

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **035308**

(13) **B1**

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

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2020.05.27**

**(51)** Int. Cl. **C12N 15/86** (2006.01)  
**A61K 48/00** (2006.01)

**(21)** Номер заявки  
**201491636**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2013.03.06**

---

**(54) ПРИМЕНЕНИЕ VLP ИЗ ВИРУСА ПОЛИОМЫ ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ДОСТАВКИ  
ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА В ЦНС И СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ ЦНС**

---

**(31)** **12001507.8**

**(32)** **2012.03.06**

**(33)** **EP**

**(43)** **2015.05.29**

**(86)** **PCT/EP2013/000656**

**(87)** **WO 2013/131644 2013.09.12**

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**ЛАЙФ САЙЕНС ИНКУБАТОР  
БЕТРИБС ГМБХ УНД КО. КГ (DE)**

**(72)** Изобретатель:  
**Демина Виктория, Маннинга Хайко,  
Гетцке Армин, Глассманн Александер  
(DE)**

**(74)** Представитель:  
**Медведев В.Н. (RU)**

**(56)** CHOU MENG-ING ET AL.: "In vitro and in vivo targeted delivery of IL-10 interfering RNA by JC virus-like particles", JOURNAL OF BIOMEDICAL SCIENCE, vol. 17, June 2010 (2010-06), XP002676066, ISSN: 1021-7770 page 1 abstract page 2, right-hand column, paragraph 3 page 4, right-hand column, paragraph 1-page 5, left-hand column, paragraph 1

CHAPAGAIN MOTI L. ET AL.: "Human Polyomavirus JC (JCV) Infection of Human B Lymphocytes: A Possible Mechanism for JCV Transmigration across the Blood-Brain Barrier", JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES, vol. 202, no. 2, July 2010 (2010-07), pages 184-191, XP002676067, ISSN: 0022-1899 page 184 abstract page 185, left-hand column, paragraph 2

JAEGER LAURA B. ET AL.: "Migration of JC virus across the human blood-brain barrier occurs via clathrin-mediated endocytosis", JOURNAL OF NEUROVIROLOGY, vol. 15, no. Suppl. 1, 2009, page 37, XP008151856, & 9TH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NEUROVIROLOGY; MIAMI BEACH, FL, USA; JUNE 02-06, 2009 ISSN: 1355-0284 the whole document

KRAUZEWICZ N. ET AL.: "Sustained ex vivo and in vivo transfer of a reporter gene using polyomavirus pseudocapsids", GENE THERAPY, vol. 7, no. 13, July 2000 (2000-07), pages 1094-1102, XP002676631, ISSN: 0969-7128 page 1094 abstract

---

**(57)** Изобретение относится к применению вирусоподобной частицы (VLP), полученной из вируса полиомы человека, содержащей лекарственное средство, для доставки лекарственного средства в центральную нервную систему (ЦНС), а также к способу лечения заболевания ЦНС с использованием указанной VLP.

---

**B1**

**035308**

**035308 B1**

### Область изобретения

Изобретение относится к применению вирусоподобных частиц (VLP) типа вируса полиомы человека для использования в качестве системы доставки лекарственного средства.

#### Уровень техники

Одной из главных проблем в современной медицине является доставка лекарственных средств. Доставка лекарственных средств к выбранному месту действия (например, выбранному органу, ткани, типу клеток или микрокомпармент клетки и т.д.) называется направленной доставкой лекарственных средств. С помощью направленной доставки лекарственного средства увеличение концентрации лекарственного средства в данном конкретном месте становится возможным даже при системном применении лекарственного средства. Кроме того, в отличие от обычного системного применения остальная часть тела не подвержена или лишь в меньшей степени подвержена действию лекарственного средства. Это приводит к снижению риска неблагоприятных побочных эффектов и может позволить более высокую дозировку лекарственного средства. Кроме того, очень токсичные лекарственные средства (например, цитотоксические агенты, используемые в терапии рака) могут применяться к человеку в первый раз, так как их токсичные побочные эффекты сведены к минимуму с помощью системы доставки лекарственного средства. В некоторых случаях еще одним преимуществом направленной доставки лекарственных средств является профилактика ранней инактивации (метаболизм), нежелательной адсорбции, выделения или нежелательной модификации лекарственного средства, так как лекарственное средство защищено способом доставки.

Доставка лекарственных средств в центральную нервную систему (ЦНС), в частности в мозг, является большой проблемой, так как активные ингредиенты сначала должны пересечь гематоэнцефалический барьер, а затем должны достичь целевых клеток.

Гематоэнцефалический барьер формируется эндотелием капилляров. Эти эндотелиальные клетки плотно соединены с помощью так называемых "плотных контактов" друг с другом и таким образом предотвращают проникновение веществ выше определенного молекулярного веса в ЦНС. Гематоэнцефалический барьер, таким образом, служит эффективным защитным барьером. Это гарантирует, с одной стороны, поступление питательных веществ в ЦНС и, с другой стороны, позволяет удалять продукты обмена из ЦНС.

Основной проблемой является транспортировка гидрофильных веществ через гематоэнцефалический барьер. Почти 95% всех эффективных *in vitro* лекарственных средств-кандидатов не могут пройти через ГЭБ в фармакологически активных концентрациях. Поэтому, чтобы достичь адекватных фармакологических концентраций препарата в ЦНС при лечении многих заболеваний ЦНС, таких как опухоли головного мозга или инфекции ЦНС требуют высоких концентраций лекарства в плазме. Это включает в себя риск неблагоприятных побочных эффектов. Поэтому в фармацевтических исследованиях ищут способы улучшить транспорт лекарственных средств, в частности гидрофильных агентов, через ГЭБ в ЦНС.

