTN, SDF1, SDF2, SFRP1, SFRP2, SFRP3, SFRP4, SFRP5, TDGF1, TFF1, TGFA, TGFB1, TGFB2, TGFB3, THBS4, TIMP1, VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD и WISP3; гормонов, причем гормоны выбраны из группы, состоящей из ADCYAP1, ADIPOQ, ADM, ADM2, ANGPTL8, APELA, APLN, AVP, C1QTNF12, C1QTNF9, CALCA, CALCB, CCK, CGA, CGB1, CGB2, CGB3, CGB5, CGB8, COPA, CORT, CRH, CSH1, CSH2, CSHL1, ENHO, EPO, ERFE, FBN1, FNDC5, FSHB, GAL, GAST, GCG, GH, GH1, GH2, GHRH, GHRL, GIP, GNRH1, GNRH2, GPHA2, GPHB5, IAPP, INS, INSL3, INSL4, INSL5, INSL6, LHB, METRNL, MLN, NPPA, NPPB, NPPC, OSTN, OXT, PMCH, PPY, PRL, PRLH, PTH, PTHLH, PYY, RETN, RETNLB, RLN1, RLN2, RLN3, SCT, SPX, SST, STC1, STC2, TG, TOR2A, TRH, TSHB, TTR, UCN, UCN2, UCN3, UTS2, UTS2B и VIP; и нейроактивных белков, причем нейроактивные белки выбраны из группы, состоящей из CARTPT, NMS, NMU, NPB, NPFF, NPS, NPVF, NPW, NPY, PCSK1N, PDYN, PENK, PNOC, POMC, PROK2, PTH2, PYY2, PYY3, QRFP, TAC1 и TAC3.

В еще одном конкретном варианте реализации настоящего изобретения белок выбран из группы, состоящей из цитокинов, причем цитокины выбраны из группы, состоящей из BMP-2, BMP-4, CNTF, MSTN, ИФНГ, ИЛ-6, SPP1; факторов роста, причем факторы роста выбраны из группы, состоящей из EGF, FGF1, GDNF, ИФР1, ИФР2, NTF3, TGFB1; гормонов, причем гормоны выбраны из группы, состоящей из EPO, FBN1, GH, GHRH, OSTN, UCN; и нейроактивных белков, причем нейроактивные белки выбраны из группы, состоящей из NPFF, NPY, PNOC, POMC.

В еще одном конкретном варианте реализации настоящего изобретения белок выбран из группы, состоящей из цитокинов, причем цитокины выбраны из группы, состоящей из BMP-2, BMP-4, CNTF, MSTN, ИФНГ, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10, SPP1; факторов роста, причем факторы роста выбраны из группы, состоящей из EGF, FGF1, GDNF, ИФР1, ИФР2, NTF3, TGFB1; гормонов, причем гормоны выбраны из группы, состоящей из EPO, FBN1, GH, GHRH, OSTN, UCN, INS; и нейроактивных белков, причем нейроактивные белки выбраны из группы, состоящей из NPFF, NPY, PNOC, POMC.

В более конкретном варианте реализации настоящего изобретения белок выбран из группы, состоящей из факторов роста. В еще более конкретном варианте реализации настоящего изобретения белок выбран из группы, состоящей из факторов роста, причем

- факторы роста выбраны из группы, состоящей из AMH, ARTN, BDNF, BTC, CDFN, CFC1, CFC1B, CHRDL1, CHRDL2, CLEC11A, CNMD, EFEMP1, EGF, EGFL6, EGFL7, EGFL8, EPGN, EREG, EYS, FGF1, FGF10, FGF16, FGF17, FGF18, FGF19, FGF2, FGF20, FGF21, FGF22, FGF23, FGF3, FGF4, FGF5, FGF6, FGF7, FGF8, FGF9, FRZB, GDNF, GFER, GKN1, HBEGF, HGF, ИФР1, ИФР2, INHA, INHBA, INHBB, INHBC, INHBE, INS, KITLG, MANF, MDK, MIA, NGF, NOV, NRG1, NRG2, NRG3, NRG4, NRTN, NTF3, NTF4, OGN, PDGFA, PDGFB, PDGFC, PDGFD, PGF, PROK1, PSPN, PTN, SDF1, SDF2, SFRP1, SFRP2, SFRP3, SFRP4, SFRP5, TDGF1, TFF1, TGFA, TGFB1, TGFB2, TGFB3, THBS4, TIMP1, VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD и WISP3.
- 10 В еще одном еще более конкретном варианте реализации настоящего изобретения белок выбран из группы, состоящей из факторов роста, причем факторы роста выбраны из группы, состоящей из EGF, FGF1, GDNF, ИФР1, ИФР2, NTF3, TGFB1. Конкретнее, белок представляет собой ИФР1, предпочтительно ИФР1 человека.
- В еще более конкретном варианте реализации настоящего изобретения белок выбран из
- 15 группы, состоящей из цитокинов; факторов роста и гормонов, причем цитокины предпочтительно выбраны из группы, состоящей из BMP-2, BMP-4, CNTF, MSTN, ИФНГ, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10, SPP1; факторы роста выбраны из группы, состоящей из EGF, FGF1, GDNF, ИФР1, ИФР2, NTF3, TGFB1; а гормоны выбраны из группы, состоящей из EPO, FBN1, GH, GHRH, OSTN, UCN, INS. В наиболее конкретном случае
- 20 белок выбран из группы, состоящей из инсулиноподобного фактора роста 1 (ИФР1), инсулина (INS), эритропоэтина (ЕРО), интерлейкина-4 (ИЛ-4) и интерлейкина-10 (ИЛ-10).
- В одном варианте реализации настоящего изобретения мРНК представляет
- 25 несвязанную мРНК. В предпочтительном варианте реализации мРНК содержит антиреверсный аналог CAP, например, кэп m7G(5')G, m7GpppG, внутренний сайт посадки рибосом (IRES) и полиА-хвост на 3'-конце, в частности, для улучшения трансляции. мРНК может содержать дополнительные области, стимулирующие трансляцию, известные специалисту.
- 30 В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения мРНК содержит комбинацию модифицированных и немодифицированных нуклеотидов. В более предпочтительном варианте реализации в такой модифицированной мРНК 1 - 100%, предпочтительно 10 - 100%, более предпочтительно 50 - 100%, еще более

предпочтительно 90 - 100%, наиболее предпочтительно 100% уридиновых нуклеозидов модифицированы. Нуклеотиды, содержащие аденозин, гуанозин и цитидин, могут быть немодифицированы или частично модифицированы, и предпочтительно присутствуют в немодифицированной форме. Содержание модифицированных уридиновых нуклеотидов в мРНК предпочтительно находится в диапазоне от 5 до 25%. В особенно предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения модифицированные уридиновые нуклеотиды представляют собой N¹-метилпсевдоуридин. В более предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения мРНК содержит комбинацию модифицированных и немодифицированных нуклеотидов, причем в такой модифицированной мРНК 1 - 100%, предпочтительно 10 - 100%, более предпочтительно 50 - 100%, еще более предпочтительно 90 - 100%, наиболее предпочтительно 100% уридиновых нуклеотидов представляют собой N¹-метилпсевдоуридин.

В более предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения мРНК

представляет собой мРНК, подвергшуюся оптимизации кодонов и содержащую комбинацию модифицированных и немодифицированных нуклеотидов. В более предпочтительном варианте реализации в такой модифицированной мРНК 1 - 100%, предпочтительно 10 - 100%, более предпочтительно 50 - 100%, еще более предпочтительно 90 - 100%, наиболее предпочтительно 100% уридиновых нуклеозидов модифицированы. Нуклеотиды, содержащие аденозин, гуанозин и цитидин, могут быть немодифицированы или частично модифицированы, и предпочтительно присутствуют в немодифицированной форме. Содержание модифицированных уридиновых нуклеотидов в мРНК предпочтительно находится в диапазоне от 5 до 25%. В особенно предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения модифицированные уридиновые нуклеотиды представляют собой N¹-метилпсевдоуридин. В более предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения РНК представляет собой мРНК, содержащую комбинацию модифицированных и немодифицированных нуклеотидов, причем в такой модифицированной мРНК 1 - 100%, предпочтительно 10 - 100%, более предпочтительно 50 - 100%, еще более предпочтительно 90 - 100%, наиболее предпочтительно 100% уридиновых нуклеотидов представляют собой N¹-метилпсевдоуридин.

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения мРНК содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую инсулиноподобный фактор роста 1

(ИФР1) человека в качестве белка, более предпочтительно - мРНК представляет собой несвязанную мРНК, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую инсулиноподобный фактор роста 1 (ИФР1) человека в качестве белка. В

предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения мРНК содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую зрелый ИФР-1 человека.

В более предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения мРНК содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую пропептид ИФР1, предпочтительно пропептид ИФР1 человека, и нуклеотидную последовательность, кодирующую зрелый белок ИФР1, предпочтительно зрелый белок ИФР1 человека, и не содержит нуклеотидной последовательности, кодирующей Е-пептид ИФР1, предпочтительно не содержит нуклеотидной последовательности, кодирующей Е-пептид ИФР1 человека.

В дополнительном более предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения мРНК содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую пропептид ИФР1, предпочтительно пропептид ИФР1 человека, и нуклеотидную последовательность, кодирующую зрелый белок ИФР1, предпочтительно зрелый белок ИФР1 человека. мРНК предпочтительно не содержит нуклеотидной последовательности, кодирующей Е-пептид ИФР1, более предпочтительно не содержит нуклеотидной последовательности, кодирующей Е-пептид ИФР1 человека. В

дополнительном более предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения мРНК содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую пропептид ИФР1, предпочтительно пропептид ИФР1 человека, нуклеотидную последовательность, кодирующую зрелый белок ИФР1, предпочтительно зрелый белок ИФР1 человека, и нуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальный пептид нейротрофического фактора головного мозга (BDNF). мРНК предпочтительно не содержит нуклеотидной последовательности, кодирующей Е-пептид ИФР1, более предпочтительно не содержит нуклеотидной последовательности, кодирующей Е-пептид ИФР1 человека.

В еще более предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения мРНК содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую пропептид (также называемый про-доменом) ИФР1, ИФР1 человека, содержащий 27 аминокислот, и нуклеотидную последовательность, кодирующую зрелый ИФР1, предпочтительно зрелый ИФР1 человека, содержащий 70 аминокислот, и предпочтительно не содержит

нуклеотидной последовательности, кодирующей Е-пептид ИФР1, предпочтительно не содержит нуклеотидной последовательности, кодирующей Е-пептид ИФР1 человека.

В дополнительном еще более предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения мРНК содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую

5 пропептид (также называемый про-доменом) ИФР1, предпочтительно ИФР1 человека, содержащий 27 аминокислот, нуклеотидную последовательность, кодирующую зрелый ИФР1, предпочтительно зрелый ИФР1 человека, содержащий 70 аминокислот, и нуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальный пептид нейротрофического фактора головного мозга (BDNF). мРНК предпочтительно не
10 содержит нуклеотидной последовательности, кодирующей Е-пептид ИФР1, более предпочтительно не содержит нуклеотидной последовательности, кодирующей Е-пептид ИФР1 человека.

В особенно предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения мРНК содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую пропептид (также

15 называемый про-доменом) ИФР1 человека, содержащий 27 аминокислот, и нуклеотидную последовательность, кодирующую зрелый ИФР1 человека, содержащий 70 аминокислот, и предпочтительно не содержит нуклеотидной последовательности, кодирующей Е-пептид (также называемый Е-доменом) ИФР1 человека, причем нуклеотидная последовательность, кодирующая пропептид (также называемый про-
20 доменом) ИФР1 человека, содержащий 27 аминокислот, и нуклеотидная последовательность, кодирующая зрелый ИФР1 человека, содержащий 70 аминокислот, и нуклеотидная последовательность, кодирующая Е-пептид, в базе данных Uniprot называются UniProtKB - P05019, а в базе данных Genbank - NM_000618.4, NM_001111285.2 и NM_001111283.2, соответственно.

25 В еще более предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения мРНК содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую пропептид (также называемый про-доменом) ИФР1 человека, содержащий 27 аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 38, и нуклеотидную последовательность, кодирующую зрелый ИФР1 человека, содержащий 70 аминокислот, представленную в SEQ ID NO:
30 39, и предпочтительно не содержит нуклеотидной последовательности, кодирующей Е-пептид (также называемый Е-доменом) ИФР1 человека.

В дополнительном еще более предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения мРНК содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую

- пропептид (также называемый про-доменом) ИФР1 человека, содержащий 27 аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 38, нуклеотидную последовательность, кодирующую зрелый ИФР1 человека, содержащий 70 аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 39, нуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальный пептид нейротрофического фактора головного мозга (BDNF), предпочтительно, нуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальный пептид нейротрофического фактора головного мозга (BDNF), представленную в SEQ ID NO: 30. мРНК предпочтительно не содержит нуклеотидной последовательности, кодирующей Е-пептид (также называемый Е-доменом) ИФР1 человека.
- 5 В особенно предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения мРНК, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую инсулиноподобный фактор роста 1 (ИФР1) человека и сигнальный пептид нейротрофического фактора головного мозга (BDNF), содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8.
- 10 В дополнительном предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения мРНК, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую инсулиноподобный фактор роста 1 (ИФР1) человека и сигнальный пептид нейротрофического фактора головного мозга (BDNF), содержит нуклеотидную последовательность, транскрибированную с последовательности ДНК, представленной
- 15 в SEQ ID NO: 7. Нуклеотидная последовательности предпочтительно транскрибирована с последовательности ДНК, представленной в SEQ ID NO: 7, *in vitro*.
- 20 В более предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения мРНК, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую инсулиноподобный фактор роста 1 (ИФР1) человека и сигнальный пептид нейротрофического фактора
- 25 головного мозга (BDNF), содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, причем предпочтительно 1 - 100%, более предпочтительно 50 - 100%, еще более предпочтительно 90 - 100%, наиболее предпочтительно 100% уридиновых нуклеотидов представляют собой N¹-метилпсевдоуридин.
- 30 В дополнительном более предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения мРНК, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую инсулиноподобный фактор роста 1 (ИФР1) человека и сигнальный пептид нейротрофического фактора головного мозга (BDNF), содержит нуклеотидную

последовательность, транскрибированную с последовательности ДНК, представленной в SEQ ID NO: 7, причем предпочтительно 1 - 100%, более предпочтительно 50 - 100%, еще более предпочтительно 90 - 100%, наиболее предпочтительно 100% уридиновых нуклеотидов представляют собой N¹-метилпсевдоуридин. В указанном варианте реализации нуклеотидная последовательность предпочтительно транскрибирована с последовательности ДНК, представленной в SEQ ID NO: 7, *in vitro*, в то время как уридиновые нуклеотиды представлены только N¹-метилпсевдоуридин-5'-трифосфатом (N¹-метилпсевдо-УТФ), т.е. 100% N¹-метилпсевдо-УТФ используются для транскрипции с последовательности ДНК, представленной в SEQ ID NO: 7.

- 10 В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения сигнальный пептид нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) представляет собой сигнальный пептид BDNF человека, более предпочтительно, сигнальный пептид, представленный в SEQ ID NO: 31, в частности, сигнальный пептид BDNF человека, кодируемый нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 30.

15 В более предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения мРНК содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую в порядке от 5'-конца к 3'-концу:

- i) сигнальный пептид нейротрофического фактора головного мозга (BDNF);
- 20 ii) необязательно, про-домен белка; и
- iii) зрелый белок.

В еще более предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения мРНК содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую в порядке от 5'-конца к 3'-концу:

- i) сигнальный пептид нейротрофического фактора головного мозга (BDNF);
- ii) необязательно, про-домен ИФР человека; и
- 25 iii) зрелый ИФР человека.

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения сигнальный пептид нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) замещает природный сигнальный пептид белка.

30 В дополнительном аспекте настоящего изобретения предложена единица транскрипции, экспрессирующий вектор или вектор для генной терапии, содержащие

нуклеиновую кислоту, кодирующую белок и сигнальный пептид, причем аминокислоты 1-9 с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида характеризуются средним показателем гидрофобности выше 2, причем указанный сигнальный пептид выбран из группы, состоящей из

- 5 i) сигнального пептида, гетерологичного указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, необязательно модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, при условии, что указанный белок не является оксидоредуктазой;
- 10 ii) сигнального пептида, гомологичного указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты; и
- 15 iii) природной аминокислотной последовательности, не обладающей функцией сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная последовательность необязательно модифицирована путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты.

В дополнительном аспекте настоящего изобретения предложена единица транскрипции, экспрессирующий вектор или вектор для генной терапии, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую белок и сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, представляет собой сигнальный пептид нейротрофического фактора головного мозга (BDNF), а указанный белок не является оксидоредуктазой, предпочтительно, не является тиоредоксином, более предпочтительно, не является фактором выживания колбочек, продуцируемым палочками. По отношению к сигнальному пептиду нейротрофического фактора

20 головного мозга (BDNF) и белку применимы те же особенности, что указаны в других частях настоящего документа.

В дополнительном аспекте настоящего изобретения предложены единица транскрипции, экспрессирующий вектор или вектор для генной терапии, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую белок; и сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, представляет собой сигнальный пептид нейротрофического фактора головного мозга (BDNF), а указанный белок выбран из группы, состоящей из карбоксипептидаз; цитокинов; внеклеточных лигандов и

30

- переносчиков; белков внеклеточного матрикса; глюкозидаз; гликозилтрансфераз; факторов роста; белков, связывающих факторы роста; белков, связывающих гепарин; гормонов; гидролаз; иммуноглобулинов; изомераз; киназ; лиаз; ингибиторов металлоферментов; металлопротеаз; белков молока; нейроактивных белков; протеаз; ингибиторов протеаз; протеинфосфатаз; эстераз; трансфераз; и вазоактивных белков.
- По отношению к сигнальному пептиду нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) и белку применимы те же особенности, что указаны в других частях настоящего документа.
- В дополнительном аспекте настоящего изобретения предложена терапевтическая композиция, содержащая указанную мРНК и/или единицу транскрипции, экспрессирующий вектор или вектор для генной терапии, описанные выше. По отношению к сигнальному пептиду нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) и белку применимы те же особенности, что указаны в других частях настоящего документа. мРНК согласно настоящему изобретению обычно предложена в виде терапевтической композиции, которая предпочтительно представляет собой жидкую композицию. Жидкая композиция представляет собой любую композицию, в которой мРНК представлена в растворе в жидкости. В одном варианте реализации настоящего изобретения мРНК растворяют в воде или буферном или незабуференном водном растворе. Указанный раствор предпочтительно представляет собой водный раствор. Таким образом, жидкость может представлять собой воду, предпочтительно стерильную воду, более предпочтительно «воду для инъекций» (WFI) или любой другой буферный или незабуференный водный раствор. В одном варианте реализации настоящего изобретения жидкая композиция представляет собой незабуференный раствор, предпочтительно раствор соли, более предпочтительно - раствор фармацевтически приемлемой соли, еще более предпочтительно - раствор NaCl, т.е. раствор поваренной соли. Раствор соли предпочтительно является изотоническим и, еще более предпочтительно, характеризуется физиологическим значением pH. В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения раствор, в котором содержится мРНК, представляет собой буферный раствор. Такой раствор предпочтительно изотоничен по отношению к крови. В принципе, можно использовать любой буфер, который проявляет эффективные буферные свойства в физиологическом диапазоне, в частности, в диапазоне pH от 3,0 до 10,5, и более предпочтительно, в

диапазоне рН от 4,0 до 9,0. Предпочтительными буферами являются ацетатный, фосфатный буферы, физиологический раствор с фосфатным буфером (PBS), карбонатный, лактатный и цитратный буферы или раствор Рингера, предпочтительно физиологический раствор с фосфатным буфером (PBS). В более предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения раствор, в котором содержится мРНК, представляет собой физиологический раствор с фосфатным буфером (PBS)

Концентрация мРНК в терапевтической композиции не особенно важна, при необходимости ее можно корректировать. Предпочтительно указанная концентрация находится в диапазоне от 0,05 до 20,0 мкг/мкл, более предпочтительно - в диапазоне от 0,1 до 10,0 мкг/мкл, еще более предпочтительно - в диапазоне от 0,2 до 5 мкг/л, в частности, в диапазоне от 0,4 до 2,0 мкг/мкл, конкретнее, в диапазоне от 0,6 до 1,5 мкг/мкл, еще конкретнее - в диапазоне от 0,80 до 1,20 мкг/мкл. Особенно предпочтительным является диапазон от 0,01 мкг до 0,1 г, предпочтительно от 0,1 мкг до 0,01 г, более предпочтительно - от 0,5 мкг до 1 мг, еще более предпочтительно - от 0,5 мкг до 10 мкг.

В дополнительном аспекте настоящего изобретения предложен набор, содержащий мРНК и/или единицу транскрипции, экспрессирующий вектор или вектор для генной терапии, или терапевтическую композицию, описанную выше, а также инструкции, необязательно карту вектора, необязательно клетку-хозяина, необязательно культуральную среду для культивирования клетки-хозяина векторов для генной терапии или, необязательно, селективную среду для селекции и культивирования трансфицированной клетки-хозяина. Набор согласно настоящему изобретению может быть представлен в виде (или в форме) набора компонентов. Набор может дополнительно содержать один или более из компонентов терапевтической композиции согласно настоящему изобретению, например, в одном или более отдельных контейнерах. Например, набор может содержать мРНК (например, в высушенной форме), растворитель и (буферный и/или незабуференный) водный раствор, например, в одном, двух или трех (или более) отдельных контейнерах, соответственно. Набор также может содержать руководство или вкладыш с инструкциями.

В дополнительном аспекте настоящего изобретения предложена мРНК, единица транскрипции, экспрессирующий вектор или вектор для генной терапии,

терапевтическая композиция или набор, описанные выше, для применения в качестве лекарственного средства. По отношению к сигнальному пептиду, например, сигнальному пептиду нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) и белку применимы те же особенности, что указаны в других частях настоящего документа.

5 В дополнительном аспекте настоящего изобретения предложена мРНК или терапевтическая композиция, включающая или содержащая мРНК, для применения в способе лечения повреждения скелетных мышц. Кроме того, в настоящем изобретении предложена мРНК или терапевтическая композиция, включающая или содержащая мРНК, для производства лекарственного средства для лечения повреждения скелетных
10 мышц у субъекта.

Кроме того, в настоящем изобретении предложен способ лечения повреждения скелетных мышц у субъекта, причем указанный способ включает введение субъекту мРНК или терапевтической композиции, включающей или содержащей мРНК.

Повреждения скелетных мышц, например, разрывы мышц представляют собой одну из
15 наиболее частых травм в спорте, причем их частота варьирует от 10 до 55% среди всех долговременных повреждений. Повреждения мышц могут быть вызваны эксцентрическими сокращениями, растяжениями мышц и избыточной нагрузкой на мышцы. Более 90% травм в спорте вызываются эксцентрическими сокращениями, растяжениями мышц и избыточной нагрузкой на мышцы. Повреждение скелетной
20 мышцы происходит, когда мышца подвергается внезапному интенсивному сдавливающему усилию, например, непосредственному удару. При разрывах мышц мышца подвергается интенсивному эксцентрическому растягивающему усилию, что приводит к перенапряжению миофибрилл и, впоследствии, их разрыву вблизи от мышечно-сухожильного соединения (МТJ). Разрывы мышц - одно из наиболее частых
25 осложнений, которое лечат врачи, и составляют большинство травм в спорте.

