

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201991338 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2019.12.30

(22) Дата подачи заявки
2017.12.07

(51) Int. Cl. *C07K 14/54* (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12P 21/04 (2006.01)

(54) κДНК IL-1RA

(31) 62/431,336; 62/486,944

(32) 2016.12.07; 2017.04.18

(33) US

(86) PCT/US2017/065173

(87) WO 2018/106956 2018.06.14

(88) 2018.07.12

(71) Заявитель:

ЮНИВЕРСИТИ ОФ ФЛОРИДА
РИСЕРЧ ФАУНДЕЙШЕН,
ИНКОРПОРЕЙТЕД (US)

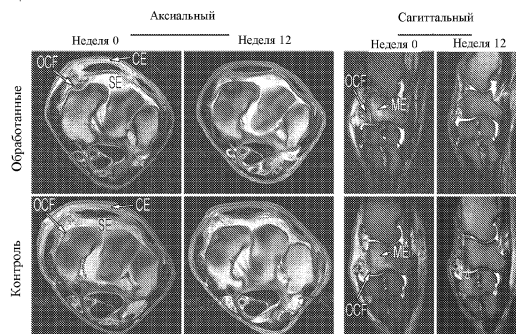
(72) Изобретатель:

Гивиццани Стивен С. (US)

(74) Представитель:

Гизатуллина Е.М., Строкова О.В.,
Лебедев В.В., Пармонова К.В.,
Угрюмов В.М., Костюшенкова М.Ю.,
Глухарёва А.О. (RU)

(57) Настоящее раскрытие относится к композициям и способам лечения дегенеративных патологических состояний крупных опорных суставов, таких как остеоартрит, с помощью внутрисуставной доставки кодон-модифицированного гена, кодирующего IL-1Ra.



A1

201991338

201991338

A1

ОПИСАНИЕ

5 **Связанные заявки**

Согласно настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с предварительной заявкой США № 62/431336, поданной 7 декабря 2016 г., и предварительной заявкой США № 62/486944, поданной 18 апреля 2017 г., полные раскрытия которых включены в данный документ посредством ссылки.

10

Государственная поддержка

Настоящее изобретение было сделано при государственной поддержке Национальных институтов здоровья в соответствии с AR048566. Государство обладает определенными правами на настоящее изобретение.

15

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

Остеоартрит (ОА) представляет собой дегенеративное тяжело протекающее патологическое состояние опорных суставов. Патология ОА отмечается постепенной трудноизлечимой эрозией суставного хряща, развитием остеофитов на границе суставов, склеротическим разрастанием субхондральной костной ткани, синовитом, а во многих случаях синовитом и суставным выпотом. ОА является неизлечимым, сложным для регулирования и часто прогрессирует до дисфункциональной недостаточности суставов. У лошадей остеоартрит представляет собой проблему не только для индивидуумов более старшего возраста, но также и для молодых лошадей.

25

Краткое раскрытие настоящего изобретения

Имеет место убедительное доказательство того, что интерлейкин-1 (IL-1) выступает в качестве внутрисуставного посредника потери, боли и воспаления суставной ткани при патологических состояниях крупных опорных суставов, таких как остеоартрит (ОА). Его природный ингибитор, антагонист рецептора IL-1 (IL-1Ra), является перспективным в качестве эффективного лечения, однако клиническое применение замедляется вследствие сложности достижения и поддержания эффективных концентраций IL-1Ra с помощью стандартных способов доставки лекарственных средств.

30

Настоящее раскрытие относится по меньшей мере отчасти к разработке кодон-модифицированных генов, кодирующих IL-1Ra лошади (eqIL-1Ra) и IL-1Ra человека

35

(hIL-1Ra), а также обнаружению того, что внутрисуставная доставка кодон-модифицированного гена, кодирующего eqIL-1Ra, приводит к значительному повышению уровней устойчивого состояния eqIL-1Ra в синовиальной жидкости, например, более чем в 100 раз по сравнению с фоновым значением в течение периода по меньшей мере 6 месяцев у субъектов-лошадей и приводит к снижению хромоты, суставного выпота и синовита в лошадиной модели ОА. Кодон-модифицированный ген, кодирующий eqIL-1Ra, обеспечивает более высокие уровни экспрессии eqIL-1Ra по сравнению с нативным или эндогенным геном, при этом какое-либо изменение в аминокислотной последовательности белка eqIL-1Ra отсутствует. Аналогичным образом, экспрессия IL-1Ra с использованием кодон-модифицированной кДНК IL-1Ra человека превышала таковую из нативной последовательности IL-1Ra человека примерно в 2-4 раза. Настоящее раскрытие также относится к обнаружению того, что, значительно отличаясь от здоровых суставов, трансгенная экспрессия после обработки является гораздо более высокой в пораженной синовиальной оболочке, особенно в участках с воспалением и синовитом, по сравнению со здоровой или непораженной тканью. Данный феномен приводит к тому, что у животных с наиболее тяжелой общей патологией образуются наиболее высокие уровни IL-1Ra.

В результате доставки кДНК IL-1Ra в клетки, являющиеся резидентными в тканях суставов (например, у человека, лошади или другого животного), и обеспечения высоких уровней независимой экспрессии биосинтетический аппарат модифицированных клеток направлен на сверхпродуцирование и непрерывное секретирование трансгенного белка IL-1Ra в синовиальную жидкость и окружающую ткань. Таким образом, пораженный сустав становится эндогенным очагом длительного повышенного продуцирования IL-1Ra, устраняя необходимость в повторном применении белка, при этом обеспечивается наиболее высокая концентрация терапевтического препарата конкретно в очаге заболевания.

Соответственно, в соответствии с некоторыми аспектами в настоящем раскрытии предусмотрена рекомбинантная нуклеиновая кислота, содержащая кодон-модифицированный ген, кодирующий IL-1Ra. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления IL-1Ra является лошадиным. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления IL-1Ra является человеческим. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления последовательность кодон-модифицированного гена, кодирующего IL-1Ra лошади, представляет собой SEQ ID NO: 2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления последовательность кодон-модифицированного гена, кодирующего IL-1Ra человека, представляет собой SEQ ID NO: 10.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления рекомбинантная нуклеиновая кислота, содержащая кодон-модифицированный ген, кодирующий eqIL-1Ra или IL-1Ra человека, дополнительно содержит последовательность Козак, расположенную непосредственно выше сайта инициации трансляции кодон-модифицированного гена. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления последовательность Козак и ген, кодирующий eq-IL-1Ra, представляют собой последовательность SEQ ID NO: 3. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления последовательность Козак и ген, кодирующий IL-1Ra человека, представляют собой последовательность SEQ ID NO: 11. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления последовательности Козак дополнительно повышают уровень экспрессии IL-1Ra человека (hIL-1Ra) или eqIL-1Ra в суставах (например, в суставах человека или суставах лошадей соответственно).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления рекомбинантная нуклеиновая кислота, содержащая кодон-модифицированный ген eqIL-1Ra или hIL-1Ra, дополнительно содержит промотор выше кодон-модифицированного гена, кодирующего eqIL-1Ra или hIL-1Ra. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления промотор представляет собой немедленно-ранний промотор/энхансер цитомегаловируса (CMV). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления немедленно-ранний промотор/энхансер CMV имеет последовательность SEQ ID NO: 4.

С целью доставки кодон-модифицированного гена, кодирующего IL-1Ra, и обеспечения непрерывной экспрессии белка eqIL-1Ra в суставе в течение длительного периода рассматривали применение аденоассоциированного вируса. Соответственно, в соответствии с некоторыми аспектами в данном документе предусмотрена частица рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), содержащая любую из нуклеиновых кислот, раскрываемых в данном документе. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления частица rAAV является самокомплементарной (т.е., частицей scAAV).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления частица rAAV принадлежит к серотипу 2.5. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления частица rAAV принадлежит к серотипу 2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления частица rAAV, содержащая кодон-модифицированный eqIL-1Ra, представляет собой AAV2.5. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления частица rAAV, содержащая кодон-модифицированный hIL-1Ra, представляет собой AAV2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления частица rAAV, содержащая кодон-модифицированный eqIL-1Ra, представляет собой AAV2. В

соответствии с некоторыми вариантами осуществления частица гAAV, содержащая кодон-модифицированный hIL-1Ra, представляет собой AAV2.5.

В соответствии с некоторыми аспектами в данном документе предусмотрен способ лечения дегенеративного патологического состояния крупных опорных суставов.

5 Указанный способ предусматривает введение субъекту, нуждающемуся в этом, любой из частиц гAAV, раскрываемых в данном документе. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления способ лечения дегенеративного патологического состояния крупных опорных суставов предусматривает введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества любой из частиц гAAV, раскрываемых в данном
10 документе.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления дегенеративное патологическое состояние крупных опорных суставов представляет собой остеоартрит. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъект представляет собой лошадь. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъект представляет
15 собой человека. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления любую из частиц гAAV, раскрываемых в данном документе, вводят субъекту с помощью внутрисуставной инъекции. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъекту-лошади вводят любую из частиц гAAV, раскрываемых в данном документе, которая содержит кодон-модифицированный IL-1Ra лошади. В соответствии с
20 некоторыми вариантами осуществления субъекту-человеку вводят любую из частиц гAAV, раскрываемых в данном документе, которая содержит кодон-модифицированный IL-1Ra человека.

Краткое описание чертежей

25 Следующие чертежи образуют часть настоящего описания и включены, чтобы дополнительно продемонстрировать определенные аспекты настоящего раскрытия, которое можно лучше понять посредством отсылки на один или несколько из этих чертежей в сочетании с подробным описанием конкретных вариантов осуществления, представленных в данном документе. Следует понимать, что данные, иллюстрируемые в
30 чертежах, никоим образом не ограничивают объем настоящего раскрытия.

На **Фиг. 1** изображена последовательность кодон-модифицированной кДНК IL-1Ra лошади. Указанная последовательность нативной кДНК IL-1Ra лошади изображена вверху (SEQ ID NO: 1), а модифицированная последовательность внизу (SEQ ID NO: 2). Основания пронумерованы, начиная с ATG сайта инициации трансляции до кодона
35 терминации трансляции. Нуклеотидные замены, используемые для модификации,

обозначены с помощью символов двоеточия. Последовательность внизу обозначает консенсусную последовательность Козак (17), вставленную непосредственно выше сайта инициации трансляции. Модифицированная последовательность, содержащая консенсусную последовательность Козак, представляет собой SEQ ID NO: 3.

5 На **Фиг. 2А-2D** изображена экспрессия трансгена eqIL-1Ra *in vitro* и *in vivo*. На Фиг. 2А изображен уровень eqIL-1Ra в кондиционированных средах через 48 часов после трансфекции синовиальных фибробластов лошади плазмидой Hpa-trs-sk на основе вектора scAAV, содержащей кодирующие последовательности GFP, нативного eqIL-1Ra, кодон-модифицированного eqIL-1Ra (*Opt*) и кодон-модифицированного eqIL-1Ra с лидерной
10 последовательностью Козак (*K+Opt*). $n = 3$ трансфекций. На Фиг. 2В изображен уровень eqIL-1Ra в кондиционированных средах после инфицирования синовиальных фибробластов лошади возрастающими дозами scAAV.eqIL-1Ra, упакованного в серотип 2.5. Вирусные геномы (vg) на клетку в случае scAAV.eqIL-1Ra показаны справа. Параллельное инфицирование 10^5 vg/клетка scAAV.GFP использовали в качестве
15 отрицательного контроля. $n = 3$ инфицирований. На Фиг. 2С изображены анатомические расположения межзапястных (IC) и пястно-фаланговых (MCP) суставов передних конечностей лошади (стрелки-указатели) (справа). Рентгеновское изображение запястья лошади, на котором показаны межзапястный сустав (стрелка), лучевая запястная кость (RC) и предплечевой запястный сустав (*). На Фиг. 2D изображен уровень eqIL-1Ra в
20 e Growth Factor Rev 13, 323-340 (2002). солевой раствор, либо scAAV.eqIL-1Ra в дозах vg, показанных справа от соответствующих графиков ($n = 6$ суставов). Планки погрешностей обозначают $\pm$ SEM.

На **Фиг. 3А-3О** изображены расположения и фенотипы клеток, трансдуцированных scAAV.GFP после внутрисуставной инъекции в здоровые суставы и суставы, пораженные
25 ОА. Межзапястные (IC) суставы 3 здоровых лошадей и 3 лошадей с поздней стадией естественно возникающего ОА, в которые инъецировали 5×10^{12} vg scAAV.GFP. Через две недели ткани суставов отбирали и анализировали в отношении флуоресценции. Расположенные друг против друга участвующие в формировании суставов поверхности иллюстративных здоровых межзапястных суставов (Фиг. 3А) и межзапястных суставов, пораженных ОА (Фиг. 3В). Стрелки на Фиг. 3В обозначают эрозию хрящевой ткани во
30 всей толще; разрастание остеофитов (*). На Фиг. 3С-3D изображена экспрессия scAAV.GFP в ворсинчатой синовиальной оболочке здорового сустава. На Фиг. 3Е-3F изображена экспрессия GFP на синовиальной поверхности сустава, пораженного ОА. На Фиг. 3С и 3Е представлены свежееотобранные ткани при 10х; на Фиг. 3D-3F представлены
35 поперечные срезы в парафине при 20х. На Фиг. 3G-3Н изображена экспрессия

scAAV.GFP в свежееотобранной хрящевой ткани, соструганной из здорового сустава. На Фиг. 3I изображена активность GFP в стружке здоровой хрящевой ткани через 48 нахождения в культуре эксплантата. На Фиг. 3J-3K изображена активность GFP в свежееотобранной хрящевой ткани, соструганной из сустава, пораженного ОА. На Фиг. 3L изображена активность GFP в хрящевой ткани, пораженной ОА, из участка с видимой эрозией. (Фиг. 3G, 3I, 3J, 3L 10x; Фиг 3H, 3K 20x). На Фиг. 3M изображена экспрессия GFP в кластерах хрящевой ткани из сустава, пораженного ОА (парафиновый срез). На Фиг. 3N изображена активность GFP в свежееотобранной ткани остеофитов (10x). На Фиг. 3O изображена иллюстративная экспрессия GFP в свежееотобранной ткани синовиальной оболочки, взятой из предплечьевого запястного сустава, расположенного непосредственно проксимально по отношению к межзапястному суставу, в который вводили scAAV.GFP. Указанные изображения представляют собой комбинацию от 6 животных в обеих группах. Широкий диапазон времени воздействия использовали для фиксации варьирующих интенсивностей флуоресценции при различных увеличениях в образцах свежееотобранной ткани различной толщины и состава. Контраст и яркость отдельных панелей регулировали линейным образом с целью однородности внешнего вида и для отражения интенсивностей флуоресценции, наблюдаемых с помощью прямого микроскопического исследования.

На Фиг. 4A-4H изображена экспрессия GFP в тканях лошадей, пораженных ОА, после внутрисуставной доставки генов с помощью scAAV. Дополнительные области, представляющие интерес, на основании результатов, описываемых на Фиг. 2. Межзапястные суставы 3 лошадей с поздней стадией естественно возникающего ОА, в которые инъецировали 5×10^{12} vg scAAV.GFP, а через две недели ткани суставов отбирали и анализировали в отношении флуоресценции. Показана экспрессия GFP в тканях с патологическими изменениями, характерными для сформированного ОА. На Фиг. 4A и 4B показана экспрессия GFP в воспаленной ткани синовиальной оболочки с помощью прямого флуоресцентного микроскопического исследования свежееотобранных тканей. Фиг. 4A представлена при 5x, а Фиг. 4B представлена при 20x. На Фиг. 4C и 4D изображена активность GFP в хрящевой ткани, пораженной ОА, из участков с видимой эрозией. Оба представлены при увеличении 5x. На Фиг. 4E-4G изображена активность GFP в кластерах хондроцитов. На Фиг. 4E изображена прямая флуоресценция в свежееотобранных стружках (40x). На Фиг. 4F и 4G представлены парафиновые срезы (20x и 40x соответственно). На Фиг. 4G изображены хондроциты в нескольких кластерах, меняющие морфологию в сочетании с разрушением окружающего матрикса. На Фиг. 4H показана экспрессия GFP в свежееотобранной ткани остеофитов (20x).

На **Фиг. 5А-5G** изображена внутрисуставная доставка и экспрессия гена scAAV.eqIL-1Ra в лошадиной модели ОА с ОCF. На **Фиг. 5А** изображено схематическое представление исследования эффективности остеохондрального фрагмента (OCF). В общей сложности 20 лошадей разделяли поровну на две группы. После хирургического получения остеохондрального повреждения в лучевой запястной кости животные в группе *Обработанные* получали инъекцию 5×10^{12} vg scAAV.eqIL-1Ra в область суставной щели; животные группы *Контроль* получали равный объем солевого раствора. Синовиальные жидкости из обоих межзапястных суставов, периферическую кровь и мочу собирали каждую вторую неделю (*). На **Фиг. 5В** изображены средние уровни eqIL-1Ra в синовиальной жидкости суставов с ОCF из групп *Обработанные* и *Контроль*. Пунктирная линия обозначает среднюю экспрессию AAV.eqIL-1Ra в здоровых суставах, полученную в результате введения той же самой дозы вируса (см. **Фиг. 5С**) ($n = 10$). На **Фиг. 5С** изображен график, обозначающий уровень eqIL-1Ra в синовиальной жидкости в суставе с ОCF каждого индивидуума в группе *Обработанные*. Каждая линия обозначает другое животное. На **Фиг. 5D** изображен средний уровень eqIL-1Ra в моче как для группы *Обработанные*, так и для группы *Контроль* ($n = 10$). На **Фиг. 5Е** изображен средний уровень eqIL-1Ra в сыворотке крови, полученной из периферической крови для 9 из 10 животных как в группе *Обработанные*, так и в группе *Контроль* ($n = 10$). На **Фиг. 5F** изображен уровень eqIL-1Ra в сыворотке крови от оставшихся лошадей как в группе *Обработанные*, так и в группе *Контроль*, который составлял в $>25\times$ больше, чем в случае других 18 животных в исследовании до обработки. На **Фиг. 5G** изображены титры нейтрализующих антител к AAV2.5 в сыворотке периферической крови синовиальных жидкостях суставов с ОCF, в которые инъецировали scAAV.eqIL-1Ra ($n = 10$). Планки погрешностей обозначают $\pm$ SEM.

На **Фиг. 6А-6В** изображены изменения хромоты и уровней PGE_2 в синовиальной жидкости суставов после обработки scAAV.eqIL-1Ra. На **Фиг. 6А** изображено относительное изменение средних визуальных индексов хромоты в группах *Обработанные* и *Контроль* во время физических упражнений (*слева*). Относительное изменение хромоты передних конечностей (сумма векторов) на основании системы анализа инерционного датчика движения Lameness Locator® (*справа*). В обоих случаях средним индексам хромоты на неделе 1 присваивали значение 1. На **Фиг. 6В** изображены средние уровни PGE_2 в синовиальной жидкости суставов с ОCF как группы *Обработанные*, так и группы *Контроль*. Планки погрешностей обозначают $\pm$ SEM; * $P < 0,05$.

На **Фиг. 7А-7В** изображена оценка MR изображений в случае изменений патологии тканей в суставах с OCF, обработанных scAAV.eqIL-1Ra. Оба межзапястных сустава всех лошадей сканировали с помощью MR визуализации до обработки (неделя 0) и в конце протокола эксперимента (неделя 12). Изображения оценивали в отношении выпота синовиальной жидкости, синовиальной пролиферации, тяжести остеохондрального повреждения (размер OCF), отека костного мозга в лучевой запястной кости, склероза лучевой запястной кости и третьей кости запястья, а также отека и фиброза суставов по шкале от 0 до 10, где 0 = норма и 10 = тяжелая патология. На **Фиг. 7А** изображены иллюстративные изображения на основе аксиальных и саггитальных изображений (PD и PD-FS соответственно) суставов с OCF от одной лошади в группе *Обработанные* и в группе *Контроль*. Стрелки белого цвета обозначают: CE – капсулярный выпот; ME – отек костного мозга; OCF – остеохондральный фрагмент; SE – синовиальный выпот. Стрелка черного цвета в саггитальном изображении на неделе 12 в случае контрольного сустава обозначает гиперинтенсивный сигнал и неполную репарацию OCF. На **Фиг. 7В** изображен ковариатный анализ основных суставных патологий, ассоциированных с моделью OCF в группах *Обработанные* и *Контроль* в конечной точке (неделя 12) с использованием индексов предварительной обработки (неделя 0) в качестве исходного уровня (*слева*). Суммарные индексы MRI в случае суставов с OCF рассчитывали исходя из значений отдельных патологий MRI (*справа, перекрестная штриховка*). Суммарные индексы MRI на основе функционирующих суставов группы *Имитация* представляют собой уровни патологии исходного уровня в межзапястных суставах, расположенных друг против друга. Планки погрешностей обозначают $\pm$ SEM; * $P < 0,05$.

На **Фиг. 8А-8В** изображена оценка артроскопии и гистологических срезов суставов с OCF в отношении изменений патологии тканей, ассоциированных с обработкой scAAV.eqIL-1Ra. Оба межзапястных сустава лошадей в группах *Обработанные* и *Контроль* исследовали артроскопически после образования остеохондрального повреждения (неделя -2) и в конечной точке (неделя 12). Изображения оценивали в баллах в отношении размера OCF и локального повреждения хрящевой ткани, синовита, повреждения хрящевой ткани в суставе (в целом) и воспаления связок. В конечной точке остеохондральный фрагмент и локальную ткань синовиальной оболочки удаляли, разрезали на срезы и окрашивали Н&Е или толуидином синим и классифицировали. На **Фиг. 8А** изображен ковариатный анализ артроскопических оценок основных суставных патологий, ассоциированных с моделью OCF в группах *Обработанные* и *Контроль* на неделе 12 с использованием индексов на неделе -2 в качестве исходного уровня (*слева*). Суммарные индексы артроскопии в случае суставов с OCF рассчитывали исходя из

значений отдельных патологий (*справа, столбцы с перекрестной штриховкой*). Суммарные индексы на основе функционирующих расположенных на разных сторонах межзапястных суставов группы Имитация представляют собой патологию исходного уровня в неповрежденных суставах. На Фиг. 8В изображены иллюстративные артроскопические изображения остеохондральных повреждений у лошадей групп *Обработанные* и *Контроль* во время образования (неделя -2) и в конечной точке (неделя 12). На Фиг. 8С изображены средние гистологические индексы отдельных патологий тканей в отобранных тканях с OCF (*слева*). Суммарные гистологические индексы, рассчитанные на основе отдельных индексов тканей (*справа*). На Фиг. 8D изображены иллюстративные микроскопические изображения репарации костной ткани в группах *Обработанные* и *Контроль*. Планки погрешностей обозначают $\pm$ SEM; * $P < 0,05$.

На Фиг. 9А-9В изображены ассоциации между экспрессией eqIL-1Ra и патологией суставов. На Фиг. 9А изображены графики суммарного индекса MRI у лошадей группы *Обработанные* непосредственно до инъекции scAAV.eqIL-1Ra в зависимости от уровней qIL-1Ra в синовиальной жидкости в случае OCF на неделе 2 (*слева*) и средние уровни eqIL-1Ra на неделях 2-12 (*справа*). В случае обоих графиков стрелка обозначает данные, полученные от одной лошади с необычайно высокой экспрессией eqIL-1Ra на неделе 2 по отношению к другим 9 животным (см. Фиг. 5С). Сплошные линии показывают графики с линиями наибольшего соответствия для точек данных всех 10 животных. Пунктирные линии показывают графики с линиями наибольшего соответствия, рассчитанные без выпадающих точек данных. Показаны коэффициенты корреляции Пирсона (r) для индекса MRI и уровня eqIL-1Ra как с выпадающей точкой данных (все), так и без нее (9/10). На Фиг. 9В представлен график всех индексов MRI непосредственно до инъекции в зависимости от суммарного индекса MRI в конечной точке для суставов с OCF для каждой из лошадей в группах *Обработанные* (серый цвет) и *Контроль* (черный цвет). Сплошные линии показывают графики с линиями наибольшего соответствия для каждой группы. Также показаны соответствующие уравнения прямых и коэффициенты корреляции Пирсона. * $P < 0,05$.

На Фиг. 10 изображена секреция IL-1Ra человека в клетках HEK293, трансфицированных векторными плазмидами scAAV, содержащими нативную или кодон-модифицированную кДНК IL-1Ra человека.

На Фиг. 11 изображена секреция IL-1Ra человека в клетках остеосаркомы человека, трансфицированных векторными плазмидами scAAV, содержащими нативную или модифицированную кДНК IL-1Ra человека. Планки погрешностей обозначают SEM.

На **Фиг. 12** изображена секрция IL-1Ra человека в первичных синовиальных фибробластах человека, инфицированных капсидами AAV2, содержащими нативную и кодон-модифицированную кДНК IL-1Ra человека. $n = 3$ инфицирования; планки погрешностей обозначают +SEM.

5 На **Фиг. 13** изображено выравнивание последовательностей нативной кДНК IL-1Ra человека (верхняя последовательность; SEQ ID NO: 9) и кодон-модифицированной последовательности IL-1Ra GeneArt (нижняя последовательность; SEQ ID NO: 10) с консенсусной последовательностью Козак (подчеркнуто), расположенной непосредственно выше сайта инициации трансляции ATG в положении 1. Различия между
10 указанными двумя последовательностями обозначены с помощью символов двоеточия. Как указано под выравниваниями последовательностей, в модификации были изменены 105 из 534 нуклеотидов в нативной последовательности кДНК IL-1Ra. Модифицированная последовательность, содержащая консенсусную последовательность Козак, представляет собой SEQ ID NO: 11.

15

Подробное раскрытие настоящего изобретения

IL-1Ra представляет собой перспективное терапевтическое средство для лечения заболеваний, связанных с дегенеративным патологическим состоянием крупных опорных
20 суставов, таких как остеоартрит (ОА), поскольку он является природным антагонистом IL-1, который связан с внутрисуставной потерей хрящевой ткани, болью и воспалением. В то же время доставка IL-1Ra к очагу заболевания, т.е., суставам, является проблематичной. Поддержание терапевтически эффективного уровня IL-1Ra в пораженном суставе в течение длительного периода времени является даже более
25 проблематичным. Следует отметить, что у лошадей эндогенный IL-1Ra экспрессируется при низких уровнях. Фактически экзогенная экспрессия IL-1Ra с помощью нуклеотидной последовательности дикого типа, которая кодирует белок eqIL-1Ra, также не способствует достижению высоких уровней IL-Ra в суставах.

В качестве решения данной проблемы авторы настоящего раскрытия разработали
30 кодон-модифицированную последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует eqIL-1Ra, который характеризуется той же самой аминокислотной последовательностью, что и белок eqIL-1Ra дикого типа, однако приводит к более высоким уровням эндогенной экспрессии IL-1Ra. Дополнительная модификация была выполнена с целью включения последовательности Козак непосредственно выше сайта инициации трансляции.
35 Включение этой последовательности Козак приводит к дополнительному повышению

уровня экспрессии белка eqIL-1Ra. Доставка разработанного кодон-модифицированного гена, кодирующего IL-1Ra, в суставы, была достигнута в результате применения частиц AAV в качестве носителей. Неожиданным образом было обнаружено, что имеет место высокая корреляция между уровнем патологии в суставе во время инъекции и последующим продуцированием IL-1Ra. Неожиданным образом было обнаружено, что пораженная ткань экспрессирует более высокие уровни eqIL-1Ra в результате раскрываемого способа лечения, чем ткань, которая не является пораженной.

Авторы настоящего изобретения также разработали кодон-модифицированный IL-1Ra человека (hIL-1Ra) с лидерными последовательностями Козак и без таковых, который приводит к секреции IL-1Ra при уровнях, которые примерно в 2-4 раза выше, чем таковая в результате использования нативной кДНК hIL-1Ra.