Некоторые подходы используют липофильные частицы, которые делают возможным рецепторопосредованный транспорт через гематоэнцефалический барьер. С этой целью, например, в частности, были разработаны транспортные системы из наночастиц. Наночастицы, как правило, состоят из полимеров и имеют размер 10-1000 нм. В основном они обладают модифицированной поверхностью.

Эти наночастицы часто сталкиваются с той проблемой, что они экспортируются из ЦНС эффлюксными насосами, которые экспрессируются в ГЭБ. Кроме того, было показано, что они влияют на целостность ГЭБ (Rempe et al., *Biochem Biophys Res Comm* 2011, 406 (1):64-69). Таким образом, защитная функция ГЭБ подвергается риску, в том числе риску побочных эффектов со стороны проникновения нежелательных веществ или инфекционных частиц в ЦНС. Это является существенным недостатком, критическим для клинического применения наночастиц в качестве систем доставки лекарств.

Другие возможные системы доставки лекарств находятся в стадии обсуждения. Например, известно, что псевдокапсиды из VP1 белка вируса полиомы мыши, связанного с ДНК, кодирующей  $\beta$ -галактозидазу, можно использовать, чтобы доставить эту ДНК в головной мозг после внутривенного введения, что приводит к экспрессии  $\beta$ -галактозидазы в головном мозге (Krauzewicz et al. *Gene Therapy* 2000, 7, 1094-1102; см. также WO 98/48841 A1). Тем не менее, эти наблюдения не обеспечивают адекватного понимания пригодности VLP, в частности VLP, полученных из вируса полиомы человека и нагруженных грузом, в качестве системы доставки лекарственных средств для центральной нервной системы.

Поэтому задачей настоящего изобретения является создание системы доставки лекарственных средств, которая делает возможным транспорт лекарственного средства в клетки ЦНС, то есть доставки лекарственных средств через ГЭБ.

#### Сущность изобретения

Авторы настоящего изобретения обнаружили в модели ГЭБ на основании первичных эндотелиальных клеток свиньи, что VLP из человека, нагруженные нуклеиновой кислотой, кодирующей белок-репортер, могут пересекать гематоэнцефалический барьер и доставлять нуклеиновую кислоту в клетки ЦНС, в которых нуклеиновая кислота экспрессируется. Эта модель считается показательной для физиологически интактного ГЭБ в естественных условиях. Следовательно, она показывает, что VLP, а не про-

сто одна активная субстанция, проникает через ГЭБ и входит в ЦНС. Таким образом, VLP, полученные из вируса полиомы человека и нагруженные веществом-грузом, можно использовать в качестве системы доставки лекарственных средств в ЦНС, в частности в мозг.

Кроме того, изобретатели обнаружили, что пересечение нагруженными VLP не требует и не приводит к потере целостности или повышенной проницаемости ГЭБ. Таким образом, целостность ГЭБ существенно не влияет на VLP. Таким образом, VLP могут быть использованы в качестве системы доставки лекарственного средства в ЦНС без существенного риска нежелательных побочных эффектов за счет ввода нежелательных веществ или инфекционных частиц в ЦНС.

В соответствии с изобретением VLP, полученные из вируса полиомы человека и включающие груз, используются, чтобы пересечь гематоэнцефалический барьер вместе с грузом. Важно отметить, что пересечение ГЭБ VLP позволяет VLP осуществлять свою функцию направленного воздействия на конкретные клеточные популяции в пределах мозга, то есть доставлять груз в клетки-мишени. В контексте данного изобретения указанная доставка включает доставку к или в клетки-мишени. Таким образом, в соответствии с изобретением функциональные VLP пересекают гематоэнцефалический барьер вместе с грузом.

Груз, предпочтительно активное вещество, предпочтительно инкапсулирован в оболочке VLP. Это, однако, не исключает того, что VLP дополнительно может быть связана с активным веществом, например, путем связывания активного вещества с внешними структурами оболочки. Некоторые молекулы активного вещества даже могут быть не полностью заключены внутри оболочки. Тем не менее, по меньшей мере часть молекул активного вещества полностью инкапсулирована в оболочку.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к применению вирусоподобной частицы (VLP), полученной из вируса полиомы человека, содержащей лекарственное средство, для доставки лекарственного средства в центральную нервную систему (ЦНС), в частности для доставки лекарственного средства в ЦНС человека.

В одном из вариантов изобретения VLP нагружена лекарственным средством и, в частности, происходит из вируса JC, предпочтительно VLP состоит из белков VP1 вируса JC.

В следующем варианте осуществления изобретения VLP способна преодолевать гематоэнцефалический барьер на пути в ЦНС, в частности VLP способна преодолевать физиологически интактный гематоэнцефалический барьер.

В еще одном варианте осуществления VLP пригодна для внутривенного введения.

В другом варианте осуществления VLP содержит VP1 и/или VP2, причем VP1 содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 по всей ее длине, и/или VP2 содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3 по всей ее длине.

В одном из вариантов осуществления лекарственное средство выбрано из цитотоксического агента и детектируемого агента, такого как радионуклид, белок, пептид и нуклеиновая кислота, в частности нуклеиновая кислота выбрана из кодирующих белки нуклеиновых кислот, таких как мРНК, кДНК, плазмиды или векторы; ингибирующих нуклеиновых кислот, таких как миРНК или микроРНК; и нуклеиновых кислот, имеющих каталитическую активность, таких как рибозимы.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к применению фармацевтической композиции для доставки лекарственного средства в ЦНС, где фармацевтическая композиция содержит VLP, полученную из вируса полиомы человека, где по меньшей мере 1% от общего количества лекарственного вещества (груза) инкапсулирован в оболочку VLP.