Повреждения комплекса задних мышц бедра (НМС) часто встречаются у спортсменов, занимающихся видами спорта, требующими резкого ускорения и снижения скорости при беге, а также эксцентрических сокращений мышц. Легкие повреждения можно лечить консервативно, но полный разрыв мышц задней
30 поверхности бедра является более обширным повреждением. Разрывы мышц задней поверхности бедра лечат консервативно или хирургически, в зависимости от их классификации. Они представляют собой легкие, умеренные или тяжелые разрывы. В то время как легкие и умеренные разрывы можно лечить консервативно, тяжелые

- разрывы являются явным показанием к хирургическому лечению. Консервативное лечение зависит от клинической картины, его начинают немедленно с криотерапии, наложению давящей повязки, иммобилизации и применения нестероидных противовоспалительных средств, а затем, когда пациент находится в комфортных условиях, накладывают эластичную повязку и выполняют физиотерапию.
- Ультразвуковая терапия широко обсуждается в качестве варианта лечения, однако обнаружено, что она не оказывает значимого эффекта на конечный исход регенерации. В течение 2 недель должно наблюдаться явное снижение боль, так что физиотерапию можно усилить и включить в нее активные физические нагрузки, упоминавшиеся выше.
- В то же время в данной области техники установлено, что хирургическое вмешательство не лишено риска, и необходим тщательный отбор кандидатов (Järvinen TA, Järvinen TL, Kääriäinen M, Aärimaa V, Vaittinen S, Kalimo H, Järvinen M (2007) Muscle injuries: optimising recovery. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 21(2):317-331. DOI:10.1016/j.berh.2006.12.004; Horst K, Dienstknecht T, Sellei RM, Pape HC (2014) Partial rupture of the hamstring muscle complex: a literature review on treatment options. *Eur J Orthop Surg Traumatol* 24(3):285-9. DOI:10.1007/s00590-013-1315-x). Текущие варианты лечения заключаются главным образом в использовании собственных процессов заживления в организме, и возможно, нестероидные противовоспалительные средства (НПВС) в действительности мешают процессу заживления. В настоящее время эффективные фармацевтические терапевтические средства отсутствуют, и медицинская потребность в них высока. В частности, существует потребность в эффективных способах лечения повреждения скелетных мышц, ускоряющих процесс восстановления и приводящих к усилению функции поврежденной мышцы.
- В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения мРНК для применения в способе лечения повреждения скелетных мышц представляет собой мРНК, кодирующую фактор роста, предпочтительно мРНК, кодирующую инсулиноподобный фактор роста 1 (ИФР1) человека. мРНК, кодирующая фактор роста, обычно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальный пептид, необязательно нуклеотидную последовательность, кодирующую пропептид фактора роста, и нуклеотидную последовательность, кодирующую зрелый фактор роста. мРНК, кодирующая ИФР1 человека, предпочтительно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальный пептид, необязательно нуклеотидную последовательность, кодирующую пропептид ИФР1 человека, и нуклеотидную

последовательность, кодирующую зрелый ИФР1 человека, еще более предпочтительно - нуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальный пептид, нуклеотидную последовательность, кодирующую пропептид ИФР1 человека, и нуклеотидную последовательность, кодирующую зрелый ИФР1 человека, и не содержит нуклеотидной последовательности, кодирующей Е-пептид ИФР1 человека. Сигнальный пептид, содержащийся в мРНК, кодирующей фактор роста, может представлять собой сигнальный пептид, гомологичный фактору роста, т.е. сигнальный пептид фактора роста, или может представлять собой сигнальный пептид, гетерологичный фактору роста, и предпочтительно представляет собой сигнальный пептид, гетерологичный фактору роста, более предпочтительно - сигнальный пептид нейротрофического фактора головного мозга (BDNF), в частности, сигнальный пептид BDNF человека. Сигнальный пептид, содержащийся в мРНК, кодирующей ИФР1 человека, может представлять собой сигнальный пептид, гомологичный ИФР1 человека, т.е. сигнальный пептид ИФР1 человека, или может представлять собой сигнальный пептид, гетерологичный ИФР1 человека, и предпочтительно представляет собой сигнальный пептид, гетерологичный ИФР1 человека, более предпочтительно - сигнальный пептид нейротрофического фактора головного мозга (BDNF), в частности, сигнальный пептид BDNF человека.

Таким образом, в более предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения мРНК для применения в способе лечения повреждения скелетных мышц представляет собой мРНК, кодирующую инсулиноподобный фактор роста 1 (ИФР1) человека, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальный пептид нейротрофического фактора головного мозга (BDNF), в частности, сигнальный пептид BDNF человека, необязательно нуклеотидную последовательность, кодирующую пропептид ИФР1 человека, и нуклеотидную последовательность, кодирующую зрелый ИФР-1 человека. В еще более предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения мРНК для применения в способе лечения повреждения скелетных мышц представляет собой мРНК, кодирующую инсулиноподобный фактор роста 1 (ИФР1) человека, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальный пептид нейротрофического фактора головного мозга (BDNF), в частности, сигнальный пептид BDNF человека, необязательно нуклеотидную последовательность, кодирующую пропептид ИФР1

человека, и последовательность, кодирующую зрелый ИФР-1 человека, и не содержит нуклеотидной последовательности, кодирующей Е-пептид ИФР1 человека.

Таким образом, в дополнительном аспекте настоящего изобретения предложена мРНК,

5 содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую

i) ИФР1, предпочтительно ИФР1 человека; и

ii) сигнальный пептид нейротрофического фактора головного мозга (BDNF), предпочтительно сигнальный пептид BDNF человека, для применения в способе лечения повреждения скелетных мышц.

10 Кроме того, в настоящем изобретении предложено применение мРНК, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую

i) ИФР1, предпочтительно ИФР1 человека; и

ii) сигнальный пептид нейротрофического фактора головного мозга (BDNF), предпочтительно сигнальный пептид BDNF человека, для производства лекарственного средства для лечения повреждения скелетных мышц у субъекта.

Кроме того, в настоящем изобретении предложен способ лечения повреждения скелетных мышц у субъекта, причем указанный способ включает введение субъекту мРНК, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую

i) ИФР1, предпочтительно ИФР1 человека; и

20 ii) сигнальный пептид нейротрофического фактора головного мозга (BDNF), предпочтительно сигнальный пептид BDNF человека.

В настоящем изобретении предпочтительно предложена мРНК, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую

i) зрелый ИФР1, предпочтительно зрелый ИФР1 человека;

25 ii) необязательно, про-домен ИФР1, предпочтительно ИФР1 человека;

iii) сигнальный пептид нейротрофического фактора головного мозга (BDNF), предпочтительно сигнальный пептид BDNF человека, для применения в способе лечения повреждения скелетных мышц.

Кроме того, в настоящем изобретении предложено применение мРНК, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую

30 нуклеотидную последовательность, кодирующую

i) зрелый ИФР1, предпочтительно зрелый ИФР1 человека;

ii) необязательно, про-домен ИФР1, предпочтительно ИФР1 человека;

iii) сигнальный пептид нейротрофического фактора головного мозга (BDNF), предпочтительно сигнальный пептид BDNF человека, для производства лекарственного средства для лечения повреждения скелетных мышц у субъекта.

Кроме того, в настоящем изобретении предложен способ лечения повреждения

5 скелетных мышц у субъекта, причем указанный способ включает введение субъекту мРНК, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую

i) зрелый ИФР1, предпочтительно зрелый ИФР1 человека;

ii) необязательно, про-домен ИФР1, предпочтительно ИФР1 человека;

iii) сигнальный пептид нейротрофического фактора головного мозга (BDNF),

10 предпочтительно сигнальный пептид BDNF человека.

В отношении мРНК, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую

инсулиноподобный фактор роста 1 (ИФР1) человека и сигнальный пептид

нейротрофического фактора головного мозга (BDNF), для применения в способе

лечения повреждения скелетных мышц, действуют те же особенности, что указаны в

15 других частях настоящего документа В особенно предпочтительном варианте

реализации настоящего изобретения мРНК, содержащая нуклеотидную

последовательность, кодирующую инсулиноподобный фактор роста 1 (ИФР1) человека

и сигнальный пептид нейротрофического фактора головного мозга (BDNF), содержит

нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8. В

20 дополнительном предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения

мРНК, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую

инсулиноподобный фактор роста 1 (ИФР1) человека и сигнальный пептид

нейротрофического фактора головного мозга (BDNF), содержит нуклеотидную

последовательность, транскрибированную с последовательности ДНК, представленной

25 в SEQ ID NO: 7. Нуклеотидная последовательности предпочтительно транскрибирована

с последовательности ДНК, представленной в SEQ ID NO: 7, in vitro.

мРНК и/или терапевтической композицией можно обрабатывать клетки и ткани,

например, скелетные мышцы, способами, известными специалисту в данной области

техники, предпочтительно посредством инъекции, более предпочтительно -

30 посредством внутримышечной инъекции, обычно с помощью шприца с иглой. В

принципе, для этой цели можно использовать любой доступный для приобретения

шприц в комбинации с иглой. Предпочтительными являются иглы для подкожных

инъекций. Диаметр иглы указывают в калибрах иглы (G; в соответствии с системой

калибров игл Стаба). Обычно для медицинского применения можно использовать иглы в диапазоне от 7 G (максимальный) до 33 G (минимальный размер).

В некоторых вариантах реализации мРНК и/или терапевтическую композицию можно доставлять в клетку посредством прямого переноса ДНК (Wolff et al. (1990) Science 247,

1465-1468). мРНК и/или терапевтическую композицию можно доставлять в клетки после легкого механического нарушения клеточной мембраны, что приводит к временной пермеабиллизации клеток. Такое легкое механическое нарушение мембраны можно осуществить посредством аккуратного продавливания клеток через небольшое отверстие (Sharei et al. PLOS ONE (2015) 10(4), e0118803). В еще одном варианте

реализации мРНК и/или терапевтическую композицию можно доставлять в клетку посредством переноса ДНК, опосредованного липосомами (например, Gao & Huang (1991) Biochem. Biophys. Res. Comm. 179, 280-285, Crystal (1995) Nature Med. 1, 15-17, Caplen et al. (1995) Nature Med. 3, 39-46). Термин «липосома» может охватывать

различные одно- и многослойные везикулы, образованные путем формирования замкнутых липидных бислойных структур или агрегатов. мРНК можно инкапсулировать в водное содержимое липосомы, внедрить в липидный бислой липосомы, присоединить к липосоме посредством связывающей молекулы, ассоциированной как с липосомой, так и с олигонуклеотидом, заключить в липосому или получить в виде комплекса с липосомой.

В одном варианте реализации настоящего изобретения РНК или терапевтическую композицию вводят непосредственно в скелетную мышцу (предпочтительно посредством инъекции) в форме терапевтической, т.е. жидкой композиции, содержащей РНК в виде несвязанной РНК. По отношению к способу введения и характеристикам композиции и РНК, содержащейся в ней, применимы те же особенности, что указаны в других частях настоящего документа. В предпочтительном варианте реализации жидкая композиция и мРНК согласно настоящему изобретению, соответственно, вводят непосредственно в скелетную мышцу. В данном контексте наиболее предпочтительным способом введения является инъекция, т.е. внутримышечная инъекция.

В принципе, в контексте настоящего изобретения предусмотрено введение мРНК и терапевтической композиции, соответственно, как можно раньше, т.е. на максимально раннем этапе повреждения скелетной мышцы. Например, эта стадия соответствует

наблюдению первого(ых) симптома(ов) (например, боли). В то же время можно и целесообразно выполнять это в любой возможный момент времени после постановки диагноза и, следовательно, это предусмотрено в соответствии с настоящим изобретением. Например, в случае хирургического вмешательства (например, после разрыва мышцы) мРНК и терапевтическую композицию, соответственно, можно вводить практически во время, но по меньшей мере через небольшое время после хирургического вмешательства.

В одном варианте реализации мРНК и терапевтическую композицию, соответственно, следует вводить во время или даже раньше воспалительной и ранней пролиферативной фазы регенерации скелетной мышцы, соответственно. Например, введение может произойти во время 0 - 10 суток, предпочтительно во время 0 - 7 суток после повреждения. Конкретнее, введение может произойти в 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 сутки после повреждения. Введение предпочтительно имеет место в 1 сутки, а еще предпочтительнее - в 0 сутки после повреждения. В предпочтительном варианте реализации терапевтическую композицию следует вводить до воспалительной фазы, которая следует за указанным повреждением скелетной мышцы. В особенно предпочтительном случае введение выполняют в 1 сутки после повреждения и повторяют в 4 сутки после повреждения.

Введение мРНК и терапевтической композиции, соответственно, в соответствии с настоящим изобретением, например, в зависимости от хода развития повреждения, подлежащего лечению, следует повторить по меньшей мере однократно, но предпочтительно - несколько раз (например, 3 - 5 раз). Повторное введение может произойти через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9 суток, предпочтительно после 2, 3, 4, 5, 6, 7 суток, более предпочтительно - после 3, 4 или 5 суток. Повторное введение может иметь место каждые несколько недель (например, каждые 1, 2, 3 или 4 недели) или каждые несколько суток (например, каждые 1, 2, 3, 4, 5 или 6 суток), предпочтительно каждые 2 или 3 суток.

мРНК или терапевтическую композицию согласно настоящему изобретению можно вводить пациенту в подходящей дозе. Схему приема может определить лечащий врач, например, на основе клинических факторов. Как известно в области медицины, дозировки для любого пациента зависят от многих факторов, включая размеры пациента, площадь поверхности тела, возраст, конкретное соединение, подлежащее введению, пол, время и путь введения, общее состояние здоровья и другие

одновременно вводимые препараты. В то же время специалист/лечащий врач легко может (а) найти (терапевтически) эффективную(ые) концентрацию(и) и/или дозировки активного(ых) соединения(й), подлежащего(их) введению, например, *in vivo* или *ex vivo*. Соответствующие образцы можно взять из, например, скелетной мышцы

5 (например, с помощью подходящего зонда), и в указанных образцах можно обнаружить активные соединения (несвязанную РНК) и определить их концентрации, например, с помощью ВЭЖХ.

Типичная доза активных соединений (например, мРНК) может находиться, например, в диапазоне от 1 нг до нескольких граммов, более предпочтительно - в диапазоне от 0,1 мкг до 1 г, предпочтительно - в диапазоне от 1 мкг до 0,1 г, более предпочтительно, в диапазоне от 10 мкг до 1 мг, еще более предпочтительно - в диапазоне от 15 мкг до 0,5 мг, и наиболее предпочтительно - от 20 мкг до 100 мкг. Особенно предпочтительным является диапазон от 0,01 мкг до 0,1 г, предпочтительно от 0,1 мкг до 0,01 г, более предпочтительно - от 0,5 мкг до 1 мг, еще более предпочтительно - от 0,5 мкг до 10 мкг.

15 Это, в частности, относится к пациенту-человеку. Применительно к терапевтическому средству на основе (м)РНК, дозировка (м)РНК для экспрессии должна соответствовать этому диапазону; в то же время дозы ниже или выше этого типичного диапазона в принципе также предусмотрены, особенно с учетом вышеупомянутых факторов. В общем случае схема в виде регулярного введения терапевтической композиции должна
20 предусматривать дозировки в диапазоне от 0,01 мкг до 10 мг, предпочтительно в диапазоне от 1 мкг до 1 мг, более предпочтительно в диапазоне от 10 мкг до 0,1 мг на килограмм массы тела в сутки. Опять-таки, это, в частности, относится к пациенту-человеку. Ход лечения можно отслеживать путем периодических оценок. Дозировки могут различаться, однако предпочтительная дозировка для введения посредством
25 инъекции (м)РНК в составе жидкой композиции согласно настоящему изобретению составляет от приблизительно 10^5 до 10^{15} копий молекулы (м)РНК на инъекцию. Опять-таки, это, в частности, относится к пациенту-человеку.

В частности, предусмотрено, что терапевтическую композицию согласно настоящему изобретению можно вводить пациенту, предпочтительно пациенту-человеку/человеку.
30 В то же время в настоящем документе описаны повреждения скелетных мышц, которые также можно лечить (или предотвратить) у субъекта/пациента-животного, не являющегося человеком, например, у домашнего животного (например, собаки, кошки, кролика, крысы и мыши), продуктивного сельскохозяйственного животного (например,

коровы, свиньи, овцы), лошади (например, скаковой лошади) или пони, верблюда (например, бегового верблюда) или птицы (например, курицы, индейки, попугая). В частности, терапевтическая композиция, содержащая мРНК, обладает терапевтической активностью в процессе лечения повреждения, расстройства и/или заболевания, например, повреждения скелетных мышц.

В более предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения мРНК, кодирующая инсулиноподобный фактор роста 1 (ИФР1 для применения в качестве лекарственного средства, содержит нуклеотидную последовательность, транскрибированную с последовательности ДНК SEQ ID NO: 7. В еще более

предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения мРНК, кодирующая инсулиноподобный фактор роста 1 (ИФР1), для применения в качестве лекарственного средства содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 8.

Любую из терапевтических композиций согласно настоящему изобретению можно представить совместно с руководством или вкладышем, содержащим инструкции.

Руководство/вкладыш с инструкциями может содержать указания для специалиста/лечащего врача по лечению (или профилактике) заболевания или расстройства, описанного в настоящем документе (повреждения скелетных мышц), в соответствии с настоящим изобретением. В частности, руководство/вкладыш с инструкциями может содержать указания относительно описанного в настоящем документе способа доставки/введения и доставки/схемы введения, соответственно (например, пути доставки/введения, схемы приема, времени доставки/введения, частоты доставки/введения). В частности, руководство/вкладыш с инструкциями может содержать инструкцию о том, что мРНК, соответственно, следует вводить путем инъекции и/или готовить для инъекции в скелетную мышцу. Руководство/вкладыш с инструкциями может содержать инструкцию о том, что мРНК, соответственно, получают для введения во время воспалительной фазы, которая следует после повреждения скелетной мышцы. В принципе, информация, приведенная в настоящем документе по отношению к способу доставки/введения и схеме доставки/введения, соответственно, может содержаться в соответствующих инструкциях в руководстве/вкладыше с инструкциями.

Примеры

Пример 1

СПОСОБЫ И МАТЕРИАЛ

5 Клонирование ИФР1 и обмен сигнальными пептидами

ИФР1 представляет собой полипептид, содержащий 70 аминокислот, синтезируемый в эндоплазматическом ретикулуме и секретируемый за счет аппарата Гольджи, действующий в качестве внеклеточного фактора роста ауто- и паракринным образом.

Для надлежащей экспрессии и секреции мРНК-индуцированного ИФР1 из

- 10 трансфицированных клеток последовательность мРНК содержала природную последовательность N-концевых пре-про-доменов природного ИФР1 человека (пре-про-ИФР1). Эта последовательность состояла из последовательности, кодирующей пре-домен (сигнальный пептид) ИФР1 человека, содержащий 21 аминокислоту (нуклеотиды 1-63), и последовательности, кодирующей про-домен человека, содержащий 27
- 15 аминокислот (нуклеотиды 64-144). Кроме того, конструкт содержал последовательность, кодирующую полную кодирующую последовательность зрелого ИФР1 человека, содержащего 70 аминокислот (нуклеотиды 145-354). В Cpд.2-7 пре-домен (сигнальный пептид, нуклеотиды 1-63) заменили на соответствующие пре-домены ИФР2, ALB, BDNF, CXCL12 или синтетические сигнальные пептиды 1 или 2.
- 20 В конструкт не добавляли С-концевой Е-домен. В целом клонирующий вектор содержал копию ДНК пре-про-ИФР1 человека без информации о Е-пептиде, и его обозначили как Cpд.1, в то время как Cpд.2-7 содержали альтернативные пре-домены (сигнальные пептиды). На фигуре 1 показаны последовательности ДНК и РНК ИФР1, кодируемого его пре-, про- и кодирующим доменом. На фигуре 2 показаны
- 25 последовательности ДНК и РНК ИФР1, кодируемого пре-доменом ИФР2 и его про- и кодирующим доменом. На фигуре 3 показаны последовательности ДНК и РНК ИФР1, кодируемого пре-доменом ALB и его про- и кодирующим доменом. На фигуре 4 показаны последовательности ДНК и РНК ИФР1, кодируемого пре-доменом BDNF и

его про- и кодирующим доменом. На фигуре 5 показаны последовательности ДНК и РНК ИФР1, кодируемого пре-доменом CXCL12 и его про- и кодирующим доменом. На фигуре 6 показаны последовательности ДНК и РНК ИФР1, кодируемого пре-доменом синтетического сигнального пептида 1 и его про- и кодирующим доменом. На фигуре 7 показаны последовательности ДНК и РНК ИФР1, кодируемого пре-доменом синтетического сигнального пептида 2 и его про- и кодирующим доменом. На фигуре 8 показан вектор pVAX.A120 (www.thermofisher.com) с инсерцией Cpd.1. На фигуре 9 показан вектор pMA-T (www.thermofisher.com) с инсерцией Cpd.2. На фигуре 10 показан вектор pMA-T с инсерцией Cpd.3. На фигуре 11 показан вектор pMA-T с инсерцией Cpd.4. На фигуре 12 показан вектор pMA-T с инсерцией Cpd.5. На фигуре 13 показан вектор pMA-RQ (www.thermofisher.com) с инсерцией Cpd.6. На фигуре 14 показан вектор pMA-RQ (www.thermofisher.com) с инсерцией Cpd.6. На фигуре 15 показаны праймеры, использованные для амплификации Cpd.2-7. На фигуре 16 приведена сводная информация об особенностях различных пре-доменов с указанием названия гена, номера UniProt, последовательности ДНК и аминокислотной последовательности пре-доменов и векторов. Для Cpd.6 и Cpd.7 названий генов не существует, поскольку они представляли собой искусственные пре-домены.

Оптимизацию кодонов последовательностей ДНК и мРНК Cpd.1-7 выполняли с использованием GeneOptimizer® (ThermoFischer, штат Массачусетс, США).

Открытую рамку считывания последовательностей ДНК пре-про-ИФР1 синтезировали в GeneArt (www.thermofisher.com, ThermoFischer, штат Массачусетс, США) с использованием сайтов рестрикции BamHI и EcoRI и субклонировали в вектор pVAX1.A120 с использованием тех же ферментов рестрикции. Последовательность ДНК всего вектора приведена на фигуре 8. Ориентацию клонированных инсерций и последовательности оснований подтверждали секвенированием нескольких клонов по Сэнгеру. Успешный клон отбирали в качестве матрицы для транскрипции *in vitro* (IVT) и продукции мРНК. Для альтернативных вариантов пре-доменов Cpd.2-Cpd.7

использовали векторы рМА-Т (фигуры 9-12) и рМА-RQ (фигуры 13-14) в качестве матриц для IVT. Все реакции IVT приводили к получению мРНК с идентичными хвостами полиА120.

5 Обмен сигнальных пептидов в мРНК Cpd.8 - Cpd.39

Пре-домен (сигнальный пептид, нуклеотиды 1-63) ИФР1 (т.е. Cpd.1) в Cpd.8-26 и Cpd.39 заменяли на соответствующие пре-домены LTBP2 (Cpd. 8; Uniprot ID: Q14767), IGFALS (Cpd. 9; Uniprot ID: P35858), INS (Cpd. 10; Uniprot ID: P01308), Epo (Cpd. 11; Uniprot ID: P01588), CSF3 (Cpd. 12; Uniprot ID: P09919), NGF (Cpd. 13; Uniprot ID: P01138), FGF5 (Cpd. 14; Uniprot ID: P12034), FHR2 (Cpd. 15; Uniprot ID: P36980), IBP5 (Cpd. 16; Uniprot ID: P24593), NTF3 (Cpd. 17; Uniprot ID: P20783), PATE2 (Cpd. 18; Uniprot ID: Q6UY27), SOD3 (Cpd. 19; Uniprot ID: P08294), фрагмент кодирующей последовательности GLR (Cpd. 20; Uniprot ID: P47871), последовательность модифицированного пре-домена ИФР1 (Cpd. 21; Uniprot ID: P47871), последовательность модифицированного пре-домена ИФР2 (Cpd. 22; Uniprot ID: P47871), последовательность модифицированного пре-домена CXCL12 (Cpd. 23; Uniprot ID: P47871), последовательность модифицированного пре-домена BDNF (Cpd. 24; Uniprot ID: P23560), последовательность модифицированного про-домена ИФР1 (Cpd. 25; Uniprot ID: P47871), последовательность модифицированного про-домена ALPI (Cpd. 39; Uniprot ID: P47871) и последовательность модифицированного пре-домена INS (Cpd. 26; Uniprot ID: P01308). Аналогично Cpd. 1, все вышеуказанные соединения не содержали Е-пептида. Оптимизацию кодонов последовательностей ДНК и мРНК Cpd.8-26 и Cpd. 39 выполняли с использованием GeneOptimizer® (ThermoFischer, штат Массачусетс, США).