Нуклеиновая кислота, содержащая кодон-модифицированный ген, кодирующий IL-1Ra лошади

В данном документе предусмотрена рекомбинантная нуклеиновая кислота, содержащая кодон-модифицированный ген, кодирующий IL-1Ra лошади (eqIL-1Ra). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ошибочное спаривание нуклеотидных последовательностей между кодон-модифицированным геном, кодирующим eqIL-1Ra, и эндогенным (или дикого типа или нативным) геном, кодирующим eqIL-1Ra, составляет 10-30% (например, 15-25%, 17-23%, 19-21%, 10-15%, 15-20% 20-25% или 25-30%). Иными словами, 10-30% нуклеотидов, кодирующих eqIL-1Ra, являются кодон-модифицированными. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления кодон-модифицирующий ген, кодирующий eqIL-1Ra, характеризуется 20,2% ошибочным спариванием по сравнению с геном дикого типа, кодирующим eqIL-1Ra. SEQ ID NO: 1 представляет собой нуклеотидную последовательность гена дикого типа, кодирующего eqIL-1Ra. SEQ ID NO:2 представляет собой кодон-модифицированную последовательность, кодирующую eqIL-1Ra. 108 из 534 нуклеотидов SEQ ID NO: 2 являются ошибочно спаренными по сравнению с SEQ ID NO: 1, что соответствует ошибочному спариванию 20,2% (Фиг. 1).

Нуклеотидная последовательность эндогенного гена, кодирующего eqIL-1Ra:

ATGGAAATCCGCAGGCGTTCTGTCAGACACCTAATCTCTCTCCTCCTTTTCTGTTCTACTCA
GAGACAGCCTGCCACCCTTTGGGGAAGAGACCCTGCAAGATGCAAGCCTTCAGAATCTGGG
ATGTTAACCAGAAGACCTTCTACATGAGGAATAACCAACTAGTTGCTGGATACTTGCAAGAA
TCAAATACTAAATTACAAGAGAAGATAGATGTGGTGCCCATTTGAGCCTGATGCTCTATTCCCT

GGGACTCCATGGGAGGAAGCTGTGCCTGGCCTGTGTCAAGTCTGGTGATGAGATTAGGTTCC
 AATTGGAGGCAGTTAACATCACTGACCTGAGCAAGAACAAGGAGGAGAACAAGCGCTTCAC
 CTTTCATCCGCTCAAACAGTGGCCCCACCACCAGCTTCGAGTCTGCCGCCTGCCCTGGCTGGTT
 CCTCTGCACGGCGCAGGAGGCAGACCGGCCCGTCAGCCTCACCAACAAGCCCAAAGAGTCC
 5 TTCATGGTCACCAAGTTCTACCTCCAGGAGGACCAGTAG (SEQ ID NO: 1)

Пример нуклеотидной последовательности кодон-модифицированного гена, кодирующего eqIL-1Ra:

ATGGAAATCAGGCGCAGAAGCGTGCGCCACCTGATCAGCCTGCTGCTGTTCTTCTACAG
 10 CGAGACAGCCTGCCACCCCCTGGGCAAGAGGCCCTGCAAGATGCAGGCCTTCAGGATCTGG
 GACGTGAACCAGAAAACCTTCTACATGCGCAACAACCAGCTGGTGGCCGGATACCTGCAGG
 AAAGCAACACCAAGCTGCAGGAAAAGATCGACGTGTCCTCCCATCGACCCGACGCCCTGTTC
 CTGGGCCTGCACGGCAGAAAGCTGTGCCTGGCCTGCGTGAAGTCCGGCGACGAGATCAGGT
 TTCAGCTGGAAGCCGTGAACATCACCGACCTGAGCAAGAACAAGAGGAAAACAAGCGCTT
 15 CACCTTCATCAGAAGCAACAGCGGCCCCACCACCAGCTTCGAGAGCGCCGCTTGCCCCGGCT
 GGTTCTGTGTACAGCCCAGGAAGCCGACAGGCCCGTCAGCCTGACCAACAAGCCCAAAGA
 AAGCTTCATGGTCACCAAGTTCTATCTGCAAGAAGATCAGTAA (SEQ ID NO: 2)

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления трансдукция клетки кодон-
 20 модифицированным геном, кодирующим eqIL-1Ra, приводит к образованию уровней
 белка eqIL-1Ra, которые в 5-200 раз выше (например, в 5-200, 10-150, 15-120, 20-100, 30-
 80, 35-60, 40-50 раз выше) по сравнению с ситуацией, когда аналогичную клетку
 трансдуцируют эндогенным (или нативным или дикого типа) геном, кодирующим eqIL-
 1Ra. Ген дикого типа, кодирующий eqIL-1Ra, представляет собой ген, который является
 25 нативным или эндогенным или встречающимся у лошадей.

Последовательность Козак

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления кодон-
 модифицированному гену, кодирующему eqIL-1Ra, предшествует последовательность
 30 Козак. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления последовательность
 Козак непосредственно предшествует сайту инициации трансляции кодон-
 модифицированного гена, кодирующего eqIL-1Ra. В соответствии с некоторыми
 вариантами осуществления последовательность Козак представляет собой 1-50
 нуклеотидов выше сайта инициации трансляции кодон-модифицированного гена,
 35 кодирующего eqIL-1Ra. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления
 последовательность Козак представляет собой GCCACC. SEQ ID NO: 3 представляет

собой пример кодон-модифицированного гена, кодирующего eqIL-1Ra, которому непосредственно предшествует последовательность Козак.

Пример нуклеотидной последовательности кодон-модифицированного гена, кодирующего

5 eqIL-1Ra (последовательность Козак подчеркнута):

GCCACCATGGAAATCAGGCGCAGAAGCGTGCGCCACCTGATCAGCCTGCTGCTGTTCTCTGTT
 CTACAGCGAGACAGCCTGCCACCCCCTGGGCAAGAGGCCCTGCAAGATGCAGGCCTTCAGG
 ATCTGGGACGTGAACCAGAAAAACCTTCTACATGCGCAACAACCAGCTGGTGGCCGGATACC
 TGCAGGAAAGCAACACCAAGCTGCAGGAAAAGATCGACGTCGTCCCCATCGACCCGACGCC
 10 CTGTTCTCTGGGCCTGCACGGCAGAAAGCTGTGCCTGGCCTGCGTGAAGTCCGGCGACGAGAT
 CAGGTTTTCAGCTGGAAGCCGTGAACATCACCGACCTGAGCAAGAACAAGAGGAAAAACAAG
 CGCTTCACCTTCATCAGAAGCAACAGCGGCCCCACCACCAGCTTCGAGAGCGCCGCTTGCCC
 CGGCTGGTTCTCTGTGTACAGCCCAGGAAGCCGACAGGCCCGTCAGCCTGACCAACAAGCCC
 AAAGAAAGCTTCATGGTCACCAAGTTCTATCTGCAAGAAGATCAGTAA (SEQ ID NO: 3)

15 В соответствии с некоторыми вариантами осуществления трансдукция клетки кодон-модифицированным геном, кодирующим eqIL-1Ra, с последовательностью Козак приводит к образованию уровней белка eqIL-1Ra, которые в 5-200 раз выше (например, в 5-200, 10-150, 15-120, 20-100, 30-80, 35-60, 40-50 раз выше) по сравнению с ситуацией,
 20 когда аналогичную клетку трансдуцируют эндогенным геном, кодирующим eqIL-1Ra. Аналогичная клетка представляет собой клетку, которая характеризуется тем же самым генетическим профилем и культивируется и обрабатывается таким же самым образом, за исключением того, что одна переменная, влияющая на клетку, отличается, например, последовательность кДНК IL-1Ra, которая используется для ее трансфекции.

Нуклеиновая кислота, содержащая кодон-модифицированный ген, кодирующий IL-1Ra человека

В данном документе также предусмотрены рекомбинантные нуклеиновые кислоты, содержащие кодон-модифицированный ген, кодирующий IL-1Ra человека. В
 30 соответствии с некоторыми вариантами осуществления ошибочное спаривание нуклеотидных последовательностей между кодон-модифицированным геном, кодирующим IL-1Ra человека, и эндогенным (или дикого типа или нативным) геном, кодирующим IL-1Ra человека, составляет 10-30% (например, 15-25%, 17-23%, 19-21%, 10-15%, 15-20% 20-25% или 25-30%). Иными словами, 10-30% нуклеотидов, кодирующих
 35 IL-1Ra человека, являются кодон-модифицированными. В соответствии с некоторыми

вариантами осуществления кодон-модифицирующий ген, кодирующий IL-1Ra человека, характеризуется 19,6% ошибочным спариванием по сравнению с геном дикого типа, кодирующим IL-1Ra человека. SEQ ID NO: 9 представляет собой нуклеотидную последовательность гена дикого типа, кодирующего IL-1Ra человека. SEQ ID NO:10

5 представляет собой пример кодон-модифицированной последовательности, кодирующей IL-1Ra человека. 105 из 534 нуклеотидов SEQ ID NO: 10 являются ошибочно спаренными по сравнению с SEQ ID NO: 9, что соответствует ошибочному спариванию 19,6% (см. Фиг. 13).

10 Пример нуклеотидной последовательности эндогенного гена, кодирующего IL-1Ra человека:

ATGGAAATCTGCAGAGGCCTCCGCAGTCACCTAATCACTCTCCTCCTCTTCCTGTTCCATTCA
GAGACGATCTGCCGACCCTCTGGGAGAAAATCCAGCAAGATGCAAGCCTTCAGAATCTGGG
ATGTTAACCAGAAGACCTTCTATCTGAGGAACAACCAACTAGTTGCTGGATACTTGCAAGGA
15 CCAAATGTCAATTTAGAGAAAAGATAGATGTGGTACCCATTGAGCCTCATGCTCTGTTCTT
GGGAATCCATGGAGGGAAGATGTGCCTGTCCTGTGTCAAGTCTGGTGATGAGACCAGACTCC
AGCTGGAGGCAGTTAACATCACTGACCTGAGCGAGAACAGAAAGCAGGACAAGCGCTTCGC
CTTCATCCGCTCAGACAGTGGCCCCACCACCAGTTTTGAGTCTGCCGCCTGCCCCGGTTGGTT
CCTCTGCACAGCGATGGAAGCTGACCAGCCCGTCAGCCTCACCAATATGCCTGACGAAGGC
20 GTCATGGTCACCAAATTCTACTTCCAGGAGGACGAGTAG (SEQ ID NO: 9)

Пример нуклеотидной последовательности кодон-модифицированного гена, кодирующего IL-1Ra человека:

ATGGAAATCTGCAGAGGCCTGCGGAGCCACCTGATTACCCTGCTGCTGTTCTGTTCCACAG
25 CGAGACAATCTGCCGGCCCAGCGGCCGGAAGTCCAGCAAGATGCAGGCCTTCCGGATCTGG
GACGTGAACCAGAAAACCTTCTACCTGCGGAACAACCAGCTGGTGGCCGGATACCTGCAGG
GCCCCAACGTGAACCTGGAAGAGAAGATCGACGTGGTGCCCATCGAGCCCCACGCCCTGTTT
CTGGGCATCCACGGCGGCAAGATGTGCCTGAGCTGCGTGAAGTCCGGCGACGAGACAAGAC
TGCAGCTGGAAGCCGTGAACATCACCGACCTGAGCGAGAACCGGAAGCAGGACAAGAGATT
30 CGCCTTCATCAGAAGCGACAGCGGCCCCACCACCAGCTTTGAGAGCGCCGCCTGCCCCGGCT
GGTTCCTGTGTACAGCCATGGAAGCCGACCAGCCCGTGTCCCTGACAAACATGCCCGACGAG
GGCGTGATGGTCACCAAGTTCTATTTCAAGAAGATGAGTAA (SEQ ID NO: 10)

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления кодон-

35 модифицированному гену, кодирующему IL-1Ra человека, предшествует последовательность Козак. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления

последовательность Козак непосредственно предшествует сайту инициации трансляции кодон-модифицированного гена, кодирующего IL-1Ra человека. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления последовательность Козак представляет собой 1-50 нуклеотидов выше сайта инициации трансляции кодон-модифицированного гена, кодирующего IL-1Ra человека. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления последовательность Козак представляет собой GCCACC. SEQ ID NO: 11 представляет собой пример кодон-модифицированного гена, кодирующего IL-1Ra человека, которому непосредственно предшествует последовательность Козак.

10 Пример нуклеотидной последовательности кодон-модифицированного гена, кодирующего IL-1Ra человека (последовательность Козак подчеркнута):

GCCACCATGGAAATCTGCAGAGGCCTGCGGAGCCACCTGATTACCCTGCTGCTGTTCTGTT
CCACAGCGAGACAATCTGCCGGCCCAGCGGCCGGAAGTCCAGCAAGATGCAGGCCTTCCGG
ATCTGGGACGTGAACCAGAAAACCTTCTACCTGCGGAACAACCAGCTGGTGGCCGGATACC
15 TGCAGGGCCCCAACGTGAACCTGGAAGAGAAGATCGACGTGGTGGCCATCGAGCCCCACGC
CCTGTTTCTGGGCATCCACGGCGGCAAGATGTGCCTGAGCTGCGTGAAGTCCGGCGACGAGA
CAAGACTGCAGCTGGAAGCCGTGAACATCACCGACCTGAGCGAGAACCGGAAGCAGGACA
AGAGATTGCCTTCATCAGAAGCGACAGCGGCCCCACCACCAGCTTTGAGAGCGCCGCCTGC
CCCGGCTGGTTCCTGTGTACAGCCATGGAAGCCGACCAGCCCGTGTCCCTGACAAACATGCC
20 CGACGAGGGCGTGATGGTCACCAAGTTCTATTTTCAAGAAGATGAGTAA (SEQ ID NO: 11)

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления трансдукция клетки кодон-модифицированным геном, кодирующим IL-1Ra человека, с последовательностью Козак приводит к образованию уровней белка IL-1Ra человека, которые в 1,1-50 раз выше (например, в 1,1-3, 1,4-10, 1,5-30, 2-30, 2-50, 2-4, 2,5-5, 3-8, 5-20 или 30-50 раз выше) по сравнению с ситуацией, когда аналогичную клетку трансдуцируют эндогенным геном, кодирующим eqIL-1Ra.

Промотор

30 Промотор, как правило, представляет собой участок нуклеиновой кислоты, который инициирует транскрипцию нуклеиновой кислоты, кодирующей продукт.

С целью достижения уровней экзогенной экспрессии eqIL-1Ra или hIL-1Ra может быть использован любой из ряда промоторов. Указанный промотор может представлять собой, к примеру, конститутивный промотор, тканеспецифичный промотор, индуцируемый промотор или синтетический промотор.

Рекомбинантная нуклеиновая кислота, описываемая в данном документе, может содержать один или несколько конститутивных промоторов, таких как вирусные промоторы или промоторы из генов млекопитающих, которые, как правило, являются активными в стимуляции транскрипции. Неограничивающие примеры конститутивных вирусных промоторов включают в себя немедленно-ранний промотор/энхансер вируса простого герпеса (HSV), тимидинкиназы (TK), вируса саркомы Рауса (RSV), вируса обезьян 40 (SV40), вируса опухоли молочной железы мышей (MMTV), Ad E1A и цитомегаловируса (CMV). Неограничивающие примеры других конститутивных промоторов млекопитающих включают в себя промоторы генов домашнего хозяйства, примерами которых являются промотор β -актина (например, промотор β -актина кур) и промотор фактора элонгации 1 α (EF-1 α).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления промотор в любой из рекомбинантных аминокислот, раскрываемых в данном документе, представляет собой промотор, контролируемый заболеванием. Промотор, контролируемый заболеванием, представляет собой промотор, который способствует экспрессии IL-1Ra, кодируемого кодон-модифицированным геном, с которым промотор связан в пораженных клетках или ткани при уровнях, которые являются более высокими, чем таковые в непораженных клетках или ткани. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления промотор, контролируемый заболеванием, в любой из рекомбинантных аминокислот, раскрываемых в данном документе, представляет собой немедленно-ранний промотор/энхансер цитомегаловируса (CMV). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления включение немедленно-раннего промотора/энхансера CMV приводит к 1,5-200 раз более высоким (например, в 1,5-150, 2-120, 5-100, 10-80 или 20-50 раз более высоким) уровням экспрессии eqIL-1Ra или hIL-1Ra в пораженной ткани по сравнению с непораженной тканью. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления пораженная и непораженная ткань находятся в одном и том же суставе субъекта. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления пораженная и непораженная ткань находятся в одном и том же организме субъекта, но в разных суставах. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления пораженная и непораженная ткань находятся в организмах разных субъектов. Последовательность немедленно-раннего промотора/энхансера CMV известна в данной области техники и описана Schmidt et al. (Molecular and Cellular Biol., 1990, 10:4406).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления последовательность немедленно-раннего промотора/энхансера CMV представляет собой SEQ ID NO: 4. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления последовательность немедленно-

раннего промотора/энхансера CMV представляет собой участок SEQ ID NO: 4, таким образом, что указанный участок обеспечивает 20-50% (например, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 99 или 100%) активности SEQ ID NO: 4.

5 Пример нуклеотидной последовательности немедленно-раннего промотора/энхансера CMV:

TCAATATTGGCCATTAGCCATATTATTCATTGGTTATATAGCATAAATCAATATTGGCTATTG
GCCATTGCATACGTTGTATCTATATCATAATATGTACATTTATATTGGCTCATGTCCAATATG
ACCGCCATGTTGGCATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGT
10 TCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCCGCCTGGCTGAC
CGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATA
GGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACA
TCAAGTGTATCATATGCCAAGTCCGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCCGCCT
GGCATTATGCCCAGTACATGACCTTACGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAG
15 TCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACACCAATGGGCGTGGATAGCGGTTT
GACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTGTGTTTGGCACCA
AAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTGCGATCGCCCGCCCCGTTGACGCAAAT
GGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAG
ATC (SEQ ID NO: 4)

20

Промотор может быть расположен выше (например, на от 0 п.о. до -100 п.о., на -30 п.о., на -75 п.о. или на -90 п.о.) сайта инициации транскрипции нуклеиновой кислоты, кодирующей продукт, или сайт инициации трансляции может быть расположен в промоторе. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления промотор

25 расположен непосредственно выше последовательности Козак, или на 90 п.о. выше последовательности Козак. Промотор может иметь длину 100-1000 пар оснований нуклеотидов или 50-2000 пар оснований нуклеотидов.

гAAV для доставки eqIL-1Ra или IL-1Ra человека

30 В качестве носителя для доставки трансгена, кодирующего eqIL-1Ra или IL-1Ra человека, используют рекомбинантные аденоассоциированные (гAAV) частицы. AAV оказался одним из наиболее благоприятных носителей для генной терапии в клинических областях применения. Его преимущества связаны с его повышенной безопасностью, низким иммуногенным профилем трансдуцированных клеток, а также его способностью

35 обеспечивать длительную эффективную экспрессию трансгенов в тканях суставов. Недавние успехи в технологии AAV, в том числе разработке самокомплементарных

(двунитевых) векторов и усовершенствованных способов получения высокого титра вирусов, дополнительно повысили его перспективу для востребованных видов клинического применения.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления серотип частицы гAAV, используемой для доставки любой из нуклеиновых кислот, раскрываемых в данном документе, в сустав лошади или человека, представляет собой серотип 2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления серотип частицы гAAV, используемой для доставки любой из нуклеиновых кислот, раскрываемых в данном документе, в сустав лошади или человека, представляет собой серотип 2.5 и он является самокомплементарным (scAAV2.5). scAAV2.5 представляет собой вектор AAV второго поколения, который отвечает за образование как последовательности нового капсида (химерного), так и уникальной структуры вектора (дуплексной). Гибридный серотип 2.5 AAV характеризуется тем же самым тропизмом к ткани, что и серотип 2, однако характеризуется сниженной реактивностью в отношении нейтрализующего антитела к AAV2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления серотип частицы гAAV, используемой для доставки любой из нуклеиновых кислот, раскрываемых в данном документе, в сустав лошади или человека, представляет собой серотип 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или гибридный серотип или серотип модифицированного или сконструированного капсида AAV.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления частица гAAV является самокомплементарной в том отношении, что она содержит участок нуклеиновой кислоты, который является комплементарным другому участку нуклеиновой кислоты, при этом происходит инициация образования двунитевой структуры нуклеиновой кислоты, содержащейся в частице.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления высокоэффективный аденовирусный вектор используется в качестве носителя для доставки любого из трансгенов, кодирующих eqIL-1Ra или IL-1Ra человека, раскрываемых в данном документе.

Необходимо понимать, что другие средства доставки генов, например, лентивирус, могут быть использованы в качестве носителя для доставки любого из трансгенов, кодирующих eqIL-1Ra или IL-1Ra человека, раскрываемых в данном документе. Различные способы доставки генов известны в данной области техники, см., например, Nayerossadat et al. (Adv Biomed Res. 2012; 1: 27), которые включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме, и могут быть использованы в качестве носителя

для доставки любого из трансгенов, кодирующих eqIL-1Ra или IL-1Ra человека, раскрываемых в данном документе.

Способы упаковки частиц rAAV

5 Неограничивающие способы получения частиц rAAV, которые содержат нуклеиновую кислоту, содержащую кодон-модифицированный ген, кодирующий eqIL-1Ra или IL-1Ra человека, описаны в данном документе. Другие способы также известны в данной области техники и коммерчески доступны (см., например, Zolotukhin et al. Production and purification of serotype 1, 2, and 5 recombinant adeno-associated viral vectors. Methods 28 (2002) 158–167; и публикации заявок на патент США №№US20070015238 и 10 US20120322861, которые включены в данный документ посредством ссылки; Li et al., J. Virol, 2012, v.86(15), а также плазмиды и наборы от ATCC и Cell Biolabs, Inc.). К примеру, плазмиду, содержащую кодон-модифицированный ген, кодирующий eqIL-1Ra или IL-1Ra человека, можно сочетать с одной или несколькими плазмидами-помощниками, например, 15 которые содержат ген гер (например, кодирующий Rep78, Rep68, Rep52 и Rep40) и ген сар (кодирующий VP1, VP2 и VP3, в том числе модифицированный участок VP2, описываемый в данном документе), и трансфицировать в рекомбинантные клетки таким образом, что частица rAAV может быть упакована и затем очищена.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления упаковка осуществляется в 20 клетку-помощника или клетку-продуцента, такую как клетка млекопитающего или клетка насекомого. Неограничивающие примеры клеток млекопитающих включают в себя без ограничения клетки HEK293, клетки COS, клетки HeLa, клетки BHK или клетки CHO (см., например, ATCC® CRL-1573™, ATCC® CRL-1651™, ATCC® CRL-1650™, ATCC® CCL-2, ATCC® CCL-10™ или ATCC® CCL-61™). Иллюстративные клетки насекомых 25 включают в себя без ограничения клетки Sf9 (см., например, ATCC® CRL-1711™). Клетка-помощник может содержать гены гер и/или сар, которые кодируют белок Rep и/или Сар для применения в способе, описываемом в данном документе. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления упаковку осуществляют *in vitro*.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления плаزمид, содержащая ген, 30 кодирующий IL-1Ra, сочетается с одной или несколькими плазмидами-помощниками, например, которые содержат ген гер первого серотипа и ген сар того же самого или другого серотипа, и трансфицируется в клетки-помощники таким образом, что частица rAAV упаковывается.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления одна или несколько 35 плазмид-помощников включают в себя первую плазмиду-помощника, содержащую ген

гер и ген сар, и вторую плазмиду-помощника, содержащую один или несколько из следующих генов-помощников: ген E1a, ген E1b, ген E4, ген E2a и ген VA. Для ясности гены-помощники представляют собой гены, которые кодируют белки-помощники E1a, E1b, E4, E2a и VA. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ген гер представляет собой ген гер, происходящий из AAV3, AAV5 или AAV6, а ген сар происходит из AAV2, AAV3, AAV5 или AAV6 и может включать в себя модификации гена с целью получения модифицированного капсидного белка, описываемого в данном документе. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ген сар модифицируют таким образом, что один или несколько из белков VP1, VP2 и VP3 не экспрессируются. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ген сар модифицируют таким образом, что VP2 не экспрессируется. Способы получения таких модификаций известны в данной области техники (Lux et al. (2005), *J Virology*, 79: 11776-87).

Плазмиды-помощники и способы получения таких плазмид известны в данной области техники и коммерчески доступны (см., например, плазмиды pDF6, pRep, pDM, pDG, pDP1rs, pDP2rs, pDP3rs, pDP4rs, pDP5rs, pDP6rs, pDG(R484E/R585E) и pDP8.ape от PlasmidFactory, Билефельд, Германия; другие продукты и услуги от Vector Biolabs, Филадельфия, Пенсильвания; Cellbiolabs, Сан-Диего, Калифорния; Agilent Technologies, Санта-Клара, Калифорния; и Addgene, Кембридж, Массачусетс; pxx6; Grimm et al. (1998), Novel Tools for Production and Purification of Recombinant Adenoassociated Virus Vectors, *Human Gene Therapy*, Vol. 9, 2745-2760; Kern, A. et al. (2003), Identification of a Heparin-Binding Motif on Adeno-Associated Virus Type 2 Capsids, *Journal of Virology*, Vol. 77, 11072-11081.; Grimm et al. (2003), Helper Virus-Free, Optically Controllable, and Two-Plasmid-Based Production of Adeno-associated Virus Vectors of Serotypes 1 to 6, *Molecular Therapy*, Vol. 7, 839-850; Kronenberg et al. (2005), A Conformational Change in the Adeno-Associated Virus Type 2 Capsid Leads to the Exposure of Hidden VP1 N Termini, *Journal of Virology*, Vol. 79, 5296-5303; и Moullier, P. and Snyder, R.O. (2008), International efforts for recombinant adeno-associated viral vector reference standards, *Molecular Therapy*, Vol. 16, 1185-1188). Плазмиды, которые кодируют кодирующие участки AAV дикого типа специфических серотипов, также известны и доступны. К примеру, pSub201 представляет собой плазмиду, которая содержит кодирующие участки генома AAV2 дикого типа (Samulski et al. (1987), *J Virology*, 6:3096-3101).

Иллюстративный неограничивающий способ получения частиц гAAV описан далее. Созданы или получены одна или несколько плазмид-помощников, которые содержат ORF гер и сар для AAV необходимого серотипа, а также VA гены аденовируса E2A (DBP) и E4

под контролем транскрипции их нативных промоторов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления одна или несколько плазмид-помощников содержат гены гер первого серотипа (например, AAV3, AAV5 и AAV6), гены сар (которые могут принадлежать или могут не принадлежать к первому серотипу) и необязательно один или несколько VA генов аденовируса E2A (DBP) и E4 под контролем транскрипции их нативных промоторов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления одна или несколько плазмид-помощников содержат ORF сар (и необязательно ORF гер) для AAV необходимого серотипа, а также VA гены аденовируса E2A (DBP) и E4 под контролем транскрипции их нативных промоторов. ORF сар может также содержать одну или несколько модификаций с целью получения модифицированного капсидного белка, описываемого в данном документе. Клетки HEK293 (доступные от ATCC®) трансфицируют с помощью СаРO₄-опосредованной трансфекции, липидов или полимерных молекул, таких как полиэтиленимин (PEI), плазмидой-помощником(плазмидами-помощниками) и плазмидой, содержащей вектор нуклеиновой кислоты, описываемый в данном документе. Клетки HEK293 затем инкубируют в течение по меньшей мере 60 часов с получением частиц гAAV. В качестве альтернативы клетки HEK293 трансфицируют с помощью способов, описываемых выше, AAV-ITR, содержащим любую из рекомбинантных нуклеиновых кислот, описываемых в данном документе, плазмидой-помощником, содержащей гены, кодирующие белки Rep и Cap, и коинфицируют вирусом-помощником. Вирусы-помощники представляют собой вирусы, которые способствуют репликации AAV. Примерами вируса-помощника являются аденовирус и вирус герпеса.

В качестве альтернативы в другом примере стабильные линии клеток-продуцентов на основе Sf9 инфицируют одним рекомбинантным бакуловирусом, содержащим любую из рекомбинантных нуклеиновых кислот, предусмотренных в данном документе. В качестве дополнительной альтернативы в другом примере клеточные линии HEK293 или ВНК инфицируют HSV, содержащим вектор нуклеиновой кислоты и необязательно один или несколько HSV-помощников, содержащих ORF гер и сар, описываемые в данной документе, и VA гены аденовируса E2A (DBP) и E4 под контролем транскрипции их нативных промоторов. Клетки HEK293, ВНК или Sf9 затем инкубируют в течение по меньшей мере 60 часов с получением частиц гAAV. Частицы гAAV затем очищают с помощью любого способа, известного в данной области техники или описываемого в данном документе, например, с помощью ступенчатого градиента йодиксанола, градиента CsCl, хроматографии или осаждения полиэтиленгликолем (PEG).