В одном из вариантов осуществления изобретения VLP не агрегированы.

В следующем аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания ЦНС, включающему а) обеспечение VLP, полученной из вируса полиомы человека, содержащей лекарственное средство; и б) введение указанной VLP в организм.

В одном из вариантов осуществления изобретения заболевание ЦНС представляет собой неврологическое, нервное или нейродегенеративное расстройство.

В следующем варианте осуществления изобретения VLP вводят перорально, парентерально или внутривенно.

VLP по изобретению не требуют обработки поверхности или использования добавок для того, чтобы эффективно проникать через гематоэнцефалический барьер и входить в ЦНС. Таким образом, в одном аспекте настоящего изобретения система доставки лекарственного средства обеспечена партикулированными структурами без дальнейшей обработки поверхности или модификации и без использования добавок. Система доставки лекарственного средства предпочтительно является бесклеточной.

Как описано выше, в соответствии с изобретением VLP используют для доставки лекарственных средств в ЦНС, в частности в мозг. Доставка в мозг может позволить направленную доставку препарата в специфические клетки, например, используя естественный тропизм вируса полиомы человека (а именно JCV).

### Подробное описание изобретения

Вирусоподобные частицы (VLP), полученные из вируса полиомы человека, в частности JCV, используются для доставки лекарственных средств в соответствии с настоящим изобретением, и предпочтительно содержат по меньшей мере один VP1. VLP предпочтительно состоят из оболочки, построенной из VP1, собранного в пентамерные структуры. Предпочтительно VLP состоят из нескольких VP1, в частности нескольких пентамеров VP1, особенно из 72 VP1 пентамеров. Тем не менее, VLP могут необязательно содержать дополнительные молекулы, включенные в оболочку. Структурные молекулы, из которых собраны VLP, могут быть либо идентичными нативным белкам вируса полиомы, или могут быть модифицированы для того, чтобы оптимизировать характеристики VLP.

Кроме того, VLP в соответствии с настоящим изобретением дополнительно содержит нагружаемый груз. В особенно предпочтительном варианте осуществления изобретения основная часть от общего количества груза в полном объеме включена в оболочку. Для описания полной инкапсуляции молекулы-груза в VLP используют термин "нагруженный". Поэтому "нагруженные VLP" являются VLP с полностью инкапсулированным грузом.

Указанный нагружаемый груз может быть любой молекулой или композицией, находящейся внутри пространства, окруженного оболочкой. Предпочтительно нагружаемый груз представляет собой цитотоксический агент, детектируемый агент, такой как радионуклид, белок, пептид или нуклеиновая кислота, в частности, выбранная из группы, состоящей из нуклеиновых кислот, кодирующих нужный белок, таких как мРНК, кДНК, плазмид или вектор, ингибирующих нуклеиновых кислот, таких как мРНК или микроРНК, и нуклеиновых кислот, имеющих каталитическую активность, такие как рибозим. Нагружаемый груз иногда называют далее "активное вещество", "лекарственное вещество" или "активный ингредиент". Пока прямо не указано иное, эти термины используются как синонимы.

VLP могут быть получены путем обеспечения необходимых компонентов, в частности VP1, необязательно VP2, необязательно VP3 или их смеси и необязательно нагружаемого груза в растворе и естественной сборки компонентов в VLP. Например, смешивание компонентов может быть выполнено в условиях, когда сборка VLP не происходит или происходит только ограниченно, например, при низких концентрациях  $Ca^{2+}$  и/или восстановительных условиях, и после добавления всех требуемых компонентов условия изменяют на благоприятные для сборки VLP, такие как более высокая концентрации  $Ca^{2+}$  и/или окислительные условия. Тем не менее, образование VLP также может происходить *in vivo*. В частности, компоненты VLP могут быть коэкспрессированы в клетке-хозяине, и сборка VLP происходит внутри клетки-хозяина или в результате лизиса или разрушения клетки-хозяина.

Термин "вирус полиомы человека" относится к семейству вирусов полиомы человека, включающему JCV, BK и SV40. В особенно предпочтительном варианте вирус полиомы человек представляет собой JCV.

"VP1" или "вирусный белок 1" в соответствии с настоящим изобретением относится к белку, который идентичен или получен из природного VP1 вируса JC, имеющего аминокислотную последовательность, в соответствии с SEQ ID NO: 1. Белок, полученный из природного VP1 вируса JC предпочтительно имеет гомологию аминокислотной последовательности или идентичность с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 1 по меньшей мере 60%, более предпочтительно по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% на протяжении последовательности, по меньшей мере 100 смежных аминокислот, предпочтительно по меньшей мере 150, по меньшей мере 200, по меньшей мере 250 или по меньшей мере 300 смежных аминокислот. Наиболее предпочтительно, чтобы аминокислотная гомология или идентичность была рассчитана по всей длине естественного JCV-VP1. Термины "VP1, полученный из природного VP1 вируса JC" и "VP1, полученный из вируса JC", в частности, также включают VP1, который идентичен натуральному VP1 вируса JC.

Термин "VP1" в соответствии с изобретением также включает в себя фракции и производные природного VP1, который может быть собран в VLP. Предпочтительно указанные фракции и производные VP1 по меньшей мере содержат от 32 до 316 аминокислот в аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 1 или их производную, обладающую гомологией или идентичностью с аминокислотной последовательностью в положениях аминокислот от 32 до 316 SEQ ID NO: 1 по меньшей мере 60%, более предпочтительно по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% на протяжении последовательности, по меньшей мере 100 смежных аминокислот, предпочтительно по меньшей мере 150, по меньшей мере 200, по меньшей мере 250 или по меньшей мере 300 смежных аминокислот, предпочтительно по всей последовательности.