25

Cpd.27 состоял из последовательности, кодирующей пре-домен (сигнальный пептид) эритропоэтина человека (Epo; Uniprot ID: P01588), содержащий 27 аминокислот (нуклеотиды 1-81), и последовательности, кодирующей кодирующую цепь

эритропоэтина человека, содержащей 166 аминокислот (нуклеотиды 82-498). В Cpd.28 и Cpd.29 пре-домен (сигнальный пептид, нуклеотиды 1-81) Еро заменяли на последовательность модифицированного пре-домена Еро (Uniprot ID: P01588) и последовательность пре-домена BDNF (Uniprot ID: P23560). Оптимизацию кодонов последовательностей ДНК и мРНК Cpd.27-29 выполняли с использованием GeneOptimizer® (ThermoFischer, штат Массачусетс, США).

Cpd.30 состоял из последовательности, кодирующей пре-домен (сигнальный пептид) инсулина человека (INS; Uniprot ID: P01308), содержащий 24 аминокислоты (нуклеотиды 1-72), и последовательности, кодирующей домен В-цепи инсулина, содержащий 30 аминокислот (нуклеотиды 73-162), и последовательности, кодирующей домен соединяющего пептида (С-пептида), содержащий 31 аминокислоту (нуклеотиды 163-255), и последовательности, кодирующей домен А-цепи, содержащий 21 аминокислоту (нуклеотиды 256-330). В Cpd.31 и Cpd.32 пре-домен (сигнальный пептид, нуклеотиды 1-72) INS заменяли на последовательность модифицированного пре-домена INS (Uniprot ID: P01308) и последовательность пре-домена BDNF (Uniprot ID: P23560). Оптимизацию кодонов последовательностей ДНК и мРНК Cpd. 30 - 32 выполняли с использованием GeneOptimizer® (ThermoFischer, штат Массачусетс, США).

Cpd.33 состоял из последовательности, кодирующей пре-домен (сигнальный пептид) интерлейкина-4 человека (ИЛ-4; Uniprot ID: P05112), содержащий 24 аминокислоты (нуклеотиды 1-72), и последовательности, кодирующей домен кодирующей цепи, содержащий 129 аминокислот (нуклеотиды 73-387). В Cpd.34 и Cpd.35 пре-домен (сигнальный пептид, нуклеотиды 1-72) ИЛ-4 заменяли на последовательность модифицированного пре-домена ИЛ-4 (Uniprot ID: P05112) и последовательность пре-домена FGF5 (Uniprot ID: P01308). Оптимизацию кодонов последовательностей ДНК и мРНК Cpd.33-35

выполняли с использованием GeneOptimizer® (ThermoFischer, штат Массачусетс, США).

Срд.36 состоял из последовательности, кодирующей пре-домен (сигнальный пептид) интерлейкина-10 человека (ИЛ-10; Uniprot ID: P22301), содержащий 24 аминокислоты (нуклеотиды 1-54), и последовательности, кодирующей домен кодирующей цепи, содержащий 160 аминокислот (нуклеотиды 55-534). В Срд.37 и Срд.38 пре-домен (сигнальный пептид, нуклеотиды 1-54) ИЛ-10 заменяли на последовательность модифицированного пре-домена ИЛ-10 (Uniprot ID: P22301) и последовательность пре-домена BDNF (Uniprot ID: P23560). Оптимизацию кодонов последовательностей ДНК и мРНК Срд. 36 - 38 выполняли с использованием GeneOptimizer® (ThermoFischer, штат Массачусетс, США).

Аминокислотная последовательность и последовательность ДНК сигнальных пептидов Срд. 1-39 и последовательность РНК и последовательность ДНК и вектор соответствующего Срд. 1- 39 отображены в таблице 1 ниже.

Таблица 1: Аминокислотная последовательность и последовательность ДНК

сигнальных пептидов Срд. 1-39 и последовательность РНК и последовательность ДНК и вектор Срд. 1-39

№ Срд	Сигнальный пептид (SP)	Белок	АК посл. SP	Посл. ДНК SP	Посл. ДНК Срд.	Посл. РНК Срд.	Посл. ДНК вектора Срд.	Вектор
1	ИФР1	ИФР 1	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 15 / SEQ ID NO: 40	pVAX.A 120/pM A-T
2	ИФР2	ИФР 1	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 16	pMA-T
3	ALB	ИФР 1	SEQ ID NO: 29	SEQ ID NO: 28	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 17	pMA-T
4	BDNF	ИФР 1	SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 30	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 18	pMA-T

5	CXCL12	ИФР 1	SEQ ID NO: 33	SEQ ID NO: 32	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 19	pMA-T
6	Синтетический seq1	ИФР 1	SEQ ID NO: 35	SEQ ID NO: 34	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 20	PMA-RQ
7	Синтетический seq2	ИФР 1	SEQ ID NO: 37	SEQ ID NO: 36	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 21	PMA-RQ
8	LTBP2	ИФР 1	SEQ ID NO: 41	SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 43	SEQ ID NO: 44	SEQ ID NO: 45	PMA-RQ
9	IGFALS	ИФР 1	SEQ ID NO: 46	SEQ ID NO: 47	SEQ ID NO: 48	SEQ ID NO: 49	SEQ ID NO: 50	PMA-RQ
10	INS	ИФР 1	SEQ ID NO: 51	SEQ ID NO: 52	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 54	SEQ ID NO: 55	PMA-RQ
11	EPO	ИФР 1	SEQ ID NO: 56	SEQ ID NO: 57	SEQ ID NO: 58	SEQ ID NO: 59	SEQ ID NO: 60	pMA-RQ
12	CSF3	ИФР 1	SEQ ID NO: 61	SEQ ID NO: 62	SEQ ID NO: 63	SEQ ID NO: 64	SEQ ID NO: 65	pMA-RQ
13	NGF	ИФР 1	SEQ ID NO: 66	SEQ ID NO: 67	SEQ ID NO: 68	SEQ ID NO: 69	SEQ ID NO: 70	pMA-RQ
30	INS	Инсулин	SEQ ID NO: 51	SEQ ID NO: 52	SEQ ID NO: 71	SEQ ID NO: 72	SEQ ID NO: 73	pMA-RQ
27	EPO	EPO	SEQ ID NO: 56	SEQ ID NO: 57	SEQ ID NO: 74	SEQ ID NO: 75	SEQ ID NO: 76	pMA-RQ
33	ИЛ-4	ИЛ-4	SEQ ID NO: 77	SEQ ID NO: 78	SEQ ID NO: 79	SEQ ID NO: 80	SEQ ID NO: 81	pMA-RQ
36	ИЛ-10	ИЛ-10	SEQ ID NO: 81	SEQ ID NO: 83	SEQ ID NO: 84	SEQ ID NO: 85	SEQ ID NO: 86	pMA-RQ
14	FGF5	ИФР 1	SEQ ID NO: 87	SEQ ID NO: 88	SEQ ID NO: 89	SEQ ID NO: 90	SEQ ID NO: 91	pMA-RQ
15	FHR2	ИФР 1	SEQ ID NO: 92	SEQ ID NO: 93	SEQ ID NO: 94	SEQ ID NO: 95	SEQ ID NO: 96	pMA-T
16	IBP5	ИФР 1	SEQ ID NO: 97	SEQ ID NO: 98	SEQ ID NO: 99	SEQ ID NO: 100	SEQ ID NO: 101	pMA-RQ
17	NTF3	ИФР 1	SEQ ID NO: 102	SEQ ID NO: 103	SEQ ID NO: 104	SEQ ID NO: 105	SEQ ID NO: 106	pMA-RQ
18	PATE2	ИФР 1	SEQ ID NO: 107	SEQ ID NO: 108	SEQ ID NO: 109	SEQ ID NO: 110	SEQ ID NO: 111	pMA-T
19	SOD3	ИФР 1	SEQ ID NO: 112	SEQ ID NO: 113	SEQ ID NO: 114	SEQ ID NO: 115	SEQ ID NO: 116	pMA-RQ
20	GLR	ИФР 1	SEQ ID NO: 117	SEQ ID NO: 118	SEQ ID NO: 119	SEQ ID NO: 120	SEQ ID NO: 121	pMA-T
21	ИФР1-модифицированный	ИФР 1	SEQ ID NO: 122	SEQ ID NO: 123	SEQ ID NO: 124	SEQ ID NO: 125	SEQ ID NO: 126	pMA-T

22	ИФР2-модифицированный	ИФР 1	SEQ ID NO: 127	SEQ ID NO: 128	SEQ ID NO: 129	SEQ ID NO: 130	SEQ ID NO: 131	pMA-T
23	CXCL12-модифицированный	ИФР 1	SEQ ID NO: 132	SEQ ID NO: 133	SEQ ID NO: 134	SEQ ID NO: 135	SEQ ID NO: 136	pMA-T
24	BDNF-модифицированный	ИФР 1	SEQ ID NO: 137	SEQ ID NO: 138	SEQ ID NO: 139	SEQ ID NO: 140	SEQ ID NO: 141	pMA-T
25	ИФР1-про-модифицированный	ИФР 1	SEQ ID NO: 142	SEQ ID NO: 143	SEQ ID NO: 144	SEQ ID NO: 145	SEQ ID NO: 146	pMA-T
26	INS-модифицированный	ИФР 1	SEQ ID NO: 147	SEQ ID NO: 148	SEQ ID NO: 149	SEQ ID NO: 150	SEQ ID NO: 151	pMA-T
28	Еро-модифицированный	EPO	SEQ ID NO: 152	SEQ ID NO: 153	SEQ ID NO: 154	SEQ ID NO: 155	SEQ ID NO: 156	pMA-T
29	BDNF	EPO	SEQ ID NO: 30	SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 157	SEQ ID NO: 158	SEQ ID NO: 159	pMA-RQ
31	INS-модифицированный	INS	SEQ ID NO: 147	SEQ ID NO: 182	SEQ ID NO: 160	SEQ ID NO: 161	SEQ ID NO: 162	pMA-T
32	BDNF	INS	SEQ ID NO: 30	SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 163	SEQ ID NO: 164	SEQ ID NO: 165	pMA-RQ
34	ИЛ-4-модифицированный	ИЛ-4	SEQ ID NO: 166	SEQ ID NO: 167	SEQ ID NO: 168	SEQ ID NO: 169	SEQ ID NO: 170	pMA-T
35	FGF5	ИЛ-4	SEQ ID NO: 87	SEQ ID NO: 183	SEQ ID NO: 171	SEQ ID NO: 172	SEQ ID NO: 173	pMA-RQ
37	ИЛ-10-модифицированный	ИЛ-10	SEQ ID NO: 174	SEQ ID NO: 175	SEQ ID NO: 176	SEQ ID NO: 177	SEQ ID NO: 178	pMA-T
38	BDNF	ИЛ-10	SEQ ID NO: 30	SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 179	SEQ ID NO: 180	SEQ ID NO: 181	pMA-RQ
39	ALPI-про-модифицированный	ИФР 1	SEQ ID NO: 189	SEQ ID NO: 190	SEQ ID NO: 191	SEQ ID NO: 192	SEQ ID NO: 193	pMA-T

Транскрипция *in vitro* (IVT) мРНК Cpd.1 - Cpd.7

Вектор pVAX.A120, содержащий Cpd.1 (SEQ ID No. 15), также нес промотор T7 и хвост поли-А длиной 120 п.о., и указанный вектор переводили в линейную форму после хвоста поли-А с помощью фермента *XhoI* перед продукцией мРНК с использованием транскрипции *in vitro* (IVT). Для векторов pMA-T и pMA-RQ использовали пару гомологичных праймеров (SEQ ID No: 22 и 23) для продукции мРНК с использованием IVT на основе ПЦР (фигура 15). Обратный праймер содержал поли-А длиной 120 п.о. для включения хвоста поли-А в зрелую мРНК. Обе линейаризованные плазмиды и ПЦР-ампликоны использовали в качестве матриц для IVT, выполняемой РНК-полимеразой T7 в наборе MEGAscript T7 (www.ambion.com). Все мРНК продуцировали с антиреверсным аналогом CAP (ARCA; [m7G(5')G]) на 5'-конце и химически модифицировали на 100% N1-метилпсевдо-УТФ (www.trilink.com). мРНК, транскрибированные *in vitro*, очищали с использованием набора MEGAclean (www.ambion.com) и анализировали на предмет качества и концентрации с использованием набора RNA 6000 Nano на Agilent 2100 Bioanalyzer (www.agilent.com).

Транскрипция *in vitro* (IVT) мРНК Cpd.1 и Cpd.8 - Cpd.39

Для векторов pMA-T и pMA-RQ, кодировавших Cpd. 1 (SEQ ID No. 40; перед субклонированием в вектор pVAX.A120) и Cpd. 8 - Cpd.39, использовали пару гомологичных праймеров (SEQ ID No: 22 и 23) для продукции мРНК с использованием IVT на основе ПЦР (фигура 15). Обратный праймер содержал поли-А длиной 120 п.о. для включения хвоста поли-А в зрелую мРНК. ПЦР-ампликоны использовали в качестве матриц для IVT, выполняемой РНК-полимеразой T7 в наборе MEGAscript T7 (www.ambion.com). Все мРНК продуцировали с антиреверсным аналогом CAP (ARCA; [m7G(5')G]) на 5'-конце и химически модифицировали на 100% N1-метилпсевдо-УТФ (www.trilink.com). мРНК, транскрибированные *in vitro*, очищали с использованием

набора MEGAclear (www.ambion.com) и анализировали на предмет качества и концентрации с использованием электрофореза РНК в агарозном геле.

Трансфекция клеток HEK293T, C2C12 и HepG2 in vitro

- 5 Клетки эмбриональной почки человека 293 (HEK293T; ATCC, CRL-1573, Роквилл, штат Мэриленд, США) поддерживали в среде Игла, модифицированной по Дульбекко (DMEM, www.biocrom.com), с добавлением 10 % (об/об) эмбриональной телячьей сыворотки (FBS) и смеси пенициллин-стрептомицин-амфотерицин В (882087, Biozym, Олдендорф, Германия). Клетки высевали из расчета 7000-20000 клеток/лунку в 96-
10 луночный культуральный планшет и инкубировали при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 5 % CO₂, в течение 24 часов перед трансфекцией. Клетки выращивали в ростовой среде DMEM, содержавшей 10 % FBS без антибиотиков до достижения < 60% конфлюентности перед трансфекцией.
- 15 Клетки линии гепатомы человека HepG2 (№ в каталоге 85011430, ECACC, Великобритания) выращивали в среде Игла, модифицированной по Дульбекко (DMEM), с 10 % эмбриональной телячьей сывороткой и смесью пенициллин-стрептомицин-амфотерицин В (882087, Biozym, Олдендорф, Германия) при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 5 % CO₂. Клетки HepG2 субкультивировали
20 каждые 2 и каждые 5 суток при коэффициенте деления 1:2 и 1:4, соответственно. Клетки высевали в планшет при плотности 20000-40000 клеток/лунку за 24 часа до трансфекции в 96-луночный титрационный микропланшет. Клетки выращивали в ростовой среде DMEM, содержавшей 10 % FBS без конфлюентности антибиотиков до 30-40% конфлюентности перед трансфекцией.
- 25 Клетки линии миобластов мыши C2C12 (ATCC, CRL-1772, Роквилл, штат Мэриленд, США) выращивали в среде Игла, модифицированной по Дульбекко (DMEM), с 10 % эмбриональной телячьей сывороткой и смесью пенициллин-стрептомицин-

амфотерицин В (882087, Biozym, Олдендорф, Германия) при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 5 % CO₂. Клетки C2C12 субкультивировали каждые 2 и каждые 5 суток при коэффициенте разделения 1:2 и 1:4, соответственно. Клетки высевали в планшеты при плотности 20000 клеток/лунку за 24 часа до трансфекции в 96-луночный титрационный микропланшет. Клетки выращивали в ростовой среде DMEM, содержащей 2 % FBS без конфлюентности антибиотиков до 80-90% конфлюентности перед трансфекцией.

После этого клетки трансфицировали различными вариантами мРНК в количестве 0,3 мкг с использованием Lipofectamine 2000 (www.invitrogen.com) согласно инструкциям производителя. 100 мкл DMEM удаляли и заменяли 50 мкл Opti-MEM и 50 мкл комплекса мРНК и Lipofectamine 2000 в Opti-MEM (www.thermofisher.com). Через 5 часов среду заменяли свежей средой, планшеты инкубировали в течение 24 часов при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 5 % CO₂.

Трансфекция клеток HSkMC in vitro

Клетки HSkMC высевали при плотности 40000 клеток на 96-луночный титрационный микропланшет в ростовую среду SkM (PromoCell, Гейдельберг, Германия). Клетки выращивали в течение 1 суток в увлажненной атмосфере при 37°C в инкубаторе и при 5% CO₂ до > 90% конфлюентности. В день трансфекции клетки обрабатывали различными вариантами мРНК (Cpd.1 или 4) в количестве 2 мкг с использованием Lipofectamin 2000 (www.invitrogen.com). Таким образом, удаляли 100 мкл среды и добавляли 1 мкл липофектамина/лунку вместе с 2 мкг мРНК/лунку в среде OPTIMEM (www.thermofisher.com). Затем клетки инкубировали в увлажненной атмосфере при 37°C и 5% CO₂ в течение 24 часов.

Трансфекция клеток IMR32 in vitro

За 24 часа перед трансфекцией клетки нейробластомы человека IMR32 (№ в каталоге 86041809, ECACC, Великобритания) высевали в 96-луночный предварительно покрытый титрационный микропланшет BRAND (№ в каталоге 782082) при плотности 60000 клеток на лунку в минимально обогащенной среде Игла (EMEM, Bioconcept № в каталоге 1-31S01-I, www.bioconcept.ch) с добавлением 10 % (v/v) термически инаktivированной эмбриональной телячьей сыворотки (FBS), L-глутамина (2 мМ) и неосновных аминокислот (NEAA, 1x). Клетки выращивали в течение ночи при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂. Клетки трансфицировали 0,3 мкг мРНК-конструктов с использованием JetMessenger (www.polyplus-transfection.com) согласно инструкциям производителя. Вкратце, образовывали комплекс мРНК / JetMessenger путем смешивания 0,25 мкл реагента JetMessenger на 0,1 мкг конструкта мРНК. После инкубирования в течение 15 минут при комнатной температуре добавляли комплекс JetMessenger в количестве 10 мкл, а через 5 часов после трансфекции из лунок удаляли среду/мРНК/JetMessenger и заменяли ее свежими 100 мкл ростовой среды, а планшеты инкубировали в течение 24 часов при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂.

Трансфекция клеток A549 in vitro

Клетки линии карциномы легкого человека (Sigma-Aldrich, Букс, Швейцария, № в каталоге 6012804) поддерживали на среде Игла, модифицированной по Дульбекко, содержащей высокую концентрацию глюкозы (DMEM, Sigma-Aldrich, Букс, Швейцария, № в каталоге D0822) с добавлением 10 % FBS (Thermofischer, Базель, Швейцария, № в каталоге 10500-064). За 24 часа до трансфекции клетки A549 высевали на планшет при плотности 10000 клеток/лунку в обычную ростовую среду. После этого клетки трансфицировали различными мРНК (0,3-0,6 мкг) с использованием Lipofectamine 2000 (www.invitrogen.com) согласно инструкциям производителя. Удаляли 100 мкл DMEM. В каждую лунку добавляли 50 мкл Opti-MEM (www.thermofisher.com), а затем 50 мкл комплекса мРНК и Lipofectamine 2000 в Opti-

МЕМ. Через 5 часов инкубирования среду заменяли свежей ростовой средой, планшеты инкубировали в течение 24 часов при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 5 % CO₂.

5 Трансфекция клеток ТНР-1 *in vitro*

Клетки линии моноцитарного лейкоза человека ТНР-1 (Sigma-Aldrich, Букс, Швейцария, № в каталоге 88081201) поддерживали в ростовой среде (RPMI 1640 с добавлением 10% FBS и 2 mM глутамина. Клетки высевали из расчета 30000 клеток ТНР-1 в 96-луночный планшет для культивирования клеток за 72 ч до трансфекции и активировали 50 нМ форбол-12-миристат-13-ацетата (РМА) (Sigma-Aldrich, Букс, Швейцария, № в каталоге. Р8139), разбавленного ростовой средой. Клетки трансфицировали (300-600 нг/лунку) мРНК с использованием Lipofectamine 2000 (www.thermofisher.com), 100 мкл DMEM удаляли. В каждую лунку добавляли 50 мкл Opti-MEM (www.thermofisher.com), а затем 50 мкл комплекса мРНК и Lipofectamine 2000 в Opti-MEM. Через 5 часов среду заменяли свежей ростовой средой с добавлением 50 нМ РМА, планшеты инкубировали в течение 24 часов при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 5 % CO₂.

Первичные нейроны спинного мозга крысы

Беременных самок крыс Wistar дикого типа (Janvier labs, Франция) или крыс SOD1G93A Sprague Dawley (Taconic Bioscience) на сроке беременности 14 дней умерщвляли под глубокой анестезией с использованием CO₂ посредством смещения шейных позвонков. Плоды извлекали из матки и немедленно помещали в ледяную среду Лейбовица с добавлением 2 % раствора пенициллина (10000 ед/мл) и стрептомицина (10 мг/мл) (PS) и 1% бычьего сывороточного альбумина (БСА). Спинной мозг вырезали и обрабатывали в течение 20 минут при 37°C 0,05 % трипсином - -0,02 % ЭДТА. Диссоциацию останавливали путем добавления среды Игла, модифицированной по Дульбекко (DMEM), с добавлением 4,5 г/л глюкозы, 0,5 мг/мл

ДНКазы I и II и 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (FCS). Клетки механически диссоциировали посредством трех пропусканий через наконечник 10-мл пипетки под давлением. Затем клетки центрифугировали при 515 g в течение 10 минут при 4°C. Полученный осадок ресуспендировали в заданной культуральной среде, состоящей из

5 нейробазальной среды, содержащей 2 % раствор добавки B27, 2 ммоль/л глутамина, 2 % раствора PS и 10 нг/мл нейротрофического фактора головного мозга (BDNF). Клетки высевали из расчета 20000 клеток на лунку в 96-луночный культуральный планшет, предварительно покрытый поли-D-лизином, и культивировали при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 5 % CO₂. Среду меняли каждые два дня. Через 11-12 суток

10 культивирования выполняли трансфекцию мРНК-конструктами (0,3 мкг) с использованием JetMessenger (www.polyplus-transfection.com) согласно инструкциям производителя.

Трансфекция дифференцированных хондроцитов человека *in vitro*.

15 Хондроциты суставного хряща человека (Sigma/Cell Applications, Букс, Швейцария, № в каталоге 402-05A) поддерживали в ростовой среде для хондроцитов (Sigma Aldrich, Букс, Швейцария, № в каталоге 411-500). Клетки инкубировали при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂. Клетки дифференцировали путем выращивания их в течение как минимум 3 недель на альгинатных гранулах в среде для

20 дифференцировки (Sigma Aldrich, Букс, Швейцария, № в каталоге A411D-250). Для получения альгинатных гранул использовали 1 мл 1,2 % стерильного раствора альгината (1,2 % альгинат, Sigma Aldrich, Букс, Швейцария, № в каталоге A-2033 в 0,9 % NaCl) на 4 x 10⁶ хондроцитов. Клетки ресуспендировали в соответствующем объеме 1,2 % раствора альгината и по каплям вносили через иглу 22 калибра в 100 mM раствор

25 CaCl₂ в 6-луночном необработанном планшете для культивирования клеток. Через 15 минут полимеризации гранулы 5-кратно промывали 0,9 % NaCl и 2-кратно - средой для дифференцировки. Хондроциты / гранулы альгината инкубировали при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 5 % CO₂, для дифференцировки в течение как

минимум 3 недель, меняя среду каждые двое суток. За 24 часа до трансфекции дифференцированные хондроциты высвобождали из альгинатных гранул путем их 2-кратной промывки 0,9 % NaCl и инкубирования в течение приблизительно 5 минут в буфере для растворения альгината (55 mM цитрата натрия, 150 mM NaCl, 30 mM ЭДТА, pH 6,8). Клетки 2-кратно промывали 0,9 % NaCl. 30000 клеток на лунку высевали в 100 мкл ростовой среды в 96-луночном TPP планшете (Sigma Aldrich, Букс, Швейцария, № в каталоге 92096) и выращивали в течение ночи. Клетки трансфицировали 0,6 мкг мРНК-конструкта с использованием JetMessenger (www.polyplus-transfection.com) согласно инструкциям производителя. Комплекс мРНК / JetMessenger добавляли в объеме 10 мкл в четырех повторностях. Комплекс мРНК / JetMessenger образовывали путем смешивания 0,25 мкл реагента JetMessenger на 0,1 мкг конструкта мРНК и инкубирования в течение 15 минут при комнатной температуре. Через 5 часов после трансфекции комплекс для трансфекции (среду / мРНК / JetMessenger) удаляли из лунок и заменяли 100 мкл ростовой среды. Планшеты инкубировали в течение 24 часов при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂.