Фармацевтические композиции

В данном документе предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая одну из частиц гAAV, раскрываемых в данном документе. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления фармацевтическая композиция содержит фармацевтически приемлемый носитель, который облегчает доставку частиц гAAV, содержащих нуклеиновую кислоту, кодирующую eqIL-1Ra или IL-1Ra человека, в сустав субъекта. Термин «носитель» относится к разбавителю, адъюванту, вспомогательному средству или основе, с которой вводят гAAV.

Фармацевтические носители могут представлять собой стерильные жидкости, такие как вода или масла, в том числе таковые на основе нефтяного масла, такого как минеральное масло, растительного масла, такого как арахисовое масло, соевое масло и кунжутное масло, животного жира или масла синтетического происхождения. Солевые растворы (например, стерилизованный не содержащий пирогенов солевой раствор) и водные растворы декстрозы и глицерина могут быть использованы в качестве жидких носителей. Носители и вспомогательные вещества степени чистоты USP являются особенно пригодными для доставки частиц гAAV субъектам-млекопитающим. Такие композиции могут дополнительно необязательно содержать липосому, липид, липидный комплекс, микросферу, микрочастицу, наносферу или наночастицу, или могут быть иным образом составлены для введения в клетки, ткани, органы или организм субъекта, нуждающегося в этом. Способы получения таких композиций хорошо известны и могут быть найдены, к примеру, в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22nd edition, Pharmaceutical Press, 2012.

Фармацевтические формы композиций на основе частицы гAAV, подходящие для инъекционного применения, включают в себя стерильные водные растворы или дисперсии. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления форма является стерильной и жидкой до той степени, до которой существует легкая проходимость через иглу. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления форма является стабильной в условиях производства и хранения и защищена от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления форма является стерильной. Носитель также может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащие, к примеру, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.), их подходящие смеси и/или растительные масла. Подходящая текучесть может поддерживаться, к примеру, за счет использования покрытия, такого как лецитин, в

результате поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и с использованием поверхностно-активных веществ.

В случае введения водных растворов для инъекций раствор может быть подходящим образом забуферен, при необходимости, а жидкий разбавитель вначале делают изотоническим с помощью достаточного количества солевого раствора или глюкозы. К примеру, одна доза может быть растворена в 1 мл изотонического раствора NaCl и добавлена к 1000 мл жидкости для гиподермоклизиса или введена в предполагаемый участок в результате инфузии (см., к примеру, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15th Edition, pages 1035-1038 and 1570-1580). Некоторая вариация дозы будет определенным образом осуществляться в зависимости от состояния субъекта, подлежащего лечению. Лицо, ответственное за введение, будет в любом случае определять подходящую дозу для индивидуального субъекта. Кроме того, в случае введения млекопитающим, препараты должны соответствовать стандартам стерильности, пирогенности и общей безопасности и чистоты, общепринятым в ветеринарных областях наук.

В типичном случае такие композиции могут содержать по меньшей мере приблизительно 0,1% терапевтического средства (например, частицы гAAV) или больше, хотя процент активного(активных) ингредиента(ингредиентов), безусловно, может варьироваться и может для удобства находиться от приблизительно 1 или 2% и до приблизительно 70% или 80% или более от массы или объема всего состава. Естественным образом, количество терапевтического(терапевтических) средства(средств) (например, частицы гAAV) в каждой терапевтически пригодной композиции может быть подготовлено таким образом, чтобы подходящая доза была получена в любой определенной унифицированной дозе соединения. Факторы, такие как растворимость, биодоступность, биологическое время полужизни, путь введения, срок хранения продукта, а также другие фармакологические аспекты будут учитываться специалистом в области получения таких фармацевтических составов, и, таким образом, ряд дозировок и режимов лечения может быть предпочтительным.

Способ лечения

В данном документе предусмотрен способ лечения дегенеративного патологического состояния крупных опорных суставов, при этом указанный способ предусматривает введение внутрисуставно субъекту любой из частиц гAAV, раскрываемых в данном документе.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъект представляет собой млекопитающее (например, человека или лошадь). В соответствии с некоторыми

вариантами осуществления субъект представляет собой лошадь. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъект представляет собой человека.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления дегенеративное патологическое состояние крупных опорных суставов вызвано острой травмой (например, повреждением или травмирующей нагрузкой) или хроническим эрозивным заболеванием. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления дегенеративное патологическое состояние крупных опорных суставов представляет собой остеоартрит (ОА). ОА лошадей также известен как дегенеративное заболевание суставов (DJD). ОА у лошадей может быть вызван травмой сустава в результате либо остро возникшей ситуации либо постоянных ударных нагрузок. Обездвиживание или неправильное подковывание также может приводить к ОА у лошадей.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления любую из частиц гAAV или фармацевтических композиций вводят в сустав, нуждающийся в лечении, с помощью внутрисуставной инъекции. Суставы, наиболее часто поражаемые артритом и, таким образом, нуждающиеся в лечении у лошадей, включают в себя коленный сустав, плечевой сустав, венечный сустав, пяточный сустав и плечо-венечный сустав (в этом случае он часто называется «кольцевая жабка»). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления сустав, нуждающийся в лечении, представляет собой пястно-фаланговый (MCP) или межзапястный (IC) сустав. Соответственно, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления рекомбинантный ген (например, в гAAV) доставляется непосредственно (например, инъецируется) в один из этих суставов. В то же время, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления композиция может быть доставлена системно.

Необходимо понимать, что любая из частиц гAAV, описываемых в данном документе, может быть использована для лечения любого патологического состояния, при котором длительное продуцирование ингибитора IL-1 обеспечивало бы положительный эффект. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления патологическое состояние, при котором длительное продуцирование ингибитора IL-1 обеспечивало бы положительный эффект, представляет собой подагру, псевдоподагру или боль и воспаление, ассоциированные с подагрой или псевдоподагрой. Другие неограничивающие примеры патологических состояний, при которых длительное продуцирование ингибитора IL-1 обеспечивало бы положительный эффект, включают в себя ревматоидный артрит, ювенильный артрит, болезнь Стилла, полиартрит, хронический младенческий неврологический кожно-артикулярный синдром, васкулит, системную красную волчанку, псориазическую артропатию, нарушение соединительной

ткани, синдром иммунного восстановления, диффузный васкулит, синдром Шницлера, амилоидоз, гематофагоцитарный синдром, синдром Макла-Уэлса, остеопороз, полихондрит, глазную гипертензию, анкилозирующий спондилит, болезнь Эрдгейма-Честера, повреждение с размождением тканей, синдром Sapho, множественные
 5 повреждения, цитолитический гепатит, склеродермию, амитрофический латеральный склероз, рецептор фактора некроза опухоли-ассоциированный периодический синдром, противовоспалительная терапия, аутоиммунное нарушение, слабовыраженное нарушение, нарушение костного мозга, псориаз, нарушение иммунной системы, болезнь Кастлемена, пирексию, недостаточность рецептора гамма-интерферона, криопирин-ассоциированные
 10 периодические синдромы, дерматомиозит, синдром Шегрена, температурную крапивницу, ревматическую полимиалгию, повышенный уровень иммуноглобулина D в крови, рак молочной железы, воспаление и синдром Рейтера. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления способ лечения патологического состояния, при котором длительное продуцирование ингибитора IL-1 (например, подагры или псевдоподагры)
 15 обеспечивало бы полезный эффект, предусматривает введение субъекту, нуждающемуся в этом, любой из частиц гAAV, раскрываемых в данном документе, внутрисуставно. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления способ лечения патологического состояния предусматривает введение субъекту, нуждающемуся в этом любой из частиц гAAV, раскрываемых в данном документе, внесуставно.

20 В соответствии с некоторыми вариантами осуществления любая из частиц гAAV, описываемых в данном документе, используется для лечения персистирующего воспалительного патологического состояния (например, воспалительного патологического состояния в соединительных тканях). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления персистирующее воспалительное патологическое состояние
 25 вызывает хромоту (например, тендонит или ламинит). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления хроническое воспаление, которое подлежит лечению, возникает в печени, кишечной или легочной тканях. Необходимо понимать, что любое из патологических состояний, указанных выше, может считаться дегенеративным патологическим состоянием крупных опорных суставов.

30 «Лечить» заболевание, как указанный термин используется в данном документе, означает снижение частоты или тяжести по меньшей мере одного признака или симптома заболевания или нарушения, испытываемого субъектом. Композиции, описываемые в данном документе выше или в других разделах данного документа, в типичном случае вводят субъекту в терапевтически эффективном количестве, иными словами, в количестве,
 35 способном вызвать необходимый результат. Указанный необходимый результат будет

зависеть от активного средства, подлежащего введению. К примеру, терапевтически эффективное количество частиц гAAV может представлять собой количество частиц, которое способно переносить кодон-модифицированный ген, кодирующий eqIL-1Ra, или кодон-модифицированный ген, кодирующий hIL-1Ra, в сустав лошади или человека
 5 соответственно. Терапевтически эффективное количество может представлять собой количество, которое способно приводить к лечению заболевания, например, ОА. Как хорошо известно в ветеринарных областях наук, доза для любого субъекта зависит от многих факторов, в том числе размера, площади поверхности тела, возраста субъекта, определенной композиции, подлежащей введению, активного(активных)
 10 ингредиента(ингредиентов) в композиции, времени и пути введения, общего состояния здоровья и других лекарственных препаратов, подлежащих одновременному введению. Лечение может быть оценено практикующим врачом-клиницистом с помощью стандартных методик в данной области техники или навыков и опыта, приобретенного в данной области техники (например, оценки воспаления в суставе).

15 В соответствии с некоторыми вариантами осуществления «вводимый» или «введение» означает предоставление вещества субъекту путем, который является фармакологически пригодным.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления от 1×10^{10} до 1×10^{13} вирусных геномов (vg) (например, от 5×10^{10} до 5×10^{12} vg, от 1×10^{11} до 1×10^{12} vg или от
 20 2×10^{11} до 9×10^{11} vg) вводят за один раз в сустав, подлежащий лечению. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления объем фармацевтической композиции или гAAV, подлежащих инъекции, составляет 1-20 мл (например, 2-15, 5-12 или 5-10 мл).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления частицы гAAV, содержащие кодон-модифицированный ген, кодирующий eqIL-1Ra, вводят в сустав
 25 лошади на регулярной основе, к примеру, через 3 месяца, через 6 месяцев или через год или через 2-5 лет. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления частицы гAAV, содержащие кодон-модифицированный ген, кодирующий IL-1Ra, вводят в сустав человека на регулярной основе, к примеру, через 3 месяца, через 6 месяцев или через год
 30 или через 2-5 лет. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления частицы гAAV, содержащие кодон-модифицированный ген, кодирующий eqIL-1Ra или hIL-1Ra, вводят в сустав лошади или человека множество раз (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 13, 14, 15 или 20 раз), либо через равные промежутки времени, либо через неравные промежутки времени. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления гAAV,
 35 содержащий кодон-модифицированный ген, кодирующий eqIL-1Ra, или кодон-

модифицированный ген, кодирующий hIL-1Ra, вводят в сустав только один раз. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления гAAV, содержащий кодон-модифицированный ген, кодирующий eqIL-1Ra, или кодон-модифицированный ген, кодирующий hIL-1Ra, вводят в сустав лошади или человека только в случае, если

5 симптомы заболевания возвращаются или усиливаются. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления гAAV, содержащий кодон-модифицированный ген, кодирующий eqIL-1Ra, или кодон-модифицированный ген, кодирующий hIL-1Ra, вводят в сустав лошади или человека непосредственно после того, как патологическое состояние (например, ОА) диагностируется (например, в течение 1 месяца или 1 года после

10 постановки диагноза). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления гAAV, содержащий кодон-модифицированный ген, кодирующий eqIL-1Ra, или кодон-модифицированный ген, кодирующий hIL-1Ra, вводят в сустав лошади или человека до того, как дегенеративное патологическое состояние диагностируется, однако после появления осложнения (например, повреждения), которое могло привести к

15 дегенеративному патологическому состоянию. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления гAAV, содержащий кодон-модифицированный ген, кодирующий eqIL-1Ra, или кодон-модифицированный ген, кодирующий hIL-1Ra, вводят в сустав лошади или человека непосредственно после (например, в течение месяца) появления травмы, которая могла привести к дегенеративному патологическому состоянию. В соответствии с

20 некоторыми вариантами осуществления гAAV, содержащий кодон-модифицированный ген, кодирующий eqIL-1Ra, или кодон-модифицированный ген, кодирующий hIL-1Ra, вводят в сустав лошади или человека тогда, когда наблюдаются первые признаки заболевания сустава. Неограничивающие симптомы дегенеративного патологического состояния крупных опорных суставов включают в себя прихрамывание или хромоту, отек

25 суставов, снижение поворота в суставах, а также скованности или сниженной подвижности сустава.

Поскольку имеет место высокая корреляция между уровнем патологии (например, суммарный индекс MRI) во время инъекции гAAV, содержащим кодон-модифицированный ген, кодирующий eqIL-1Ra, или кодон-модифицированный ген, кодирующий hIL-1Ra, и последующим продуцированием IL-1Ra (см. Пример 2), лечение

30 может быть начато после травмы, но до поставки диагноза дегенеративного заболевания (например, ОА). Без дальнейшего детального рассмотрения, считается, что специалист в данной области техники на основании вышеизложенного описания может использовать настоящее раскрытие в его наиболее полной степени. Таким образом, следующие

35 конкретные варианты осуществления следует рассматривать только в качестве

иллюстративных и никоим образом не ограничивающих оставшуюся часть раскрытия. Все публикации, цитируемые в данном документе, включены посредством ссылки для целей или предмета изобретения, на которые дается отсылка в данном документе.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления инъекция гAAV, содержащего кодон-модифицированный ген, кодирующий eqIL-1Ra, или кодон-модифицированный ген, содержащий hIL-1Ra, в пораженный сустав, приводит к более высокому уровню продуцирования IL-1Ra по сравнению с инъекцией гAAV, содержащего кодон-модифицированный ген, кодирующий eqIL-1Ra, или кодон-модифицированный ген, кодирующий hIL-1Ra, в непораженный или здоровый сустав. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления продуцирование IL-1Ra в пораженном суставе происходит в 1,1-50 раз выше (например, в 1,1-2, 2-4, 2-10, 5-10, 5-20, 10-20, 20-30 или 30-50 раз выше) по сравнению с непораженным или здоровым суставом.

Примеры

Пример 1: scAAV-опосредованная доставка гена IL-1Ra для лечения остеоартрита: временная экспрессия и биораспределение в лошадиной модели

Данные, описанные ниже, показывают, что scAAV может обеспечивать длительную экспрессию eqIL-1Ra в суставе лошади с помощью кодон-модифицированного гена, кодирующего eqIL-1Ra, и последовательности Козак.

Выполняли исследования, направленные на пястно-фаланговые (mcp) суставы передней конечности лошади. Поскольку эти суставы несут 60-65% массы тела лошади во время передвижения, они также очень подвержены ОА вследствие травмы и избыточной нагрузки.

С целью характеристики паттернов терапевтической экспрессии трансгена и его относительной безопасности после внутрисуставной доставки исследования дозирования и временной экспрессии выполняли с помощью кДНК лошадиного ортолога IL-1Ra. С помощью наиболее эффективной дозы вектора и зеленого флуоресцентного белка (GFP) в качестве цитологического репортерного гена, исследовали биодоступность вектора после доставки в здоровые суставы и суставы с естественно возникающим ОА, при этом особое внимание уделяли влиянию заболевания на локальные трансдуцированные клеточные популяции и системное рассредоточение вирусных геномов.

Животные, используемые в исследовании

Животных, используемых в данном исследовании, жертвовали Университету Флориды, или приобретали на местных фермах и в учебно-тренировочных центрах. Конечные точки для каждого параметра исследований предварительно определяли, как описано ниже. Никаких животных из анализа данных не исключали. Все процедуры с животными осуществляли в соответствии как с Руководством по содержанию и использованию лабораторных животных NIH, так и Институциональным комитетом по уходу за животными и их использованию Университета Флориды. Если не указано иное, то лошадей содержали в группах в больших открытых загонах для лошадей при полном доступе к передвижению.

Конструирование и получение векторов AAV

С целью сведения к минимуму иммунного распознавания продукта трансгена IL-1Ra и создания фармакокинетического профиля переноса гомологического гена IL-1Ra с помощью вектора AAV последовательности ДНК, кодирующие лошадиный ортолог IL-1Ra, использовали в качестве терапевтического репортера. С целью сведения к максимуму экспрессии трансгенного белка нативную кДНК eqIL-1Ra кодон-модифицировали и консенсусную последовательность Козак вставляли непосредственно выше кодона инициации трансляции (Фиг. 1). В указанной конструкции экспрессия трансгена управляется немедленно-ранним промотором/энхансером CMV. Векторы AAV упаковывали в капсид AAV2.5 в отделе векторов Университета Флориды или отделе векторов Университета Северной Каролины в Чапел-Хилл с помощью способов, описанных ранее.

кДНК, кодирующие GFP и модифицированный eqIL-1Ra, направленно вставляли в сайты Sac II и Not I экспрессионной кассеты плазмиды pHpa-trs-SK, самокомплементарного (с двунитевой ДНК) варианта вектора AAV, сконструированного на основе генома AAV2. В указанной конструкции экспрессия трансгена управляется немедленно-ранним промотором/энхансером CMV. Векторы AAV упаковывали в капсид AAV2.5 в отделе векторов Университета Флориды или отделе векторов Университета Северной Каролины в Чапел-Хилл.

Дозирование и экспрессия in vivo

Для анализа экспрессии трансгенов *in vivo* использовали 6 здоровых лошадей, достигших скелетной зрелости, в возрасте 2-7 лет. Эксперименты проводили как с использованием МСР суставов, так и межзапястных суставов обеих передних конечностей каждого животного. За две недели до инъекции вектора синовиальную жидкость из

каждого сустава аспирировали с помощью артроцентеза с целью установления исходных уровней eqIL-1Ra. Во время инъекции рандомизированным образом объемы жидкости 5 или 10 мл раствора Рингера с лактатом, содержащего $0, 5 \times 10^{10}, 5 \times 10^{11}$ и 5×10^{12} vg scAAV.eqIL-1Ra, доставляли в 4 сустава передней конечности каждого животного.

5 Данную стратегию использовали для обеспечения наиболее высокой оценки межиндивидуальной вариабельности экспрессии трансгена у животных при соответствующих дозах с помощью минимального количества субъектов. После инъекции животных содержали на карантине в течение 24 часов и тщательно контролировали группой ветеринаров. На 7, 14 и 30 дни после инъекции и один раз в
10 месяц после этого в общей сложности в течение 6 месяцев синовиальную жидкость, периферическую кровь и мочу собирали у каждого животного для измерения содержания eqIL-1Ra с помощью ИФА. Синовиальную жидкость, периферическую кровь и мочу будут собирать до 1 года включительно в отдельном эксперименте для оценки продолжительности эффекта инъекции кодон-модифицированного IL-1Ra в суставы.

15

ИФА для определения IL-1Ra лошади

Уровни IL-1Ra лошади определяли с помощью специфического ИФА (R&D Systems). Образцы синовиальной жидкости из суставов как группы Обработанные, так и группы Контроль разводили 1:1 забуференным солевым раствором, содержащим
20 гиалуронидазу при 50 ЕД/мл, и инкубировали при 37°C в течение 30 минут до измерения содержания белка. Двукратные серийные разведения в разведенных реагентом (R&D Systems) образцах синовиальной жидкости получали в широком диапазоне с целью обеспечения вариабельности результатов анализа. Каждую серию разведений выполняли в двух повторностях и каждый разведенный образец анализировали в лунках в трех
25 поторностях. Средние значения рассчитывали на основе считываний с границами стандартных кривых соответствующих анализов.

Биораспределение вектора in vivo

С целью определения системного биораспределения вектора AAV после
30 внутрисуставной инъекции в межзапястные суставы 3 здоровых лошадей и 3 лошадей с поздней стадией естественно возникающего ОА инъецировали 5×10^{12} vg scAAV.GFP, разведенных в 5 мл раствора Рингера с лактатом. Через две недели животных умерщвляли и вскрывали. Значимых повреждений органов, отличных от опорно-двигательной системы, не выявляли. Ткани извлекали из инъецированного межзапястного
35 сустава, прилегающего предплечевого запястного сустава, прилегающей четырехглавой

мышцы, ипсилатерального MCP сустава, контралатерального межзапястного сустава и прилегающей четырехглавой мышцы, головного мозга, сердца, легкого, печени и селезенки. Ткани, расположенные дальше всего от участка инъекции, извлекали первыми, и соблюдали осторожность с целью минимизации перекрестной контаминации образцов.

Части каждого образца помещали в DMEM с 10% FBS для последующего анализа экспрессии GFP, либо с помощью инвертированной флуоресцентной микроскопии свежееотобранной ткани, либо после осуществления парафинового среза и иммуногистохимического окрашивания. Оставшиеся части тканей помещали в RNALater (Ambion) и хранили при -80°C для последующего выделения геномной ДНК (gDNA).

Для анализа векторных геномов gDNA экстрагировали из сохраненных образцов тканей с помощью набора для анализа крови и тканей Qiagen DNeasy (Qiagen) в соответствии с инструкциями производителя. Концентрации gDNA определяли с помощью спектрофотометра NanoDrop (Thermo Scientific). Количественную ПЦР в реальном времени выполняли с помощью 100 нг gDNA и термоциклера Eppendorf RealPlex (Eppendorf). Праймеры конструировали с целью отжига последовательностей в промоторе CMV экспрессионной кассеты вектора. Последовательности прямого и обратного праймеров представляли собой 5'- CACGCTGTTTGACCTCCATAGAAGACAC (SEQ ID NO: 5) и 5'- TTCTTTGATTTGCACCACCACCGGATCCG (SEQ ID NO: 6) соответственно. Для каждой совокупности реакций получали стандартную кривую с использованием серийных разведений ДНК плазмиды pHpa-tr-sk. Реакции ПЦР, специфичные в отношении β-актина лошади (прямой праймер 5'- CCAGCACGATGAAGATCAAG (SEQ ID NO: 7) и обратный праймер 5'- GTGGACAATGAGGCCAGAAT (SEQ ID NO: 8)) и без матричной ДНК использовали в качестве положительных и отрицательных контролей соответственно. Все образцы gDNA анализировали в трех повторностях. Для исследования специфической в отношении образца реакции ингибирования аликвоты образцов gDNA метили ДНК вектора pHpa-trs-SK в количестве 100 копий/мкг gDNA. Если выявляли 40 копий/мкг или больше меченой ДНК, то образец gDNA считали приемлемым.

Иммуногистохимический анализ

Образцы тканей из исследования биораспределения, характеризующиеся видимой активностью GFP, фиксировали в параформальдегиде, обрабатывали для гистологического анализа и заключали в парафин. Срезы, нарезанные толщиной 5 мкм и помещенные на заряженные микроскопические препараты, депарафинировали и осуществляли опосредованное нагреванием демаскирование антигена.

Микроскопические препараты блокировали 10% нормальной сывороткой, затем инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре с кроличьим антителом к GFP при разведении 1:200 (Abcam), после чего с биотинилированным вторичным антителом (Invitrogen) в течение 30 минут при комнатной температуре при разведении 1:500.

- 5 Микроскопические препараты заключали с DAPI (Vector Laboratories) и исследовали с помощью флуоресцентного микроскопа.

Конструирование и характеристика вектора scAAV.eqIL-1Ra vector in vitro u in vivo

- В предыдущем исследовании, включающем доставку с использованием scAAV
- 10 кДНК IL-1Ra человека в сустав лошади, было обнаружено, что после пика через 1-2 недели после инъекции экспрессия трансгена стабильно снижалась, а через 7 недель IL-1Ra человека не был определен в синовиальных жидкостях с помощью ИФА. Это было связано с иммунным распознаванием трансдуцированных клеток, экспрессирующих продукт ксеногенного трансгена. Несмотря на то, что можно было получать измеримые
- 15 уровни экспрессии IL-1Ra лошади с помощью рекомбинантного аденовирусного вектора, экспрессия белка из нативной кДНК в целом была сравнительно незначительной. Таким образом, с целью сведения к минимуму иммунного распознавания продукта трансгена IL-1Ra и сведения к максимуму экспрессии кДНК ортологического кодона IL-1Ra лошади модифицировали и синтезировали как с наличием (SEQ ID NO: 3) и без 5'
- 20 фосфорилирования (SEQ ID NO: 2), так и без наличия лидерной последовательности Козак непосредственно выше сайта инициации трансляции. После вставки векторной плазмиды scAAV (pHpa-trs-sk) обе модифицированные конструкции приводили к 30-50-кратному усилению экспрессии по сравнению с нативной последовательностью в анализах временной трансфекции (Фиг. 2А). Поскольку конструкция, содержащая
- 25 последовательность Козак, непрерывно обеспечивала наиболее высокие уровни экспрессии eqIL-1Ra, ее выбирали для упаковки вирусов и исследования *in vivo*.

- Предыдущие данные показали, что синовиальные фибробласты человека в культуре характеризуются предпочтением к инфицированию AAV2. Учитывая перспективный
- переход на исследование у человека, векторную конструкцию eqIL-1Ra упаковывали
- 30 капсид AAV2.5, который поддерживает тропизм AAV2, однако характеризуется сниженной реактивностью в отношении нейтрализующего антитела к AAV2, распространенной в популяции человека. Инфицирование культур синовиальных фибробластов лошади диапазоном доз вектора AAV2.5 приводило к чрезвычайно высокой экспрессии eqIL-1Ra, которая превосходила 10 мкг/мл при уровне 10^5 вирусных геномов
- 35 (vg)/клетка (Фиг. 2В). Продуцирование eqIL-1Ra не превышало фоновый уровень в

параллельных контрольных культурах, инфицированных при уровне 10^5 vg/клетка вектором AAV2.5, содержащим GFP.

Для определения влияния дозы вектора на экспрессию scAAV.eqIL-1Ra после внутрисуставной доставки выполняли подход, разработанный для обеспечения понимания 5 внутри- и межиндивидуальной вариабельности у животных с помощью минимального количества животных. У каждой из 6 лошадей инъекции scAAV.eqIL-1Ra в 3 различных дозах (5×10^{10} , 5×10^{11} и 5×10^{12} vg; Фиг. 2D) распределяли в случайном порядке между межзапястными суставами и MCP суставами обеих передних конечностей. В оставшийся 10 сустав инъецировали эквивалентный объем средства доставки (раствор Рингера с лактатом) и он выступал в качестве отрицательного контроля. Периодически после этого в течение предварительно определенного интервала времени ~6 месяцев синовиальную жидкость аспирировали из каждого из суставов передней конечности, а также собирали периферическую кровь и мочу. Содержание eqIL-1Ra в биологических жидкостях 15 измеряли с помощью коммерчески доступных наборов для ИФА и интерпретировали по отношению к значениям до инъекции.

Несмотря на получение AAV в 3 сустава передней конечности никаких побочных эффектов не наблюдали в острой фазе или в любой временной точке во время протокола. В контрольных суставах, в которые вводили только жидкий носитель, eqIL-1Ra в синовиальной жидкости оставался на уровнях до инъекции (<1 нг/мл) в течение всего 20 времени (Фиг. 2B). В суставах, в которые вводили вирус, зависящие от дозы повышения eqIL-1Ra в синовиальной жидкости наблюдали в течение 2-4 недель после инъекции, при этом средние уровни варьировали от ~6 нг/мл при уровне 5×10^{10} vg до ~40 нг/мл при уровне 5×10^{12} vg. Пиковое продуцирование eqIL-1Ra происходило между 4 и 8 неделями после инъекции для оставшейся части исследования (Фиг. 2B). В отличие от почти 25 линейной связи между дозой вектора и экспрессией eqIL-1Ra, наблюдаемой в культуре, 100-кратное повышение дозы вектора по сравнению с исследуемым диапазоном *in vivo*, приводило лишь к ~10-кратному повышению экспрессии IL-1Ra. Более того, повышение дозы от 5×10^{11} до 5×10^{12} vg приводило лишь к повышению eqIL-1Ra в синовиальной жидкости в 1,5 раза. Таким образом, возможно, что эти значения соответствуют 30 максимуму или находится возле него.