VP1 в соответствии с настоящим изобретением может также включать гетерологичный сигнал ядерной локализации (NLS). Предпочтительно этот NLS вводится перед или в N-конец NP1, в частности в первые 30, первые 25, первые 20, первые 15 или первые 10 аминокислот VP1. Например, NLS, как описано в WO 2009/036933 (например, с.10, строки от 4 до 13 и фиг. 4A) или в Shishido-Hara et al. (Shishido-Hara, Y., Hara, Y., Larson, T., Yasui, K., Nagashima, K. & Stoner, G.L. Analysis of Capsid Formation of Hu-

man Polyomavirus JC (Tokyo-1 Strain) by a Eukaryotic Expression System: Splicing of Late RNAs, Translation and Nuclear Transport of Major Capsid Protein VP1 and Capsid Assembly. *Journal of Virology* 74, 1840-1853 (2000).

Согласно одному варианту осуществления аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 5 вводят в N-концевую часть VP1, в частности между аминокислотами, соответствующими аминокислотам 9 и 10 SEQ ID NO: 1. "VP2" или "вирусный белок 2" в соответствии с настоящим изобретением относится к белку, идентичному или полученному из природного VP2 вируса JC, имеющему аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 3. Белок, полученный из естественного VP2 вируса JC предпочтительно имеет гомологию или идентичность аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 3 по меньшей мере 60%, более предпочтительно по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% на протяжении последовательности, по меньшей мере 100 смежных аминокислот, предпочтительно по меньшей мере 150, по меньшей мере 200, по меньшей мере 250 или по меньшей мере 300 смежных аминокислот. Наиболее предпочтительно аминокислотную гомологию или идентичность рассчитывают по всей длине естественного JCV-VP2. Термины "VP2 полученный из природного VP2 вируса JC" и "VP2, полученный из вируса JC", в частности, также включают VP2, идентичный натуральному VP2 вируса JC.

Термин "VP2" в соответствии с изобретением также включает в себя фракции и производные природного VP2, которые можно собрать в VLP вместе с VP1. Предпочтительно указанные фрагменты VP2 по меньшей мере содержат аминокислоты от 214 до 318 из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 3 или их производные, имеющие гомологию или идентичность с аминокислотной последовательностью в положении аминокислот от 214 до 318 из SEQ ID NO: 3 по меньшей мере 60% более предпочтительно по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% на протяжении последовательности по меньшей мере 100 смежных аминокислот, предпочтительно по меньшей мере 150, по меньшей мере 200, по меньшей мере 250 или по меньшей мере 300 смежных аминокислот, предпочтительно по всей последовательности. "Пептид" в соответствии с настоящим изобретением может состоять из любого количества аминокислот любого типа, предпочтительно природных аминокислот, которые предпочтительно связаны пептидными связями. В частности, пептид включает по меньшей мере 3 аминокислоты, предпочтительно по меньшей мере 5, по меньшей мере 7, по меньшей мере 9, по меньшей мере 12 или по меньшей мере 15 аминокислот. Кроме того, нет верхнего предела по длине пептида. Тем не менее, предпочтительно пептид в соответствии с изобретением не превышает в длину 500 аминокислот, предпочтительно 300, 250, 200, 150 или 120 аминокислот.

Выражение "содержать", как здесь используется, кроме его буквального смысла также включает и специально относится к выражениям "состоять в основном из" и "состоять". Таким образом, выражение "содержать" относится к вариантам осуществления, где предмет, который "содержит" специально перечисленные элементы, не включает дополнительные элементы, также как к вариантам осуществления, где предмет, который "содержит" конкретно указанные элементы может и/или действительно ли содержит дополнительные элементы. Кроме того, выражение "иметь" следует понимать как выражение "содержать", также включая и особенно обращаясь к выражениям "состоять, по существу, из" и "состоять из".

Способы введения.

VLP согласно изобретению можно вводить различными путями. Особенно предпочтительными являются лекарственные формы, которые делают возможным системное влияние на активное вещество. Наиболее предпочтительными являются лекарственные формы, которые вводят перорально или парентерально, в частности внутривенно.

Способы производства.

Изготовление вирусоподобных частиц.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способу получения вирусоподобных частиц в соответствии с настоящим изобретением. Этот способ, в частности, включает в себя стадии:

- (a) получение вирусного белка VP1, который получен из вируса JC;
- (b) необязательно обеспечение вирусного белка VP2 и VP3 или предпочтительно VP2, который является производным от вируса JC, и смешивание VP1 с VP2 (и/или VP3);
- (c) естественной сборки VP1 и необязательно VP2 (и/или VP3) в вирусоподобные частицы.

Способ предпочтительно дополнительно включает стадию обеспечения нагружаемого груза и смешивания VP1 и необязательно VP2 и/или VP3 с нагружаемым грузом. Предпочтительной является смесь VP1 и VP2. После сборки VLP нагружаемый груз предпочтительно заключен внутри VLP.

Предпочтительно по меньшей мере один VLP несет нагружаемый груз, более предпочтительно по меньшей мере 1%, по меньшей мере 2%, по меньшей мере 3%, по меньшей мере 5%, по меньшей мере 7%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%,

по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99 или 100% от собранного VLP несет нагружаемый груз.