Анализ уровня белка в супернатантах клеточных культур

Через 24 часа после трансфекции собирали супернатанты трансфицированных клеток, замораживали их и хранили при 20°C до выполнения количественного анализа ИФР1 (№ в каталоге E20, Mediatech, Ройтлинген, Германия), эритропоэтина (ЕРО; № в каталоге BMS2035, ThermoFisher, Базель, Швейцария), инсулина (INS, № в каталоге RAB0327, Sigma-Aldrich, Букс, Швейцария), интерлейкина 4 (ИЛ-4, № в каталоге 88-7046-22, ThermoFisher, Базель, Швейцария) и интерлейкина 10 (ИЛ-10, № в каталоге KIT 10947 Sino Biological, Китай) посредством твердофазного ИФА в соответствии с инструкциями производителя. Супернатанты клеток анализировали после разбавления соответствующим буфером для твердофазного ИФА.

Анализ данных

Для оценки уровня белков (ИФР1, ЕРО, INS, ИЛ-4, ИЛ-10) в стандарте или образце среднее значение поглощения холостого образца вычитали из среднего значения поглощения стандартов или образцов. Стандартную кривую получали и строили с использованием четырехпараметрической нелинейной регрессии в соответствии с протоколом производителя. Для определения концентрации белков (ИФР1, ЕРО, INS, ИЛ-4, ИЛ-10) в каждом образце концентрацию различных белков интерполировали по стандартной кривой. Конечную концентрацию белка в образце рассчитывали путем умножения на коэффициент разбавления. Все расчеты выполняли с использованием GraphPad Prism 8 (Сан-Диего, США). Для выражения кратности увеличения по сравнению с конструктом, содержащим эндогенный сигнальный пептид, уровень белка, продуцируемого отдельным конструктом, делили на уровень белка, получаемого с помощью конструкта, содержавшего эндогенный сигнальный пептид, в той же концентрации.

15 РЕЗУЛЬТАТЫ

Клонирование ИФР1

Успешное клонирование всех вставленных фрагментов в pVAX.A120 подтверждали секвенированием по Сэнгеру. Все протестированные клоны приводили к правильной ориентации инсерции ИФР1 со 100% точностью последовательности. Положительные клоны отбирали для продукции мРНК посредством IVT.

Средняя гидрофобность и полярность Cpd.1-39

Средняя гидрофобность Cpd.1-39 для 1-9 аминокислот, для 1-7 аминокислот и для 1-5 аминокислот с N-конца и для последних девяти аминокислот с C-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида и средняя полярность Cpd.1-39 для 1-9 аминокислот с N-конца показаны ниже в таблицах 2-5.

Таблица 2: Средняя гидрофобность и полярность Cpd.1-39 для 1-18 аминокислот с N-конца и для последних девяти аминокислот с C-конца аминокислотной

последовательности сигнального пептида и средняя полярность Срд.1-39 для 1-9

аминокислот с N-конца сигнального пептида

Срд. №	Показате ль гидрофоб ности						
	аминокисл оты 1-9	аминокис лоты 2- 10	аминокис лоты 3- 11	аминокис лоты 4- 12	аминокис лоты 5- 13	аминокис лоты 6- 14	аминокис лоты 7- 15
1	0,614	0,114	0,071	0,129	0,029	0,543	0,1
2	0,344	0,556	1,067	0,989	1,589	1,3	1,656
3	1,211	1,422	2,167	2,689	2,533	2,522	2,122
5	1,878	2,133	2,944	3,211	4,067	3,522	3,256
6	1,989	2,2	2,711	3,011	3,022	2,944	2,367
7	0,278	0,489	1,344	1,644	1,922	2,222	2,644
8	-1,867	-2,256	-1,8	-2,122	-1,422	-0,922	-0,989
9	0,433	0,644	0,644	0,644	1,567	2,422	2,889
10	1,111	1,322	1,544	1,322	1,844	2,056	2,756
11	0,089	0,3	0,244	0,2	0,978	1,789	1,422
12	-0,344	-0,344	-0,978	-0,511	-0,122	-0,122	0,378
13	1,767	1,478	1,767	1,867	1,867	2,056	2,156
30	1,111	1,322	1,544	1,322	1,844	2,056	2,756
27	0,089	0,3	0,244	0,2	0,978	1,789	1,422
33	0,7	0,311	0,778	0,667	1,056	1,567	2,378
36	1,278	1,489	2,311	2,822	3,333	3,056	2,589
4	2,39	2,68	2,67	2,02	1,91	1,56	1,41
14	2,46	2,56	2,96	2,44	2,18	2,29	2,37
15	2,72	3,01	3,02	2,10	2,18	1,62	1,62
16	2,96	3,17	3,12	2,90	2,68	2,61	2,61
17	2,49	2,70	2,99	2,34	2,34	1,53	1,63
18	2,56	2,81	2,70	2,66	2,66	2,62	2,02
19	2,57	2,78	2,78	2,78	2,56	2,09	2,01
20	2,678	2,667	2,744	3,211	2,967	2,5	2,5
21	3,067	3,278	3,167	2,233	2,089	1,978	1,833
22	3,5	3,711	3,711	3,133	3,022	3,022	2,8
23	3,589	3,844	4,067	3,522	3,256	3,211	3,022
34	2,167	2,378	2,378	2,156	2,011	2,389	2,522
37	3,122	3,333	3,333	3,333	3,333	3,056	2,589
31	2,244	2,233	2,456	2,456	2,756	2,756	2,233
24	3,389	3,678	3,678	3,033	2,922	2,567	2,422

28	3,267	3,478	3,478	2,922	3,067	3,067	2,778
25	2,544	2,756	2,256	2,256	2,322	1,811	1,522
38	2,39	2,68	2,67	2,02	1,91	1,56	1,41
29	2,39	2,68	2,67	2,02	1,91	1,56	1,41
32	2,39	2,68	2,67	2,02	1,91	1,56	1,41
35	2,46	2,56	2,96	2,44	2,18	2,29	2,37
26	2,244	2,233	2,456	2,456	2,756	2,756	2,233
39	3,411	3,622	3,622	3,622	3,578	3,578	3,578

Таблица 3: Средняя гидрофобность и полярность Cpd.1-39 для 1-18 аминокислот с N-конца и для последних девяти аминокислот с C-конца аминокислотной

последовательности сигнального пептида и средняя полярность Cpd.1-39 для 1-9

5 аминокислот с N-конца сигнального пептида (продолжение)

Cpd. №					Показатель полярности
	аминокислоты 8-16	аминокислоты 9-17	аминокислоты 10-18	последние девять аминокислот	аминокислоты 1-9
1	-0,086	0,5	1	1	7,79
2	2,511	2,8	2,9	2,3	6,352
3	1,822	1,767	1,256	1,256	6,344
5	3,211	3,022	3,022	1,144	6,107
6	1,822	1,867	1,2	1,144	0,824
7	2,1	1,878	1,211	0,7	12,178
8	-1,578	-1,256	-1,267	1,356	23,538
9	2,844	2,322	2,589	0,2	11,466
10	2,756	2,233	2,367	0,133	6,548
11	2,022	2,244	2,256	1,711	12,024
12	0,378	0,889	1,489	-0,311	1,272
13	2,733	1,922	1,622	1,622	0,949
30	2,756	2,233	2,367	0,133	6,548
27	2,022	2,244	2,256	1,711	12,024
33	2,156	2,011	2,389	0,622	1,14
36	2,633	1,856	1,778	1,778	6,621
4	1,70	1,06	0,79	0,79	0,783
14	2,37	1,86	1,63	1,11	0,641
15	1,62	1,08	0,61	0,61	0,664

16	2,10	1,50	1,28	-0,04	0,43
17	1,67	0,78	0,42	0,42	0,659
18	1,46	1,40	1,43	-0,67	0,454
19	2,01	1,34	1,12	1,12	0,731
20	1,989	1,356	1,356	-0,378	0,231
21	1,622	1,511	1,511	0,656	0,436
22	2,9	2,678	2,122	1,833	0,419
23	3,022	2,467	1,656	1,144	0,26
34	1,711	1,711	1,867	0,622	0,646
37	2,633	1,856	1,778	1,778	0,56
31	2,367	1,767	0,956	0,133	0,64
24	2,211	1,567	1,3	1,3	0,443
28	2,778	2,178	2,178	1,711	0,41
25	1,3	0,944	0,722	0,722	0,599
38	1,70	1,06	0,79	0,79	0,783
29	1,70	1,06	0,79	0,79	0,783
32	1,70	1,06	0,79	0,79	0,783
35	2,37	1,86	1,63	1,11	0,641
26	2,367	1,767	0,956	0,133	0,64
39	3,111	2,889	2,6	1,556	0,26

Таблица 4: Средняя гидрофобность и полярность Cpd.1-39 для 1-13 аминокислот с N-конца и для последних девяти аминокислот с C-конца аминокислотной

последовательности сигнального пептида и средняя полярность Cpd.1-39 для 1-7

5 аминокислот с N-конца сигнального пептида

Cpd. №	Показатель гидрофобности								Показатель полярности
	аминокислоты 1-7	аминокислоты 2-8	аминокислоты 3-9	аминокислоты 4-10	аминокислоты 5-11	аминокислоты 6-12	аминокислоты 7-13	последние девять аминокислот	аминокислоты 1-7
1	0,614	0,114	0,071	0,129	0,029	0,543	0,1	1	7,79
2	0,286	-0,1	0,229	0,129	0,957	1,229	1,829	2,157	7,724
3	1,129	0,743	1,843	2,514	2,314	2,957	2,957	0,671	7,9

5	1,271	1,6	2,643	2,986	4,086	4,086	4,029	1,029	7,814
6	1,614	1,886	2,343	3,014	3,729	3,629	2,886	0,029	0,991
7	-0,586	-0,314	0,586	1,257	1,957	2,343	3,243	0,043	15,589
8	-1,643	-2,557	-2,029	-2,029	-1,443	-1,986	-1,171	0,943	22,596
9	-0,243	0,029	0,029	0,029	0,929	2,029	2,629	-1,057	14,723
10	1,114	1,386	0,9	0,9	1,571	1,557	2,743	-0,243	8,174
11	-0,014	-0,029	-0,1	-0,157	0,171	1,214	1,4	1,886	15,16
12	-0,1	-0,486	-0,971	-0,643	-0,971	-0,686	-0,314	0,171	1,171
13	1,086	1,357	2,114	1,743	1,457	1,457	2,186	1,929	1,183
30	1,114	1,386	0,9	0,9	1,571	1,557	2,743	-0,243	8,174
27	-0,014	-0,029	-0,1	-0,157	0,171	1,214	1,4	1,886	15,16
33	0,586	0,857	0,686	-0,086	0,557	1,071	1,971	0,186	1,221
36	0,929	1,014	1,829	2,486	3,2	3,486	3,486	1,143	8,09
4	2,2	2,2	2,9	2,9	2,243	1,657	1,514	0,486	0,784
14	2,071	2,343	3	2,857	3,371	2,857	1,857	2	0,787
15	2,314	2,686	3,357	3,457	2,8	1,557	2,314	0,257	0,817
16	2,714	2,986	2,929	2,929	2,929	3,286	3,286	-0,571	0,516
17	2,157	2,529	3,043	2,943	2,657	2,071	2,8	-0,257	0,779
18	3,443	3,114	2,471	2,471	2,329	2,471	2,471	-0,3	0,347
19	2,4	2,486	2,486	2,771	2,771	2,486	2,386	0,357	0,71
20	2,643	2,629	2,629	2,943	3,329	3,329	2,729	-0,971	0,279
21	2,857	3,129	3,129	3,029	2,886	1,786	1,6	1	0,523
22	3,357	3,629	3,686	3,586	3,586	2,943	2,8	2,057	0,501
23	3,471	3,8	4,086	4,086	4,029	3,329	2,986	1,029	0,297
34	1,986	2,114	1,971	1,971	1,971	2,457	3,043	0,186	0,73
37	3,3	3,386	3,143	3,143	3,2	3,486	3,486	1,143	0,297
31	1,8	2,071	2,357	2,071	2,743	2,743	2,457	-0,243	0,786
24	3,486	3,486	3,543	3,543	3,543	2,957	2,814	0,486	0,347
28	3,114	3,386	3,386	3,329	3,514	2,857	3,143	1,886	0,49
25	2,371	2,457	2,457	2,6	2,686	2,543	2,186	0,486	0,54
38	2,2	2,2	2,9	2,9	2,243	1,657	1,514	0,486	0,784
29	2,2	2,2	2,9	2,9	2,243	1,657	1,514	0,486	0,784
32	2,2	2,2	2,9	2,9	2,243	1,657	1,514	0,486	0,784
35	2,071	2,343	3	2,857	3,371	2,857	1,857	2	0,787
26	1,8	2,071	2,357	2,071	2,743	2,743	2,457	-0,243	0,786
39	3,586	3,857	3,571	3,571	3,514	3,514	3,514	1,686	0,316

Таблица 5: Средняя гидрофобность и полярность С_рd.1-39 для 1-9 аминокислот с N-конца и для последних девяти аминокислот с C-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида и средняя полярность С_рd.1-39 для 1-5

аминокислот с N-конца сигнального пептида

Срд. №	Показатель гидрофобности						Показат ель полярно сти
	аминокислоты 1-5	аминокислоты 2-6	аминокислоты 3-7	аминокислоты 4-8	аминокислоты 5-9	последние девять аминокислот	аминокислоты 1-5
1	0,26	-0,28	0,56	1,02	-0,02	0,34	10,546
2	1,26	0,8	0,1	-0,96	-0,26	2,1	0,914
3	0,12	0,3	1,98	2	1,92	-0,38	10,964
5	0,1	0,56	2,1	2,58	4,12	0,32	10,888
6	0,46	0,98	1,96	2,9	3,62	-0,18	1,336
7	-0,82	-2,1	-0,5	0,44	1,14	-0,66	11,398
8	-1,88	-3,04	-1,78	-2,36	-1,62	-0,08	21,734
9	-0,18	-0,64	-1,08	-1,08	0,18	-1,08	20,612
10	1,7	0,42	0,82	0,82	0,68	0,06	1,018
11	-0,2	-0,08	-0,32	-0,8	-0,34	1,96	20,612
12	0,7	0,18	-0,88	-0,96	-0,96	-0,88	0,602
13	1,92	1,28	1,3	1,68	1,82	1,38	1,002
30	1,7	0,42	0,82	0,82	0,68	0,06	1,018
27	-0,2	-0,08	-0,32	-0,8	-0,34	1,96	20,612
33	0,76	-0,32	0,52	0,52	0,34	-0,02	0,978
36	-0,22	0,16	1,56	2,22	2,88	0,08	11,274
4	2,46	2,84	2,84	2,32	2,4	0,38	0,74
14	1,38	1,76	2,68	2,68	3,6	1,14	1,05
15	2,56	2,02	3,04	3,18	3,18	0,36	0,784
16	2,6	2,58	2,58	2,58	2,58	-0,9	0,696
17	2,44	1,8	2,8	2,8	2,6	-0,86	0,742
18	3,3	3,68	3,68	2,76	1,86	-0,54	0,434
19	3,02	3,14	2,22	2,36	2,36	-0,22	0,364
20	2,18	2,56	2,56	3	3,4	-0,42	0,338
21	3,56	3,94	2,86	2,72	2,72	0,34	0,39
22	3,56	3,94	3,56	3,42	3,5	1,76	0,39
23	3,26	3,72	4,12	4,12	4,04	0,32	0,364
34	2,34	1,64	1,64	1,44	1,24	-0,02	0,68
37	3,1	3,48	3,4	3,14	2,88	0,08	0,364
31	2,08	2,46	1,78	1,78	2,72	0,06	0,758
24	3,36	3,74	3,74	3,22	3,3	0,38	0,434

28	3,24	3,22	3,22	3,14	3,4	1,96	0,66
25	2,2	2,18	2,18	2,12	3,14	0,26	0,73
38	2,46	2,84	2,84	2,32	2,4	0,38	0,74
29	2,46	2,84	2,84	2,32	2,4	0,38	0,74
32	2,46	2,84	2,84	2,32	2,4	0,38	0,74
35	1,38	1,76	2,68	2,68	3,6	1,14	1,05
26	2,08	2,46	1,78	1,78	2,72	0,06	0,758
39	3,5	3,88	3,88	3,88	3,4	0,6	0,39

Транскрипция мРНК *in vitro*

Плазмиду IGF1_pVAX.A120 линеаризовали с помощью *XhoI*, мРНК ИФР1 (Cpd.1) продуцировали с помощью IVT-системы. Аналогичным образом, мРНК ИФР1 с

5 модифицированными пре-доменами (сигнальными пептидами, Cpd.2-Cpd.7, кодируемые векторами рМА-Т и рМА-RQ (фигура 16), продуцировали в диапазоне 50-200 мкг для экспериментов по трансфекции *in vitro* с использованием IVT на основе ПЦР. Аналогичным образом, мРНК ИФР1 с модифицированными сигнальными пептидами для Cpd.1 (SEQ ID No. 40) и Cpd. 8-26, кодируемых векторами рМА-Т и

10 рМА-RQ, продуцировали в диапазоне 50-200 мкг для экспериментов по трансфекции *in vitro* с использованием IVT на основе ПЦР. В дополнение к мРНК ИФР1, мРНК для эритропоэтина (ЕРО, Cpd. 27-29), инсулина (INS, Cpd. 30-32), интерлейкина 4 (ИЛ-4, Cpd. 33-35) и интерлейкина 10 (ИЛ-10, Cpd. 36-38) с эндогенным или

модифицированным сигнальным пептидом продуцировали в количестве 50-200 мкг для

15 экспериментов по трансфекции *in vitro*.

Трансфекция клеток НЕК293Т *in vitro* для тестирования секреции ИФР1

Через 24 часа инкубирования клеток НЕК293Т с мРНК Cpd.1-Cpd.7 выполняли оценку секретируемых уровней ИФР1 в супернатантах клеточных культур (фигура 17). Cpd.1

20 мог индуцировать секрецию ИФР1 вплоть до уровня 50 нг/мл. Cpd.4 индуцировал секрецию ИФР1 в значительно более высокой степени, чем Cpd.1 (в 3,3 раза, 0,001). Для оценки концентрационной зависимости Cpd.1 и Cpd.4 тестировали различные концентрации как Cpd.1, так и Cpd.4 (0,02-2 мкг/лунку) на предмет индукции секреции

ИФР1 в супернатант (фигура 18). Cpд.1 позволил получить EC_{50} , равную 0,89 мкг, а Cpд.4 - EC_{50} , равную 0,13 мкг, что указывало на 6,8-кратно более высокую эффективность Cpд.4 в отношении индукции секреции ИФР1 из клеток НЕК293Т. В совокупности данные на фигурах 17 и 18 демонстрируют, что Cpд.4 индуцировал секрецию ИФР1 в клетках НЕК293Т с большей эффективностью по сравнению с Cpд.1, что указывало на способность этого сигнального пептида облегчать выход продуцируемого ИФР1 из клеток этого типа.

Трансфекция клеток C2C12 *in vitro* для тестирования секреции ИФР1

10 Через 24 часа инкубирования клеток C2C12 с мРНК Cpд.1-Cpd.7 выполняли оценку секретируемых уровней ИФР1 в супернатантах клеточных культур (фигура 19). Cpд.1 мог индуцировать секрецию ИФР1 вплоть до уровня 60 нг/мл. Cpд.4 индуцировал секрецию ИФР1 в значительно более высокой степени, чем Cpд.1 (в 6,1 раза, 0,001). Данные демонстрируют, что Cpд.4 индуцировал секрецию ИФР1 в клетках C2C12 с
15 большей эффективностью по сравнению с Cpд.1, что также указывало на способность этого сигнального пептида облегчать выход продуцируемого ИФР1 из клеток этого типа.

Трансфекция клеток HSkMC *in vitro* для тестирования секреции ИФР1

20 Через 24 часа инкубирования клеток HSkMC с мРНК Cpд.1 или Cpд.4 выполняли оценку секретируемых уровней ИФР1 в супернатантах клеточных культур (фигура 20). Cpд.1 мог индуцировать секрецию ИФР1 вплоть до уровня 30 нг/мл. Cpд.4 индуцировал секрецию ИФР1 в значительно более высокой степени, чем Cpд.1 (в 3,1 раза, $p < 0,05$). Данные демонстрируют, что Cpд.4 индуцировал секрецию ИФР1 в первичных клетках
25 HSkMC с большей эффективностью по сравнению с Cpд.1, что также указывало на способность этого сигнального пептида облегчать выход продуцируемого ИФР1 из клеток этого типа.

Трансфекция клеток НЕК293Т *in vitro* дополнительными мРНК для тестирования секреции ИФР1

В еще одном наборе экспериментов анализировали Cpd.8-Cpd.26 на предмет способности модулировать секрецию ИФР1 из клеток НЕК293Т. Через 24 часа инкубирования с Cpd.1 в качестве контроля и Cpd.8-Cpd.26 в качестве тестируемых мРНК выполняли оценку секретируемых уровней ИФР1 в супернатантах клеточных культур (фигура 22). Ответ Cpd.1 принимали за 1, данные выражали в виде кратного изменения по сравнению с Cpd.1. В то время как Cpd.8, Cpd.9, Cpd.10, Cpd.11, Cpd.12 и Cpd.13 демонстрировали снижение секреции ИФР1, Cpd.14, Cpd.15, Cpd.16, Cpd.17, Cpd.18, Cpd.19, Cpd.20, Cpd.21, Cpd.23, Cpd.24, Cpd.25 и Cpd.26 могли индуцировать секрецию ИФР1 на значительно более высоком уровне (до 2,6-кратного) по сравнению с Cpd.1. При этом Cpd.15 и Cpd.21 демонстрировали индукцию аналогично Cpd.4 (см. фигуру 17). В совокупности эти данные демонстрируют, что Cpd.14, Cpd.15, Cpd.16, Cpd.17, Cpd.18, Cpd.19, Cpd.20, Cpd.21, Cpd.23, Cpd.24, Cpd.25 и Cpd.26 индуцировали секрецию ИФР1 в клетках НЕК293Т с большей эффективностью по сравнению с Cpd.1, что указывало на способность этих сигнальных пептидов облегчать выход продуцируемого ИФР1 из клеток этого типа.

Трансфекция клеток НерG2 *in vitro* для тестирования секреции ИФР1

Через 24 часа инкубирования клеток НерG2 с Cpd.1 в качестве контроля и Cpd.4-Cpd.26 в качестве тестируемых мРНК выполняли оценку секретируемых уровней ИФР1 в супернатантах клеточных культур (фигура 23). Ответ Cpd.1 принимали за 1, данные выражали в виде кратного изменения по сравнению с Cpd.1. В то время как Cpd.8, Cpd.9 и Cpd.12 демонстрировали снижение секреции ИФР1, Cpd.4, Cpd.14, Cpd.15, Cpd.16, Cpd.17, Cpd.18, Cpd.19, Cpd.20, Cpd.21, Cpd.22, Cpd.23, Cpd.24, Cpd.25 и Cpd.26 могли индуцировать секрецию ИФР1 на значительно более высоком уровне (до 8,3-кратного) по сравнению с Cpd.1. В совокупности эти данные демонстрируют, что Cpd.4, Cpd.14, Cpd.15, Cpd.16, Cpd.17, Cpd.18, Cpd.19, Cpd.20, Cpd.21, Cpd.22, Cpd.23,

Cpd.24, Cpd.25 и Cpd.26 индуцировали секрецию ИФР1 в клетках НерG2 с большей эффективностью по сравнению с Cpd.1, что указывало на способность этих сигнальных пептидов облегчать выход продуцируемого ИФР1 из клеток этого типа.