Экспрессия трансгена AAV2.5 в здоровых суставах и суставах с ОА

Поскольку доза 5×10^{12} vg scAAV.eqIL-1Ra устойчиво обеспечивала наиболее высокое продуцирование eqIL-1Ra внутрисуставно, и, по-видимому, обоснованно была 35 безопасной ее выбирали для дальнейшей характеристики *in vivo*. С целью определения

влияния окружения ОА на локальное и системное распределение вектора AAV и трансдуцированные клеточные популяции, векторную конструкцию scAAV, содержащую кодирующую последовательность GFP, упаковывали в капсид AAV2.5. Затем 5×10^{12} vg scAAV.GFP инъецировали в один межзапястный сустав 3 здоровых лошадей и 3 лошадей с запущенным естественно возникающим ОА (Фиг. 3А-3В). Через две недели лошадей умерщвляли и ткани отбирали из инъецированных суставов и участков во всем организме.

Аналогично серотипам AAV, исследованным ранее, в каждом из здоровых суставов преобладающим участком экспрессии GFP была синовиальная оболочка. Исследование свежееотобранных образцов ткани показало избыток флуоресцентных клеток во всей выстилке суставной капсулы, которые часто концентрировались в более утолщенных ворсиначатых участках (Фиг. 3С-3D). Активность GFP были заметной в стружках суставного хряща, однако была слабой и ограниченной в разбросанных изолированных клетках (Фиг. 3G-3H). Значительно отличаясь от этого, активность GFP в синовиальной оболочке, пораженной ОА, была гораздо более высокой, чем в здоровых суставах. Эти образцы часто отличались блестящей флуоресценцией, даже при малом увеличении (Фиг. 3Е). Плотность флуоресцентных клеток была заметно более высокой вдоль всей синовиальной выстилки, однако особенно в участках с воспалением и синовитом (Фиг. 3F и 4А-4В). Аналогично здоровым суставам, флуоресцентные клетки были почти исключительно ограничены синовиальной оболочкой и субсиновальным слоем, и лишь редко наблюдались в поддерживающих фиброзных тканях.

Хрящевая ткань, пораженная ОА, характеризовалась наиболее выраженным усилением активности GFP, поскольку популяции ярко флуоресцирующих клеток были легко заметны во всех извлеченных стружках (Фиг. 3J-3K). Стружки, извлеченные возле эрозий во всей толще, часто содержали локальные участки интенсивной флуоресценции (Фиг. 3L и 4С-4D), а также часто содержали клетки с веретенообразной морфологией, что соответствовало дедифференцировке до фиброхондроцитов (20). Более высокое увеличение показало, что экспрессия GFP была заметной в большей части резидентной популяции хондроцитов, однако особенно выраженной в кластерах хондроцитов, характерных для хрящевой ткани, пораженной ОА (Фиг. 3М и 4Е-4G). Включения ярко флуоресцирующих клеток также были заметны на поверхностях остеофитов, извлеченных на границах суставов, пораженных ОА (Фиг. 3N и 4H).

Как в случае здоровых суставов, так и в случае суставов, пораженных ОА, в которые вводили вирус, синовиальная оболочка предплечевого запястного сустава запястья была единственной тканью за пределами межзапястного сустава, которая характеризовалась флуоресценцией. Несмотря на свое расположение непосредственно вблизи с участком

инъекции (Фиг. 2С), наблюдали лишь малочисленные флуоресцентные клетки, и только в нескольких извлеченных образцах (Фиг. 3О).

В связанном с этим наблюдение было обнаружено, что экспрессия GFP в стружках здоровой хрящевой ткани (едва различимой при извлечении) значительно повышалась через 48 часов после инкубации в культуре эксплантата, таким образом, что ярко флуоресцирующие клетки появлялись во всем матриксе в каждом образце (Фиг. 3И). Это свидетельствовало о том, что большой процент хондроцитов фактически был трансдуцирован вирусом *in situ*, однако не мог экспрессировать флуоресцентный репортерный белок выше видимого порогового уровня в контексте здорового сустава.

Биораспределение AAV2.5

С целью оценки эмиграции вектора AAV из сустава после внутрисуставной инъекции суммарную ДНК выделяли из образцов ткани и анализировали в отношении содержания векторных геномов с помощью количественной ПЦР. Как показано в Табл. 1, системное распределение векторных геномов главным образом находилось в соответствии с видимой активностью GFP. У всех животных ткани из суставов, в которые вводили вирус, характеризовались наибольшим содержанием векторных геномов. Несмотря на то, что имело место значительное варьирование между индивидуумами, в среднем, содержание векторной ДНК в синовиальной оболочке было в ~30-50 раз выше, чем в хрящевой ткани, при этом значимые различия между суставами, пораженными ОА, и нормальными суставами, отсутствовали. Определимое, но значимо более низкое содержание векторных геномов обнаруживали в синовиальной оболочке прилегающего предплечевого запястного сустава у лошадей из обеих групп. За пределами запястья одно животное из группы здоровых животных характеризовалось низким числом векторных геномов в печени; при этом печень и селезенка от одного животного в группе ОА также были положительными в отношении содержания векторов. В совокупности, как в условиях нормы, так и в условиях патологии > 99,7% выявленных векторных геномов AAV находились в тканях сустава. Эти результаты свидетельствовали о том, что вектор главным образом содержался в суставе, и, несмотря на то, что окружение ОА могло усиливать трансгенную экспрессию внутрисуставно, по-видимому, оно значительным образом не оказывало влияния на внесуставное рассредоточение векторов.

Таблица 1

Распределение геномов AAV.GFP после инъекции в межзапястный сустав здоровых лошадей и лошадей с естественно возникающим ОА

Значения обозначают копии векторного генома на микрограмм геномной ДНК и представляют собой средние значения из по меньшей мере трех повторностей $\pm$ SEM. Ткани и расположения приведены с отсылкой на инъецированный сустав. Н.о., не определено.

Ткань	Здоровые			ОА		
	Лошадь	Лошад	Лошад	Лошад	Лошад	Лошад
	1	ь 2	ь 3	ь 4	ь 5	ь 6
Синовиальная оболочка, межзапястный сустав	178,313 ± 559	66,022 ± 167	16,460 ± 114	212,262 ± 237	15,590 ± 280	142,033 ± 720
Хрящевая ткань, межзапястный сустав	3,349 $\pm$ 43	989 $\pm$ 109	1 726 $\pm$ 59	2 499 $\pm$ 69	887 $\pm$ 19	6 177 $\pm$ 55
Предплечевой запястный сустав	159 $\pm$ 86	202 $\pm$ 9	Н.о.	Н.о.	Н.о.	84 $\pm$ 16
Перисуставная мышечная ткань	Н.о.	Н.о.	Н.о.	Н.о.	Н.о.	Н.о.
Синовиальная оболочка контралатерального межзапястного сустава	Н.о.	Н.о.	Н.о.	Н.о.	Н.о.	Н.о.
Контралатеральная четырехглавная мышца	Н.о.	Н.о.	Н.о.	Н.о.	Н.о.	Н.о.
Ипсилатеральный МСР	Н.о.	Н.о.	Н.о.	Н.о.	Н.о.	Н.о.
Головной мозг	Н.о.	Н.о.	Н.о.	Н.о.	Н.о.	Н.о.
Сердце	Н.о.	Н.о.	Н.о.	Н.о.	Н.о.	Н.о.
Печень	Н.о.	Н.о.	45 $\pm$ 5	380 $\pm$ 15	Н.о.	Н.о.
Легкое	Н.о.	Н.о.	Н.о.	Н.о.	Н.о.	Н.о.
Селезенка	Н.о.	Н.о.	Н.о.	277 $\pm$ 64	Н.о.	Н.о.

5

Исследования, описанные в данном примере, показали, что в крупном суставе млекопитающих генетически модифицированные клетки могут поддерживать повышенные уровни синтеза белка в течение 6 месяцев. Суставные патологии, такие как острая травма или хроническое эрозивное заболевание, могли приводить к значительному повышению вирусной трансдукции и экспрессии трансгенов. Более того, как в здоровых, так и в пораженных суставах большая часть векторной ДНК сохранялась в тканях сустава, и локальное сверхпродуцирование IL-1Ra в кровотоке не выявляли. На основании этих данных можно предположить, что генетически модифицированные клетки могут поддерживать повышенные уровни синтеза белка в течение более чем 6 месяцев (например, до 1 года, до 2 лет, до 5 лет или до 10 лет).

10

15

Преимущества в отношении лошадиной модели

Локальный AAV-опосредованный перенос генов исследовали ранее в суставах человека в связи с лечением ревматоидного артрита (26) и он вошел в исследование II фазы (27). К сожалению, измерение трансгенного белка (антагониста фактора некроза опухоли α), продуцируемого в суставах, не было частью протокола, и какая-либо информация касательно уровня и продолжительности экспрессии трансгенов, достигаемой в суставах человека, отсутствует. В то же время, учитывая его связь с терапевтической эффективностью, эта информация будет определяющей для эффективного клинического применения.

С этой целью применение лошадиной системы оказалось особенно информативным, обеспечивая возможность вектора AAV переносить гены, подлежащие исследованию в масштабе, соответствующему лечению у человека, и в контексте естественно возникающего ОА. Возможность последовательно аспирировать синовиальную жидкость обеспечивает прямую количественную оценку внутрисуставной экспрессии трансгена и получение информативных фармакокинетических профилей. Помимо этого, применение аутбредных животных, их варьирующие ответы на остеохондральное повреждение, свойственные различия в поведении и способность к заживлению обеспечивают адекватную имитацию вариабельность, ассоциированной с лечением людей в клинических условиях.

Паттерны экспрессии генов

Значительно более высокую экспрессию репортера GFP наблюдали в связи с клеточными и морфологическими изменениями в суставе, характерными для запущенного ОА. В синовиальной оболочке хроническая воспалительная стимуляция индуцирует гиперплазию, ангиогенез, лейкоцитарную инфильтрацию и фиброзное утолщение. В то время как AAV-опосредованная экспрессия GFP, по-видимому, была стабильно выше в синовиальной оболочке суставов, пораженных ОА, флуоресценция была особенно выраженной в участках синовиита, в которых повышенная насыщенность клетками способствовала повышению плотности целевых клеток, восприимчивых к трансдукции AAV.

Наиболее примечательное повышение экспрессии GFP в суставах, пораженных ОА, происходило в суставном хряще. При полном контрасте с хрящевой тканью из здоровых суставов, где GFP+ клетки встречались крайне редко, а флуоресценция была едва заметной, избыток ярко флуоресцирующих клеток наблюдали во всех стружках, извлеченных из суставов, пораженных ОА, при этом наиболее выраженные повышения

наблюдались в участках с явными признаками эрозии. Несмотря на то, что утрата целостности матрикса, по-видимому, облегчала проникновение и диффузию векторных частиц в хрящевой ткани, пораженной ОА, данные настоящего исследования свидетельствуют о том, что значительная часть повышенной экспрессии трансгенов в хрящевой ткани (и синовиальной оболочке) возникает в результате воспалительной и индуцированной стрессом активации немедленно-раннего промотора цитомегаловируса (CMV).

Хондроциты в здоровой хрящевой ткани главным образом существуют в ненарушенном покоем состоянии. При ОА разрушение хрящевого матрикса уменьшает его защитные свойства, вызывая избыточную механическую нагрузку на локальные хондроциты. Такие аномальные усилия приводят к стимуляции передачи сигнала от ядерного фактора κB (NF- κB) и индуцированных стрессом митоген-активируемых протеинкиназ (МАРК), что направляет метаболизм в нормальных условиях покоящихся хондроцитов в высокоактивное состояние. Активированные хондроциты претерпевают заметное изменение фенотипа; они становятся пролиферативными, секретируют высокие уровни воспалительных цитокинов и высвобождают протеолитические ферменты, которые дополнительно разрушают локальный матрикс. Несмотря на то, что немедленно-ранний промотор CMV в целом считается конститутивным промотором высокого уровня, транскрипция из этого элемента, как известно, является восприимчивой к NF- κB , а также передаче сигнала от p38 и других активируемым стрессом протеинкиназ. В нативном вирусе вовлечение этих путей требуется для активации немедленно-раннего промотора CMV и инициации репликации вируса. Аналогичным образом, воспаление и клеточный стресс может значительно повышать экспрессию трансгенов под его контролем (40, 43-45). В этом отношении хрящевая ткань, пораженная ОА, является обогащенной активированными стрессом хондроцитами, которые населяют участки эрозии с высокой плотностью. Экспрессия GFP также была выраженной в участках пролиферации хондроцитов и образования кластеров, а также на поверхностях остеофитов, которые возникают в результате устойчивой активации костно-хрящевых предшественников при переходе от хрящевой ткани в синовиальную оболочку. Выраженную активацию экспрессии GFP также наблюдали в стружках хрящевой ткани из здоровых суставов после инкубации в культуре эксплантата. Поскольку дополнительно вектора к указанным стружкам не добавляли, такая индукция возникала вследствие векторной ДНК, уже присутствующей в хондроцитах. Таким образом, это должно отражать значительное повышение метаболической и

транскрипционной активности в трансдуцированных хондроцитах в результате стресса на фоне извлечения и/или изменения условий роста.

Таким образом, несмотря на то, что в ряде отчетов описано получение синтетических индуцируемых воспалением промоторных систем для областей применения генной терапии, немедленно-ранний промотор CMV по меньшей мере в контексте ОА и крупного сустава млекопитающих, по-видимому, естественным образом регулируется заболеванием. Кроме того, региональные отличия экспрессии GFP, наблюдаемые в хрящевой ткани, пораженной ОА, указывают на перспективу вектора AAV и экспрессионной кассеты, управляемой промотором CMV, предпочтительно направлять экспрессию в области суставного хряща, находящиеся в условиях наибольшего патологического стресса. Это закладывает основу для разработки направленных хондропротекторных и регенеративных стратегий.

В совокупности данные из указанного исследования продемонстрировали, что scAAV может обеспечивать длительную экспрессию гомологического терапевтического трансгена в крупном суставе млекопитающих. Кроме того, доставка генов, по-видимому, является значительно более эффективной в контексте ОА, способствуя повышенной экспрессии в тканях синовиальной оболочки и в суставном хряще.

Пример 2: scAAV-опосредованная доставка гена IL-1Ra для лечения остеоартрита: фармакокинетика и эффективность в лошадиной модели

В данном примере описана доставка eqIL-1Ra с помощью гAAV в лошадиной модели ОА с остеохондральным фрагментом (OCF). Данные показывают, что генная терапия с помощью рекомбинантного AAV может обеспечивать эффективную доставку антиартрических белков в суставах человеческого размера. В отличие от любого существующего лечения ОА, данный подход характеризуется способностью блокировать болевые симптомы и эрозивное прогрессирование заболевания.

Животные, используемые в исследовании

Животных, используемых в данном исследовании, жертвовали Университету Флориды, или приобретали на местных фермах и в учебно-тренировочных центрах. Для исследования эффективности в модели OCF специалистам по работе и оценке животных предоставляли обезличенную информацию касательно распределения в группы обработки. Одну лошадь, изначально распределенную в группу *Обработанные* умерщвляли в середине протокола эксперимента в связи с пневмонией, возникшей в

результате осложнений во время восстановления после анестезии. Это животное затем заменяли для восполнения количества субъектов, необходимых для статистического анализа. Конечные точки для каждого параметра исследований предварительно определяли, как описано ниже. Все представленные данные сформированы на основе 10 животных из группы *Обработанные* и 10 животных из группы *Контроль*, которые завершили протокол эксперимента; никаких животных из анализа данных не исключали. Обсуждение выпадающих точек данных четко описано в текстовом документе и на фигурах. Все процедуры с животными осуществляли в соответствии как с Руководством по содержанию и использованию лабораторных животных NIH, так и Институциональным комитетом по уходу за животными и их использованию Университета Флориды. Если не указано иное, то лошадей содержали в группах в больших открытых загонах для лошадей при полном доступе к передвижению.

Конструирование и получение векторов AAV

С целью сведения к минимуму иммунного распознавания продукта трансгена IL-1Ra и создания фармакокинетического профиля переноса гомологического гена IL-1Ra с помощью вектора AAV последовательности ДНК, кодирующие лошадиный ортолог IL-1Ra, использовали в качестве терапевтического репортера. С целью сведения к максимуму экспрессии трансгенного белка нативную кДНК eqIL-1Ra (57, 58) кодон-модифицировали (16) (GeneArt) и консенсусную последовательность Козак (17) вставляли непосредственно выше кодона инициации трансляции (Фиг. 1). В указанной конструкции экспрессия трансгена управляется немедленно-ранним промотором/энхансером CMV (30). Векторы AAV упаковывали в капсид AAV2.5 (18, 19) в отделе векторов Университета Флориды или отделе векторов Университета Северной Каролины в Чапел-Хилл с помощью способов, описанных ранее (7).

ИФА для определения IL-1 β , IL-1Ra и PGE₂ лошади

Уровни IL-1Ra лошади (R&D Systems), PGE₂ (R&D Systems) и IL-1 β лошади (GenWay) анализировали с помощью специфического ИФА. Образцы синовиальной жидкости из суставов как группы *Обработанные*, так и группы *Контроль* разводили 1:1 забуференным солевым раствором, содержащим гиалуронидазу при 50 ЕД/мл, и инкубировали при 37°C в течение 30 минут до измерения содержания белка. Двукратные серийные разведения в разведенных реагентом (R&D Systems) образцах сыворотки крови и синовиальной жидкости получали в широком диапазоне с целью обеспечения вариабельности результатов анализа. Каждую серию разведений выполняли в двух повторностях и каждый разведенный образец анализировали в лунках в трех повторностях.

Средние значения рассчитывали на основе считываний с границами стандартных кривых соответствующих анализов.

5 *Исследование эффективности в модели OCF*

Двадцать чистокровных лошадей в возрасте от 2 до 9 лет разного пола использовали для данной фазы исследования. Животные были здоровые, с отсутствием хромоты или рентгенологических признаков заболевания запястных суставов. Перед индукцией модели заболевания лошадей тренировали на беговой дорожке 5 дней/неделя в течение 3
10 недель. В каждый день тренировок лошадей заставляли бежать рысью (4-5 м/сек) в течение 2 минут, галопом (~9 м/сек) в течение 2 минут и снова рысью в течение 2 минут. Перед последующим использованием животных случайным образом распределяли на равные группы *Обработанные* и *Контроль*.

После тренировки на беговой дорожке в условиях общей анестезии выполняли
15 артроскопическое исследование билатерально в обоих межзапястных суставах. Во время процедуры в одном случайным образом распределенном суставе выполняли 8 мм остеохондральное повреждение медиально от лучевой запястной кости с помощью остеома, выравненного перпендикулярно суставной поверхности (14). Указанный фрагмент оставляли прикрепленным к капсулярным тканям. С целью имитации
20 естественного повреждения (59) выполняли хирургическое очищение исходной кости (14). Контралатеральный сустав у каждой лошади выступал в качестве имитационного функционирующего внутреннего контроля. Всех лошадей содержали в конюшне в течение 7 дней после операции и предоставляли соответствующую ветеринарную помощь.

Через две недели после хирургического вмешательства после хирургической
25 дезинфекции суставов передней конечности сустав с OCF лошадей, распределенных в группу *Обработанные*, получал инъекцию 5×10^{12} vg scAAV.eqIL-1Ra, суспендированного в растворе Рингера с лактатом в суммарном объеме 5 мл. Лошади в группе *Контроль* получали 5 мл раствора Рингера с лактатом без вируса. Через неделю после инъекции лошадей возвращали к 5 дневной/неделя программе тренировок на
30 беговой дорожке, описанной выше, в течение 10 недель. Во время тренировок лошадям проводили еженедельные исследования и оценки хромоты. В конце 10-недельного периода тренировок выполняли окончательное артроскопическое исследование на обоих межзапястных суставах. Указанный фрагмент удаляли и повреждение в исходной кости очищали хирургическим путем и восстанавливали. После выздоровления животных
35 возвращали в стадо для исследования. Во время артроскопических процедур собирали

артроскопические изображения. Рентгенологические и MR изображения выполняли непосредственно перед артроскопическими процедурами и до лечения на неделе 0. Каждую вторую неделю в течение всего протокола собирали периферическую кровь и мочу и аспирировали синовиальную жидкость из обоих межзапястных суставов.

5

Оценка хромоты

Хромоту передних конечностей оценивали еженедельно в течение 10 недель после функционального периода тренировок на беговой дорожке как с помощью субъективных, так и с помощью объективных способов. Субъективные визуальные оценки хромоты выполняли с участием двух квалифицированных специалистов по оценке, которым подходящим образом предоставляли обезличенную информацию, с участием лошадей на беговой дорожке во время ходьбы и бега рысью (~4 м/сек) в соответствии с руководствами Американской ассоциации практикующих иппологов. Система балльной оценки была следующей: 0, хромота незаметна; 1, хромоту сложно заметить и она незаметна на постоянной основе; 2, хромоту сложно заметить при ходьбе или при беге рысью по прямой линии, но она заметна при определенных обстоятельствах; 3, хромота заметна на постоянной основе при беге рысью при всех обстоятельствах; 4, хромота заметна при ходьбе; 5, хромота приводит к минимальной весовой нагрузке при движении и/или в покое или полной неспособности двигаться.

С целью объективной оценки походки использовали систему анализа инерционного датчика движения Lameness Locator® (Lameness Locator®; Equinosis), которую разработали специально для определения и оценки хромоты у лошадей (22, 23). Для каждого еженедельного сеанса выполняли по меньшей мере 3 измерения при скорости бега рысью на беговой дорожке ~4 м/сек. Каждое измерение рассчитывали исходя из минимум 30 непрерывных шагов. Хромоту рассчитывали в виде суммы векторов с использованием средней максимальной высоты головы (HDmax) и средней минимальной высоты головы (HDmin) между левыми и правыми шагами для каждого шага в каждом измерении (22, 23). HDmax представляет собой разницу максимального положения головы, которое образуется после возвращения правой передней конечности в исходное положение и такового, которое образуется после возвращения левой передней конечности в исходное положение. HDmin представляет собой разницу минимальной высоты головы, которая образуется во время возвращения правой передней конечности в исходное положение и таковой, которая образуется во время возвращения левой передней

конечности в исходное положение. Для каждой сессии средние значения HDmax и HDmin из по меньшей мере 3 измерений использовали для расчета суммы векторов (VS) следующим образом:

$$VS = \sqrt{HD_{\max}^2 + HD_{\min}^2} \quad (22, 23)$$

5

Как в случае субъективных, так и в случае объективных оценок значения хромоты на неделе 1 использовали в качестве исходных уровней для каждой лошади. Последующие измерения для каждой лошади рассчитывали в виде процента изменения по отношению к исходному уровню.

10

MR визуализация и оценка

MR исследования обоих запястий выполняли с помощью высокопольного блока Toshiba Titan (Япония) 1.5 Tesla. Под общей анестезией животных помещали в лежащее положение на левый бок, при этом каждое запястье находилось в частичном сгибании (15-
25 градусов) в квадратурной приемно-передающей коленной катушке (QD Knee). MR катушку и последовательности выбирали и модифицировали таким образом, чтобы они были клинически применимы у живых лошадей (24), и включали в себя сагиттальную и аксиальную протонную плотность (PD), дорсальное T2-взвешенное, аксиальное T2 сокращенное тау-инверсное восстановление (STIR), сагиттальную протонную плотность с подавлением сигнала от жировой ткани (PD-FS) и сагиттальное градиентное эхо с очищением с подавлением сигнала от жировой ткани (SPGR-FS). Суммарное время обнаружения составляло примерно один час и двадцать минут для всех последовательностей в обеих конечностях. MR изображения для каждой лошади исследовали с участием трех специалистов по оценке, которым предоставляли
25 обезличенную информацию касательно распределения в группы обработки. После описания изображения из 6 MR последовательностей для каждого межзапястного сустава и временной точки индексы определяли для преобладающих патологий, ассоциированных с моделью, в том числе выпота синовиальной жидкости, синовиальной пролиферации, тяжести остеохондрального повреждения, повреждения суставного хряща, отека костного
30 мозга в лучевой запястной кости, склероза лучевой запястной кости и третьей кости запястья, отека суставной капсулы и капсулярного фиброза, с помощью шкалы от 0 до 10, где 0 означал норму и 10 означало тяжелую патологию (60, 61). Оценку проводили на основе вовлечения только межзапястного сустава. Конечные индексы для каждой патологии представляют собой средние значения от 3 специалистов по оценке.

Суммарные индексы MR патологии определяли исходя из суммы отдельных патологий (60, 61).

Артроскопическая оценка

5 Оба межзапястных сустава лошадей в группах *Обработанные* и *Контроль* исследовали и визуализировали артроскопически после образования остеохондрального повреждения и повторно в конечной точке протокола эксперимента. Цифровые изображения, собранные во время процедур, оценивали в баллах с участием трех специалистов по оценке, которым предоставляли обезличенную информацию касательно

10 размера повреждения и степени репарации фрагмента, интеграции пограничной зоны нарушения окружающей хрящевой ткани, внешнего вида поверхностного хряща в целом и внешнего вида синовиальной оболочки и связок. На основании критериев Dymock et al. (62) использовали систему оценивания от 0 до 10, где 0 означал норму, а 10 означало тяжелую патологию.

15

Гистологическое исследование

Остеохондральный фрагмент и ткань синовиальной оболочки, удаленные во время артроскопии в конечной точке, фиксировали в параформальдегиде, декальцифицировали и заключали в парафин. Последовательные срезы толщиной 5 мкм помещали на

20 заряженные микроскопические препараты, депарафинировали, регидратировали и блокировали в 3% смеси пероксид/метанол в течение 10 минут при комнатной температуре. Чередующиеся срезы в участках, представляющих интерес, окрашивали гематоксилином и эозином (H&E) и толуидином синим соответственно. Серии срезов анализировали и классифицировали с участием двух специалистов по оценке, которым

25 предоставляли обезличенную информацию, с помощью системы классификации, адаптированной на основе McIlwraith et al. (63). Вкратце, целостность суставного хряща оценивали в баллах на основании признаков некроза хондроцитов, образования кластеров, фибрилляции и/или очаговой потери клеток. Синовиальную мембрану оценивали и классифицировали на основании признаков васкуляризации, гиперплазии интимы,

30 субинтимального отека и/или субинтимального фиброза. Лейкоцитарную инфильтрацию оценивали в баллах по той же самой шкале, что и значение воспаления. В конечном итоге, субхондральную кость и поверхность репарации оценивали в отношении качества матрикса, остеохондральных повреждений, ремоделирования костной ткани и остеохондрального расслоения. Суммарный индекс рассчитывали на основании суммы

35 отдельных индексов.

Измерение целенаправленно воздействующих на капсид нейтрализующих антител

Способы адаптировали на основании таковых, описанных Li et al. (64). Синовиальную жидкость переваривали гиалуронизадой, как описано для ИФА, а сыворотку крови инкубировали при 56°C в течение 30 минут для инактивации комплемента. С помощью бессывороточной среды получали ряд двукратных серийных разведений из предварительно приготовленной сыворотки крови или синовиальной жидкости. Разведенные образцы смешивали с $\sim 1 \times 10^9$ vg scAAV.eqIL-1Ra, упакованными в капсид AAV2.5 в суммарном объеме 250 мкл, и инкубировали в течение 1 часа при 37°C с целью связывания антител. Затем смеси добавляли в конфлюэнтные культуры синовиальных фибробластов лошади в 24-луночных планшетах, содержащих 250 мкл среды для культивирования (500 мкл/лунка суммарного объема). После инкубации в течение 48 часов при стандартных условиях культивирования кондиционированные среды собирали и анализировали в отношении содержания eqIL-1Ra с помощью ИФА. Титры NAb указывали в виде обратной величины от максимального разведения, способной снижать на 50% уровни eqIL-1Ra, продуцируемые клетками, инфицированными AAV.eqIL-1Ra, предварительно инкубированными, как описано выше, но без биологических жидкостей.