Сборка вирусоподобных частиц предпочтительно происходит в растворе, более предпочтительно в водном растворе. Возможность сборки VLP предпочтительно включает корректировку концентрации ионов  $Ca^{2+}$  в растворе до уровня, при котором может произойти сборка VLP. Указанная концентрация ионов  $Ca^{2+}$ , в частности, в интервале от 0,1 до 5 мМ, предпочтительно от 0,2 до 3 мМ, более предпочтительно от 0,5 до 2 мМ или от 0,8 до 1,2 мМ, наиболее предпочтительно примерно 1 мМ. Кроме того, естественная сборка VLP предпочтительно происходит в окислительных условиях, в частности, в отсутствие значительных концентраций восстановителей, таких как DTT, DTE или меркаптоэтанола.

Предоставление вирусных белков и возможность сборки VLP могут быть выполнены одновременно. В частности, вирусные белки предоставляются в условиях, когда может произойти сборка VLP.

В предпочтительных вариантах осуществления предоставление вирусных белков и VLP сборка выполняется *in vivo*. В частности, VLP собираются внутри клеток-хозяев, экспрессирующих вирусные белки или в результате лизиса или разрушения клеток-хозяев. Сборка VLP может, например, быть выполнена, как описано в EP 0862633, раскрытие которого включено сюда посредством ссылки.

Способы доставки.

Настоящее изобретение также относится к способу доставки вещества или композиции в клетку-мишень в центральной нервной системе при помощи вирусоподобных частиц в соответствии с настоящим изобретением. Способ предпочтительно включает в себя стадии:

(a) получения вирусоподобной частицы в соответствии с настоящим изобретением, которое включает вещество или композицию в качестве нагружаемого груза; и

(b) введения в вирусоподобной частицы в живой организм, предпочтительно в человека.

Клетка-мишень может быть естественной клеткой-мишенью вируса JC.

Активное вещество или композиция может быть любого вида и характера. В предпочтительном варианте осуществления активное вещество представляет собой нуклеиновую кислоту, в частности нуклеиновую кислоту, кодирующую белок или пептид, или ингибирующую нуклеиновую кислоту, такую как миРНК или микроРНК. В другом предпочтительном варианте осуществления активное вещество представляет собой белок или пептид. В еще одном варианте осуществления изобретения активное вещество представляет собой небольшую молекулу, в частности отрицательно заряженную малую молекулу. Активное вещество может также представлять собой смесь различных активных веществ.

Активное вещество предпочтительно представляет собой цитотоксическое средство.

Кроме того, изобретение относится к VLP, в целом, которые можно использовать в качестве системы доставки лекарственного средства, предназначенного для лечения или диагностики неврологических, нервных или нейродегенеративных расстройств, таких как, в частности, рассеянный склероз, болезнь Паркинсона или болезнь Альцгеймера.

В предпочтительном варианте осуществления VLP транспортируют к или в олигодендроциты.

### Примеры

1. VP1-VLP в гематоэнцефалическом барьере (ГЭБ). Модель *in vitro*.

Этот эксперимент показывает *in vitro* способность VLP пересекать гематоэнцефалический барьер в системе модели, которая соответствует организации и свойствам ГЭБ человека. В модельной системе использовали первичные эндотелиальные клетки мозга свиньи (PBCEC), способные сформировать гематоэнцефалический барьер *in vitro* (Angelow S., Zeni P. and Galla H.J. "Usefulness and limitation of primary cultured porcine choroid plexus epithel cells as an *in vitro* model to study drug transport at the blood-CSF barrier", *Adv Drug Delivery* 2004; 56(12):1859-73). Подготовку и выращивание PBCEC проводили, как описано Rempe et al., *BBRC*, 2011: Transport of Poly-(n-butylcyano-acrylate) nanoparticles across the blood-brain-barrier *in vitro* and their influence on barrier integrity.

Влияние содержащих груз VLP на капиллярные эндотелиальные клетки мозга свиньи (PBCEC) в фильтрующей системе Transwell изучали с помощью измерения относительного трансэндотелиального электрического сопротивления (TEER) (Rempe et al., 2011). Чтобы установить количественное доказательство доставки, мы использовали плазмидную ДНК в качестве груза. Целостность гематоэнцефалического барьера не была затронута VP1-VLP ни при каких обстоятельствах и концентрации. Для проверки транспорта груза через гематоэнцефалический барьер *in vitro* плазмидные ДНК упаковывали в VLP, как описано Goldmann et al. 1999 (*Journal of Virology: Molecular cloning and expression of major structural protein VP1 of the human polyoma virus: formation of virus like particles useful for immunological and therapeutic studies and measured quantitatively by specific qPCR*). Копии плазмидной ДНК считали на апикальной и базолатеральной сторонах ГЭБ в модели *in vitro*. Апикальная сторона - та, на которую добавляли VLP (просвет кровеносных сосудов *in vivo*), базолатеральная сторона относится к мозгу. Количественный показатель плазмидной ДНК на базолатеральной стороне представляет собой VLP-опосредованное прохождение молекул через эндотелиальные клетки головного мозга, соответственно доставку груза через гематоэнцефалический барьер.

2. Доставка генов-репортеров и экспрессия *in vivo*.

Эксперимент по доставке генов-репортеров запланировали, чтобы показать способности JC VP1-VLP доставлять вещества в клетки и органы живого организма. В этом случае экспрессия гена-репортера

является одним из лучших методов, чтобы показать не только доставку, но функциональность поставляемого вещества тоже (Hoffman, R.M., 2005: THE MULTIPLE USES OF FLUORESCENT PROTEINS TO VISUALIZE CANCER IN VIVO. *Nat. Rev. Cancer*; 5 (10):796-806).

Материалы.