5 Трансфекция нейронных клеток IMR32 *in vitro* для тестирования секреции ИФР1

Через 24 часа инкубирования нейронных клеток IMR324 с Cpd.1 в качестве контроля и Cpd.4-Cpd.24 в качестве тестируемых мРНК выполняли оценку секретируемых уровней ИФР1 в супернатантах клеточных культур (фигура 24). Ответ Cpd.1 принимали за 1, данные выражали в виде кратного изменения по сравнению с Cpd.1. Cpd.4, Cpd.14, Cpd.15, Cpd.16, Cpd.17, Cpd.20, Cpd.22, Cpd.23 и Cpd.24 могли индуцировать секрецию ИФР1 на значительно более высоком уровне (до 2,6-кратного) по сравнению с Cpd.1. В совокупности эти данные демонстрируют, что Cpd.4, Cpd.14, Cpd.15, Cpd.16, Cpd.17, Cpd.20, Cpd.22, Cpd.23 и Cpd.24 индуцировали секрецию ИФР1 в нейронных клетках IMR32 с большей эффективностью по сравнению с Cpd.1, что указывало на способность этих сигнальных пептидов облегчать выход продуцируемого ИФР1 из клеток этого типа.

Трансфекция хондроцитов человека *in vitro* для тестирования секреции ИФР1

Через 24 часа инкубирования хондроцитов с Cpd.1 в качестве контроля и Cpd.4-Cpd.25 в качестве тестируемых мРНК выполняли оценку секретируемых уровней ИФР1 в супернатантах клеточных культур (фигура 25). Ответ Cpd.1 принимали за 1, данные выражали в виде кратного изменения по сравнению с Cpd.1. Cpd.4, Cpd.14, Cpd.15, Cpd.16, Cpd.20, Cpd.21, Cpd.22, Cpd.24 и Cpd.25 могли индуцировать секрецию ИФР1 на значительно более высоком уровне (до 1,9-кратного) по сравнению с Cpd.1. В совокупности эти данные демонстрируют, что Cpd.4, Cpd.14, Cpd.15, Cpd.16, Cpd.20, Cpd.21, Cpd.22, Cpd.24 и Cpd.25 индуцировали секрецию ИФР1 в хондроцитах с большей эффективностью по сравнению с Cpd.1, что указывало на способность этих сигнальных пептидов облегчать выход продуцируемого ИФР1 из клеток этого типа.

Трансфекция мотонейронов крысы *in vitro* для тестирования секреции ИФР1

Через 48 часов инкубирования мотонейронов трансгенной крысы SOD1^{G93A} (фигура 26B) с Cpd.1 в качестве контроля и Cpd.4, Cpd.14 и Cpd.17 для животных дикого типа (фигура 26A) или Cpd.14 и Cpd.17 для трансгенных животных SOD1^{G93A} (фигура 26B) в качестве тестируемых мРНК выполняли оценку секретируемых уровней ИФР1 в супернатантах клеточных культур (фигура 26 А и В). Ответ Cpd.1 принимали за 1, данные выражали в виде кратного изменения по сравнению с Cpd.1. Cpd.4, Cpd.14 и Cpd.17 могли индуцировать секрецию ИФР1 с 4,3-кратной эффективностью в клетках животных дикого типа или с 9,3-кратной эффективностью в клетках трансгенных животных SOD1G^{S93A} по сравнению с Cpd.1. В совокупности эти данные демонстрируют, что Cpd.4, Cpd.14 и Cpd.17 индуцировали секрецию ИФР1 в мотонейронах с большей эффективностью по сравнению с Cpd.1, что указывало на способность этих сигнальных пептидов облегчать выход продуцируемого ИФР1 из клеток этого типа.

Трансфекция клеток HEK293T, HepG2 и A549 *in vitro* для тестирования секреции ЕРО

Через 24 часа инкубирования клеток HEK293T, HepG2 или A549 с Cpd.27 в качестве контроля и Cpd.28 или Cpd.29 в качестве тестируемых мРНК выполняли оценку секретируемых уровней эритропоэтина (ЕРО) в супернатантах клеточных культур (фигура 27). Ответ Cpd.27 принимали за 1, данные выражали в виде кратного изменения по сравнению с Cpd.27. Cpd.28 мог индуцировать секрецию ЕРО с 1,8-кратной эффективностью по сравнению с Cpd.27 в клетках HEK293T (фигура 27A), клетках HepG2 (фигура 27B) и клетках A549 (фигура 27C), Cpd.29 индуцировал секрецию ЕРО с 1,4-кратной эффективностью по сравнению с Cpd.27 в клетках HEK293T (фигура 27A) и клетках HepG2 (фигура 27B). В совокупности эти данные демонстрируют, что Cpd.28 и Cpd.29 индуцировали секрецию ЕРО с большей

эффективностью по сравнению с Cpd.27, что указывало на способность этих сигнальных пептидов облегчать выход продуцируемого ЕРО из клеток этих типов.

Трансфекция клеток HEK293T *in vitro* для тестирования секреции INS

Через 24 часа инкубирования клеток HEK293T с Cpd.30 в качестве контроля и Cpd.31
5 или Cpd.32 в качестве тестируемых мРНК выполняли оценку секретируемого инсулина (INS) в супернатантах клеточных культур (фигура 28). Ответ Cpd.30 принимали за 1, данные выражали в виде кратного изменения по сравнению с Cpd.30. Cpd.31 и Cpd.32 могли индуцировать секрецию INS с 3,9-кратной эффективностью по сравнению с Cpd.30 в клетках HEK293T. В совокупности эти данные демонстрируют, что Cpd.31 и
10 Cpd.32 индуцировали секрецию INS с большей эффективностью по сравнению с Cpd.30, что указывало на способность этих сигнальных пептидов облегчать выход продуцируемого INS из клеток этого типа.

Трансфекция клеток HEK293T, HepG2, THP-1 и A549 *in vitro* для тестирования ИЛ-4

Через 24 часа инкубирования клеток HEK293T, HepG2, THP-1 или A549 с Cpd.33 в качестве контроля и Cpd.34 или Cpd.35 в качестве тестируемых мРНК выполняли оценку секретируемого интерлейкина 4 (ИЛ-4) в супернатантах клеточных культур (фигура 29). Ответ Cpd.33 принимали за 1, данные выражали в виде кратного
20 изменения по сравнению с Cpd.33. Cpd.34 мог индуцировать секрецию ИЛ-4 с 2,2-кратной эффективностью по сравнению с Cpd.33 в клетках HEK293T (фигура 29A), клетках HepG2 (фигура 29B), клетках THP-1 (фигура 29C) и клетках A549 (фигура 29D), Cpd.35 индуцировал секрецию ИЛ-4 с 1,3-кратной эффективностью по сравнению с Cpd.33 в клетках HepG2 (фигура 29B) и клетках THP-1 (фигура 29C),
25 соответственно. В совокупности эти данные демонстрируют, что Cpd.34 и Cpd.35 индуцировали секрецию ИЛ-4 с большей эффективностью по сравнению с Cpd.33, что указывало на способность этих сигнальных пептидов облегчать выход продуцируемого ИЛ-4 из клеток этих типов.

Трансфекция клеток HEK293T, НерG2 и ТНР-1 *in vitro* для тестирования ИЛ-10

Через 24 часа инкубирования клеток HEK293T, НерG2 или ТНР-1 с Срд.36 в качестве контроля и Срд.37 или Срд.38 в качестве тестируемых мРНК выполняли оценку

- 5 секретируемого интерлейкина 10 (ИЛ-10) в супернатантах клеточных культур (фигура 30). Ответ Срд.36 принимали за 1, данные выражали в виде кратного изменения по сравнению с Срд.36. Срд.37 мог индуцировать секрецию ИЛ-10 с 2,2-кратной эффективностью по сравнению с Срд.36 в клетках HEK293T (фигура 30А), клетках НерG2 (фигура 30В) и клетках ТНР-1 (фигура 30С), Срд.38 индуцировал секрецию ИЛ-10 с 1,4-кратной эффективностью по сравнению с Срд.36 в клетках ТНР-1 (фигура 30С). В совокупности эти данные демонстрируют, что Срд.37 и Срд.38 индуцировали секрецию ИЛ-10 с большей эффективностью по сравнению с Срд.36, что указывало на способность этих сигнальных пептидов облегчать выход продуцируемого ИЛ-10 из клеток этих типов.

15 Трансфекция клеток НерG2 и первичных хондроцитов человека *in vitro* Срд.39 для тестирования секреции ИФР1

Через 24 часа инкубирования клеток НерG2 или хондроцитов с Срд.1 в качестве контроля и Срд.39 в качестве тестируемых мРНК выполняли оценку секретируемых уровней ИФР1 в супернатантах клеточных культур (фигура 31). Ответ Срд.1 принимали
20 за 1, данные выражали в виде кратного изменения по сравнению с Срд.1. Срд.39 мог индуцировать секрецию ИФР1 на значительно более высоком уровне (до 1,4-кратного) по сравнению с Срд.1 в НерG2 (фигура 31А) и первичных хондроцитах человека (фигура 31В). В совокупности эти данные демонстрируют, что Срд.39 индуцировал секрецию ИЛ-10 с большей эффективностью по сравнению с Срд.1, что указывало на
25 способность этого сигнального пептида облегчать выход продуцируемого ИФР1 из клеток этих типов.

Пример 2

Для проверки эффективности мРНК ИФР-I при местном применении на модели повреждения скелетных мышц у мыши самцов мышей C57BL6/J в возрасте 8-10 недель подвергали миотоксическому повреждению передней большеберцовой мышцы (ТА), индуцированному нотексином, в день 0. В 1 сутки после повреждения в поврежденную мышцу вводили среду-носитель или 1 мкг мРНК (Cpd.4) посредством внутримышечной инъекции и повторяли эту процедуру на 4 сутки после повреждения. Функцию ТА мышцы измеряли на 1, 4, 7, 10, 14, 21 и 28 сутки после повреждения. Подгруппу мышц ТА с противоположной стороны также оценивали на протяжении всего исследования с целью определения контрольных уровней функции здоровой ТА мышцы.

СПОСОБЫ И МАТЕРИАЛ

Клонирование ИФР-1 и транскрипция мРНК ИФР1 *in vitro*

Клонирование ИФР-1 и транскрипцию мРНК ИФР-1 *in vitro* выполняли, как описано в примере 1. Кодон-оптимизированную ДНК Cpd. 4 (фигура 4) использовали для клонирования в векторе рМА-Т и получения конструкта, показанного на фигуре 11. Этот конструкт использовали для продукции мРНК, транскрибированной *in vitro* и используемой для мРНК-терапии.

Повреждение нотексином

Нотексин (Latoxan, Валанс, Франция) получали в концентрации 0,4 мкг в 40 мкл физиологического раствора для каждой мыши. Анестезию у мышей индуцировали в камере (~4-5% изофлурана, до получения эффекта) и поддерживали посредством носового конуса (~2-3% изофлурана, до получения эффекта). Затем мышь фиксировали на теплом (37°C) хирургическом столе. Кожу над серединой брышка ТА мышцы обрабатывали кремом для депиляции (Nair Hair Remover в течение 45 секунд, затем 3-кратно промывали водой), а затем выполняли предварительную подготовку посредством трех чередующихся протираний бетадином и 70% спиртом во избежание попадания бактерий с кожи в мягкие ткани. Используя шприц для введения

туберкулина, выполняли внутримышечную инъекцию 0,04 мл подготовленного нотексина в брюшко правой ТА. Согласно наблюдениям, животные не ощущали боли во время процедуры, а впоследствии им вводили соответствующее обезболивающее (бупренорфин, 0,05-0,1 мг/кг каждые 12 ч в течение 48 ч после инъекции). Первую дозу

5 анальгетика вводили во время индукции анестезии для обеспечения обезболивания с момента восстановления. По истечении первых 48 ч животных обследовали по меньшей мере два раза в неделю, чтобы убедиться в надлежащем заживлении и восстановлении нормальной походки.

10 **Лечение с использованием мРНК**

Мышей случайным образом назначали в группы обработки мРНК или средой-носителем. Мышей анестезировали изофлураном, как описано выше, и в середину поврежденной ТА мышцы вводили одну внутримышечную инъекцию мРНК или среды-носителя.

15

Оценка функции ТА *in vivo*

Работоспособность мышцы измеряли *in vivo* с помощью мышечно-рычажной системы 305C (Aurora Scientific Inc., Аврора, Канада) на 1, 4, 7, 10, 14, 21 и 28 сутки после повреждения. Мышь анестезировали, как описано выше, и помещали на

20 термостатированный стол. Коленный сустав изолировали с помощью штифта, прижимающего головку большеберцовой кости, а стопу плотно фиксировали на подножке вала двигателя. Сокращения группы мышц, выполняющих сгибание назад, вызывали путем чрескожной электрической стимуляции малоберцового нерва.

Оптимальный изометрический крутящий момент дергающего усилия определяли,

25 увеличивая силу тока, при минимальном 30-с промежутке между сокращениями во избежание утомления. Затем выполняли серию раздражений с возрастающей частотой раздражения (0,2-мс импульс, 500 мс продолжительность серии): 1, 10, 20, 40, 60, 80,

100, 150 Гц, а затем последнее раздражение с частотой 1 Гц. Строили график максимального пикового изометрического усилия.

Анализ данных

- 5 Данные группировали, рассчитывали средние значения и значения стандартной ошибки. Статистический анализ выполняли с использованием GraphPad Prism 8 (Сан-Диего, США). Сравнения выполняли с использованием t-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ

- В примере 2 показано, что в модели повреждения ГА мышцы, вызванного токсином (нотексином) у мыши, внутримышечное введение мРНК ИФР-1 на ранних сроках после повреждения мышцы в 1 и 4 сутки приводило к ускоренному и полному восстановлению функции мышцы (фигура 21). Животные, обработанные 1 мкг CpD. 4, достигали функциональных уровней здорового диапазона к 16 суткам. В отличие от этого, контрольные животные, обработанные средой-носителем, и мыши, обработанные более низкими дозами, не достигали полного функционального восстановления к 28 суткам. Таким образом, эти данные показывают, что обработка мРНК ИФР-1 может ускорить заживление после повреждения мышцы и потенциально может предотвратить хроническое нарушение функции, полностью восстановив функцию мышцы. При этом, как ни странно, требуются лишь две дозы на ранних сроках после повреждения.

Формула изобретения

1. мРНК, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую белок и сигнальный пептид, причем аминокислоты 1-9 с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида характеризуются средним показателем гидрофобности выше 2, причем указанный сигнальный пептид выбран из группы, состоящей из
 - i) сигнального пептида, гетерологичного указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, необязательно модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, при условии, что указанный белок не является оксидоредуктазой;
 - ii) сигнального пептида, гомологичного указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты; и
 - iii) природной аминокислотной последовательности, не обладающей функцией сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная последовательность необязательно модифицирована путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты.
2. мРНК по п. 1, отличающаяся тем, что аминокислоты 1-9 с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида характеризуются средней полярностью, равной 6,1 или ниже.
3. мРНК по п. 1 или 2, отличающаяся тем, что средний показатель гидрофобности последних девяти аминокислот с C-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида по меньшей мере на 1,0 единицы ниже среднего показателя гидрофобности аминокислот 1-9 с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида.
4. мРНК по любому из пп. 1 - 3, отличающаяся тем, что аминокислоты 1-9, аминокислоты 2-10, аминокислоты 3-11, аминокислоты 4-12 и аминокислоты 5-13 с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида характеризуются средним показателем гидрофобности выше 1,5.

5. мРНК по любому из пп. 1 - 4, отличающаяся тем, что средний показатель гидрофобности аминокислот 8-16 с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида равен или ниже среднего показателя гидрофобности аминокислот 3-11 с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида.
5
6. мРНК по любому из пп. 1 - 4, отличающаяся тем, что сигнальный пептид содержит аминокислотную последовательность длиной от 18 до 40 аминокислот, причем средний показатель гидрофобности аминокислот 10-18 с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида по меньшей мере на 0,5 единицы ниже среднего показателя гидрофобности аминокислот 3-11 с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида.
10
7. мРНК по любому из п. 1- 6, отличающаяся тем, что средний показатель гидрофобности последних девяти аминокислот с С-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида по меньшей мере на 1,5 единицы ниже среднего показателя гидрофобности аминокислот 3-11 с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида.
15
8. мРНК по любому из пп. 1 - 7, отличающаяся тем, что средний показатель гидрофобности любых 9 следующих друг за другом аминокислот в аминокислотной последовательности сигнального пептида не превышает 4,1.
20
9. мРНК по любому из пп. 1 - 8, отличающаяся тем, что последние девять аминокислот с С-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида содержат по меньшей мере одну аминокислоту с отрицательным показателем гидрофобности.
25
10. мРНК по п. 9, отличающаяся тем, что по меньшей мере одна аминокислота с отрицательным показателем гидрофобности выбрана из группы, состоящей из G, Q, N, T, S, R, K, H, D, E, P, Y и W.
30

11. мРНК по любому из пп. 1 - 10, отличающаяся тем, что вторая аминокислота из аминокислот 1-9 с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида выбрана из группы, состоящей из P, Y, W, S, T, G, A, M, C, F, L, V и I.
- 5 12. мРНК по любому из пп. 1 - 10, отличающаяся тем, что вторая аминокислота из аминокислот 1-9 с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида выбрана из группы, состоящей из A, L, S, T, V и W.
- 10 13. мРНК по любому из пп. 1 - 12, отличающаяся тем, что сигнальный пептид представляет собой ii) сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, причем средний показатель гидрофобности аминокислот 1-9 с N-конца аминокислотной последовательности модифицированного сигнального пептида, гомологичного указанному белку, по меньшей мере на 1,0 единицы выше среднего показателя гидрофобности аминокислот 1-9 с N-конца аминокислотной последовательности сигнального пептида, не содержащего модификации.
- 15 14. мРНК по любому из пп. 1 - 13 или 2 - 13, отличающаяся тем, что показатель гидрофобности рассчитывают по шкале Кайта-Дулитла, а полярность рассчитывают согласно индексу полярности Циммермана.
- 20 15. мРНК по любому из пп. 1 - 14, отличающаяся тем, что сигнальный пептид представляет собой i) сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, причем сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, выбран из группы, состоящей из сигнального пептида нейротрофического фактора головного мозга (BDNF), сигнального пептида нейротрофина-3 (NTF-3), сигнального пептида фактора роста фибробластов 5 (FGF5), сигнального пептида белка 5, связывающего инсулиноподобный фактор роста (IBP5), сигнального пептида белка 2, экспрессируемого предстательной железой и яичками (PATE2),
- 25 30 сигнального пептида внеклеточной супероксиддисмутазы (SOD3) и сигнального пептида белка 2, родственного фактору комплемента H (FHR2).

16. мРНК по любому из пп. 1 - 14, отличающаяся тем, что сигнальный пептид представляет собой i) сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, причем сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, причем сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, выбран из группы, состоящей из сигнального пептида лиганда 12 хемокина с C-X-C-мотивом (CXCL12), сигнального пептида инсулиноподобного фактора роста 2 (ИФР2), сигнального пептида инсулина (INS) и сигнального пептида нейротрофического фактора головного мозга (BDNF).
17. мРНК по любому из пп. 1 - 14, отличающаяся тем, что сигнальный пептид представляет собой ii) сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, причем сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, причем сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, и указанный белок выбраны из группы, состоящей из сигнального пептида инсулиноподобного фактора роста 1 (ИФР1) и ИФР1, сигнального пептида инсулина (INS) и INS, сигнального пептида эритропоэтина (ЕРО) и ЕРО, сигнального пептида интерлейкина-4 (ИЛ-4) и ИЛ-4 и сигнального пептида интерлейкина-10 (ИЛ-10) и ИЛ-10.
18. мРНК по любому из пп. 1 - 14, отличающаяся тем, что сигнальный пептид представляет собой iii) природную аминокислотную последовательность, не обладающую функцией сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная последовательность необязательно модифицирована путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, причем природная аминокислотная последовательность выбрана из группы, состоящей из пропептида инсулиноподобного фактора роста 1 (ИФР1), кодирующей последовательности рецептора глюкагона (GL-R) и пропептида кишечной щелочной фосфатазы (ALPI).
19. мРНК по любому из пп. 1 - 18, отличающаяся тем, что сигнальный пептид представляет собой i) сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку,

причем сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, необязательно модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, и при этом количество белка, секретируемого с использованием сигнального пептида, гетерологичного указанному белку, превышает количество
 5 указанного белка, секретируемого с использованием сигнального пептида, гомологичного указанному белку.

20. мРНК по любому из пп. 1 - 18, отличающаяся тем, что сигнальный пептид представляет собой ii) сигнальный пептид, гомологичный указанному белку,
 10 причем сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, и при этом количество белка, секретируемого с использованием модифицированного сигнального пептида, гомологичного указанному белку, превышает количество указанного белка, секретируемого с использованием
 15 сигнального пептида, гомологичного указанному белку, не содержащего модификации.

21. мРНК по любому из пп. 1 - 18, отличающаяся тем, что сигнальный пептид представляет собой iii) природную аминокислотную последовательность, не
 20 обладающую функцией сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная последовательность необязательно модифицирована путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, причем количество белка, секретируемого с использованием природной аминокислотной последовательности, не обладающей функцией сигнального
 25 пептида в природе, превышает количество указанного белка, секретируемого с использованием сигнального пептида, гомологичного указанному белку.

22. мРНК по любому из пп. 1 - 21, отличающаяся тем, что сигнальный пептид представляет собой i) сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку,
 30 причем сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, необязательно модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены менее чем 50% от количества аминокислот в аминокислотной последовательности сигнального пептида, гетерологичного указанному белку.

23. мРНК по любому из пп. 1 - 21, отличающаяся тем, что сигнальный пептид представляет собой ii) сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, причем сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены менее чем 50% от количества аминокислот в аминокислотной последовательности сигнального пептида, гомологичного указанному белку.
24. мРНК по любому из пп. 1 - 21, отличающаяся тем, что сигнальный пептид представляет собой iii) природную аминокислотную последовательность, не обладающую функцией сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная последовательность необязательно модифицирована путем инсерции, делеции и/или замены менее чем 50% от количества аминокислот в указанной природной аминокислотной последовательности.
25. мРНК по любому из пп. 1 - 24, отличающаяся тем, что белок выбран из группы, состоящей из цитокинов, факторов роста и гормонов.
26. мРНК по любому из пп. 1 - 25, отличающаяся тем, что сигнальный пептид представляет собой i) сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, а белок выбран из группы, состоящей из инсулиноподобного фактора роста 1 (ИФР1), инсулина (INS), эритропоэтина (ЕРО), интерлейкина-4 (ИЛ-4) и интерлейкина-10 (ИЛ-10).
27. мРНК по любому из пп. 1 - 25, отличающаяся тем, что сигнальный пептид представляет собой i) сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, а белок представляет собой ИФР1.
28. мРНК по любому из пп. 1 - 27, отличающаяся тем, что сигнальный пептид представляет собой iii) природную аминокислотную последовательность, не обладающую функцией сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная последовательность необязательно модифицирована

путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты, а белок представляет собой ИФР1.

29. мРНК по любому из пп 1 - 5 и 7 - 28, отличающаяся тем, что сигнальный пептид
5 содержит аминокислотную последовательность длиной от 16 до 40 аминокислот.
30. Единица транскрипции, экспрессирующий вектор или вектор для генной терапии, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую белок и сигнальный пептид, причем аминокислоты 1-9 с N-конца аминокислотной последовательности
10 сигнального пептида характеризуются средним показателем гидрофобности выше 2, причем указанный сигнальный пептид выбран из группы, состоящей из
i) сигнального пептида, гетерологичного указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, необязательно модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной
15 аминокислоты, при условии, что указанный белок не является оксидоредуктазой; ii) сигнального пептида, гомологичного указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гомологичный указанному белку, модифицирован путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты; и
iii) природной аминокислотной последовательности, не обладающей функцией
20 сигнального пептида в природе, причем указанная природная аминокислотная последовательность необязательно модифицирована путем инсерции, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты.
31. Терапевтическая композиция, содержащая мРНК по любому из пп. 1 - 29 и/или
25 единицу транскрипции, экспрессирующий вектор или вектор для генной терапии по п. 30.
32. Набор, содержащий мРНК по любому из пп. 1 - 29 и/или единицу транскрипции, экспрессирующий вектор или вектор для генной терапии по п. 30 и/или
30 терапевтическую композицию по п. 31, а также инструкции, необязательно карту вектора, необязательно клетку-хозяина, необязательно культуральную среду для культивирования клетки-хозяина и/или, необязательно, селективную среду для селекции и культивирования трансфицированной клетки-хозяина.