Статистический анализ

Анализы состояли из t-критериев Стьюдента для независимых выборок, ковариационного анализа t-критериев Стьюдента с индексами исходного уровня, выступающими в качестве ковариат, а также корреляционных анализов. В большинстве случаев использовали односторонние критерии, поскольку *a priori* выдвигали гипотезу о том, что лошади, получающие обработку scAAV.eqIL-1Ra, будут иметь более низкие средние значения на основе используемых диагностических оценок, тем самым указывая направление «хвоста». Схема эксперимента представляла собой схему с использованием двухвыборочных повторных измерений с использованием лошадей, случайным образом распределенных в группы обработки (*Обработанные* или *Контроль*). Данные анализировали с помощью t-критериев Стьюдента в нескольких независимых выборках. При ошибке I типа 0,05, 80% мощности и величине эффекта $d = 1,3$ (большой), в общей сложности в исследовании требовалось 20 лошадей для того, чтобы показать эффект обработки в любое время. Поскольку предполагали, что будут иметь место корреляции между измерениями исходного уровня и повторными измерениями, мощность

исследования превышала 80% с включением измерений исходного уровня в качестве ковариат.

Эффективность scAAV.eqIL-1Ra в модели ОА с остеохондральным фрагментом

5 С целью оценки функциональной возможности AAV-опосредованной экспрессии IL-1Ra использовали модель ОА с OCF, адаптированную на основе Frisbie et al. (14). Для этого исследования (представленного на диаграмме на Фиг. 5А) 20 здоровых чистокровных лошадей случайным образом распределяли на равные группы: *Обработанные* и *Контроль*. В одном межзапястном суставе каждого животного
10 выполняли 8 мм остеохондральное повреждение артроскопически в медиальной части лучевой запястной кости. Контралатеральный сустав параллельно артроскопически исследовали и он выступал в качестве имитационного функционирующего внутреннего контроля. Через две недели после хирургического вмешательства (0-й день исследования) в сустав с OCF лошадей в группе *Обработанные* вводили инъекцию 5×10^{12} vg
15 scAAV.eqIL-1Ra. Лошади в группе *Контроль* получали аналогичный объем инъекции солевого раствора. Через неделю (время, отводившееся для начала проявления трансгенной экспрессии IL-1Ra) лошадям устанавливали график спортивных тренировок в течение 10 недель, которые в контексте остеохондрального повреждения индуцируют патологии, соответствующие ранней стадии ОА.

20 В конце спортивных тренировок межзапястные суставы животных оценивали артроскопически и остеохондральный фрагмент и прилегающую синовиальную оболочку извлекали для анализа. Повреждение очищали хирургическим путем и восстанавливали, а после выздоровления животных возвращали в стадо для исследования.

Локальные и системные уровни eqIL-1Ra после внутрисуставной инъекции вектора

Измерение с помощью ИФА синовиальных жидкостей из суставов с OCF группы *Обработанные* характеризовалось значительным повышением содержания eqIL-1Ra в течение всего 12-недельного исследования. Достигая среднего уровня 214 нг/мл через две недели после инъекции, продуцирование eqIL-1Ra составляло в ~4 раза больше, чем при
30 измерении в здоровых суставах, в которые вводили ту же самую дозу вируса (Фиг. 5В). В течение протокола тренировок экспрессия eqIL-1Ra постепенно снижалась, и на неделе 12 составляла ~59 нг/мл, что было близко к экспрессии, наблюдаемой в нормальных суставах. В синовиальных жидкостях из суставов с OCF группы *Контроль*, а также из имитационных функционирующих суставов обеих групп IL-1Ra сохранялся на уровнях до
35 обработки в течение исследования и не превышал 1 нг/мл. Несмотря на то, что средние

уровни eqIL-1Ra в суставах группы *Обработанные* характеризовались достаточно сглаженной динамикой, экспрессия у отдельных животных была высоковариабельной (Фиг. 5C), особенно в наиболее ранней временной точке, когда экспрессия характеризовалась более 230-кратным диапазоном варьирования более, а у одного животного превышала 930 нг/мл. В конце исследования значительная часть раннего варьирования исчезала, и диапазон варьирования сужался до ~30-кратного, при этом наиболее высокая экспрессия происходила при уровне 119 нг/мл.

С целью анализа утечки трансгенного белка из сустава в каждый момент времени измеряли содержание eqIL-1Ra в моче и сыворотке периферической крови. Уровень eqIL-1Ra в моче оставался устойчиво низким (< 3 нг/мл), при этом значимые различия между группами *Обработанные* и *Контроль* (Фиг. 5D) отсутствовали. Аналогичным образом, средний уровень eqIL-1Ra в сыворотке крови оставался менее 4 нг/мл для 9 из 10 лошадей в обеих группах (Фиг. 5E). До инъекции одна лошадь из каждой из групп *Обработанные* и *Контроль* характеризовалась уровнями eqIL-1Ra в сыворотке крови, которые превышали 100 нг/мл без очевидной причины (Фиг. 5F). Несмотря на то, что уровни циркулирующего eqIL-1Ra у этих животных впоследствии возрастали до >500 нг/мл, не наблюдали никакого сопутствующего повышения eqIL-1Ra в синовиальной жидкости сустава с OCF лошади из группы *Контроль*, или в имитационных функционирующих суставах этой или иной лошади, также уровень eqIL-1Ra у каждой устойчиво оставался на уровне ниже 1 нг/мл. Уровень эндогенного IL-1 в синовиальных жидкостях оставался ниже уровня детекции (16 пг/мл) во всех биологических жидкостях в течение всего исследования. Эти результаты свидетельствовали о том, что при указанных условиях обработки трансгенная экспрессия eqIL-1Ra функционально ограничена суставом и не повышает уровни IL-1Ra системно. В отличие от этого, повышения eqIL-1Ra в сыворотке крови в 200 раз выше нормы не оказывали заметного эффекта на содержание eqIL-1Ra в синовиальных жидкостях.

В подтверждение результатов других авторов (21), повышение средних уровней нейтрализующих антител к AAV2.5 (NAb) со временем наблюдали как в сыворотке крови, так и в синовиальной жидкости лошадей, получавших вектор (Фиг. 5G). Титр NAb в синовиальных жидкостях суставов, в которые вводили вектор, был устойчиво выше, чем в крови. В жидкостях животных группы *Контроль* никаких NAb не выявляли в какой-либо момент времени.

Снижение хромоты, ассоциированное с обработкой scAAV.eqIL-1Ra

С целью оценки влияния обработки на суставную боль хромоту передней конечности оценивали с помощью индекса хромоты и с помощью анализа движения с использованием беспроводной детекции прикрепленных инерционных датчиков (22, 23). Хромоту откладывали на графике в зависимости от времени в виде среднего процента по отношению к началу тренировок на неделе 1 после инъекции. По отношению к группе *Контроль*, животные в группе *Обработанные* характеризовались постепенным, но прогрессивным снижением хромоты, определяемой с помощью обоих способов, которое достигало пика при 36% ($P = 0,03$) улучшении на неделе 10 на основании визуальной оценки (Фиг. 6А, левая панель) и 40% ($P = 0,04$) улучшении на неделях 10 и 11 на основании анализа движения (Фиг. 6А, правая панель). В соответствии со снижением суставной боли на основании этих функциональных показателей, измерение содержания простагландина E_2 (PGE_2) в жидкостях суставной оболочки характеризовалось >50% снижением в группе *Обработанные* по сравнению с группой *Контроль*, начиная с недели 4 до завершения протокола (Фиг. 6В).

Доставка scAAV.eqIL-1Ra повышает репарацию острого остеохондрального повреждения

Рентгенологические нарушения наблюдали во всех суставах с OCF через две недели после хирургического вмешательства и в конечной точке; однако анатомическая сложность запястного сустава в сочетании с вариабельностью положений между сессиями визуализаций не позволяла проводить однородные временные сравнения у лошадей. Магнитно-резонансные (MR) изображения, получаемые в одни и те же временные точки, обеспечивали более четкое представление об изменениях в патологии суставов, ассоциированных с каждым остеохондральным повреждением, способствуя сравнению индексов до обработки и в конечной точке через 12-недельный интервал для каждого индивидуума (24). Во всех случаях изменения MR изображений главным образом обнаруживали медиально, вблизи хирургическим образом полученной трещины (Фиг. 7А). Через две недели после повреждения четко определяемый сигнал высокой интенсивности определял границы каждого фрагмента в лучевой запястной кости и сопровождался в варьирующей степени в суставах с OCF повышенной плотностью прилегающей костной ткани, региональным накоплением жидкости в костном мозге (отек костного мозга), суставным выпотом, синовиальной гиперплазией, а также фиброзной экспансией и отеком суставной капсулы. С помощью предварительно определенных индексов (неделя 0) для этих патологий в качестве исходных уровней для каждой лошади

выполняли ковариационный анализ с использованием MR изображений, полученных в конечной точке, с целью оценки эффектов обработки на морфологию суставов. Как отражено на Фиг. 7А-7В, обе группы характеризовались эквивалентными изменениями суставной капсулы, с аналогичным снижением капсулярного отека и повышением фиброзного уплотнения, что связывали главным образом с артроскопической процедурой и инфузией жидкости и в меньшей степени с остеохондральным повреждением. В соответствии с противовоспалительными свойствами IL-1Ra, вводимого внутрисуставно, суставы с OCF в группе *Обработанные* характеризовались значимо сниженным суставным выпотом (34%, $P = 0,008$) и синовиальной пролиферацией (27%, $P = 0,008$) по сравнению с группой *Контроль* (Фиг. 7В). Группа *Обработанные* также характеризовалась 32% ($P = 0,01$) повышением репарации перелома и 36% ($P = 0,02$) снижением отека костного мозга. Среди основных патологий, индуцируемых OCF, суставы в группе *Обработанные* характеризовались 25% ($P = 0,001$) снижением суммарного индекса патологии по сравнению с группой *Контроль* (Фиг. 7В).

Артроскопические изображения, выполненные во время получения OCF и в конечной точке (непосредственно до хирургической репарации фрагмента), также были предоставлены в обезличенной форме для оценки патологий. Ковариантный анализ выполняли с использованием индексов до лечения (неделя -2) в качестве исходного уровня (Фиг. 8А-8В). Как изображено на Фиг. 8А, эти результаты главным образом соответствовали результатам, полученным на основании MR изображений. Животные в группе *Обработанные* характеризовались значимым повышением репарации остеохондрального повреждения (29%, $P = 0,03$) и суставного хряща, прилегающего к трещине (17%, $P = 0,02$). Несмотря на наличие тенденций к улучшению суммарных индексов для хрящевой ткани и нормализации воспаления связок, они не достигали статистической значимости в индивидуальном отношении. В то же время в совокупности среди всех патологических параметров суставы с OCF в группе *Обработанные* характеризовались 24% ($P = 0,04$) улучшением суммарных индексов артроскопической патологии (Фиг. 8А). В соответствии с этими данными, у 8/10 лошадей в группе *Обработанные* остеохондральные повреждения восстанавливались до степени, в которой требовалось извлечение изначально полученного фрагмента с помощью медицинского долота. В отличие от этого, у 7/10 лошадей в группе *Контроль*, репарированная ткань была губчатой и мягкой во время испытания твердости вдавливанием, и фрагмент легко удаляли с помощью артроскопического пинцета.

Гистологическое исследование извлеченных фрагментов и прилегающих тканей синовиальной оболочки характеризовалось значимыми различиями качества

репарированной ткани на границе с повреждением с OCF (Фиг. 8B-8C). В соответствии с результатами артроскопии и MRI, в группе *Обработанные* костная ткань на поверхности раздела выглядела более зрелой, с более высокой минерализацией и образованием ламеллярной костной ткани с определяемыми остеонами (Фиг. 8D). Репарированная

5 ткань в группе *Контроль* главным образом состояла из первичной незрелой костной ткани. Несмотря на то, что имела место тенденция к улучшению хрящевой ткани, индексы немного выходили за пределы диапазона статистической значимости ($P = 0,06$). Также наблюдали умеренные снижения средних индексов синовиальной инфильтрации и фиброза, однако они также не были статистически значимыми. На основании

10 оцениваемых критериев суставы группы *Обработанные* характеризовались 24% ($P = 0,003$) нормализацией общего индекса патологии по сравнению с необработанной группой *Контроль* (Фиг. 8C).

Ассоциация между уровнями eqIL-1Ra и суставной патологией

15 Наблюдая повышенную активность GFP в суставах лошадей с естественно возникающим ОА (см., Пример 1), изучали ассоциацию между экспрессией eqIL-1Ra в суставах с OCF группы *Обработанные* и тяжестью суставной патологии во время инъекции. Проводя сравнение у каждого животного суммарных индексов MRI на неделе 0 с пиковыми уровнями eqIL-1Ra в синовиальной жидкости на неделе 2 после инъекции

20 (Фиг. 9А, *левая панель*) и средними уровнями eqIL-1Ra во время 10-недельного исследования (Фиг. 9А, *правая панель*) у всех 10 лошадей значимой корреляции не отмечали. В то же время, если лошадь с экспрессией eqIL-1Ra 930 нг/мл на неделе 2 рассматривали в качестве резкого отклоняющегося значения, то высокую прямую корреляцию обнаруживали между суставной патологией при инъекции и уровнем eqIL-

25 1Ra, продуцируемого на неделе 2 ($r = 0,80$, $P = 0,01$), а также средними уровнями eqIL-1Ra во всех временных точках ($r = 0,69$, $P = 0,03$). Таким образом, для 90% животных имела место значимая прямая ассоциация между суставной патологией во время обработки и количеством трансгенного IL-1Ra, продуцируемого в суставе.

Интересным является то, что в суставах с OCF группы *Обработанные* средние

30 уровни IL-1Ra в синовиальной жидкости в течение 10-недельного исследования варьировали от ~6 до 159 нг/мл, при этом значимой корреляции с терапевтическим эффектом не наблюдали. График суммарных индексов MRI каждой лошади непосредственно перед инъекцией в зависимости от таковых в конечной точке иллюстрировал эффект обработки AAV.eqIL-1Ra по сравнению с солевым раствором

35 (Фиг. 9B). С помощью формул для линий наибольшего соответствия для групп

Обработанные и *Контроль*, устойчивое 24-25% улучшение с использованием scAAV.eqIL-1Ra оценивали независимо от исходной патологии. Учитывая, что животные с наихудшими индексами суммарной патологии в целом продуцировали наиболее высокие уровни eqIL-1Ra (Фиг. 9А), довольно устойчивый эффект обработки наблюдали у
 5 всех животных группы *Обработанные* независимо от конкретного количества продуцируемого IL-1Ra. Принимая во внимание вариабельность экспрессии трансгенов среди животных (Фиг. 5А-5G и 9А), эти данные свидетельствуют о том, что для каждого животного уровень IL-1Ra, продуцируемого в каждом из суставов, получающих scAAV.eqIL-1Ra, достигал максимального уровня эффективности в указанной модельной
 10 системе.

Эти исследования показали, что в крупном суставе млекопитающих прямая внутрисуставная AAV-опосредованная доставка генов может приводить к повышению уровней устойчивого состояния секретируемого гомологичного терапевтического продукта гена (IL-1Ra) в синовиальных жидкостях более чем в 50 раз по сравнению с
 15 эндогенным фоновым значением. Несмотря на вариабельную экспрессию среди суставов группы *Обработанные* в контексте острого остеохондрального повреждения, длительное повышение IL-1Ra обеспечивало значительный положительный эффект таким образом, что однократное введение AAV.IL-1Ra через две недели после повреждения приводило к снижению суставной боли и внутрисуставного воспаления и повышало эндогенную
 20 репарацию поврежденной костной ткани и прилегающей хрящевой ткани.

В совокупности эти данные продемонстрировали, что AAV может обеспечивать длительную терапевтически релевантную экспрессию IL-1Ra в суставах, пропорциональных по размеру человеческому колену, и при применении вскоре после повреждения могут оказывать защитное действие от симптоматического развития острой
 25 модели пред-ОА. Кроме того, никакого побочного эффекта на вектор или трансген не наблюдали, и по меньшей мере в лошадиной системе внутрисуставная экспрессия IL-1Ra обеспечивала отсутствие видимого риска системной иммуносупрессии.

Аналогично отчету Ishihara et al. (21), наблюдали повышение титра NAb после доставки вектора, как в синовиальной жидкости, так и в сыворотке крови. В то же время,
 30 учитывая видимую эффективность трансдукции суставных хондроцитов, которые, вероятно, представляют собой относительно стабильную клеточную популяцию, частое повторное введение векторов может не быть необходимым. Кроме того, поскольку титр первичных антител снижается, то циркулирующие NAb при более низком титре могут быть неспособны к ингибированию супра-физиологического болюса вирионов AAV,
 35 доставляемых внутрисуставно.

Паттерны экспрессии генов

Стандартные способы доставки лекарственных препаратов обеспечивают практикующего врача приемлемой степенью контроля в том отношении, что определенную дозу можно вводить для достижения прогнозируемого эффекта. При современной системе понятий клетки суставных тканей генетически модифицируют с помощью рекомбинантного вируса с целью непрерывного синтеза и секреции антиартрического белка, IL-1Ra, в суставной щели и локальных тканях. В то же время, поскольку количество трансгенного IL-1Ra, продуцируемого в любое определенное время отражает совместный синтез модифицированных клеток, присутствующих в суставе, уровни могут значительно варьировать (как на внутрииндивидуальном уровне, так и на межиндивидуальном уровне) исходя из природы клеточных популяций, изначально модифицированных вирусом и обеспечивающих изменения в своем составе и метаболической активности.

В этом отношении данные настоящего исследования касательно сустава лошади показали, что патологический статус сустава во время лечения оказывает значительное прямое воздействие на экспрессию трансгенов. Доставка AAV.IL-1Ra в воспаленные суставы с острым остеохондральным повреждением приводила к ~5-кратному повышению средних уровней IL-1Ra по сравнению с уровнем, наблюдаемым в здоровых суставах. Несмотря на то, что уровень IL-1Ra в синовиальной жидкости находился в более чем 100-кратном диапазоне в суставах с OCF через две недели после обработки, у 9 из 10 животных имела место высокая прямая корреляция между уровнем патологии (суммарным индексом MRI) во время инъекции и последующим продуцированием IL-1Ra. В соответствии со снижением воспаления и заживлением трещины, повышенная экспрессия IL-1Ra аналогичным образом постепенно снижалась и в 12-недельной конечной точке достигала уровней, продуцируемых в нормальных суставах.

IL-1Ra в качестве терапевтического гена при ОА

В суставах, обработанных scAAV.eqIL-1Ra, наблюдали среднюю нормализацию патологии ~25% по отношению к группе *Контроль*. В соответствии с его ролью в качестве противовоспалительного средства (49), длительная сверхэкспрессия eqIL-1Ra приводила к повышению подвижности и снижению суставного выпота и синовита. Несмотря на то, что имел место защитный эффект в хряще, прилежащем к повреждению, эффект не распространялся на весь сустав. В данной острой модели повреждения дегенерация хрящевой ткани, дистальной по отношению к остеохондральному повреждению, была

умеренной, делая любые изменения, связанные с обработкой, сложными для выявления. В отношении способности этой обработки ингибировать эрозию хрящевой ткани, предполагается, что эффективность и безопасность локальной доставки scAAV.eqIL-1Ra в модели хронического ОА в течение 12-месячного временного отрезка показали бы, что

5 длительная экспрессия IL-1Ra приводит к более отдаленному хондропротекторному эффекту.

Интересным является то, что несмотря на снижение PGE₂ в синовиальной жидкости, группа *Обработанные* характеризовалась значимо повышенной репарацией остеохондральной трещины по сравнению с группой *Контроль*. Данный результат, по

10 видимому, находится в противоречии с литературными данными, указывающими на жизненно важные функции циклооксигеназы-2 и простагландинов в репарации трещин (50, 51). Однако эти молекулы главным образом способствуют острой воспалительной фазе заживления костной ткани, которая начинает завершаться через приблизительно 7-14

15 дней после повреждения, сменяясь репарационными процессами, связанными с клеточной дифференцировкой и синтезом матрикса (52). Несмотря на то, что острое воспаление требуется для инициации процесса репарации, хроническое воспаление может препятствовать активации пути с участием Wnt/ β -катенина и дифференцировке остеобластов, что ингибирует репарацию костной ткани (53, 54). Таким образом, в

20 результате введения вектора через две недели после хирургического вмешательства снижение передачи воспалительного сигнала в результате сверхэкспрессии IL-1Ra, вероятно, способствовало дифференцировке остеобластов во время фазы репарации, приводя к повышению заживления. В соответствующем порядке обработка AAV.IL-1Ra в аналогичном временном отрезке после повреждения сустава может обеспечивать терапевтические/профилактические эффекты при посттравматическом ОА, сочетая

25 снижение воспаления и усиление репарации тканей с перспективной последующей хондропротекцией.

Несмотря на внутрисуставную экспрессию IL-1Ra в широком диапазоне корреляцию между содержанием eqIL-1Ra в синовиальной жидкости и терапевтическим эффектом не наблюдали. Это связывали с механизмом действия IL-1Ra в качестве конкурентного

30 ингибитора рецептора IL-1 1 типа (4). Вследствие эффективности передачи сигнала с участием IL-1, IL-1Ra должен присутствовать в 100-1000-кратном избытке по сравнению с IL-1 для полного ингибирования его активности (55, 56). В суставах с OCF уровень IL-1 в синовиальной жидкости был ниже предела обнаружения (16 пг/мл). Таким образом, в большинстве обработанных суставов, IL-1Ra присутствовал в 6000-кратном избытке по

35 меньшей мере 400-кратном избытке в суставах с наименее низкой экспрессией.

Поскольку IL-1Ra не характеризуется каким-либо известным агонистическим эффектом (4), при доступности рецепторы IL-1 становятся занятыми, и дополнительное количество IL-1Ra может не обеспечивать дополнительного эффекта. Принимая во внимание эти аспекты, устойчивая ~24-25% нормализация патологии суставов, наблюдаемая в группе

5 *Обработанные*, по-видимому отражала максимальный эффект, достигаемый в данной модели заболевания при данном способе доставки IL-1Ra.

В целом эти данные свидетельствовали о том, что IL-1Ra является особенно пригодным для внутрисуставных видов генной терапии в случае ОА. Он не требует сложной регуляции, а только уровней синтеза выше терапевтического порога. При его

10 достижении сверхпродуцирование имеет незначительное видимое побочное последствие, и, тем самым, является устойчивым к широкому варьированию, ассоциированному с опосредованной вирусом доставкой генов *in vivo*. Данные указывают на то, что доставка гена IL-1Ra маловероятно приводит к излечению ОА, а только способна блокировать компонент передачи сигнала с участием IL-1 чрезвычайно сложного заболевания,

15 вовлекающего масштабные патологии и процессы, опосредованные на уровне тканей и организма. Тем не менее, поскольку IL-1 представляет собой первичный фактор, влияющий на воспалительный каскад, и играет важную роль во множестве эрозивных процессов при ОА, которые опосредованы на клеточном уровне, он имеет перспективу для обеспечения значительного полезного эффекта пациентам в широком спектре тяжести

20 заболеваний.

В совокупности данные указанного исследования показывают, что генная терапия с помощью рекомбинантного AAV может обеспечивать безопасную, длительную, эффективную доставку антиартрического белка в суставах человеческого размера. Более того, AAV.IL-1Ra, используемые вскоре после повреждения сустава, могут приводить к

25 снижению симптоматического развития в острой модели пред-ОА. В отличие от любого существующего лечения, данный подход характеризуется способностью блокировать болевые симптомы и эрозивное прогрессирование заболевания. На основании этих результатов можно сделать заключение, что AAV.IL-1Ra сочетает эффективность с подходящим уровнем безопасности, обеспечивая профиль, поддерживающий клиническое

30 исследование при ОА человека и лошади.

Пример 3: Получение кодон-модифицированной кДНК IL-1Ra человека

кДНК антагониста рецептора интерлейкина-1 человека (IL-1Ra), который

35 обеспечивал наиболее высокую экспрессию (секрецию) IL-1Ra из генетически

модифицированных клеток, получали с целью клинического применения в протоколе генной терапии. С этой целью нативную последовательность кДНК кодон-модифицировали с помощью алгоритмов оптимизации для человека от двух компаний, выполняющих синтез ДНК, GeneScript и GeneArt. Две модифицированные

5 последовательности IL-1Ra заказывали из GeneArt, с наличием и без наличия консенсусной последовательности Козак непосредственно выше сайта инициации трансляции. После получения синтетической кДНК все три направленно вставляли в сайты Sac II и Not I экспрессионной кассеты плазмиды pHpa-trs-SK, самокомплементарного (с двунитевой ДНК) варианта вектора AAV, сконструированного

10 на основе генома AAV2, и трансформировали в бактериальные клетки Sure II. В указанной конструкции экспрессия трансгена управлялась немедленно-ранним промотором/энхансером CMV. После проверки соответствующих вставок получали культуры из 3 новых конструкций в промышленных масштабах, а также две предварительно существующие конструкции на основе вектора scAAV, содержащие а)

15 нативную кДНК IL-1Ra человека, и б) кодирующую последовательность зеленого флуоресцентного белка (GFP). Плазмиды из каждой культуры выделяли и дважды очищали с помощью градиентов хлорида цезия. Концентрации каждого препарата ДНК определяли с помощью спектрофотометра и визуализации в агарозных гелях.

С целью определения относительной экспрессии белка IL-1Ra из каждой

20 конструкции эквивалентные количества каждой плазмиды трансфицировали в клетки НЕК 293 при ~70% конфлюентности. Примерно через 48 часов кондиционированную среду из каждой культуры извлекали и определяли содержание IL-1Ra человека с помощью ИФА с использованием коммерчески доступных наборов. На Фиг. 10 изображены средние уровни из трех трансфекций с использованием каждой плазмидной

25 конструкции. Как и предполагали, определяемого уровня IL-1Ra в культурах, получавших плазмиду scAAV.GFP, не наблюдали. Экспрессия IL-1Ra из 3 кодон-модифицированных кДНК превышала таковую из нативной последовательности в ~2-4 раза. В то время как экспрессия IL-1Ra из обеих конструкций, синтезированных GeneArt, превышала таковую от GeneScript, кДНК от GeneArt с консенсусной последовательностью

30 Козак обеспечивала наиболее высокую экспрессию IL-1Ra.

С целью подтверждения результатов, наблюдаемых в клетках 293 (Фиг. 10) в другой клеточной линии, равные количества векторных плазмид scAAV, содержащих кодон-модифицированные кДНК IL-1Ra от GeneArt (с наличием и без наличия лидерной последовательности Козак), трансфицировали в культуры клеток остеосаркомы человека

35 (OS) при ~75% конфлюентности. Параллельные культуры клеток OS трансфицировали

векторными плазмидами scAAV, содержащими кодирующие последовательности GFP или нативного IL-1Ra человека. Примерно через 48 часов кондиционированную среду из культур извлекали и определяли содержание IL-1Ra с помощью коммерчески доступного ИФА. На Фиг. 11 изображены средние уровни из трех трансфекций с использованием каждой плазмиды. Аналогично таковой, наблюдаемой в клетках 293 (Фиг. 10), экспрессия IL-1Ra человека из клеток OS, получавших модифицированные конструкции, была значительно выше, чем таковая из нативной последовательности человека, с модифицированной последовательностью с последовательностью Козак, приводя к образованию наиболее высоких уровней в целом.

С целью исследования уровня экспрессии модифицированной кДНК IL-1Ra человека в контексте опосредованной вирусом доставки генов векторные плазмиды scAAV, содержащие кодирующие последовательности а) GFP, б) нативного IL-1Ra человека, и с) кодон-модифицированную последовательность IL-1Ra человека с лидерной последовательность Козак от GeneArt (opt + K), упаковывали в капсид AAV2. Титры соответствующих вирусных препаратов определяли как с помощью ПЦР-, так и с помощью слот-блот-анализов. Культуры первичных синовиальных фибробластов человека инфицировали обоими вирусными препаратами IL-1Ra в диапазоне доз от 10^3 до 10^5 устойчивых к ДНКазе вирусных геномов (vg) на клетку. Параллельное инфицирование 10^5 vg/клетка scAAV.GFP использовали в качестве отрицательного контроля. Через 5 дней после инфекции среду, кондиционированную инфицированными культурами, извлекали и анализировали в отношении содержания IL-1Ra с помощью ИФА. Как изображено на Фиг. 12, клетки, инфицированные вектором на основе кодон-модифицированного IL-1Ra человека, продуцировали более высокие уровни трансгенной IL-1Ra человека при всех вирусных дозах.