Различные VP1-VLP зонды проверяли на способность упаковывать и доставлять плазмиды-репортеры в COS7 клетки (клетки почек зеленой мартишки) *in vitro*, так как эта клеточная линия, как известно, может быть трансдуцирована JCV VLP. Было 9 осаждаемых солевых VP1-VLP зондов и 15 хроматографически очищенных VP1-VLP зондов. Эксперименты на трансдукцию *in vitro* повторяли 5 раз. В этих экспериментах проверяли способность доставлять максимум люминесцентного сигнала с люциферинным субстратом *in vivo*.

Осаждаемые соли VP1-VLP осаждали в течение ночи и подвергали диализу в течение 24 ч в стандартном буфере (150 мМ NaCl, 10 мМ, Трис-HCl, pH7,5). Упаковка плазмидного гена-репортера была достигнута за счет химической диссоциации и реассоциации, как описано в Goldmann et al., 1999, *Journal of Virology: Molecular cloning and expression of major structural protein VP1 of the human polyoma virus: formation of virus like particles useful for immunological and therapeutic studies*.

Схема экспериментальной установки.

Внутривенное введение VLP в мышей иммунокомпетентной линии BALB/C проводили в хвостовую вену под анестезией изофлураном.

Животные были сгруппированы следующим образом:

- 5 мкг осаждаемых солью VLP (4 животных),
- 50 мкг осаждаемых солью VLP (4 животных),
- 5 мкг хроматографически очищенных VLP (4 животных),
- ДНК контроль (только плазмидный ген-репортер) (3 животных),
- VLP контроль (только капсиды VP1-VLP) (3 животных).

Биолюминесценцию измеряли на 2, 4, 7, 14 день и 22, 12 мин после внутрибрюшинного введения субстрата люциферина. Результаты объединяли в каждой группе и рассчитывали средний результат и стандартное отклонение. Средние были проанализированы с помощью двустороннего ANOVA с тестом Холма-Сидака в рамках анализа *posthoc*.

Результаты показаны на фиг. 3 и 4.

3. Эффективность трансдукции клеток Cos7 (африканских зеленых клеток почек обезьян) с помощью JC VP1-VLP, нагруженных плазмидами люциферазы, и JC VP1-VLP, смешанных с плазмидами люциферазы.

1. За 18 ч до трансдукции клетки Cos7 перемещали в 24-луночный планшет.
2. VP1-VLP диссоциировали с DTT и EGTA, смешивали с плазмидами люциферазы и подвергали диализу в буфере для реассоциации в течение ночи при температуре +4°C.
3. На следующий день упакованные VP1-VLP изымали из диализа.
4. Смесь VP1-VLP с плазмидами люциферазы получали в Krauzewicz (*Gene Therapy* (2000) 7, 1094-1102):
  - a) отношение VLP и плазмид люциферазы в смеси составляло 30:1 (мас./мас.);
  - b) эту смесь выдерживали 15 мин при комнатной температуре;
  - c) смеси разбавляли клеточной средой DMEM и с помощью пипетки помещали к клеткам Cos7 в 24-луночный планшет.

5. VP1-VLP с включением плазмид люциферазы с помощью пипетки добавляли к клеткам Cos7; то же самое было выполняли с VP1-VLP, смешанными с плазмидами люциферазы.

6. Через 72 ч клетки лизировали и измеряли активность люциферазы в триплетах с помощью Luciferase Assay Promega.

Результаты экспериментов независимой трансдукции показаны на фиг. 5.

4. Иммуногистохимическое определение люциферазы и VP1 белка в головном мозге мыши после внутривенного применения VLP с включением плазмид люциферазы.

Как показано выше, JC VP1-VLP способны доставлять вещества в клетки и органы живого организма как доказано обнаружением плазмидной ДНК (по кПЦР) или активности люциферазы. Эти экспериментальные результаты, кроме того поддерживают иммуногистохимическое обнаружение белка люциферазы и белка VP1 в головном мозге.

Ткани мозга, выделенные из мышей после внутривенной инъекции VLP в мышей иммунокомпетентной линии BALB/c (процедура, как описано выше), фиксировали в PFA и заливали в парафин, как описано (J. Jankowski et al., *The Journal of comparative Neurology* 472: 87-99, 2004: "Engrailed-2 negatively regulates the onset of prenatal Purkinje Cell differentiation"). Тонкие срезы от 7 до 10 мкм срезали и помещали на предметные стекла Histobondplus. Срезы повторно гидратировали, эндогенную пероксидазу инактивировали и срезы пермеабелизировали. Этап блокады проводили в 3%-ном растворе альбумина бычьей сыворотки. Белок люциферазы или белок VP1 соответственно были обнаружены с помощью моноклональных антител. Чтобы увеличить уровень сигнала, использовали амплификационную флуоресцентную систему TSA (TSA™ Plus Fluorescein System, Perkin Elmer).

#### Результаты.

Как показано в правой панели на фиг. 6В, с помощью иммуногистохимического анализа с использованием антитела анти-VP1 смогли обнаружить белок VP1 в клетках центральной нервной системы. Срез головного мозга показывает разбросанные пятна неодинакового размера, что свидетельствует о клеточной локализации VP1 в паренхиме головного мозга. С помощью использования антител анти-люциферазы также смогли обнаружить белок люциферазы в клетках центральной нервной системы. В соответствии с результатами для белка VP1 окрашивание среза головного мозга с помощью люциферазы показало разбросанные пятна неодинакового размера, что свидетельствует о клеточной локализации люциферазы в паренхиме головного мозга.

Обсуждение: клеточное присутствие люциферазы и белка VP1 в головном мозге представляет собой дополнительную поддержку основной концепции изобретения, поскольку она показывает, что VLP, а не только одно активное вещество, пересекают гематоэнцефалический барьер и входят в ЦНС.

5. Анализ колокализации показывает присутствие белка VP1 в олигодендроцитах.