33. мРНК, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую
i) белок; и
ii) сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку,
5 причем указанный сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку,
представляет собой сигнальный пептид нейротрофического фактора головного
мозга (BDNF), а указанный белок не является оксидоредуктазой.
34. мРНК, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую
10 i) белок; и
ii) сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, причем указанный
сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, представляет собой
сигнальный пептид нейротрофического фактора головного мозга (BDNF), а
указанный белок выбран из группы, состоящей из карбоксипептидаз; цитокинов;
15 внеклеточных лигандов и переносчиков; белков внеклеточного матрикса;
глюкозидаз; гликозилтрансфераз; факторов роста; белков, связывающих факторы
роста; белков, связывающих гепарин; гормонов; гидролаз; иммуноглобулинов;
изомераз; киназ; лиаз; ингибиторов металлоферментов; металлопротеаз; белков
молока; нейроактивных белков; протеаз; ингибиторов протеаз; протеинфосфатаз;
20 эстераз; трансфераз; и вазоактивных белков.
35. мРНК по п. 33 или 34, отличающаяся тем, что белок выбран из группы, состоящей
из цитокинов; факторов роста; белков, связывающих факторы роста; белков,
связывающих гепарин; гормонов; нейроактивных белков; и вазоактивных белков.
25
36. мРНК по п. 33 или 34, отличающаяся тем, что указанный белок представляет
собой фактор роста.
37. мРНК по п. 36, отличающаяся тем, что фактор роста выбран из группы, состоящей
30 из AMH, ARTN, BTC, CDNF, CFC1, CFC1B, CHRDL1, CHRDL2, CLEC11A,
CNMD, EFEMP1, EGFL6, EGFL7, EGFL8, EPGN, EREG, EYS, FGF1, FGF10,
FGF16, FGF17, FGF18, FGF19, FGF2, FGF20, FGF21, FGF22, FGF23, FGF3, FGF4,
FGF5, FGF6, FGF7, FGF8, FGF9, FRZB, GDNF, GFER, GKN1, HBEGF, ИФР1,

ИФР2, INHA, INHBA, INHBB, INHBC, INHBE, KITLG, MANF, MDK, MIA, NGF, NOV, NRG1, NRG2, NRG3, NRG4, NRTN, NTF3, NTF4, OGN, PDGFA, PDGFB, PDGFC, PDGFD, PGF, PROK1, PSPN, PTN, SDF1, SDF2, SFRP1, SFRP2, SFRP3, SFRP4, SFRP5, TDGF1, TFF1, TGFA, TGFB1, TGFB2, TGFB3, THBS4, TIMP1, VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD и WISP3.

38. мРНК по п. 33 или 34, отличающаяся тем, что указанный белок представляет собой ИФР1.

39. мРНК по любому из пп. 33 - 38, отличающаяся тем, что сигнальный пептид нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 31.

40. мРНК по любому из пп. 33 - 39, отличающаяся тем, что нуклеотидная последовательность, кодирующая белок, и нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнальный пептид нейротрофического фактора головного мозга (BDNF), гетерологичный указанному белку, функционально связаны.

41. мРНК по любому из пп. 33 - 40, отличающаяся тем, что мРНК содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую в следующем порядке от 5'-конца к 3'-концу:

- i) сигнальный пептид нейротрофического фактора головного мозга (BDNF);
- ii) необязательно, про-домен белка; и
- iii) зрелый белок;

причем нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнальный пептид нейротрофического фактора головного мозга (BDNF), необязательная нуклеотидная последовательность, кодирующая про-домен белка, и нуклеотидная последовательность, кодирующая зрелый белок, функционально связаны.

42. мРНК по любому из пп. 33 - 41, отличающаяся тем, что указанная мРНК содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую пропептид ИФР1, нуклеотидную последовательность, кодирующую зрелый ИФР1, и нуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальный пептид нейротрофического

фактора головного мозга (BDNF), и не содержит нуклеотидной последовательности, кодирующей Е-пептид ИФР1.

43. мРНК по любому из пп. 33 - 42, отличающаяся тем, что сигнальный пептид нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) замещает природный сигнальный пептид белка.
44. Единица транскрипции, экспрессирующий вектор или вектор для генной терапии, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую белок и сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, представляет собой сигнальный пептид нейротрофического фактора головного мозга (BDNF), а указанный белок не является оксидоредуктазой.
45. Единица транскрипции, экспрессирующий вектор или вектор для генной терапии, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую белок и сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, причем указанный сигнальный пептид, гетерологичный указанному белку, представляет собой сигнальный пептид нейротрофического фактора головного мозга (BDNF), а указанный белок выбран из группы, состоящей из карбоксипептидаз; цитокинов; внеклеточных лигандов и переносчиков; белков внеклеточного матрикса; глюкозидаз; гликозилтрансфераз; факторов роста; белков, связывающих факторы роста; белков, связывающих гепарин; гормонов; гидролаз; иммуноглобулинов; изомераз; киназ; лиаз; ингибиторов металлоферментов; металлопротеаз; белков молока; нейроактивных белков; протеаз; ингибиторов протеаз; протеинфосфатаз; эстераз; трансфераз; и вазоактивных белков.
46. Терапевтическая композиция, содержащая мРНК по любому из пп. 33 - 43 и/или единицу транскрипции, экспрессирующий вектор или вектор для генной терапии по п. 44 или 45.
47. Набор, содержащий мРНК по любому из пп. 33 - 43 или единицу транскрипции, экспрессирующий вектор или вектор для генной терапии по п. 44 или 45 и/или терапевтическую композицию по п. 46, а также инструкции, необязательно карту

вектора, необязательно клетку-хозяина, необязательно культуральную среду для культивирования клетки-хозяина и/или, необязательно, селективную среду для селекции и культивирования трансфицированной клетки-хозяина.

- 5 48. мРНК по любому из пп. 1 - 28 или 33 - 43, единица транскрипции, экспрессирующий вектор или вектор для генной терапии по п. 30 или 44-45, терапевтическая композиция по п. 31 или 46 или набор по п. 32 или 47 для применения в качестве лекарственного средства.
- 10 49. мРНК по любому из пп. 1-29 или по п. 38 или 42 для применения в способе лечения повреждения скелетных мышц.
50. мРНК для применения в способе лечения повреждения скелетных мышц.
- 15 51. Терапевтическая композиция, содержащая мРНК, для применения в способе лечения повреждения скелетных мышц.
- 20 52. мРНК или композиция для применения по п. 50 или 51, отличающиеся тем, что мРНК представляет собой мРНК, кодирующую инсулиноподобный фактор роста 1 (ИФР1) человека.
- 25 53. мРНК или композиция для применения по п. 52, отличающиеся тем, что мРНК, кодирующая ИФР1 человека, содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальный пептид, необязательно нуклеотидную последовательность, кодирующую пропептид ИФР1 человека, и нуклеотидную последовательность, кодирующую зрелый ИФР1 человека.
- 30 54. мРНК или композиция для применения по п. 53, отличающиеся тем, что нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнальный пептид, кодирует сигнальный пептид нейротрофического фактора головного мозга (BDNF).

Фигура 1

- A) ATGGGCAAGATTAGCAGCCTGCCTACACAGCTGTTCAAGTGCTGCTTCTGCGACTTC
CTGAAAGTGAAGATGCACACCATGAGCAGCAGCCACCTGTTCTATCTGGCCCTGT
GCCTGCTGACCTTTACCAGCTCTGCTACCGCCGGACCTGAGACACTTTGTGGCG
CTGAACTGGTGGACGCCCTGCAGTTTGTGTGTGGCGACAGAGGCTTCTACTT
CAACAAGCCCACAGGCTACGGCAGCAGCTCTAGAAGGGCTCCTCAGACCGGAA
TCGTGGACGAGTGCTGTTTTCAGAAGCTGCGACCTGCGGCGGCTGGAAATGTA
TTGTGCCCCCTCTGAAGCCTGCCAAGAGCGCCTAA
- B) AUGGGCAAGAUUAGCAGCCUGCCUACACAGCUGUUCAAGUGCUGCUUCUGCGAC
UCCUGAAAGUGAAGAUGCACACCAUGAGCAGCAGCCACCUGUUCUAUCUGGCC
CUGUGCCUGCUGACCUUUACCAGCUCUGCUACCGCCGGACCUGAGACACUUUGU
GGCGCUGAACUGGUGGACGCCCUGCAGUUUGUGUGUGGGCGACAGAGGCUUCUAC
UUCAACAAGCCCACAGGCUACGGCAGCAGCUCUAGAAGGGCUCCUCAGACCGGA
AUCGUGGACGAGUGCUGUUUCAGAAGCUGCGACCUGCGGCGGCUGGAAAUGUA
UUGUGCCCCUCUGAAGCCUGCCAAGAGCGCCUAA

Фигура 2

- A) *ATGGGAATACCTATGGGCAAGAGCATGCTGGTGCTGCTGACCTTCCTGGCCTTCGCC
TCTTGTGTATCGCCGTGAAGATGCACACCATGAGCAGCAGCCACCTGTTCTATCT
GGCCCTGTGCCTGCTGACATTCACCAGCTCTGCTACCGCCGGACCTGAGACACTT
TGTGGCGCTGAACTGGTGGACGCCCTGCAGTTTGTGTGTGGCGACAGAGGCT
TCTACTTCAACAAGCCACAGGCTACGGCAGCAGCTCTAGAAGGGCTCCTCAG
ACCGGAATCGTGGACGAGTGCTGCTTCAGAAAGCTGCGACCTGCGGCGGCTGG
AAATGTATTGTGCCCCCTCTGAAGCCTGCCAAGAGCGCCTAA*
- B) *AUGGGAUACCUAUGGGCAAGAGCAUGCUGGUGCUGCUGACCUUCCUGGCCUUC
GCCUCUUGUUGUAUCGCCGUGAAGAUGCACACCAUGAGCAGCAGCCACCUGUUC
UAUCUGGCCCUGUGCCUGCUGACAUUCACCAGCUCUGCUACCGCCGGACCUGAG
ACACUUUGUGGCGCUGAACUGGUGGACGCCUGCAGUUUGUGUGUGGCGACAG
AGGCUUCUACUUAACAAGCCACAGGCUACGGCAGCAGCUCUAGAAGGGCUCC
UCAGACCGGAUUCGUGGACGAGUGCUGCUUCAGAAGCUGCGACCUGCGGCGGCU
GGAAAUGUAUUGUGCCCCUCUGAAGCCUGCCAAGAGCGCCUAA*

Фигура 3

A) ATGAAATGGGTACACCTTTATCAGCCTGCTGTTCTGTTTCAGCAGCGCCTACAGCGTG
AAGATGCACACCATGAGCAGCAGCCACCTGTTCTATCTGGCCCTGTGCCTGCTGA
CCTTCACAAGCTCTGCTACCGCCGGACCTGAGACACTGTGTGGTGCTGA
ACTGTGGACGCCCTGCAGTTCGTGTGTGGCGATAGAGGCTTCTACTTCAACAAGC
CCACCGGCTACGGCAGCAGCTCTAGAAGGGCTCCTCAGACCGGAATCGTGGAC
GAGTGCTGCTTCAGAAGCTGCGACCTGCGGCGGCTGGAAATGTATTGTGCCC
CTCTGAAGCCTGCCAAGAGCGCCTAA

B) AUGAAAUGGGUCACCUUUUAUCAGCCUGCUGUUCCUGUUCAGCAGCGCCUACAGC
GUGAAGAUGCACACCAUGAGCAGCAGCCACCUGUUCUAUCUGGCCCUUGUGCCUG
CUGACCUUCACAAGCUCUGCUACCGCCGGACCUGAGACACUGUGUGGUGCUGAA
CUGGUGGACGCCCUGCAGUUCGUGUGUGGGCAUAGAGGCUUCUACUUCAACAAG
CCCACCGGCUACGGCAGCAGCUCUAGAAGGGCUCCUCAGACCGGAAUCGUGGAC
GAGUGCUGCUUCAGAAGCUGCGACCUGCGGCGGCUGGAAAUGUAUUGUGCCCU
CUGAAGCCUGCCAAGAGCGCCUAA

Фигура 4

- A) ATGACCATCCTGTTTCTGACAATGGTCATCAGCTACTTCGGCTGCATGAAGGCCGTG
AAGATGCACACCATGAGCAGCAGCCACCTGTTCTATCTGGCCCTGTGCCTGCTGA
CCTTTACCAGCTCTGCTACCGCCGGACCTGAGACACTTTGTGGCGCTGAACTGG
TGGACGCCCTGCAGTTTGTGTGTGGCGACAGAGGCTTCTACTTCAACAAGCC
CACAGGCTACGGCAGCAGCTCTAGAAGGGCTCCTCAGACCGGAATCGTGGAC
GAGTGCTGCTTCAGAAGCTGCGACCTGCGGCGGCTGGAAATGTATTGTGCCC
CTCTGAAGCCTGCCAAGAGCGCCTAA
- B) AUGACCAUCCUGUUUCUGACAAUGGUCAUCAGCUACUUCGGCUGCAUGAAGGCC
GUGAAGAUGCACACCAUGAGCAGCAGCCACCUGUUCUAUCUGGCCCUUGUGCCUG
CUGACCUUUACCAGCUCUGCUACCGCCGGACCUGAGACACUUUGUGGCGCUGAA
CUGGUGGACGCCUGCAGUUUGUGUGUGGCGACAGAGGCUUCUACUUCAACAAG
CCCACAGGCUACGGCAGCAGCUCUAGAAGGGCUCCUCAGACCGGAAUCGUGGAC
GAGUGCUGCUUCAGAAGCUGCGACCUGCGGCGGCUGGAAAUGUAUUGUGCCCU
CUGAAGCCUGCCAAGAGCGCCUAA

Фигура 5

A) ATGAATGCCAAAGTGGTGGTGGTGCTGGTCCTGGTGCTGACAGCTCTGTGTCTGTCC
GACGGCGTGAAGATGCACACCATGAGCAGCAGCCACCTGTTCTATCTGGCCCTGT
GCCTGCTGACCTTTACCAGCTCTGCTACCGCCGGACCTGAGACACTTTGTGGCG
CTGA^{ACTGGTGGACGCCCTGCAGTTTGTGTGTGGCGACAGAGGCTTCTACTT}
CAACAAGCCCACAGGCTACGGCAGCAGCTCTAGAAGGGCTCCTCAGACCGGAA
TCGTGGACGAGTGCTGCTTCAGAAGCTGCGACCTGCGGCGGCTGGAAATGTA
TTGTGCCCTCTGAAGCCTGCCAAGAGCGCCTAA

B) AUGAAUGCCAAAGUGGUGGUGGUGCUGGUCCUGGUGCUGACAGCUCUGUGUCU
GUCCGACGGCGUGAAGAUGCACACCAUGAGCAGCAGCCACCUGUUUCUAUCUGGC
CCUGUGCCUGCUGACCUUUACCAGCUCUGCUACCGCCGGACCUGAGACACUUUG
UGGCGCUGAACUGGUGGACGCCCUGCAGUUUGUGUGUGGGGACAGAGGCUUCU
ACUUCAACAAGCCCACAGGCUACGGCAGCAGCUCUAGAAGGGCUCCUCAGACCG
GAAUCGUGGACGAGUGCUGCUUCAGAAGCUGCGACCUGCGGGCGGCUGGAAAUGU
AUUGUGCCCCUCUGAAGCCUGCCAAGAGCGCCUAA

Фигура 6

- A) *ATGGGCTGGTCCTGCATCATCCTGTTTCTGGTGGCCACAGCCACAGGCGTGCACAGC*
GTGAAGATGCACACAATGAGCAGCAGCCACCTGTTCTATCTGGCCCTGTGCCTGC
TGACCTTTACCAGCTCTGCTACCGCCGGACCTGAGACACTTTGTGGCGCTGAAC
TGGTGGACGCCCTGCAGTTTGTGTGTGGCGACAGAGGCTTCTACTTCAACAA
GCCCACAGGCTACGGCAGCAGCTCTAGAAGGGCTCCTCAGACCGGAATCGTG
GACGAGTGCTGCTTCAGAAGCTGCGACCTGCGGCGGCTGAAAATGTATTGTG
CCCCTCTGAAGCCTGCCAAGAGCGCCTAA
- B) *AUGGGCUGGUCCUGCAUCAUCCUGUUUCUGGUGGCCACAGCCACAGGCGUGCAC*
AGCGUGAAGAUGCACACAAUGAGCAGCAGCCACCUGUUCUAUCUGGCCCUUGUC
CUGCUGACCUUUACCAGCUCUGCUACCGCCGGACCUGAGACACUUUGUGGCGCU
GAACUGGUGGACGCCCUGCAGUUUGUGUGUGGGGACAGAGGCUUCUACUUCAAC
AAGCCCACAGGCUACGGCAGCAGCUCUAGAAGGGCUCCUCAGACCGGAAUCGUG
GACGAGUGCUGCUUCAGAAGCUGCGACCUGCGGCGGCUGGAAAUGUAUUGUGCC
CCUCUGAAGCCUGCCAAGAGCGCCUAA

Фигура 7

- A) *ATGGACTGGACTTGGAGAATCCTGTTCTGGTGGCCGCTGCCACAGGCGCCATTCT*
GTGAAGATGCACACCATGAGCAGCAGCCACCTGTTCTATCTGGCCCTGTGCCTGC
TGACCTTTACCAGCTCTGCTACCGCCGGACCTGAGACACTTTGTGGCGCTGAAC
TGGTGGACGCCCTGCAGTTTGTGTGTGGCGACAGAGGCTTCTACTTCAACAA
GCCACAGGCTACGGCAGCAGCTCTAGAAGGGCTCCTCAGACCGGAATCGTG
GACGAGTGCTGCTTCAGAAGCTGCGACCTGCGGCGGCTGAAAATGTATTGTG
CCCCTCTGAAGCCTGCCAAGAGCGCCTAA
- B) AUGGACUGGACUUGGAGAAUCCUGUUCCUGGUGGCCGUGCCACAGGCGCCCAU
UCUGUGAAGAUGCACACCAUGAGCAGCAGCCACCUGUUCUAUCUGGCCUGUGC
CUGCUGACCUUUACCAGCUCUGCUACCGCCGGACCUGAGACACUUUGUGGCGCU
GAACUGGUGGACGCCCUGCAGUUUGUGUGUGGGGACAGAGGCUUCUACUUCAAC
AAGCCCACAGGCUACGGCAGCAGCUCUAGAAGGGCUCCUCAGACCGGAAUCGUG
GACGAGUGCUGCUUCAGAAGCUGCGACCUGCGGCGGUGGAAAUGUAUUGUGCC
CCUCUGAAGCCUGCCAAGAGCGCCUAA

Фигура 8

GACTCTTCGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAA
 TTACGGGGTCATTAGTTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTG
 GCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATTTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGA
 CTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATA
 TGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCT
 TATGGGACTTTCCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGC
 AGTACATCAATGGGCGTGATAGCGGTTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAATG
 GGAGTTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAA
 TGGGCGGTAGGCGTGATCGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCACTGCTT
 ACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAACTTAAGCTTGG
 TACCGAGCTCGGATCCGCCACCATGGGCAAGATTAGCAGCCTGCCTACACAGCTGTTCAAGTGTGCTTC
TGCGACTTCTGAAAGTGAAGATGCACACCATGAGCAGCAGCCACCTGTTCTATCTGGCCCTGTGCTG
CTGACTTTACCAGCTCTGCTACCGCCGGACCTGAGACACTTTGTGGCGCTGAACTGGTGGGACGCCCTG
CAGTTTTGTGTGTGGCGACAGAGGCTTCTACTTCAACAAGCCACAGGCTACGGCAGCAGCTCTAGAAG
GGCTCCTCAGACCGGAATCGTGGACGAGTGCTGTTTTCAGAAGCTGCGACCTGCGGCGGCTGGAAATGT
ATTGTGCCCTCTGAAGCCTGCCAAGAGCGCCTAAGAATTCTGCAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCGCCGCTCGAGTCTAGAGGGCCCGTTTAAACCCGCTGATCA
 GCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCTCCCCCGTGCTTCTTGAACCTGGAAG
 GTGCCACTCCCACTGTCTTTTCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCTATTCTA
 TTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGAT
 GCGGTGGGCTCTATGGCTTCTACTGGGCGGTTTTATGGACAGCAAGCGAACCAGGAAATGCCAGCTGGGGCGC
 CCTCTGGTAAGGTTGGGAAGCCCTGCAAAGTAAACTGGATGGCTTCTCGCCGCCAAGGATCTGATGGCGCA
 GGGGATCAAGCTCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCA
 GGTTCTCCGCGCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCCGGCTGCTCTGAT
 GCGCGCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGA
 ATGAACTGCAAGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCCTTGCGCAGCTGTGCTCG
 ACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCATCTC
 ACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTA
 CCTGCCCATTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTAATCGGATGGAAGCCGGTCTTGTGCG
 ATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACGTGTTCCGCAAGGCTCAAGGCGAGCA
 TGCCCGACGGCGAGGATCTCGTCTGACCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAGATGGCC
 GCTTTTCTGGATTATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCC
 GTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCG
 ATTGCGCAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAATTATTAACGCTTACAATTTCTGA
 TGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCATACAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGT
 GCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCTG
 ATAAATGCTTCAATAATAGCACGTGCTAAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTT
 TTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCTGTTCCACTGAGCGTCAGACCCGTAGAAAAGA
 TCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACACCGCTAC
 CAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGC
 AGATACCAAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTA
 CATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCTGTGCTTACCAGGTTGG
 ACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGGTTCTGTGCACACAGCCAGCT
 TGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAG
 GGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGG
 GGAAACGCCCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGC
 TCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCTTTTTACGGTTTCTGGGCTTTTGCTGG
 CTTTTGCTCACATGTTCTT

Фигура 9

СТАААТТГТААГCGTTAATATTTTGTТААААТTCGCGTTAAATTTTGTТАААТCAGCTCATTTT
 ТТААССААТАGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTG
 AGTGGCCGCTACAGGGCGCTCCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGTTTCGG
 TGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAAGTTGG
 GTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAAACGACGGCCAGTGAGCGCGACGTAATACG
 ACTCACTATAGGGCGAATTGGCGGAAGGCCGTCAAGGCCACGTGTCTTGTCCAGAGCTCGGATCC
 GCCACCATGGGAATACCTATGGGCAAGAGCATGCTGGTGCTGCTGACCTTCCTGGCCTTCGCC
TCTTGTGTATCGCCGTGAAGATGCACACCATGAGCAGCAGCCACCTGTTCTATCTGGCCCT
GTGCCTGCTGACATTCACCAGCTCTGCTACCGCCGGACCTGAGACACTTTGTGGCGCTGAAC
GGTGGACGCCCTGCAGTTTGTGTGTGGCGACAGAGGCTTCTACTTCAACAAGCCCACAGGCT
ACGGCAGCAGCTCTAGAAGGGCTCCTCAGACCGGAATCGTGGACGAGTGCTGCTTCAGAAGC
TGCGACCTGCGGCGGTGGAAATGTATTGTGCCCTCTGAAGCCTGCCAAGAGCGCCTAAGA
 ATTCGGTACCTGGAGCACAAGACTGGCCTCATGGGCCTTCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTCGGG
 AAACCTGTGCTGCCAGCTGCATTAACATGGTCATAGCTGTTTCCTTGGCTATTGGGCGCTCTCCGC
 TTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTGCTTCGGGTAAAGCCTGGGGTGCTAATGAGCAAAA
 GGCCAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCC
 CCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAAACCCGACAGGACTATAAA
 GATACCAGGCGTTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCG
 GATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATC
 TCAGTTTCGGTGATAGGTGCTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACC
 GCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGG
 CAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAG
 TGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGT
 TACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTT
 TTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTT
 TCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATC
 AAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTAAATCAATCTAAAGTATA
 TATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTG
 TCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCT
 TACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGAACCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAG
 CAATAAACCCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCC
 AGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTTCGCCAGTTAATAGTTTTCGCAACGTT
 GTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGT
 TCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGG
 TCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGC
 ATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAG
 TCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATAC
 CGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTTGAAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCT
 CAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTTCGATGTAACCCACTCGTGCAACCACTGATCTTCAG
 CATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAG
 GGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTCAATATTATTGAAGCAT
 TTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATA
 GGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCAC

Фигура 10

СТАААТТГТАAGCGTTAATATTTTGTТААААТTCGCGTTAAATTTTGTТАААТCAGCTCATTTT
 ТТААССААТАGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAAATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTG
 AGTGGCCGCTACAGGGCGCTCCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGTTTCGG
 TGGGGGCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCCGATTAAGTTGG
 GTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAGCGCGACGTAATACG
 ACTCACTATAGGGCGAATTGGCGGAAGGCCGTCAAGGCCACGTGTCTTGTCCAGAGCTCGGATCC
 GCCACC**ATGAAATGGGTCACCTTTATCAGCCTGCTGTTCTGTTTCAGCAGCGCCTACAGCGTG**
AAGATGCACACCATGAGCAGCAGCCACCTGTTCTATCTGGCCCTGTGCCTGCTGACCTTCACA
AGCTCTGCTACCGCCGGACCTGAGACACTGTGTGGTGTGAACTGGTGGACGCCCTGCAGTT
CGTGTGTGGCGATAGAGGCTTCTACTTCAACAAGCCCACCGGCTACGGCAGCAGCTCTAGAA
GGGCTCCTCAGACCGGAATCGTGGACGAGTGCTGCTTCAGAAGCTGCGACCTGCGGCGGCTG
GAAATGTATTGTGCCCTCTGAAGCCTGCCAAGAGCGCCTAAGAATTCGGTACCTGGAGCACA
 AGACTGGCCTCATGGGCCTTCCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTGCTGCCAGCTG
 CATTAACATGGTCATAGCTGTTTCTTGGCTATTGGGCGCTCTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCG
 CTGCGCTCGGTGCTTCGGGTAAAGCCTGGGGTGCTAATGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGG
 AACCCTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAA
 AATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCC
 TGGAAGCTCCCTCGTGGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCT
 CCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCAGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGGTGTAGGTGCT
 TCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAA
 CTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACA
 GGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGC
 TACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGT
 TGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTTTGCAAGCAGC
 AGATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCT
 CAGTGGAACGAAAACCTACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTA
 GATCCTTTTAAATTA AAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCT
 GACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCTGTTTCATCCAT
 AGTTGCCTGACTCCCCGTGCTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGC
 TGCAATGATACCGCGAGAACCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCG
 GAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCC
 GGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTTCGCCAGTTAATAGTTTTCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGC
 ATCGTGGTGTACGCTCGTCTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGTTCCCAACGATCAAGGCGA
 GTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAG
 AAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCA
 TGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGT
 ATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAAC
 TTTAAAAGTGCTCATCATTTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCAAGGATCTTACCGCTGT
 TGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTACCA
 GCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACG
 GAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTC
 TCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCGCGCACATTT
 CCCCAGAAAGTGCCAC

Фигура 11

СТАААТТГТААГCGTTAATATTTTGTТААААТTCGCGTTAAATTTTGTТАААТCAGCTCATTTT
 ТТААССААТАGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTG
 AGTGGCCGCTACAGGGCGCTCCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGTTTCGG
 TGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAAGTTGG
 GTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAAACGACGGCCAGTGAGCGCGACGTAATACG
 ACTCACTATAGGGCGAATTGGCGGAAGGCCGTCAAGGCCACGTGTCTTGTCCAGAGCTCGGATCC
 GCCACCATGACCATCCTGTTTTCTGACAATGGTCATCAGCTACTTCGGCTGCATGAAGGCCGTG
AAGATGCACACCATGAGCAGCAGCCACCTGTTCTATCTGGCCCTGTGCCTGCTGACCTTTACC
AGCTCTGCTACCGCCGGACCTGAGACACTTTGTGGCGCTGAACTGGTGGACGCCCTGCAGTT
TGTGTGTGGCGACAGAGGCTTCTACTTCAACAAGCCCACAGGCTACGGCAGCAGCTCTAGAA
GGGCTCCTCAGACCGGAATCGTGGACGAGTGCTGCTTCAGAAGCTGCGACCTGCGGCGGCTG
GAAATGTATTGTGCCCCCTCTGAAGCCTGCCAAGAGCGCCTAAGAATTCGGTACCTGGAGCACA
 AGACTGGCCTCATGGGCCTTCCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTGCTGCCAGCTG
 CATTAACATGGTCATAGCTGTTTCCTTGCCTATTGGGCGCTCTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCG
 CTGCGCTCGGTCGTTCCGGTAAAGCCTGGGGTGCTAATGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGG
 AACCCTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAA
 AATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCC
 TGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCT
 CCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGGTGTAGGTCGT
 TCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTACGCCCAGCGCTGCGCCTTATCCGGTAA
 CTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACA
 GGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGC
 TACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGT
 TGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGC
 AGATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCT
 CAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTA
 GATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCT
 GACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCAT
 AGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTG
 TGCAATGATACCGCGAGAACCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCG
 GAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCC
 GGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTTCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGC
 ATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTACGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGA
 GTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTGAG
 AAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCA
 TGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGT
 ATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAAC
 TTTAAAAAGTGCTCATCATTTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGT
 TGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGACCCCACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCA
 GCGTTTCTGGGTGAGCAAAAAACAGGAAGGCCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACG
 GAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTC
 TCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCGCGCACATTT
 CCCCAGAAAAGTGCCAC

Фигура 12

CTAAATTGTAAGCGTTAATAATTTTTGTTAAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCATTTTT
TTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAAGATAGACCGAGATAGGGTTG
AGTGGCCGCTACAGGGCGCTCCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGTTTCGG
TGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAAGTTGG
GTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAACGACGCGCCAGTGAGCGCGACGTAATACG
ACTCACTATAGGGCGAATTGGCGGAAGGCCGTCAAGGCCACGTGTCTTGTCAGAGCTCGGATCC
GCCACC**ATGAATGCCAAAGTGGTGGTGGTGCTGGTCTGGTGCTGACAGCTCTGTGTCTGTC**
CGACGGCGTGAAAGATGCACACCATGAGCAGCAGCCACCTGTTCTATCTGGCCCTGTGCCTGCT
GACCTTTACCAGCTCTGCTACCGCCGGACCTGAGACACTTTGTGGCGCTGAACTGGTGGACGC
CCTGCAGTTTGTGTGTGGCGACAGAGGCTTCTACTTCAACAAGCCCACAGGCTACGGCAGCA
GCTCTAGAAGGGCTCCTCAGACCGGAATCGTGGACGAGTGCTGCTTCAGAAAGCTGCGACCTG
CGGCGGCTGGAAATGTATTGTGCCCCCTCTGAAGCCTGCCAAGAGCGCCTAAGAATTCGGTACC
TGGAGCAAGACTGGCCTCATGGGCCTTCCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTGC
TGCCAGCTGCATTAACATGGTCATAGCTGTTTCCTTGCGTATTGGGCGCTCTCCGCTTCTCGCTC
ACTGACTCGCTGCGCTCGGTCTGTTTCGGGTAAAGCCTGGGGTGCTAATGAGCAAAAGGCCAGCAA
AAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAG
CATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGC
GTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGTTACCGGATACCTGTCC
GCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTG
TAGGTCTGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTACAGCCGACCGCTGCGCCTTA
TCCGGTAAGTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACT
GGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCCTGAAGTGGTGGCCTAA
CTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAA
AAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGC
AAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTC
TGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCT
TCACCTAGATCCTTTTAAATTAATAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACT
TGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTT
ATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCC
CAGTGCTGCAATGATACCGCGAGAACCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGC
CAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATT
GTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTTCGCCAGTTAATAGTTTGGCAACGTTGTTGCCATTGCT
ACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTACGCTCCGGTTCCTAACGATCA
AGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGT
TGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTA
CTGTATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAA
TAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGGCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAG
CAGAACTTTAAAGTGCTCATCATTGGAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTAC
CGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGACCCCACTGATCTTCAGCATCTTTTACTT
TCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGC
GACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTT
ATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGC
ACATTTCCCCGAAAAGTGCCAC

Фигура 13

СТАААТТГТААГCGTTAATATTTTGTТААААТTCGCGTTAAATTTTGTТАААТCAGCTCATTTT
 ТТААССААТАGGCCGAAATCGGCAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTG
 AGTGGCCGCTACAGGGCGCTCCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGTTTCGG
 TGGGGGCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAAGTTGG
 GTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAACGACGGCCAGTGAGCGCGACGTAATACG
 АСТCACTATAGGGCGAATTGGCGGAAGGCCGTCAAGGCCGCATGGATCCGCCACC**ATGGGCTGGT**
CCTGCATCATCTGTTTCTGGTGGCCACAGCCACAGGCGTGACAGCGTGAAGATGCACACAA
TGAGCAGCAGCCACCTGTTCTATCTGGCCCTGTGCCTGCTGACCTTTACCAGCTCTGCTACCG
CCGGACCTGAGACACTTTGTGGCGCTGAACTGGTGGACGCCCTGCAGTTTGTGTGTGGCGAC
AGAGGCTTCTACTTCAACAAGCCCACAGGCTACGGCAGCAGCTCTAGAAGGGCTCCTCAGACC
GGAATCGTGGACGAGTGCTGCTTCAAGAGCTGCGACCTGCGGCGGCTGGAAATGTATTGTGC
CCCTCTGAAGCCTGCCAAGAGCGCCTAAGAATTCCTGGGCCTCATGGGCCTTCCGCTCACTGCCC
 GCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCTGTGCCAGCTGCATTAACATGGTTCATAGCTGTTTCCTTGCGTAT
 TGGGCGCTCTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTGCTTCGGGTAAAGCCTGGGGTG
 CCTAATGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTC
 CATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCC
 GACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGAC
 CCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTC
 ACGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGGTGTAGGTGCTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCC
 CGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGA
 CTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTA
 CAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCT
 CTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGC
 TGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAG
 ATCCTTTGATCTTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTG
 GTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATC
 AATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTA
 TCTCAGCGATCTGTCTATTTCTGTTTATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGA
 TACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGAACCACGCTCACCGGCTC
 CAGATTTATCAGCAATAAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTA
 TCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAG
 TTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTC
 ATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGG
 TTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTTATCACTCATGGTT
 ATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGA
 GTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCCGGCGTCAA
 TACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTTGGAAAACGTTCTTCG
 GGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTGATGTAACCCACTCGTGCAACC
 CAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAAACAGGAAGGCAAA
 ATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAA
 TATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAA
 AAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCAC

Фигура 14

СТАААТТГТААГCGTTAATATTTTGTТААААТTCGCGTTAAATTTTGTТАААТCAGCTCATTTT
 ТТААССААТАGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTG
 AGTGGCCGCTACAGGGCGCTCCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGTTTCGG
 TGGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAAGTTGG
 GTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAACGACGGCCAGTGAGCGCGACGTAATACG
 ACTCACTATAGGGCGAATTGGCGGAAGGCCGTCAAGGCCGCATGGATCCGCCACC**ATGGACTGGA**
CTTGAGAAATCCTGTTCTGTTGGCGCTGCCACAGGCGCCCATTTCTGTGAAGATGCACACCA
TGAGCAGCAGCCACCTGTTCTATCTGGCCCTGTGCCTGTGACCTTTACCAGCTCTGCTACCG
CCGGACCTGAGACACTTTGTGGCGCTGAACTGGTGGACGCCCTGCAGTTTGTGTGTGGCGAC
AGAGGCTTCTACTTCAACAAGCCACAGGCTACGGCAGCAGCTCTAGAAGGGCTCCTCAGACC
GGAATCGTGGACGAGTGTCTGTTTCAAGCTGCGACCTGCGGCGGCTGGAAATGTATTGTGC
CCCTCTGAAGCCTGCCAAGAGCGCCTAAGAATTCCTGGGCCTCATGGGCCTCCGCTCACTGCCC
 GCTTTCAGTCGGGAAACCTGTCTGTGCCAGCTGCATTAACATGGTCATAGCTGTTTTCCTTGCGTAT
 TGGGCGCTCTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCTGTTGGGTAAAGCCTGGGGTG
 CTAATGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTC
 CATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCC
 GACAGGACTATAAAGATAACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGAC
 CCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTC
 ACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCTGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCC
 CGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGA
 CTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTA
 CAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCT
 CTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACACCGC
 TGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAG
 ATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTG
 GTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATC
 AATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTA
 TCTCAGCGATCTGTCTATTTCTGTTTATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGA
 TACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGAACCACGCTCACCGGCTC
 CAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAAGTGGTCTGCAACTTTA
 TCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAG
 TTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTGGTATGGCTTC
 ATTCAGCTCCGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGG
 TTAGCTCCTTCGGTCCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTTATCACTCATGGTT
 ATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCTATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGA
 GTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAA
 TACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTTGGAAAACGTTCTTCG
 GGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTTCGATGTAACCCACTCGTGCAAC
 CAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAAACAGGAAGGCAAA
 ATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTCAA
 TATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAA
 AAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCAC

Фигура 15

Прямой праймер: 5' GCTGCAAGGCGATTAAGTTG 3'.

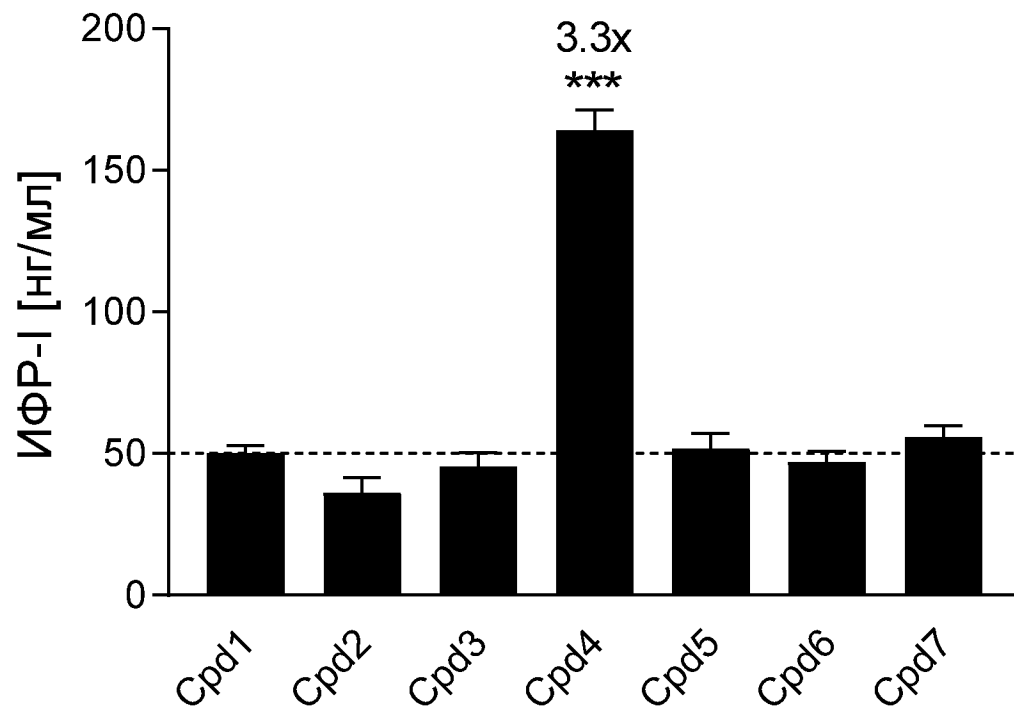
Обратный праймер: 5'U(2'OMe)U(2'OMe)U(2'OMe)TTTTTTTTTTTTTTTTT

[illegible]

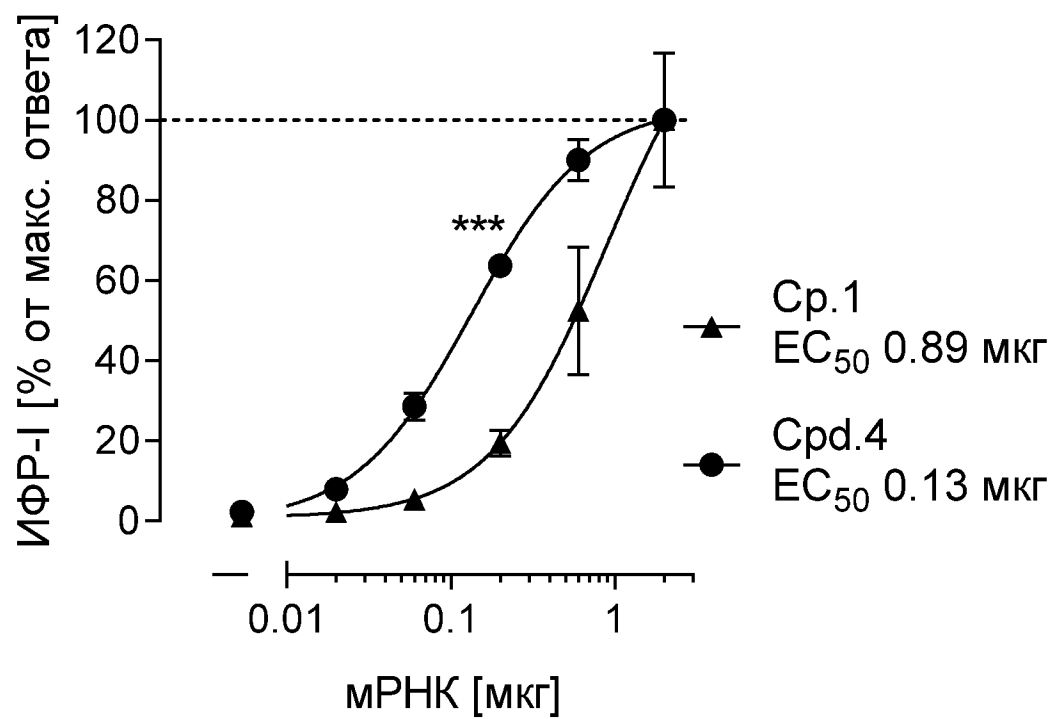
Фигура 16

Срд.	Название гена	UniProt	ДНК	Аминокислоты	Вектор
1	ИФР1	P05019	ATGGGCAAGATTAGCAGCC TGCCTACACAGCTGT TCAAGTGCTGCTTCTGCGA CTTCCTGAAA (SEQ ID NO: 24)	MGKISSLPTQLF KCCFCDFLK (SEQ ID NO: 25)	pVAX.A120
2	ИФР2	P01344	ATGGGAATACCTATGGGCA AGAGCATGCTGGTGCT GCTGACCTTCCTGGCCTTC GCCTCTTGTTGTATCGCC (SEQ ID NO: 26)	MGIPMGKSMLVL LTFLAFASCCIA (SEQ ID NO: 27)	pMA-T
3	ALB	P01344	ATGAAATGGGTCACCTTTA TCAGCCTGCTGTTCT GTTCAGCAGCGCTACAGC (SEQ ID NO: 28)	MKWVTFISLLFL FSSAYS (SEQ ID NO: 29)	pMA-T
4	BDNF	P23560	ATGACCATCCTGTTTCTGA CAATGGTCATCAGCTAC TTCGGCTGCATGAAGGCC (SEQ ID NO: 30)	MTILFLTMVISY FGCMKA (SEQ ID NO: 31)	pMA-T
5	CXCL12	P48061	ATGAATGCCAAAGTGGTGG TGGTGCTGGTCCTGGTG CTGACAGCTCTGTGTCTGT CCGACGGC (SEQ ID NO: 32)	MNAKVVVVLVLV LTALCLSDG (SEQ ID NO: 33)	pMA-T
6	Синтетический seq1		ATGGGCTGGTCCTGCATCA TCCTGTTTCTGGTGGCC ACAGCCACAGGCGTGCACA GC (SEQ ID NO: 34)	MGWSCILFLVA TATGVHS (SEQ ID NO: 35)	pMA-RQ
7	Синтетический seq2		ATGGACTGGACTTGGAGAA TCCTGTTCTGGTGGCC GCTGCCACAGGCGCCCAT CT (SEQ ID NO: 36)	MDWTWRILFLVA AATGAHS (SEQ ID NO: 37)	pMA-RQ