На Фиг. 13 изображено выравнивание нативной кДНК IL-1Ra человека и кодон-модифицированной последовательности IL-1Ra, содержащей подчеркнутую последовательность Козак. Выравнивание показало, что в модификации изменяли 105 из 534 нуклеотидов в нативной последовательности кДНК IL-1Ra. Несмотря на то, что последовательность ДНК изменяли с целью повышения трансляции и экспрессии РНК IL-1Ra, аминокислотная последовательность транслированного белка была идентичной нативному белку.

Литературные источники

1. R. F. Loeser, S. R. Goldring, C. R. Scanzello, M. B. Goldring, Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ. *Arthritis Rheum* **64**, 1697-1707 (2012).

2. S. A. Olson, P. Horne, B. Furman, J. Huebner, M. Al-Rashid, V. B. Kraus, F. Guilak, The role of cytokines in posttraumatic arthritis. *J Am Acad Orthop Surg* **22** , 29-37 (2014).
3. M. Kapoor, J. Martel-Pelletier, D. Lajeunesse, J. P. Pelletier, H. Fahmi, Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* **7** , 33-42 (2011).
- 5 4. W. P. Arend, M. Malyak, C. J. Guthridge, C. Gabay, Interleukin-1 receptor antagonist: role in biology. *Annu Rev Immunol* **16** , 27-55 (1998).
5. X. Chevalier, P. Goupille, A. D. Beaulieu, F. X. Burch, W. G. Bensen, T. Conrozier, D. Loeuille, A. J. Kivitz, D. Silver, B. E. Appleton, Intraarticular injection of anakinra in osteoarthritis of the knee: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Arthritis Rheum* **61** , 344-352 (2009).
- 10 6. J. D. Kay, E. Gouze, T. J. Oligino, J. N. Gouze, R. S. Watson, P. P. Levings, M. L. Bush, A. Dacanay, D. M. Nickerson, P. D. Robbins, C. H. Evans, S. C. Ghivizzani, Intra-articular gene delivery and expression of interleukin-1Ra mediated by self-complementary adeno-associated virus. *J Gene Med* **11** , 605-614 (2009).
7. R. S. Watson, T. A. Broome, P. P. Levings, B. L. Rice, J. D. Kay, A. D. Smith, E. Gouze, J. N. Gouze, E. A. Dacanay, W. W. Hauswirth, D. M. Nickerson, M. J. Dark, P. T. Colahan, S. C. Ghivizzani, scAAV-mediated
- 15 gene transfer of interleukin-1-receptor antagonist to synovium and articular cartilage in large mammalian joints. *Gene Ther* **20** , 670-677 (2013).
8. C. H. Evans, S. C. Ghivizzani, P. D. Robbins, Arthritis gene therapy and its tortuous path into the clinic. *Transl Res* **161** , 205-216 (2013).
9. H. Madry, M. Cucchiaroni, Advances and challenges in gene-based approaches for osteoarthritis. *J Gene*
- 20 *Med* **15** , 343-355 (2013).
10. K. R. Vincent, B. P. Conrad, B. J. Fregly, H. K. Vincent, The pathophysiology of osteoarthritis: a mechanical perspective on the knee joint. *PMR* **4** , S3-9 (2012).
11. L. R. Goodrich, A. J. Nixon, Medical treatment of osteoarthritis in the horse - a review. *Vet J* **171** , 51-69 (2006).
- 25 12. D. M. McCarty, P. E. Monahan, R. J. Samulski, Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis. *Gene Ther* **8** , 1248-1254 (2001).
13. D. M. McCarty, H. Fu, P. E. Monahan, C. E. Toulson, P. Naik, R. J. Samulski, Adeno-associated virus terminal repeat (TR) mutant generates self-complementary vectors to overcome the rate-limiting step to transduction in vivo. *Gene Ther* **10** , 2112-2118 (2003).
- 30 14. D. D. Frisbie, S. C. Ghivizzani, P. D. Robbins, C. H. Evans, C. W. McIlwraith, Treatment of experimental equine osteoarthritis by in vivo delivery of the equine interleukin-1 receptor antagonist gene. *Gene Ther* **9** , 12-20 (2002).
15. E. Gouze, J. N. Gouze, G. D. Palmer, C. Pilapil, C. H. Evans, S. C. Ghivizzani, Transgene persistence and cell turnover in the diarthrodial joint: implications for gene therapy of chronic joint diseases. *Mol Ther* **15** , 1114-
- 35 1120 (2007).
16. S. Fath, A. P. Bauer, M. Liss, A. Priestersbach, B. Maertens, P. Hahn, C. Ludwig, F. Schäfer, M. Graf, R. Wagner, Multiparameter RNA and codon optimization: a standardized tool to assess and enhance autologous mammalian gene expression. *PLoS One* **6** , e17596 (2011).
17. M. Kozak, Interpreting cDNA sequences: some insights from studies on translation. *Mamm Genome* **7** ,
- 40 563-574 (1996).

18. C. Li, N. Diprimio, D. E. Bowles, M. L. Hirsch, P. E. Monahan, A. Asokan, J. Rabinowitz, M. Agbandje-McKenna, R. J. Samulski, Single Amino Acid Modification of Adeno-Associated Virus Capsid Changes Transduction and Humoral Immune Profiles. *J Virol* , (2012).
19. D. E. Bowles, S. W. McPhee, C. Li, S. J. Gray, J. J. Samulski, A. S. Camp, J. Li, B. Wang, P. E. Monahan,
5 J. E. Rabinowitz, J. C. Grieger, L. Govindasamy, M. Agbandje-McKenna, X. Xiao, R. J. Samulski, Phase 1 gene therapy for Duchenne muscular dystrophy using a translational optimized AAV vector. *Mol Ther* **20** , 443-455 (2012).
20. L. J. Sandell, T. Aigner, Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Res* **3** , 107-113 (2001).
- 10 21. A. Ishihara, J. S. Bartlett, A. L. Bertone, Inflammation and immune response of intra-articular serotype 2 adeno-associated virus or adenovirus vectors in a large animal model. *Arthritis* **2012** , 735472 (2012).
22. K. G. Keegan, C. G. MacAllister, D. A. Wilson, C. A. Gedon, J. Kramer, Y. Yonezawa, H. Maki, P. F. Pai, Comparison of an inertial sensor system with a stationary force plate for evaluation of horses with bilateral forelimb lameness. *Am J Vet Res* **73** , 368-374 (2012).
- 15 23. K. G. Keegan, D. A. Wilson, J. Kramer, S. K. Reed, Y. Yonezawa, H. Maki, P. F. Pai, M. A. Lopes, Comparison of a body-mounted inertial sensor system-based method with subjective evaluation for detection of lameness in horses. *Am J Vet Res* **74** , 17-24 (2013).
24. M. D. Winter, The basics of musculoskeletal magnetic resonance imaging: terminology, imaging sequences, image planes, and descriptions of basic pathologic change. *Vet Clin North Am Equine Pract* **28** , 599-
20 616 (2012).
25. L. R. Goodrich, J. N. Phillips, C. W. McIlwraith, S. B. Foti, J. C. Grieger, S. J. Gray, R. J. Samulski, Optimization of scAAVIL-1ra In Vitro and In Vivo to Deliver High Levels of Therapeutic Protein for Treatment of Osteoarthritis. *Mol Ther Nucleic Acids* **2** , e70 (2013).
26. P. J. Mease, K. Hobbs, A. Chalmers, H. El-Gabalawy, A. Bookman, E. Keystone, D. E. Furst, P.
25 Anklesaria, A. E. Heald, Local delivery of a recombinant adenoassociated vector containing a tumour necrosis factor alpha antagonist gene in inflammatory arthritis: a phase 1 dose-escalation safety and tolerability study. *Ann Rheum Dis* **68** , 1247-1254 (2009).
27. P. J. Mease, N. Wei, E. J. Fudman, A. J. Kivitz, J. Schechtman, R. G. Trapp, K. F. Hobbs, M. Greenwald, A. Hou, S. A. Bookbinder, G. E. Graham, C. W. Wiesenhutter, L. Willis, E. M. Ruderman, J. Z. Forstot, M. J.
30 Maricic, K. H. Dao, C. H. Pritchard, D. N. Fiske, F. X. Burch, H. M. Prupas, P. Anklesaria, A. E. Heald, Safety, tolerability, and clinical outcomes after intraarticular injection of a recombinant adeno-associated vector containing a tumor necrosis factor antagonist gene: results of a phase 1/2 Study. *J Rheumatol* **37** , 692-703 (2010).
28. C. R. Scanzello, S. R. Goldring, The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis. *Bone* **51** , 249-257 (2012).
- 35 29. R. Rollín, F. Marco, J. A. Jover, J. A. García-Asenjo, L. Rodríguez, L. López-Durán, B. Fernández-Gutiérrez, Early lymphocyte activation in the synovial microenvironment in patients with osteoarthritis: comparison with rheumatoid arthritis patients and healthy controls. *Rheumatol Int* **28** , 757-764 (2008).
30. E. V. Schmidt, G. Christoph, R. Zeller, P. Leder, The cytomegalovirus enhancer: a pan-active control element in transgenic mice. *Mol Cell Biol* **10** , 4406-4411 (1990).
- 40 31. R. Lane Smith, M. C. Trindade, T. Ikenoue, M. Mohtai, P. Das, D. R. Carter, S. B. Goodman, D. J. Schurman, Effects of shear stress on articular chondrocyte metabolism. *Biorheology* **37** , 95-107 (2000).
32. F. Berenbaum, Signaling transduction: target in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* **16** , 616-622 (2004).

33. C. J. Malemud, Protein kinases in chondrocyte signaling and osteoarthritis. *Clin Orthop Relat Res* , S145-151 (2004).
34. S. Rigoglou, A. G. Papavassiliou, The NF- κ B signalling pathway in osteoarthritis. *Int J Biochem Cell Biol* **45** , 2580-2584 (2013).
- 5 35. M. B. Goldring, K. B. Marcu, Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther* **11** , 224 (2009).
36. M. B. Goldring, Chondrogenesis, chondrocyte differentiation, and articular cartilage metabolism in health and osteoarthritis. *Ther Adv Musculoskelet Dis* **4** , 269-285 (2012).
37. R. Liu-Bryan, R. Terkeltaub, Emerging regulators of the inflammatory process in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* **11** , 35-44 (2015).
- 10 38. P. Löser, G. S. Jennings, M. Strauss, V. Sandig, Reactivation of the previously silenced cytomegalovirus major immediate-early promoter in the mouse liver: involvement of NF κ B. *J Virol* **72** , 180-190 (1998).
39. R. A. Johnson, S. M. Huong, E. S. Huang, Activation of the mitogen-activated protein kinase p38 by human cytomegalovirus infection through two distinct pathways: a novel mechanism for activation of p38. *J Virol* **74** , 1158-1167 (2000).
- 15 40. R. U. Svensson, J. M. Barnes, O. W. Rokhlin, M. B. Cohen, M. D. Henry, Chemotherapeutic agents up-regulate the cytomegalovirus promoter: implications for bioluminescence imaging of tumor response to therapy. *Cancer Res* **67** , 10445-10454 (2007).
41. J. L. Meier, M. J. Keller, J. J. McCoy, Requirement of multiple cis-acting elements in the human
- 20 cytomegalovirus major immediate-early distal enhancer for viral gene expression and replication. *J Virol* **76** , 313-326 (2002).
42. X. F. Liu, X. Wang, S. Yan, Z. Zhang, M. Abecassis, M. Hummel, Epigenetic control of cytomegalovirus latency and reactivation. *Viruses* **5** , 1325-1345 (2013).
43. W. Bruening, B. Giasson, W. Mushynski, H. D. Durham, Activation of stress-activated MAP protein
- 25 kinases up-regulates expression of transgenes driven by the cytomegalovirus immediate/early promoter. *Nucleic Acids Res* **26** , 486-489 (1998).
44. M. Ramanathan, G. Haskó, S. J. Leibovich, Analysis of signal transduction pathways in macrophages using expression vectors with CMV promoters: a cautionary tale. *Inflammation* **29** , 94-102 (2005).
45. A. J. Simpson, G. A. Cunningham, D. J. Porteous, C. Haslett, J. M. Sallenave, Regulation of adenovirus-
- 30 mediated elafin transgene expression by bacterial lipopolysaccharide. *Hum Gene Ther* **12** , 1395-1406 (2001).
46. A. V. Miagkov, A. W. Varley, R. S. Munford, S. S. Makarov, Endogenous regulation of a therapeutic transgene restores homeostasis in arthritic joints. *J Clin Invest* **109** , 1223-1229 (2002).
47. M. Khoury, J. Adriaansen, M. J. Vervoordeldonk, D. Gould, Y. Chernajovsky, P. Bigey, C. Bloquel, D. Scherman, P. P. Tak, C. Jorgensen, F. Apparailly, Inflammation-inducible anti-TNF gene expression mediated by
- 35 intra-articular injection of serotype 5 adeno-associated virus reduces arthritis. *J Gene Med* **9** , 596-604 (2007).
48. F. A. van de Loo, A. S. de Hooge, R. L. Smeets, A. C. Bakker, M. B. Bennink, O. J. Arntz, L. A. Joosten, H. M. van Beuningen, P. K. van der Kraan, A. W. Varley, W. B. van den Berg, An inflammation-inducible adenoviral expression system for local treatment of the arthritic joint. *Gene Ther* **11** , 581-590 (2004).
49. K. A. Elsaid, L. Zhang, Z. Shaman, C. Patel, T. A. Schmidt, G. D. Jay, The impact of early intra-articular
- 40 administration of interleukin-1 receptor antagonist on lubricin metabolism and cartilage degeneration in an anterior cruciate ligament transection model. *Osteoarthritis Cartilage* **23** , 114-121 (2015).

50. X. Zhang, E. M. Schwarz, D. A. Young, J. E. Puzas, R. N. Rosier, R. J. O'Keefe, Cyclooxygenase-2 regulates mesenchymal cell differentiation into the osteoblast lineage and is critically involved in bone repair. *J Clin Invest* **109** , 1405-1415 (2002).
51. P. Geusens, P. J. Emans, J. J. de Jong, J. van den Bergh, NSAIDs and fracture healing. *Curr Opin Rheumatol* **25** , 524-531 (2013).
52. L. Claes, S. Recknagel, A. Ignatius, Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. *Nat Rev Rheumatol* **8** , 133-143 (2012).
53. M. M. Matzelle, M. A. Gallant, K. W. Condon, N. C. Walsh, C. A. Manning, G. S. Stein, J. B. Lian, D. B. Burr, E. M. Gravalles, Resolution of inflammation induces osteoblast function and regulates the Wnt signaling pathway. *Arthritis Rheum* **64** , 1540-1550 (2012).
54. J. Chang, F. Liu, M. Lee, B. Wu, K. Ting, J. N. Zara, C. Soo, K. Al Hezaimi, W. Zou, X. Chen, D. J. Mooney, C. Y. Wang, NF- κ B inhibits osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells by promoting β -catenin degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110** , 9469-9474 (2013).
55. W. P. Arend, H. G. Welgus, R. C. Thompson, S. P. Eisenberg, Biological properties of recombinant human monocyte-derived interleukin 1 receptor antagonist. *J Clin Invest* **85** , 1694-1697 (1990).
56. W. P. Arend, The balance between IL-1 and IL-1Ra in disease. *Cytokine Growth Factor Rev* **13** , 323-340 (2002).
57. R. D. Howard, C. W. McIlwraith, G. W. Trotter, J. K. Nyborg, Cloning of equine interleukin 1 receptor antagonist and determination of its full-length cDNA sequence. *Am J Vet Res* **59** , 712-716 (1998).
58. H. Kato, T. Ohashi, H. Matsushiro, T. Watari, R. Goitsuka, H. Tsujimoto, A. Hasegawa, Molecular cloning and functional expression of equine interleukin-1 receptor antagonist. *Vet Immunol Immunopathol* **56** , 221-231 (1997).
59. M. K. Boyce, T. N. Trumble, C. S. Carlson, D. M. Groschen, K. A. Merritt, M. P. Brown, Non-terminal animal model of post-traumatic osteoarthritis induced by acute joint injury. *Osteoarthritis Cartilage* **21** , 746-755 (2013).
60. C. E. Kawcak, D. D. Frisbie, N. M. Werpy, R. D. Park, C. W. McIlwraith, Effects of exercise vs experimental osteoarthritis on imaging outcomes. *Osteoarthritis Cartilage* **16** , 1519-1525 (2008).
61. D. D. Frisbie, C. E. Kawcak, C. W. McIlwraith, N. M. Werpy, Evaluation of polysulfated glycosaminoglycan or sodium hyaluronan administered intra-articularly for treatment of horses with experimentally induced osteoarthritis. *Am J Vet Res* **70** , 203-209 (2009).
62. D. C. Dymock, M. P. Brown, K. A. Merritt, T. N. Trumble, Concentrations of stromal cell-derived factor-1 in serum, plasma, and synovial fluid of horses with osteochondral injury. *Am J Vet Res* **75** , 722-730 (2014).
63. C. W. McIlwraith, D. D. Frisbie, C. E. Kawcak, C. J. Fuller, M. Hurtig, A. Cruz, The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the horse. *Osteoarthritis Cartilage* **18 Suppl 3** , S93-105 (2010).
64. C. Li, M. Hirsch, A. Asokan, B. Zeithaml, H. Ma, T. Kafri, R. J. Samulski, Adeno-associated virus type 2 (AAV2) capsid-specific cytotoxic T lymphocytes eliminate only vector-transduced cells coexpressing the AAV2 capsid in vivo. *J Virol* **81** , 7540-7547 (2007).

Другие варианты осуществления

Все из характеристик, раскрываемых в настоящем описании, могут быть

комбинированы в любом сочетании. Каждая характеристика, раскрытая в настоящем описании, может быть заменена альтернативной характеристикой, предназначенной для выполнения той же самой, эквивалентной или аналогичной цели. Таким образом, если явно не указано иное, то каждая раскрываемая характеристика представляет собой только

5 пример характерной последовательности эквивалентных или аналогичных характеристик.

Из приведенного выше описания специалист в данной области техники может легко установить необходимые характеристики настоящего раскрытия, и не отклоняясь от его сущности и объема, может выполнить различные изменения и модификации настоящего раскрытия для адаптации его к различным видам применения и условиям. Таким образом,

10 другие варианты осуществления также находятся в объеме формулы изобретения.

Эквиваленты

Несмотря на то, что варианты осуществления настоящего изобретения были описаны и проиллюстрированы в данном документе, специалисты в данной области

15 техники легко предусмотрят множество средств и/или структур для осуществления функции и/или получения результатов и/или одного или нескольких преимуществ, описываемых в данном документе, и каждое из таких вариаций и/или модификаций описано в объеме вариантов осуществления настоящего изобретения, описываемых в данном документе. В более общем плане специалистам в данной области техники будет

20 легко понять, что все параметры, размеры, материалы и конфигурации, описываемые в данном документе, являются иллюстративными, и что фактические параметры, размеры, материалы и/или конфигурации будут зависеть от конкретного применения или областей применения, для которых (используется)используются идея(идеи) настоящего изобретения. Специалистам в данной области техники будут понятны многие

25 эквиваленты конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения, описываемого в данном документе, или с помощью проведения только лишь обычных экспериментов они будут способны установить такие эквиваленты. Таким образом, следует понимать, что вышеизложенные варианты осуществления представлены лишь в качестве примера и что в объеме прилагаемой формулы изобретения и эквивалентов к ней

30 варианты осуществления настоящего изобретения могут применяться на практике иначе, чем так, как конкретным образом описано и представлено в формуле изобретения. Варианты осуществления настоящего изобретения направлены на каждую отдельную характеристику, систему, изделие, материал, набор и/или способ, описываемые в данном документе. Кроме того, любая комбинация из двух или более таких свойств, систем,

35 изделий, материалов и/или способов в случае, если такие свойства, системы, изделия,

материалы, наборы и/или способы не являются взаимно противоречащими, включена в объем настоящего раскрытия.

Все определения, определенные и использованные в данном документе, следует понимать в целях контроля за словарными определениями, определениями в документах, включенных посредством ссылки и/или обычных значений определяемых терминов.

Все ссылки, патенты и заявки на патенты, раскрытые в данном документе, включены посредством ссылки по отношению к рассматриваемому вопросу, для которого каждое из них цитируется, что в некоторых случаях может охватывать полноту документа.

Формы единственного числа, как используется в данном документе в описании и в формуле изобретения, если отчетливо не указано противоположное, необходимо понимать как означающие «по меньшей мере одно».

Фразу «и/или», используемая в данном документе в описании и в формуле изобретения, следует понимать как обозначающую «любое из двух или оба вместе» из элементов таким образом сочетанных, например, элементов, которые совместно присутствуют в некоторых случаях и раздельно присутствуют в других случаях. Несколько элементов, приведенных с фразой «и/или», следует подразумевать тем же самым образом, например, что и «один или несколько» из элементов, таким образом сочетанных. Могут необязательно присутствовать другие элементы, отличные от элементов, особым образом определяемых условием «и/или», связанных или несвязанных с этими элементами, особым образом определяемыми. Таким образом, в качестве неограничивающего примера отсылка на «А и/или В» при использовании в связи с открытой формулировкой, такой как «содержащий», может относиться в соответствии с одним вариантом осуществления только к А (при этом необязательно включаются элементы, отличные от В); в соответствии с другим вариантом осуществления только к В (при этом необязательно включаются элементы, отличные от А); в соответствии с еще одним вариантом осуществления как к А, так и к В (при этом необязательно включаются другие элементы); и т.д.

Как используется в настоящем описании и в формуле изобретения термин «или» необходимо понимать как имеющую тоже самое значение, что и «и/или», как определено выше. Например, при разделении пунктов в перечне фраза «или» или «и/или» будет пониматься как включающая, т.е., включение по меньшей мере одного, но также включающая более одного, ряда или перечня из элементов, и необязательно дополнительных неприведенных пунктов. Только термины, явно указывающие на противоположное, такие как «только одно из» или «точно одно из» при использовании в формуле изобретения, «состоящий из» будет относиться к включению точно одного

элемента из ряда или перечня элементов. Как правило, термин «или», используемый в данном документе, будет истолковываться только как указывающий на исключающие альтернативы (т.е., «одно или другое, но не оба») в случае, если ему предшествуют термины исключительности, такие как «либо», «один из», «только один из» или «точно один из». Термин «состоящий по сути из» при использовании в формуле изобретения, будет иметь свое обычное значение, используемое в области патентного права.

Используемую в данном документе в описании и в формуле изобретения фразу «по меньшей мере» по отношению к перечню из одного или нескольких элементов необходимо понимать как означающую по меньшей мере один элемент, выбранный из любого одного или нескольких элементов в перечне элементов, но необязательно включающую по меньшей мере одно из каждого и всякого элемента, особым образом представленного в перечне элементов, и не исключающую любые комбинации элементов в перечне элементов. Это определение также допускает возможность того, что могут необязательно присутствовать элементы, отличные от элементов, особым образом определяемых в перечне элементов, к которым относится фраза «по меньшей мере один», вне зависимости от того связаны или не связаны они с этими элементами, особым образом определяемыми. Таким образом, в качестве неограничивающего примера «по меньшей мере одно из А и В» (или, что является эквивалентным «по меньшей мере одно из А или В», или, что является эквивалентным «по меньшей мере одно из А и/или В») может относиться в соответствии с одним вариантом осуществления по меньшей мере к одному, необязательно включающему более одного, А, при этом В не присутствует (и необязательно включающему элементы, отличные от В); в соответствии с другим вариантом осуществления по меньшей мере к одному, необязательно включающему более одного, В, при этом А не присутствует (и необязательно включающему элементы, отличные от А); в соответствии с еще одним вариантом осуществления по меньшей мере к одному, необязательно включающему более одного, А, и по меньшей мере к одному, необязательно включающему более одного, В (и необязательно включающему другие элементы); и т.д.

Следует также понимать, что, если отчетливо не указано иное, в любых способах, заявляемых в данном документе, которые предусматривают более одной стадии или действия, порядок стадий или действий способа не обязательно ограничен порядком, при котором стадии или действия способа упомянуты.

В формуле изобретения, а также в описании выше, все переходные фразы, такие как «содержащий», «включающий», «несущий», «имеющий», «содержащий в себе», «включающий в себя», «удерживающий», «состоящий из» и т.п. следует понимать как

открытые, т.е., они означают включение, но не ограничение. Только переходные фразы «состоящий из» и «состоящий по сути из» будут закрытыми или полужакрытыми переходными фразами соответственно, как изложено в Руководстве по проведению патентной экспертизы Патентного ведомства США, раздел 2111.03. Следует понимать, что также предусмотрены варианты осуществления, описываемые в данном документе, в которых также используется открытая переходная фраза (например, «содержащий»), в соответствии с альтернативными вариантами осуществления, такими как «состоящий из» и «состоящий по сути из», характеристику описывают с помощью открытой переходной фразы. К примеру, если в настоящем раскрытии описана «композиция, содержащая А и В», то настоящее раскрытие также предусматривает альтернативные варианты осуществления «композиция, состоящая из А и В» и «композиция, состоящая по сути из А и В».

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Университи оф Флорида Ресеч Фаундайшен, Инк.

<120> кДНК IL-1RA

<130> U1197.70099WO00

<140> Настоящим еще

<141> не присвоено

<150> US 62/486944

<151> 18 апреля 2017 г.

<150> US 62/431336

<151> 16 декабря 2016 г.