На основе описанного выше клеточного обнаружения белка VP1 в ЦНС проводили эксперимент колокализации, чтобы определить соответствующие клетки-мишени. Для этого обнаруженный белок VP1 совместно локализуется с маркером Olig 2, который специально расположен на олигодендроцитах (B. Menn et al., "Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain", *The Journal of Neuroscience*, 2006, 26(30): 7907-7918).

#### Результаты.

Как показано в нижней левой части фиг. 8, с помощью маркера OLIG2 несколько пятен неправильной формы можно обнаружить в срезе мозга, которые в каждом случае также окрашены с помощью окрашивания ядер DAPI (верхняя левая часть фиг. 8) и таким образом указывают на олигодендроциты. Каждый из этих олигодендроцитов также дает положительный результат на белок VP1 белка, как показано в нижней правой панели фиг. 8

Клетки, которые являются положительными для OLIG2 и VP1 помечены белой стрелкой. Таким образом, белок VP1 локализован в олигодендроцитах ЦНС, что свидетельствует об инфицировании вводимыми внутривенно VLP.

Обсуждение: обнаружение белка VP1 в олигодендроцитах мозга в соответствии с естественным тропизмом вируса JCV. В результате заявленные VLP по изобретению особенно подходят для терапевтического лечения заболеваний, связанных с олигодендроцитами, таких как рассеянный склероз.

#### Надписи к фигурам.

Фиг. 1А и 1В - относительная трансэндотелиальное электрическое сопротивление (А и В) после добавления VP1-VLP в концентрации между  $5 \times 10^8$  и  $2 \times 10^{12}$  частиц на лунку (n=3).

Фиг. 2 - прохождение ДНК, нагруженной VP1-VLP, через гематоэнцефалический барьер в модели *in vitro*, измеренное с помощью кПЦР со специфическими праймерами. Добавленные VLP-количество VLP, добавленных на апикальную сторону модели ГЭБ, обнаруженные VLP представляют собой количество плазмид на апикальной и базолатеральной сторонах модели ГЭБ (n=3).

Фиг. 3 - биолюминесцентные сигналы в теле мыши после внутривенного применения: 5 мкг осаждаемых солей VLP; 50 мкг осаждаемых солей VLP; 5 мкг хроматографически очищенных VLP; ДНК контроль (только плазмидный ген-репортер); VLP контроль (только VP1-VLP капсиды). Как пример, 1 мышь каждой группы, вентральная и дорсальная стороны.

Фиг. 4 - биолюминесцентные сигналы в головах мышей после внутривенного применения: 5 мкг осаждаемых солей VLP; 50 мкг осаждаемых солей VLP; 5 мкг хроматографически очищенных VLP; ДНК контроль (только плазмидный ген-репортер). Средние результаты в группах минус VLP контроль (в качестве фонового сигнала).

Фиг. 5А и 5В - трансдукция клеток Cos7 с помощью VP1-VLP, нагруженных ДНК плазмид люциферазы. RLU - относительная световая единица; 25 мкг VLP с включением - 25 мкг JC VP1-VLP с включением плазмид люциферазы; 50 мкг VLP упакованы - 50 мкг JC VP1-VLP с включением плазмид люциферазы; 50 мкг VLP смешанные - 50 мкг JC VP1-VLP смешанные с плазмидами люциферазы; ДНК контроль - контроль плазмид люциферазы.

Фиг. 6 - иммуногистохимический анализ срезов мозга. Левая колонка показывает DAPI окрашивание клеточного ядра, правая колонка - флуоресцентное мечение белков: А - негативный контроль; В - FITC-флуоресцентное окрашивание VP1 белка; С - FITC-флуоресцентное окрашивание белка люциферазы.

Фиг. 7 - отрицательный контроль колокализации белка VP1 с маркером олигодендроцитов Olig2. Верхняя левая панель показывает окрашивание клеточных ядер красителем DAPI. Верхняя правая панель показывает сигнал после обнаружения флуоресценции без использования антител анти-VP1. Нижняя левая панель показывает сигнал после обнаружения флуоресценции без использования антител анти-Olig2. Нижняя правая панель представляет объединенные фотографии двух контрольных окрашиваний.

Фиг. 8 - колокализация белка VP1 и маркера олигодендроцитов Olig2. Верхняя левая панель показывает окрашивание клеточных ядер красителем DAPI. Верхняя правая панель показывает локализацию белка VP1 (FITC-флуоресценция). Нижняя левая панель показывает окрашивание антителами анти-Olig2

(TRITC-флуоресценция). Нижняя правая панель представляет собой объединенные картины окрашивания для OLIG2-маркера и белка VP1.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение вирусоподобной частицы (VLP), полученной из вируса полиомы человека, содержащей лекарственное средство, для доставки лекарственного средства в центральную нервную систему (ЦНС).

2. Применение по п.1 для доставки лекарственного средства в ЦНС человека.

3. Применение по п.1 или 2, где VLP нагружена лекарственным средством.

4. Применение по любому из предшествующих пунктов, где VLP происходит из вируса JC.

5. Применение по любому из предшествующих пунктов, где VLP способна преодолевать гематоэнцефалический барьер на пути в ЦНС.

6. Применение по любому из предшествующих пунктов, где VLP способна преодолевать физиологически интактный гематоэнцефалический барьер.

7. Применение по любому из пп.4-6, где VLP состоит из белков VP1 вируса JC.

8. Применение по любому из предшествующих пунктов, где VLP пригодна для внутривенного введения.

9. Применение по любому из пп.1-6 или 8, где VLP содержит VP1 и/или VP2, причем VP1 содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности SEQ ID NO: 1 по всей ее длине, а VP2 содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности SEQ ID NO: 3 по всей ее длине.