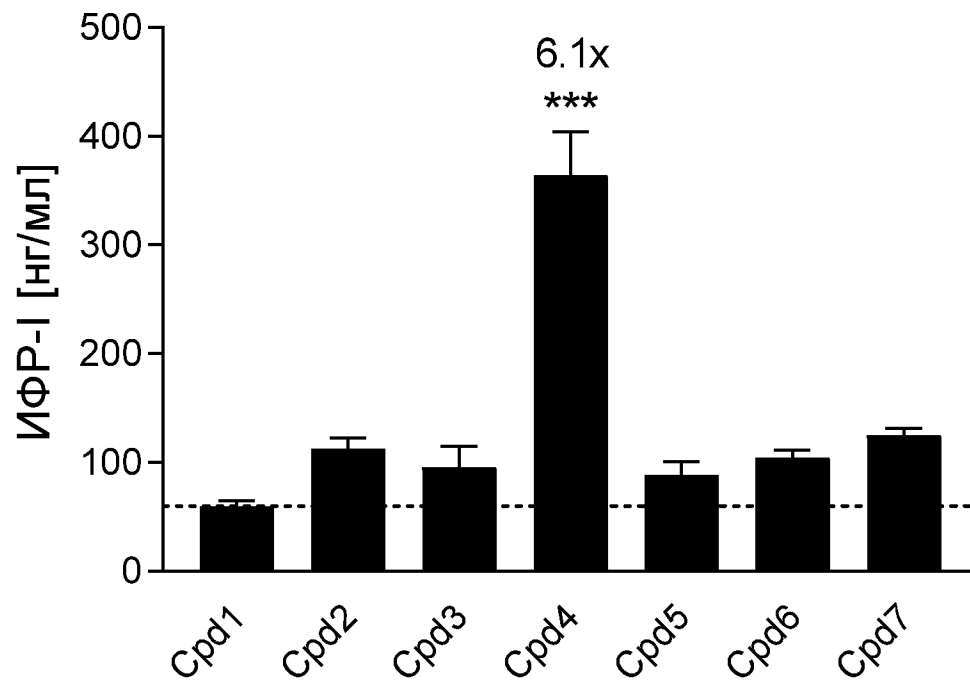
Фигура 17



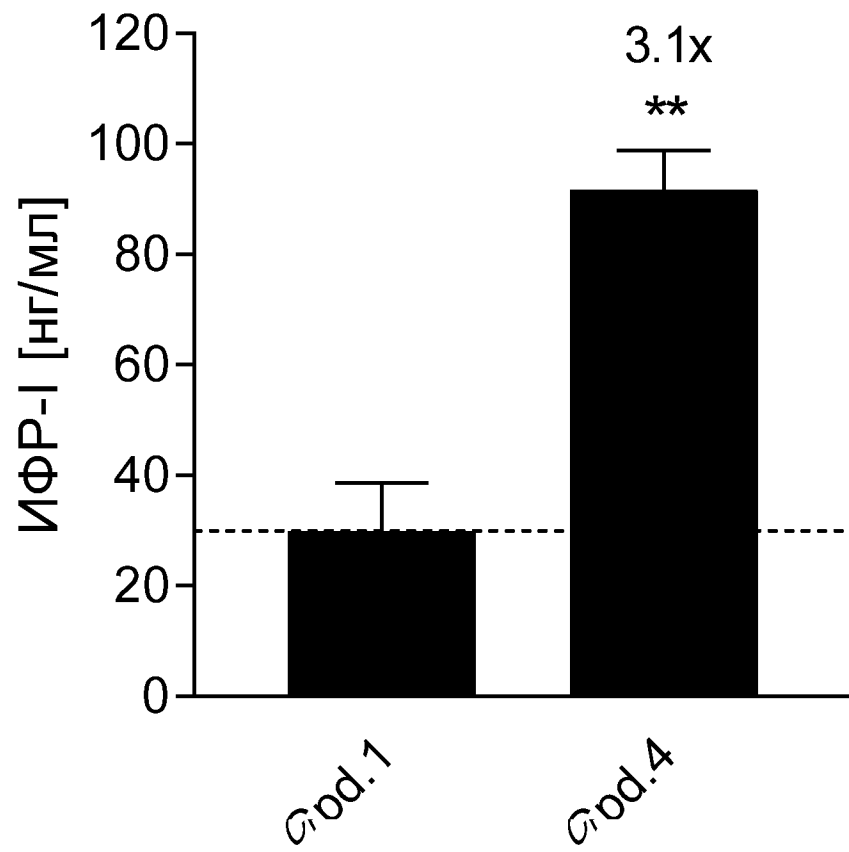
Фигура 18



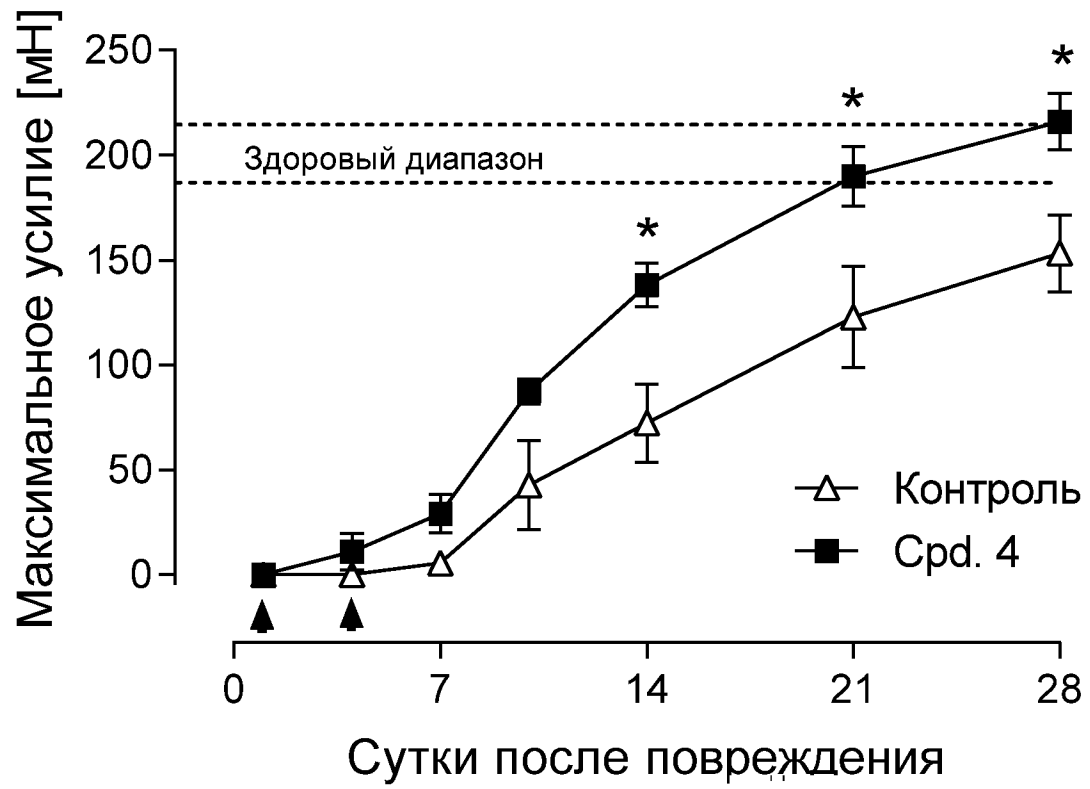
Фигура 19



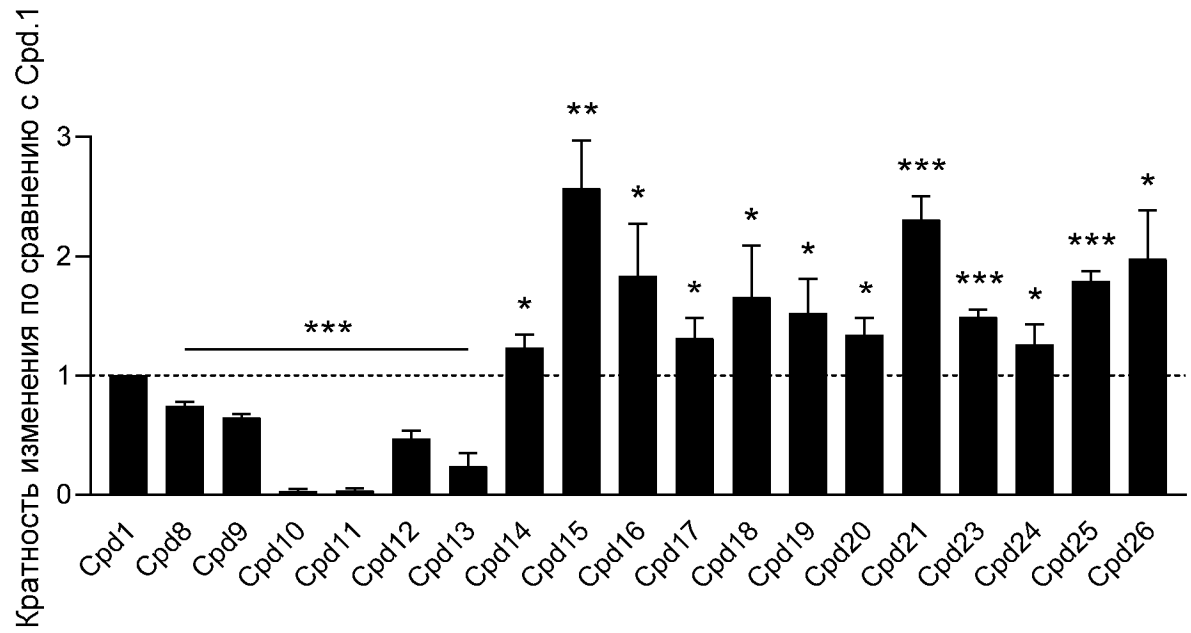
Фигура 20



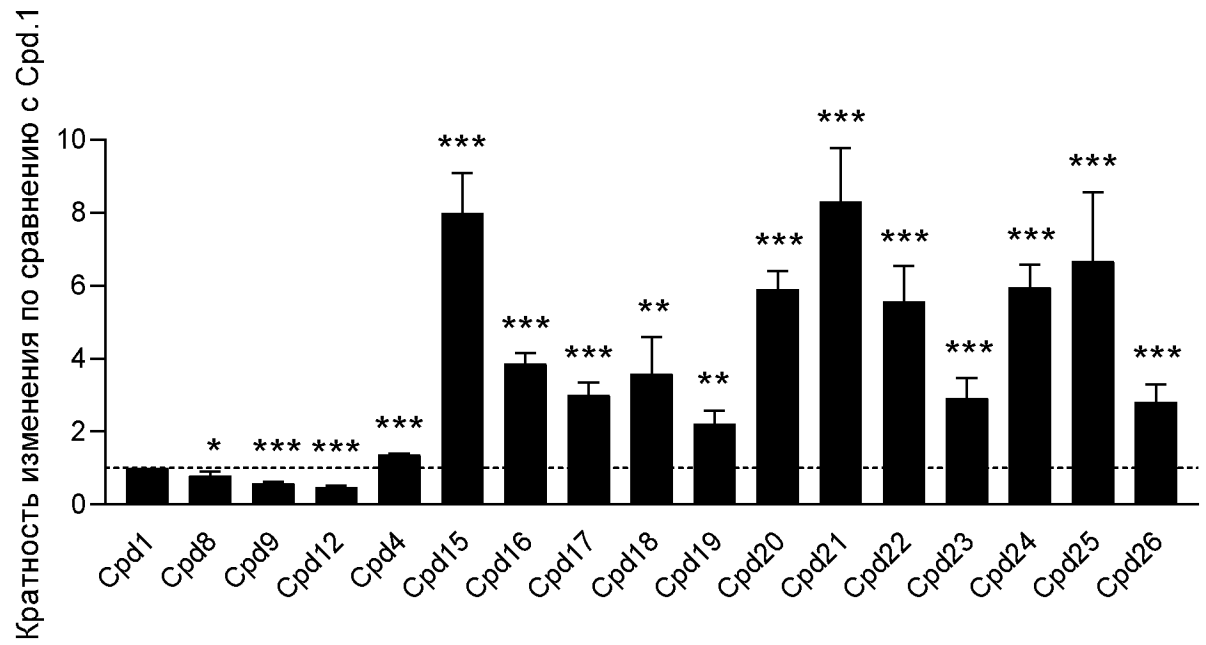
Фигура 21



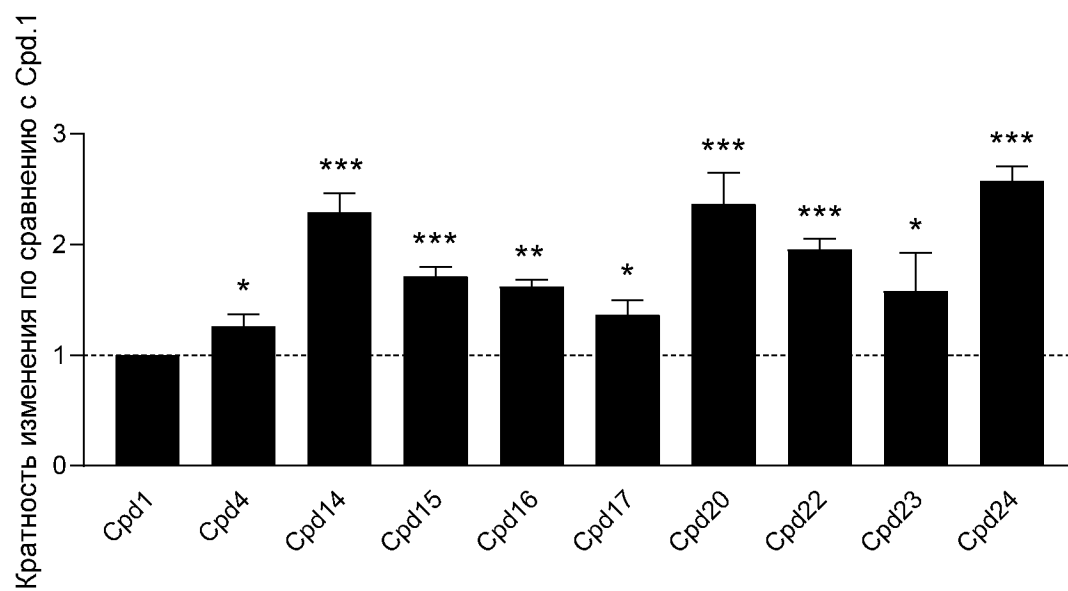
Фигура 22



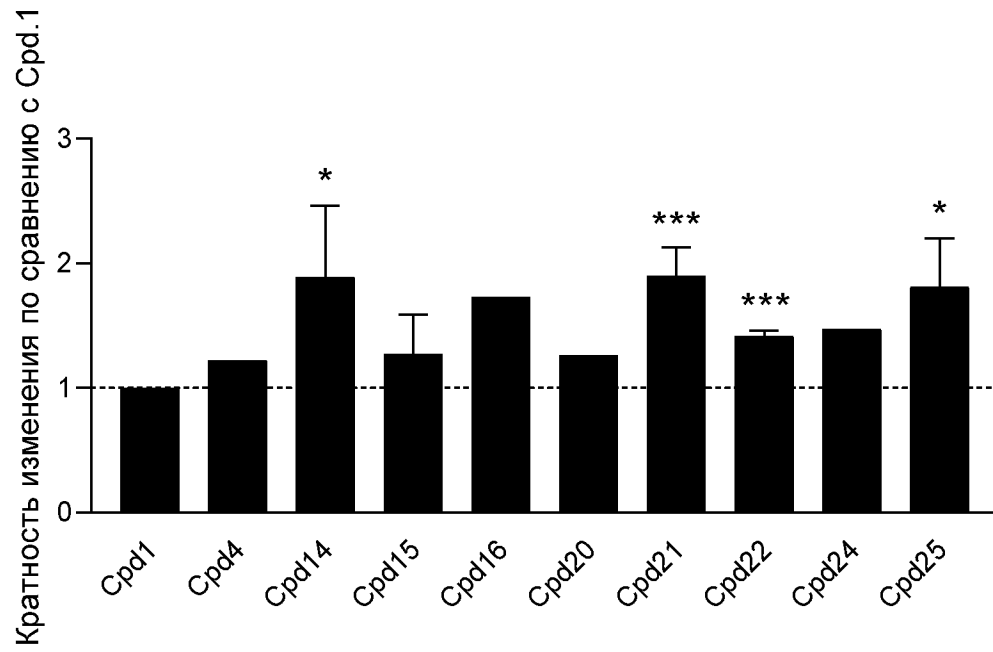
Фигура 23



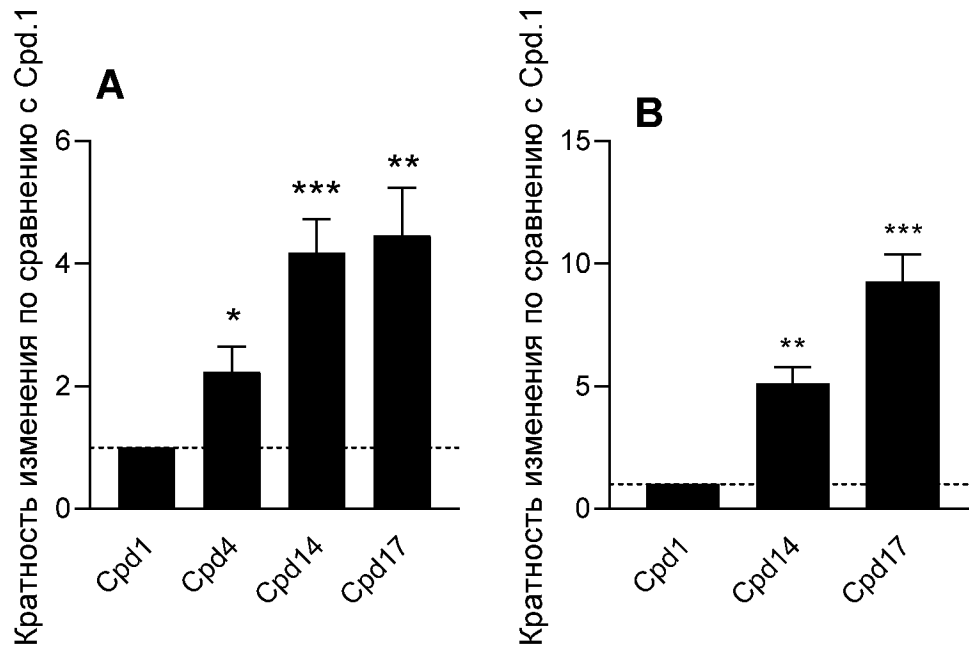
Фигура 24



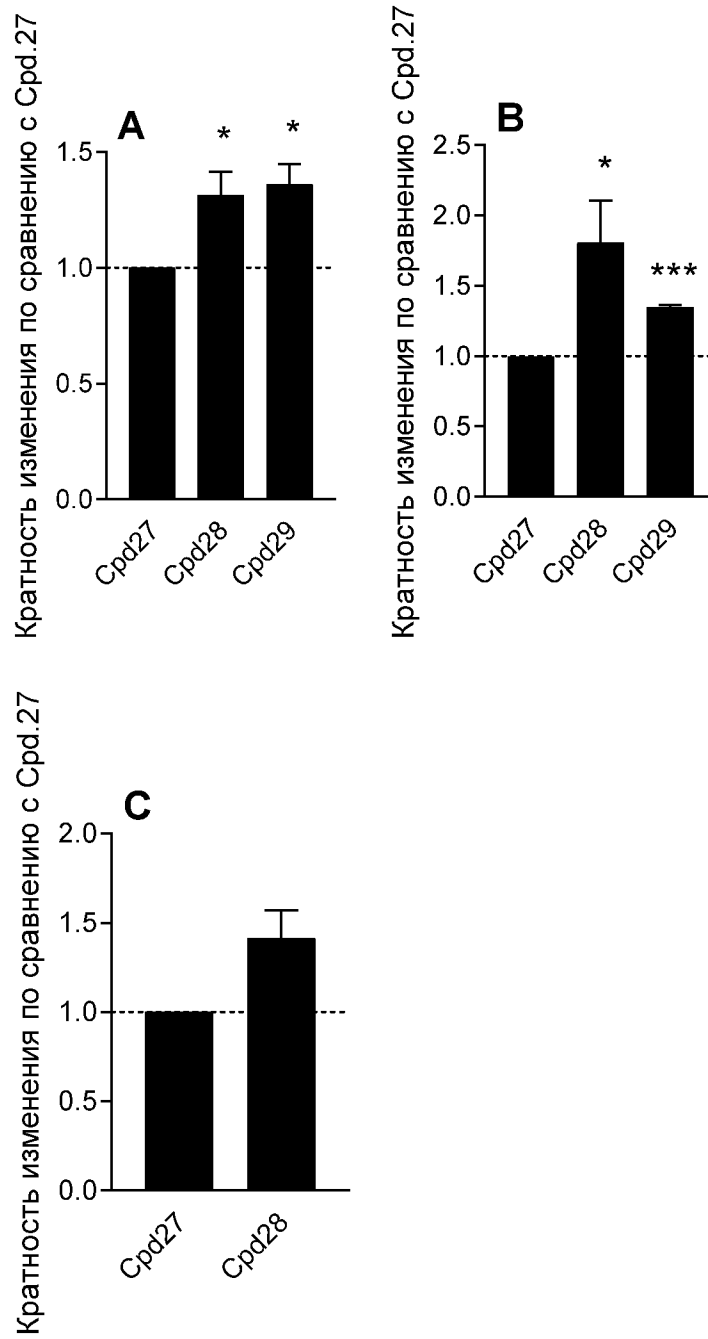
Фигура 25



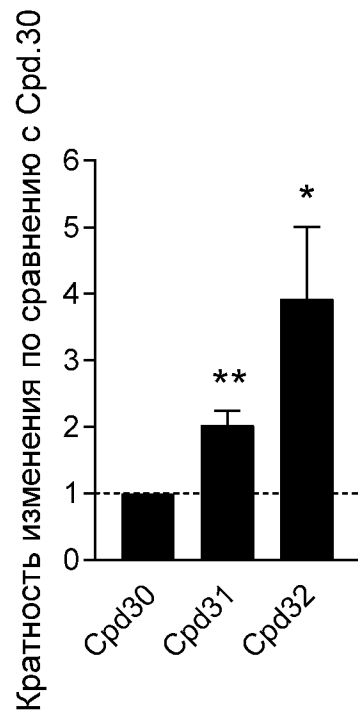
Фигура 26



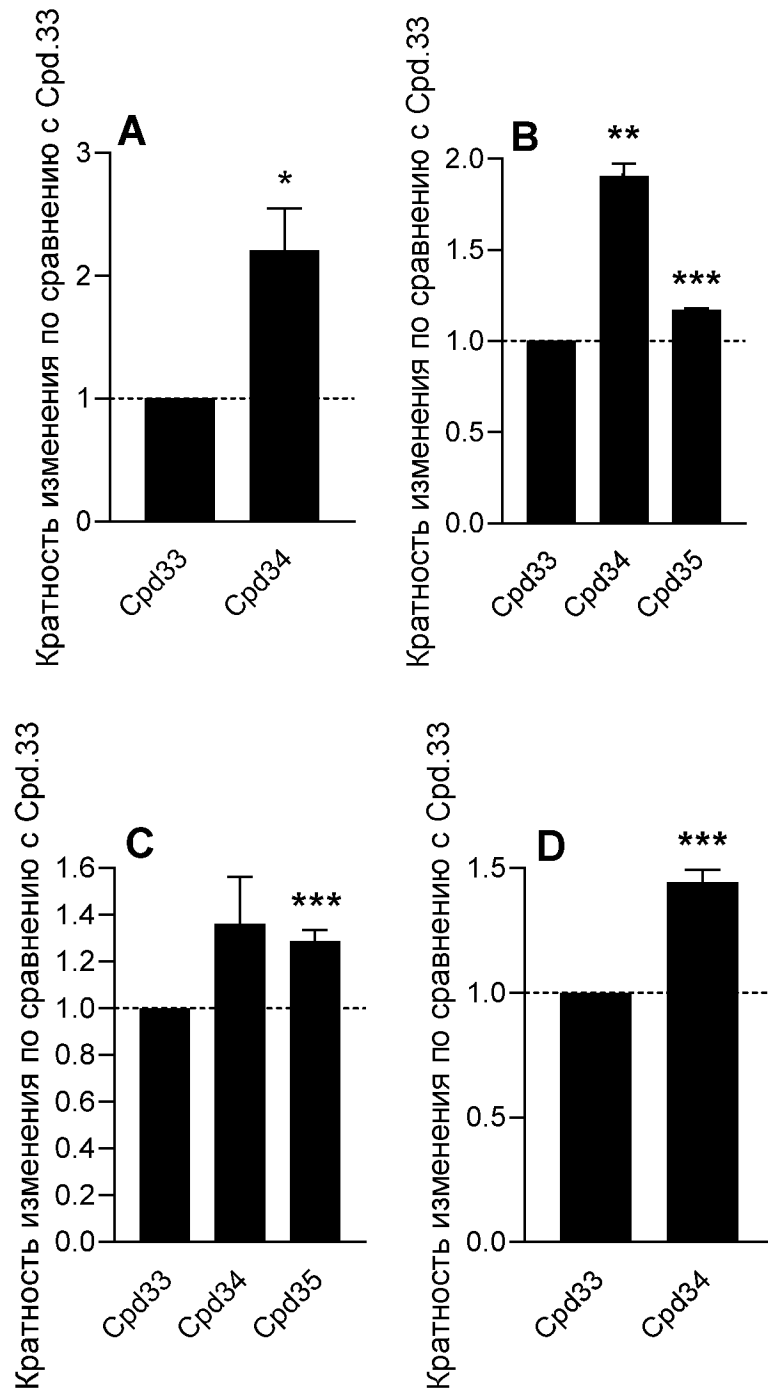
Фигура 27



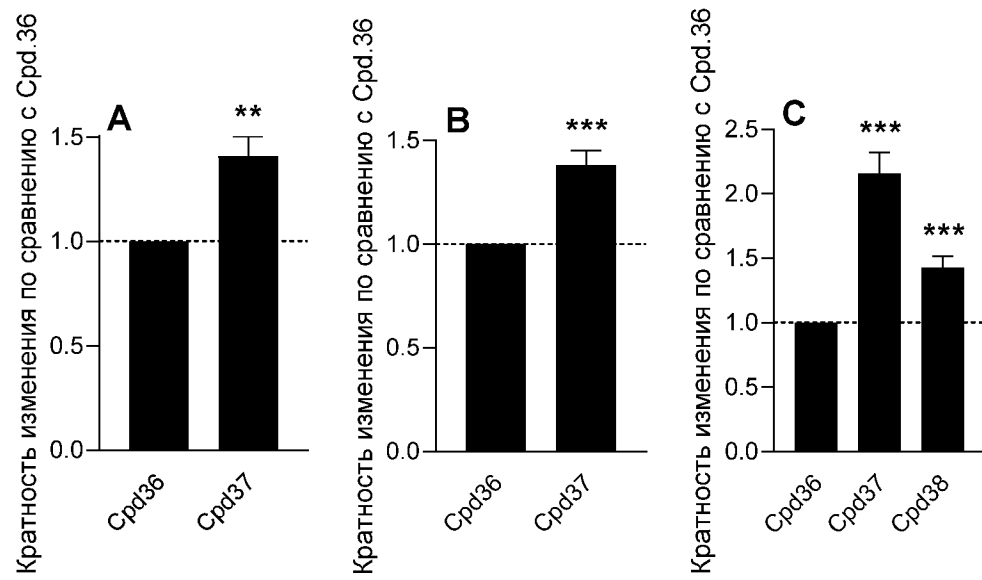
Фигура 28



Фигура 29



Фигура 30



Фигура 31