<160> 11

<170> Версия PatentIn 3.5

<210> 1

<211> 534

<212> ДНК

<213> Equus caballus

<400> 1

atggaaatcc gcaggcggttc tgtcagacac ctaatctctc tcctcctttt cttgtttctac 60

tcagagacag cctgccaccc tttgggggaag agaccctgca agatgcaagc cttcagaatc 120

tgggatgtta accagaagac cttctacatg aggaataacc aactagttgc tggatacttg 180

caagaatcaa atactaaatt acaagagaag atagatgtgg tgccattga gcctgatgct 240

ctattcctgg gactccatgg gaggaagctg tgcctggcct gtgtcaagtc tggatgatgag 300

attaggttcc aattggaggc agttaacatc actgacctga gcaagaacaa ggaggagaac 360

aagcgcttca cttcatccg ctcaaacagt ggccccacca ccagcttcga gtctgccgcc 420

tgccctggct ggttcctctg cacggcgagc gaggcagacc ggcccgtcag cctcaccaac 480

aagcccaaag agtccttcat ggtcaccaag ttctacctcc aggaggacca gtag 534

<210> 2

<211> 533

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический полинуклеотид

<400> 2

atggaaatca ggcgcagaag cgtgcgccac ctgatcagcc tgctgctggt cctgtttctac 60

agcgagacag cctgccaccc cctggggaag aggccttgca agatgcaggc cttcaggatc 120

tgggacgtga accagaaaac cttctacatg cgcaacaacc agctggtggc cggatacctg 180

caggaaagca acaccaagct gcaggaaaag atcgacgtcg tccccatcga cccgacgccc 240

tggttcctggg cctgcacggc agaaagctgt gcctggcctg cgtgaagtcc ggcgacgaga 300

tcaggtttca gctggaagcc gtgaacatca ccgacctgag caagaacaaa gagggaaaaca	360
agcgcttcac cttcatcaga agcaacagcg gccccaccac cagcttcgag agcgccgctt	420
gccccggtcg gttcctgtgt acagcccagg aagccgacag gcccgtcagc ctgaccaaca	480
agcccaaaga aagcttcatg gtcaccaagt tctatctgca agaagatcag taa	533

<210> 3
 <211> 539
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический полинуклеотид

<400> 3	
gccaccatgg aaatcaggcg cagaagcgtg cgccacctga tcagcctgct gctgttccctg	60
ttctacagcg agacagcctg ccacccccctg ggcaagaggc cctgcaagat gcaggccttc	120
aggatctggg acgtgaacca gaaaaccttc tacatgcgca acaaccagct ggtggccgga	180
tacctgcagg aaagcaacac caagctgcag gaaaagatcg acgtcgtccc catcgacccg	240
acgccttgtt cctgggcctg cacggcagaa agctgtgcct ggccctgcgtg aagtccggcg	300
acgagatcag gtttcagctg gaagccgtga acatcaccca cctgagcaag aacaaagagg	360
aaaacaagcg cttcaccttc atcagaagca acagcggccc caccaccagc ttcgagagcg	420
ccgcttgccc cggctgggtc ctgtgtacag cccaggaagc cgacaggccc gtcagcctga	480
ccaacaagcc caaagaaagc ttcatgggtc ccaagttcta tctgcaagaa gatcagtaa	539

<210> 4
 <211> 750
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический полинуклеотид

<400> 4	
tcaatattgg ccattagcca tattattcat tggttatata gcataaatca atattggcta	60
ttggccattg catagcttgt atctatatca taatatgtac atttatattg gctcatgtcc	120
aatatgaccg ccatgttggc attgattatt gactagttat taatagtaat caattacggg	180
gtcattagtt catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc	240
gcctggctga ccgccaacg acccccgcgc attgacgtca ataatgacgt atgttcccat	300
agtaacgcca atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac ggtaaactgc	360
ccacttggca gtacatcaag tgtatcatat gccaaagtccg ccccctattg acgtcaatga	420
cggtaaattg cccgcctggc attatgcca gtacatgacc ttacgggact ttccacttgc	480
gcagtacatc tacgtattag tcatcgctat taccatgggtg atgcgggtttt ggcagtacac	540

caatgggcgt ggatagcggg ttgactcacg gggatttcca agtctccacc ccattgacgt	600
caatgggagt ttgttttggc accaaaatca acgggacttt ccaaaatgtc gtaacaactg	660
cgatcgcccg ccccgttgac gcaaattggg ggtaggcgtg tacgggtggga ggtctatata	720
agcagagctc gtttagtgaa ccgtcagatc	750

<210> 5
 <211> 28
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический полинуклеотид

<400> 5	
cacgctgttt gacctccata gaagacac	28

<210> 6
 <211> 29
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический полинуклеотид

<400> 6	
ttctttgatt tgcaccacca ccggatccg	29

<210> 7
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический полинуклеотид

<400> 7	
ccagcacgat gaagatcaag	20

<210> 8
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический полинуклеотид

<400> 8	
gtggacaatg aggccagaat	20

<210> 9
 <211> 534
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 9

atggaaatct gcagaggcct ccgcagtcac ctaatcactc tcctcctctt cctgttccat	60
tcagagacga tctgccgacc ctctgggaga aaatccagca agatgcaagc cttcagaatc	120
tgggatgtta accagaagac cttctatctg aggaacaacc aactagttgc tggatacttg	180
caaggaccaa atgtcaattht agaagaaaag atagatgtgg taccattga gcctcatgct	240
ctgttcttgg gaatccatgg agggaagatg tgctgtcct gtgtcaagtc tggatgatgag	300
accagactcc agctggaggc agttaacatc actgacctga gcgagaacag aaagcaggac	360
aagcgcttcg cttcatccg ctcatagact ggccccacca ccagttttga gtctgccgcc	420
tgccccggtt ggttcctctg cacagcgatg gaagctgacc agcccgtcag cctcaccaat	480
atgcctgacg aaggcgatc ggtcaccaaa ttctacttcc aggaggacga gtag	534

<210> 10
 <211> 534
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический полинуклеотид

<400> 10	
atggaaatct gcagaggcct gcggagccac ctgattaccc tgctgctggt cctgttccac	60
agcgagacaa tctgccggcc cagcggccgg aagtccagca agatgcaggc cttccggatc	120
tgggacgtga accagaaaac cttctacctg cggaacaacc agctgggtggc cggatacctg	180
cagggcccca acgtgaacct ggaagagaag atcgacgtgg tgcccatcga gccccacgcc	240
ctgtttcttg gcatccacgg cggcaagatg tgctgagct gcgtgaagtc cggcgacgag	300
acaagactgc agctggaagc cgtgaacatc accgacctga gcgagaaccg gaagcaggac	360
aagagattcg cttcatcag aagcgacagc ggccccacca ccagctttga gagcgccgcc	420
tgccccggtt ggttcctgtg tacagccatg gaagccgacc agcccggtgc cctgacaaac	480
atgcccgcag agggcgatg ggtcaccaag ttctattttc aagaagatga gtaa	534

<210> 11
 <211> 540
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический полинуклеотид

<400> 11	
gccaccatgg aaatctgcag aggcctgcgg agccacctga ttaccctgct gctgttctctg	60
ttccacagcg agacaatctg ccggcccagc ggccggaagt ccagcaagat gcaggccttc	120
cggatctggg acgtgaacca gaaaaccttc tacctgcgga acaaccagct ggtggccgga	180
tacctgcagg gccccaacgt gaacctggaa gagaagatcg acgtggtgcc catcgagccc	240

cacgccctgt	ttctgggcat	ccacggcggc	aagatgtgcc	tgagctgcgt	gaagtcggc	300
gacgagaaa	gactgcagct	ggaagccgtg	aacatcacg	acctgagcga	gaaccggaag	360
caggacaaga	gattcgcctt	catcagaagc	gacagcggcc	ccaccaccag	ctttgagagc	420
gccgcctgcc	ccggctgggt	cctgtgtaca	gccatggaag	ccgaccagcc	cgtgtccctg	480
aaaacatgc	ccgacgagg	cgtgatggc	accaagttct	attttcaaga	agatgagtaa	540

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантная нуклеиновая кислота, содержащая кодон-модифицированный ген, кодирующий IL-1Ra.
- 5 2. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по п. 1, где IL-1Ra является лошадиным (eqIL-1Ra) и имеет SEQ ID NO: 2.
3. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по п. 1, где IL-1Ra является человеческим и имеет SEQ ID NO: 10.
- 10 4. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по п. 2 или п. 3, дополнительно содержащая последовательность Козак непосредственно выше сайта инициации трансляции кодон-модифицированного гена, кодирующего IL-1Ra, при этом последовательность Козак и кодон-модифицированный ген, кодирующий eqIL-1Ra, представляют собой SEQ ID NO. 3, а последовательность Козак и кодон-модифицированный ген, кодирующий eqIL-1Ra, представляют собой SEQ ID NO. 11.
- 15 5. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по любому из предыдущих пунктов, дополнительно содержащая промотор выше кодон-модифицированного гена, кодирующего IL-1Ra.
6. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по п. 5, где промотор представляет собой немедленно-ранний промотор/энхансер цитомегаловируса (CMV).
- 20 7. Частица рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), содержащая нуклеиновую кислоту по любому из предыдущих пунктов.
8. Частица rAAV по п. 7, где rAAV принадлежит к серотипу 2 или 2.5 и является самокомплементарным (scAAV2 или scAAV2.5).
- 25 9. Способ лечения дегенеративного патологического состояния крупных опорных суставов, при этом указанный способ предусматривает введение субъекту, нуждающемуся в этом, частицы rAAV по п. 7 или п. 8 внутрисуставно.
10. Способ по п. 9, где дегенеративное патологическое состояние крупных опорных суставов представляет собой остеоартрит.
11. Способ по п. 9 или п. 10, где субъект представляет собой лошадь.

12. Способ по п. 9 или п. 10, где субъект представляет собой человека.

13. Способ по любому из пп. 9-12, где частицу гAAV вводят с помощью внутрисуставной инъекции.

Нативная кДНК L-1RA лошади

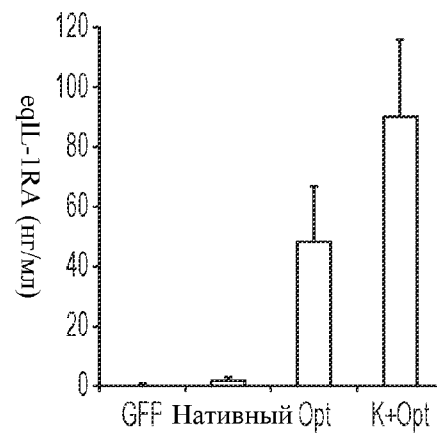
Кодон-модифицированная последовательность L-1RA лошади:

последовательность Козак

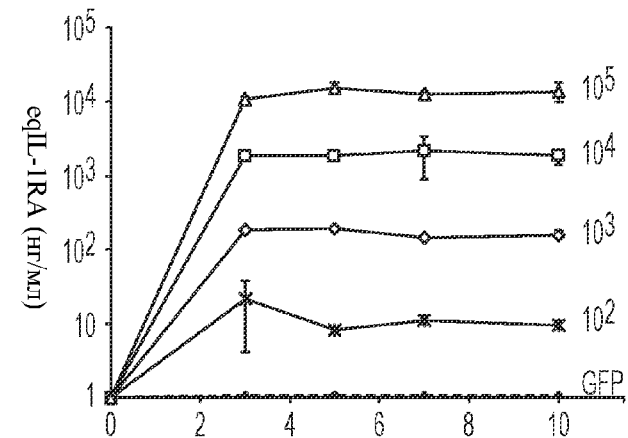
1	ATGGAAATCCGCAGGCGTTC	TGTCAGACACCTAATCTCTC	TCCTCCTTTTCTTGTCTAC	60
<u>GCCACC</u>	ATGGAAATCAGGCGCAGAAG	CGTGCGCCACCTGATCAGCC	TGCTGCTGTTCTCTCTAC	
61	TCAGAGACAGCCTGCCACCC	TTTGGGGAAGAGACCCCTGCA	AGATGCAAGCCTTCAGAATC	120
	AGCGAGACAGCCTGCCACCC	CCTGGGCAAGAGGCCCTGCA	AGATGCAGGCCTTCAGGATC	
121	TGGGATGTTAACCAGAAGAC	CTTCTACATGAGGAATAACC	AAGTAGTTGCTGGATACTTG	180
	TGGGACGTTGAACCAGAAAAC	CTTCTACATGCGCAACAACC	AGCTGGTGGCCGGATACCTG	
181	CAAGAATCAAAATACTAAATT	ACAAGAGAAGATAGATGTGG	TGCCCCATTGAGCCTGATGCT	240
	CAGGAAAGCAACACCAAGCT	GCAGGAAAAGATCGACGTCG	TCCCCATCGAGCCCGACGCC	
241	CTATTCTCTGGGACTCCATGG	GAGGAAGCTGTGCCTGGCCT	GTGTCAAGTCTGGTGATGAG	300
	CTGTTCTCTGGGCTGCACGG	CAGAAAGCTGTGCCTGGCCT	GCGTGAAGTCCGGCGACGAG	
301	ATTAGGTTCCAATTGGAGGC	AGTTAACATCACTGACCTGA	GCAAGAACAAGGAGGAGAAC	360
	ATCAGGTTTCAGCTGGAAGC	CGTGAACATCACCGACCTGA	GCAAGAACAAGGAGGAGAAC	
361	AAGCGCTTCACCTTCATCCG	CTCAAACAGTGGCCCCACCA	CCAGCTTCGAGTCTGCCGCC	420
	AAGCGCTTCACCTTCATCAG	AAGCAACAGCGGCCCCACCA	CCAGCTTCGAGAGCGCCGCT	
421	TGCCCCTGGCTGGTTCTCTG	CACGGCGCAGGAGGCAGACC	GGCCCCGTCAGCCTCACCAC	480
	TGCCCCGGCTGGTTCTCTGTG	TACAGCCCAGGAAGCCGACA	GGCCCCGTCAGCCTCACCAC	
481	AAGCCCAAAGAGTCCTTCAT	GGTCACCAAGTTCTACCTCC	AGGAGGACCAGTAG	534
	AAGCCCAAAGAAAGCTTCAT	GGTCACCAAGTTCTATCTGC	AAGAAGATCAGTAA	

108/534 (20,2%) ошибочно спаренных оснований

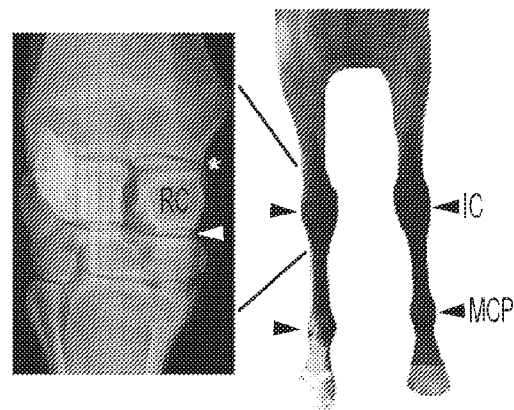
Фиг. 1



Фиг. 2А



Фиг. 2В

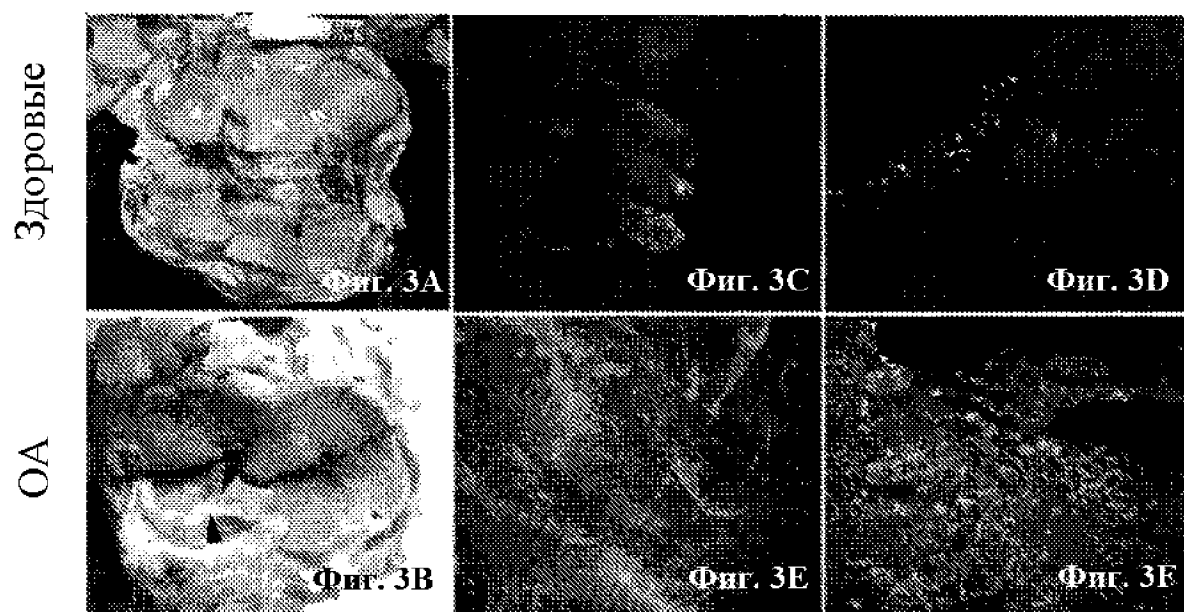


Фиг. 2С

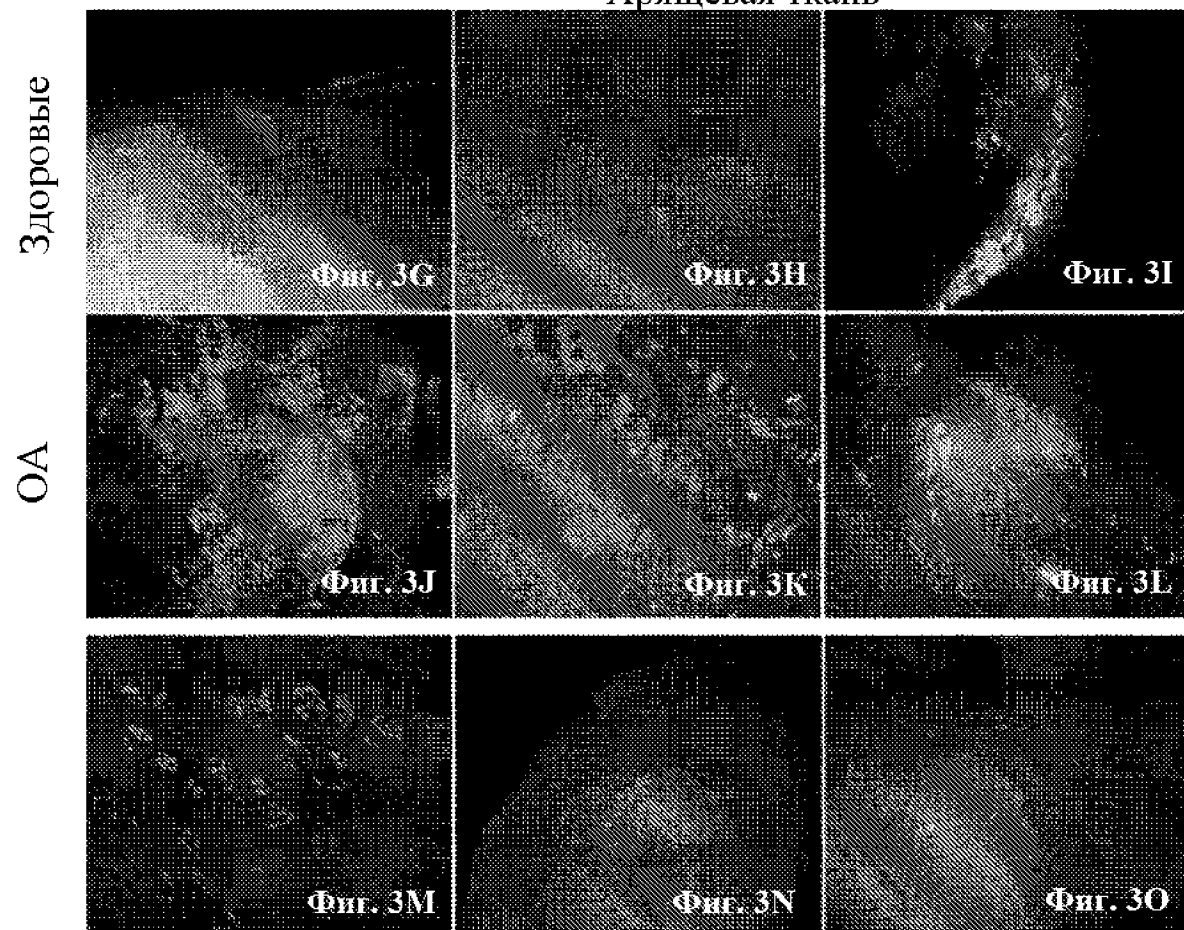


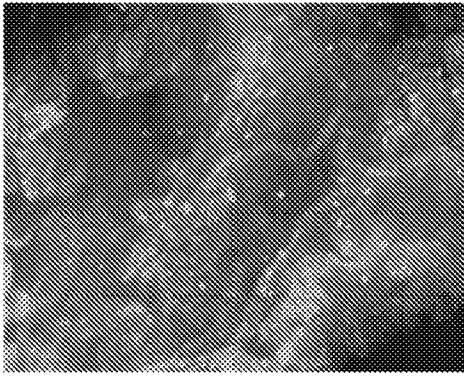
Фиг. 2D

Синовиальная оболочка

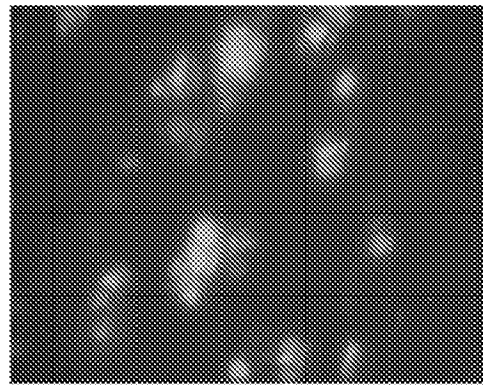


Хрящевая ткань

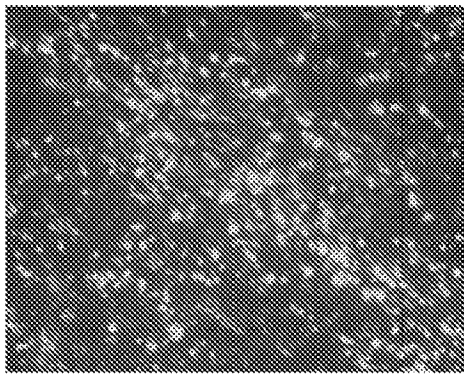




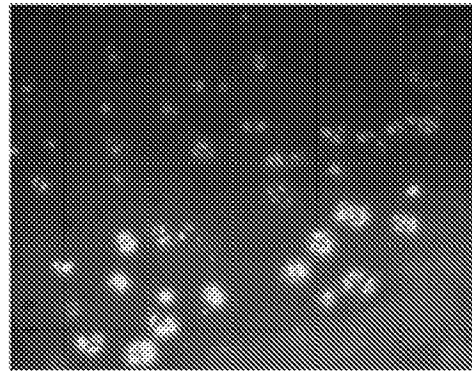
Фиг. 4А



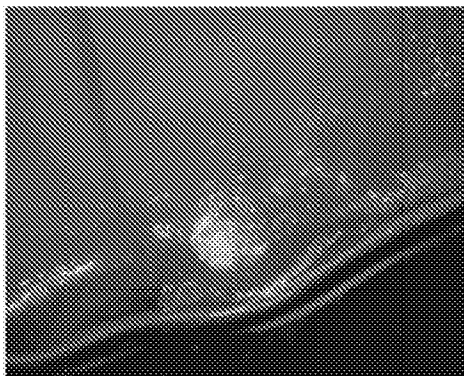
Фиг. 4Е



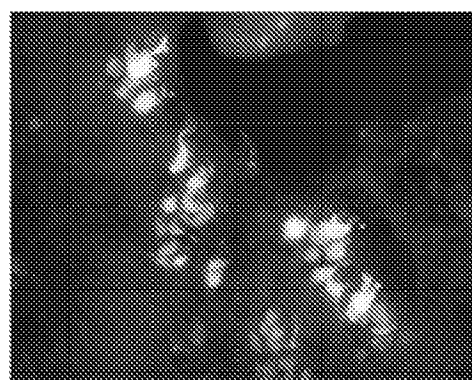
Фиг. 4В



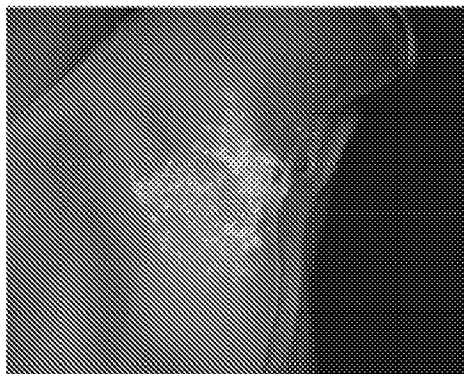
Фиг. 4F



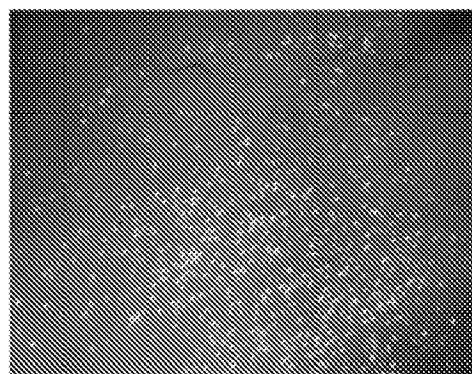
Фиг. 4С



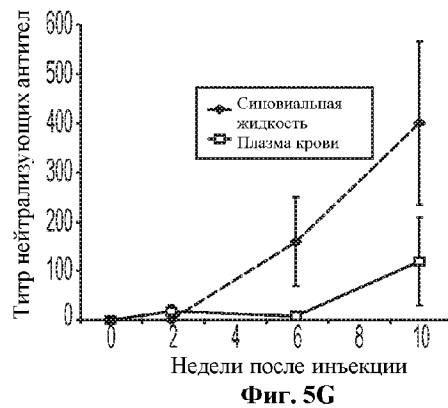
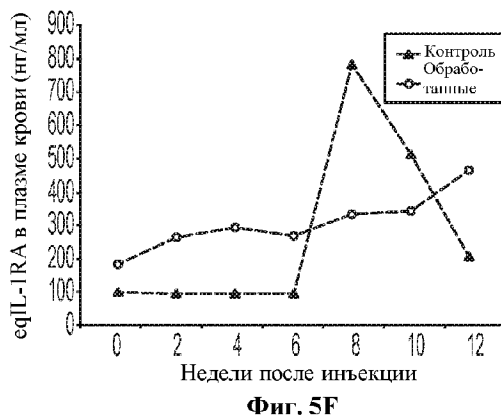
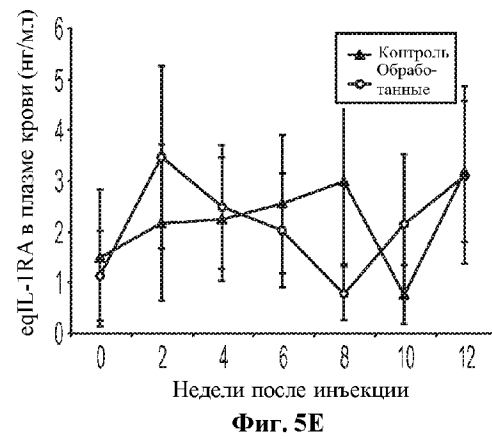
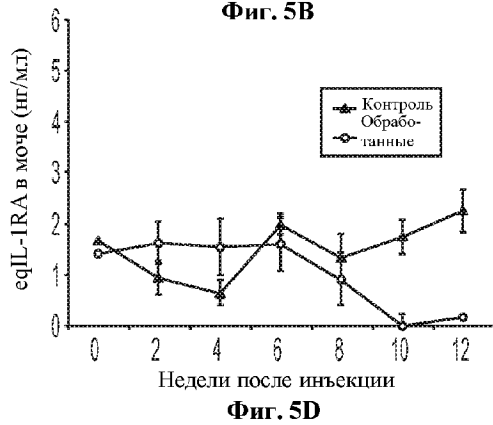
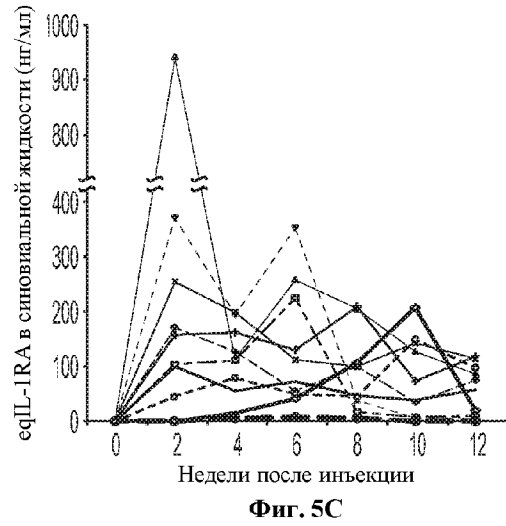
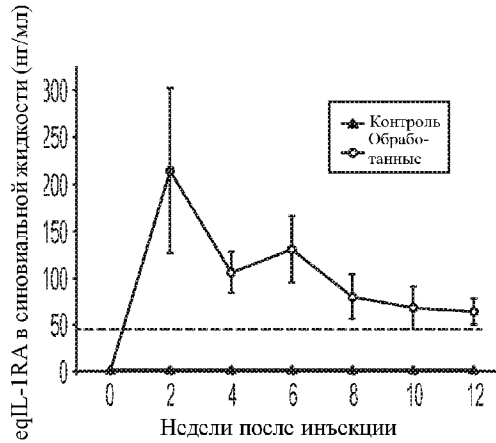
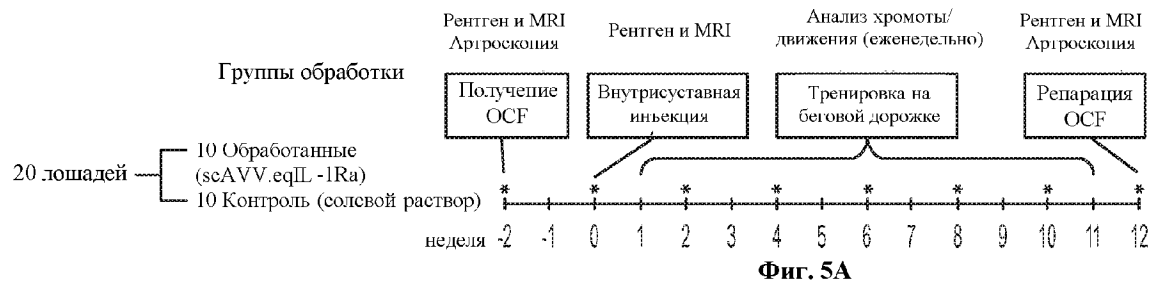
Фиг. 4G

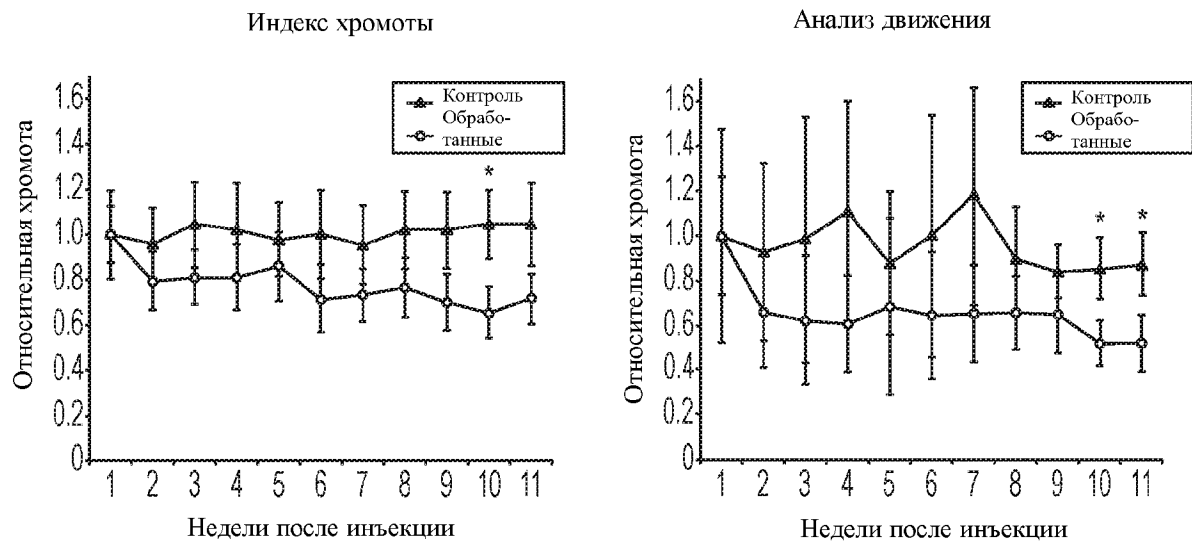


Фиг. 4D

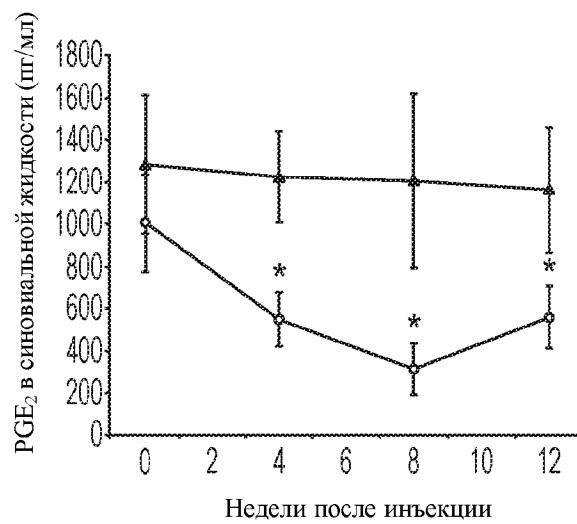


Фиг. 4H

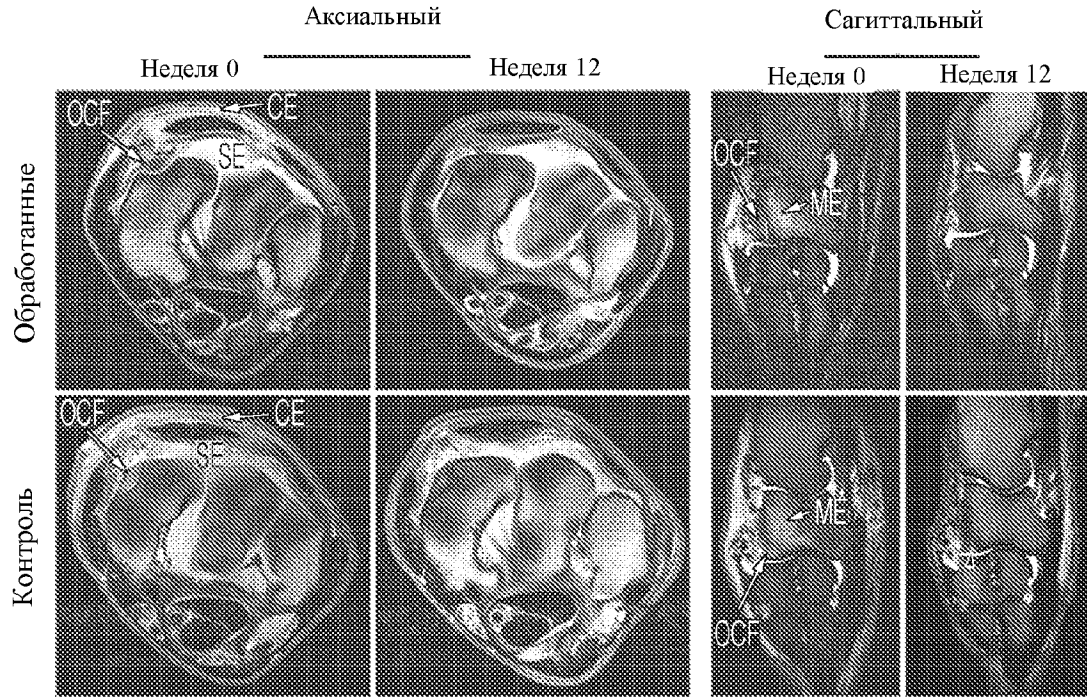




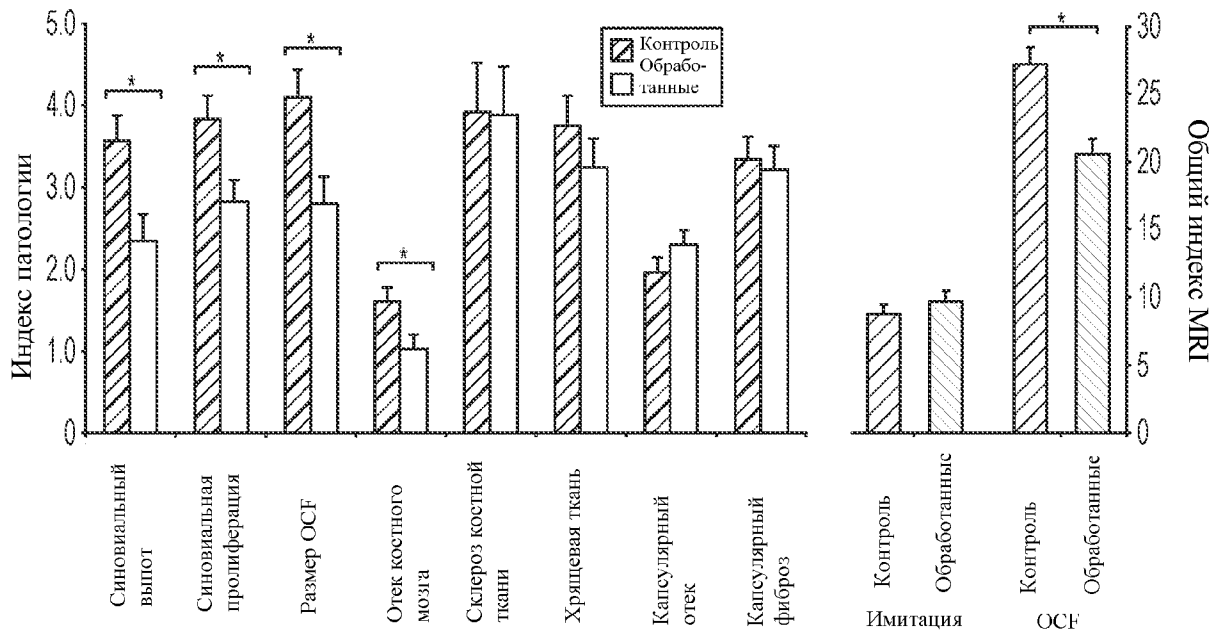
Фиг. 6А



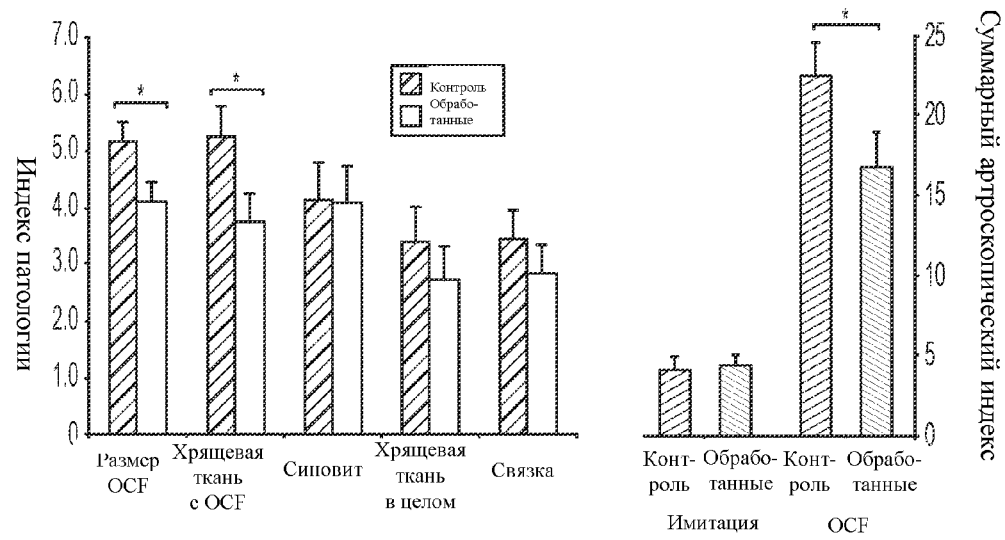
Фиг. 6В



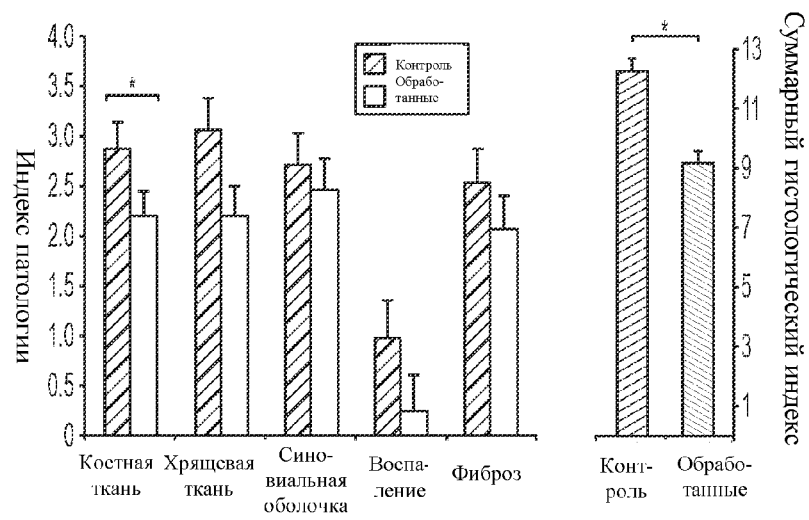
Фиг. 7А



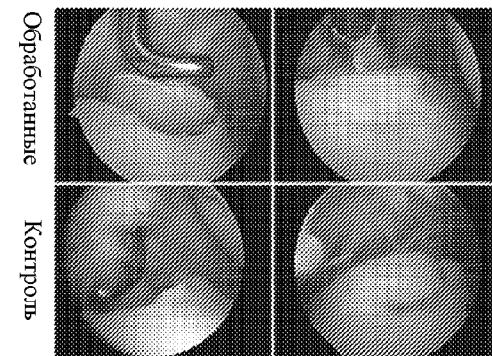
Фиг. 7В



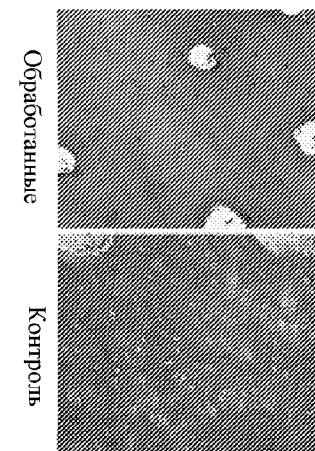
Фиг. 8А



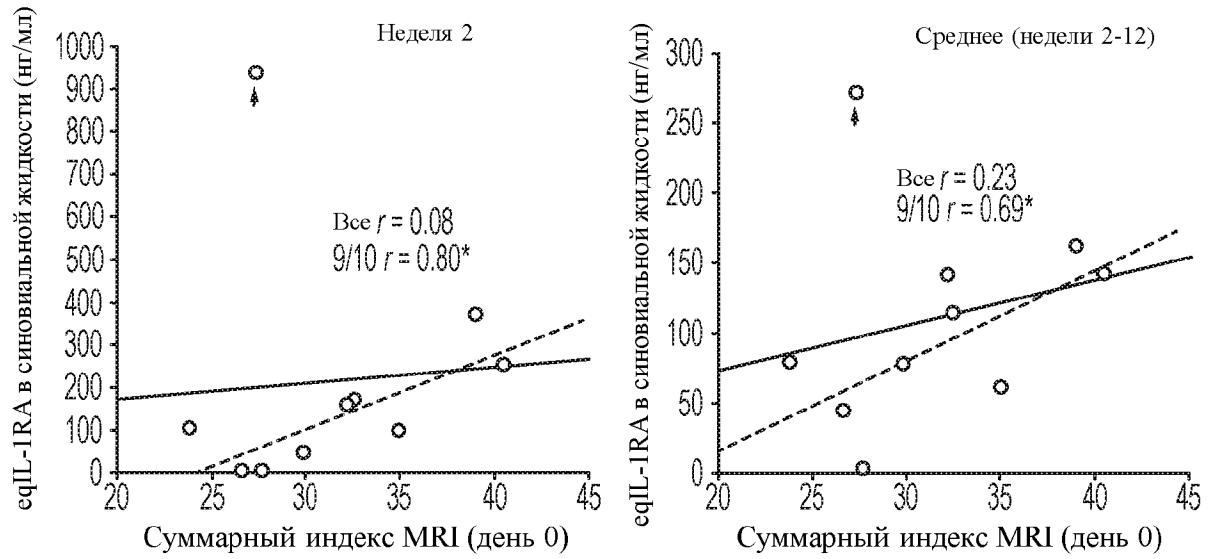
Фиг. 8С



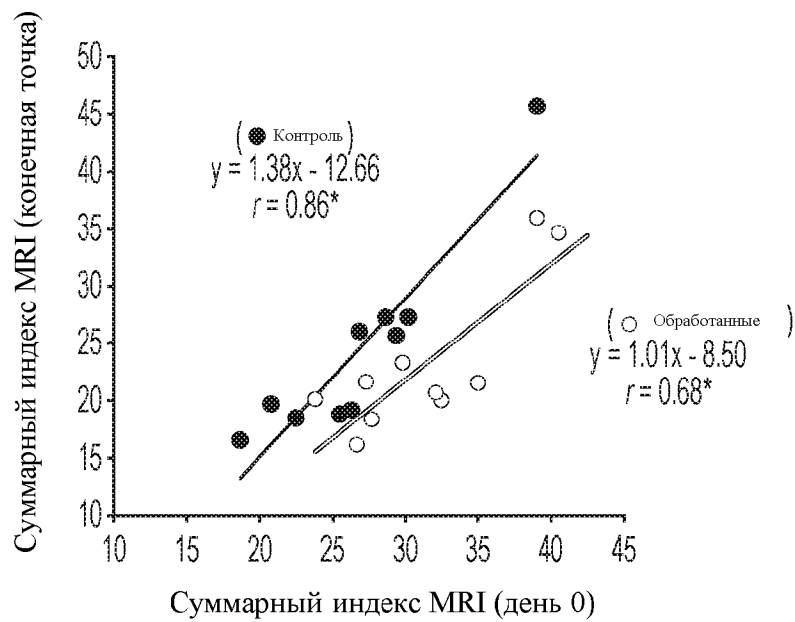
Фиг. 8В



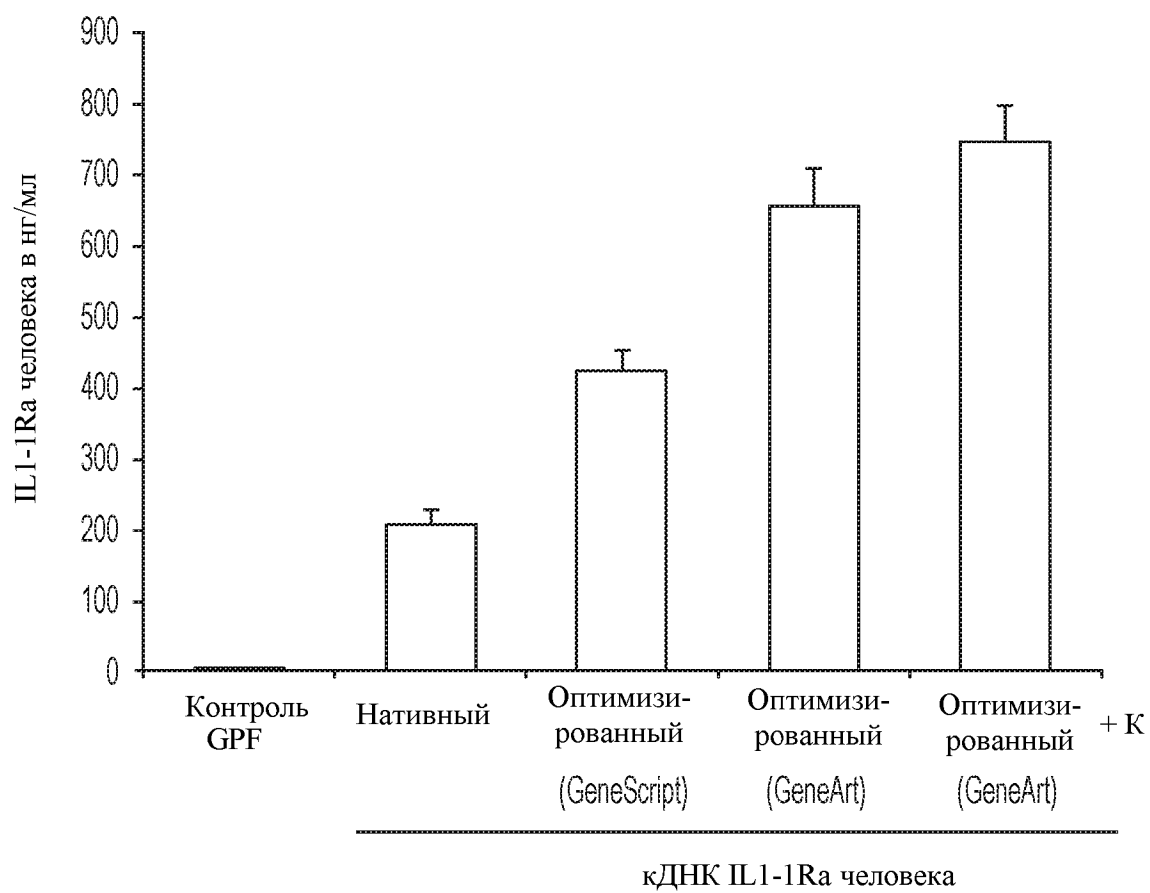
Фиг. 8D



Фиг. 9А

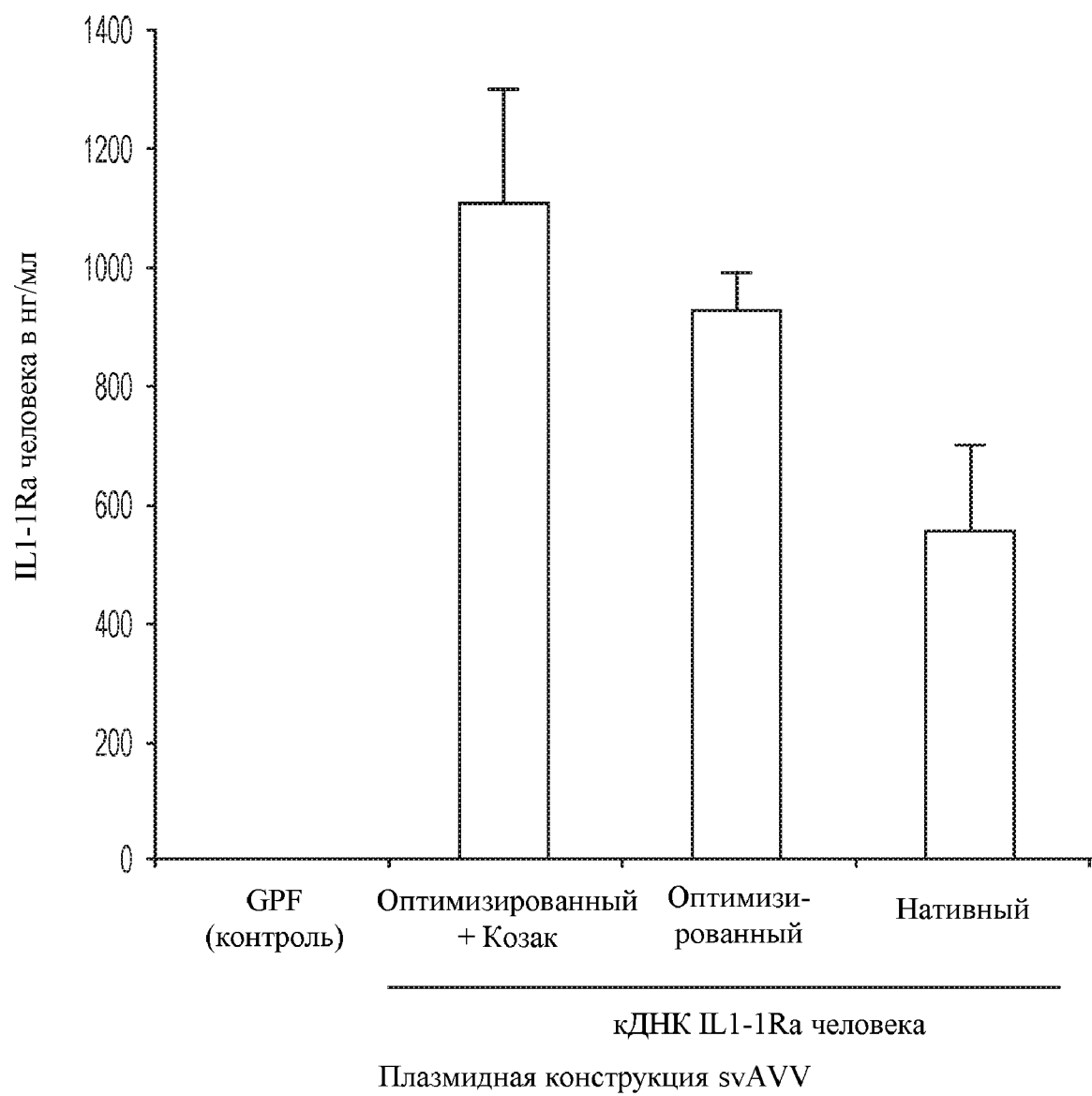


Фиг. 9В

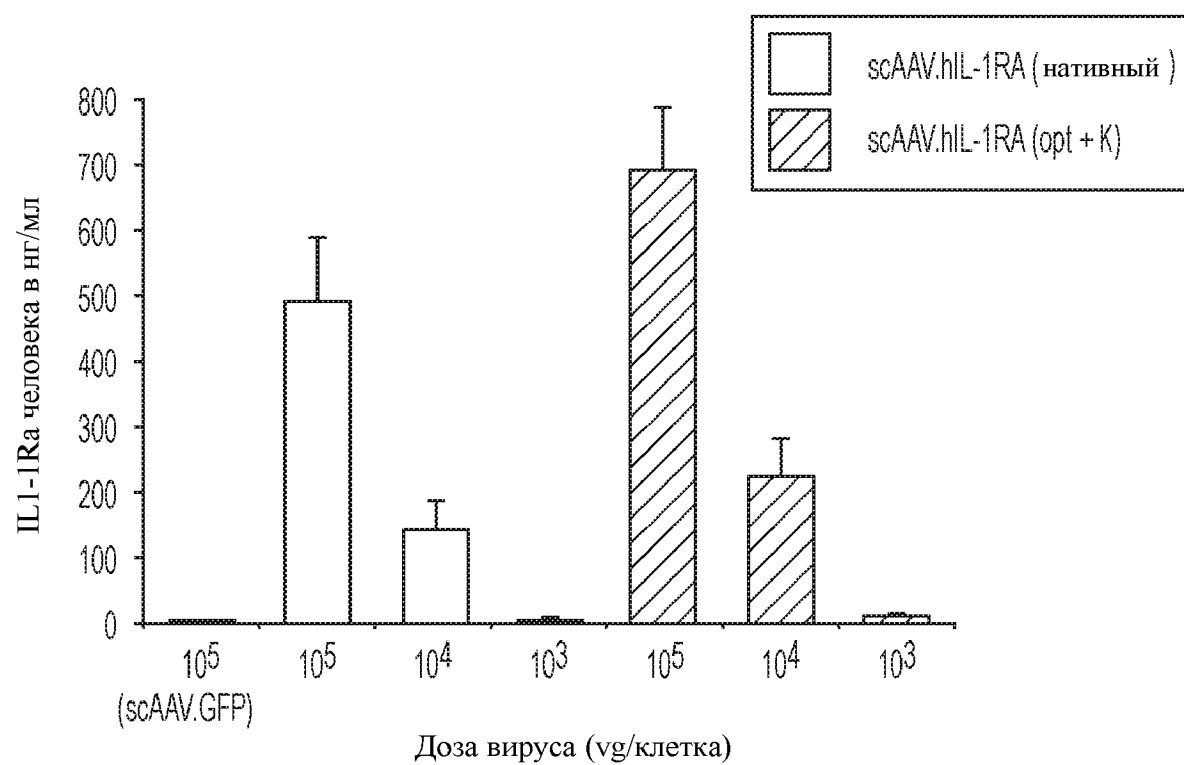


Плазмидная конструкция svAVV

Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12

Нативная кДНК П-1РА человека

Кодон-модифицированная последовательность П-1РА человека

последовательность Козак

```

60
ATGGAAATCTGCAGAGGCCT CCGCAGTCACCTAATCACTC TCCTCCTCTTCCTGTTCCAT
GCCACCATGGAAATCTGCAGAGGCCT GCGGAGCCACCTGATTACCC TGCTGCTGTTCTGTTCCAC
120
TCAGAGACGATCTGCCGACC CTCTGGGAGAAAATCCAGCA AGATGCAAGCCTTCAGAATC
AGCGAGACAATCTGCCGGCC CAGCGGCCGGAAGTCCAGCA AGATGCAGGCCTTCCGGATC
180
TGGGATGTTAACCAGAAGAC CTTCTATCTGAGGAACAACC AACTAGTTGCTGGATACTTG
TGGGACGTGAACCAGAAAAC CTTCTACCTGCGGAACAACC AGCTGGTGGCCGGATACCTG
240
CAAGGACCAAATGTCAATTT AGAAGAAAAGATAGATGTGG TACCCATTGAGCCTCATGCT
CAGGGCCCCAACGTGAACCT GGAAGAGAAGATCGACGTGG TGCCCATCGAGCCCCACGCC
300
CTGTTCTTGGAATCCATGG AGGGAAGATGTGCCTGTCCT GTGTCAAGTCTGGTGATGAG
CTGTTTCTGGGCATCCACGG CGGCAAGATGTGCCTGAGCT GCGTGAAGTCCGGCGACGAG
360
ACCAGACTCCAGCTGGAGGC AGTTAACATCACTGACCTGA GCGAGAACAGAAAGCAGGAC
ACAAGACTGCAGCTGGAAGC CGTGAACATCACCGACCTGA GCGAGAACCGGAAGCAGGAC
420
AAGCGCTTCGCCTTCATCCG CTCAGACAGTGGCCCCACCA CCAGTTTTGAGTCTGCCGCC
AAGAGATTGCGCTTCATCAG AAGCGACAGCGGCCCCACCA CCAGCTTTGAGAGCGCCGCC
480
TGCCCCGGTTGGTTCCTCTG CACAGCGATGGAAGCTGACC AGCCCGTCAGCCTCACCAAT
TGCCCCGGCTGGTTCCTGTG TACAGCCATGGAAGCCGACC AGCCCGTGTCCCTGACAAAC
534
ATGCCTGACGAAGGCGTCAT GGTACCAAAATTCTACTTCC AGGAGGACGAGTAG
ATGCCCGACGAGGCGTGAT GGTACCAAGTTCTATTTTC AAGAAGATGAGTAA

```

105/534 (19,6%) ошибочно спаренных оснований

Фиг. 13