10. Применение по любому из предшествующих пунктов, где лекарственное средство выбрано из цитотоксического агента и детектируемого агента, такого как радионуклид, белок, пептид и нуклеиновая кислота.

11. Применение по п.10, где нуклеиновая кислота выбрана из кодирующих белки нуклеиновых кислот, таких как мРНК, кДНК, плазмиды или векторы; ингибирующих нуклеиновых кислот, таких как миРНК или микроРНК; и нуклеиновых кислот, имеющих каталитическую активность, таких как рибозимы.

12. Применение фармацевтической композиции для доставки лекарственного средства в ЦНС, где фармацевтическая композиция содержит VLP, полученную из вируса полиомы человека, причем по меньшей мере 1% от общего количества лекарственного средства инкапсулирован в оболочку VLP.

13. Применение по п.12, где VLP не агрегированы.

14. Способ лечения заболевания ЦНС, включающий:

а) обеспечение VLP, полученной из вируса полиомы человека, содержащей лекарственное средство;

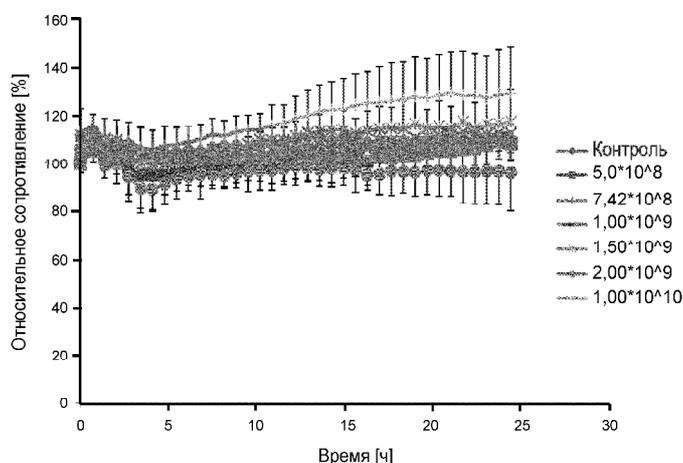
и

б) введение указанной VLP в организм.

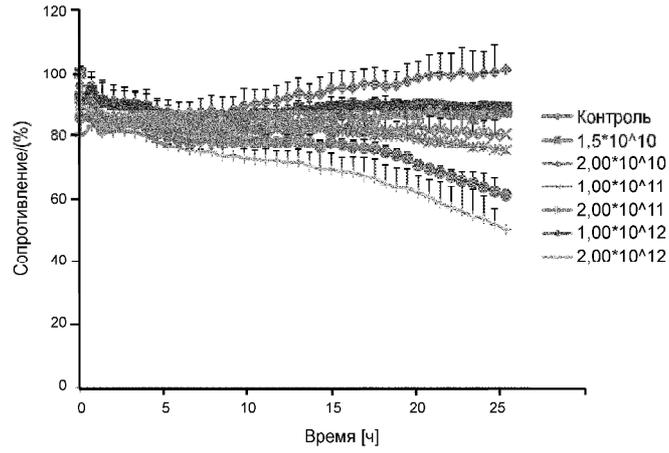
15. Способ по п.14, где заболевание ЦНС представляет собой неврологическое, нервное или нейродегенеративное расстройство.

16. Способ по п.14 или 15, где VLP вводят перорально или парентерально.

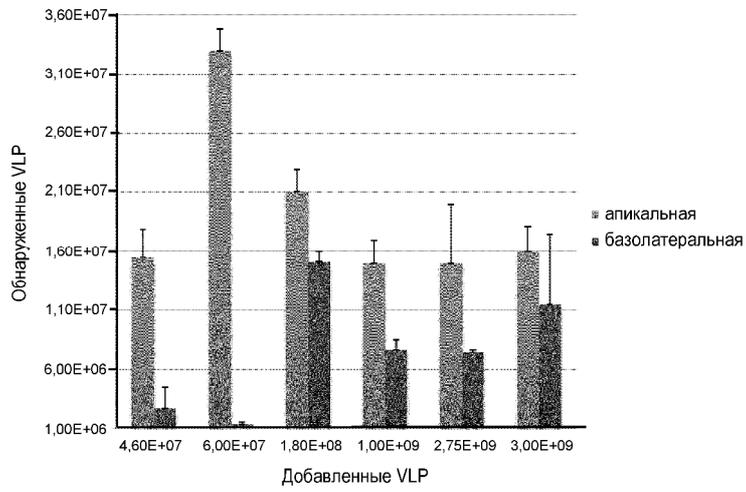
17. Способ по любому из пп.14-16, где VLP вводят внутривенно.



Фиг. 1А



Фиг. 1В

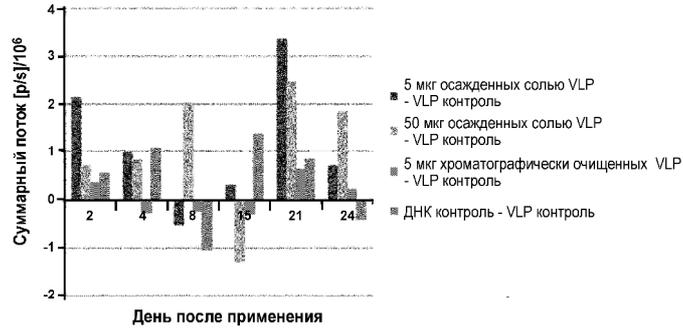


Фиг. 2

5 мкг осажженных солью VLP	50 мкг осажженных солью VLP	5 мкг хроматографически очищенных VLP	ДНК контроль	VLP контроль

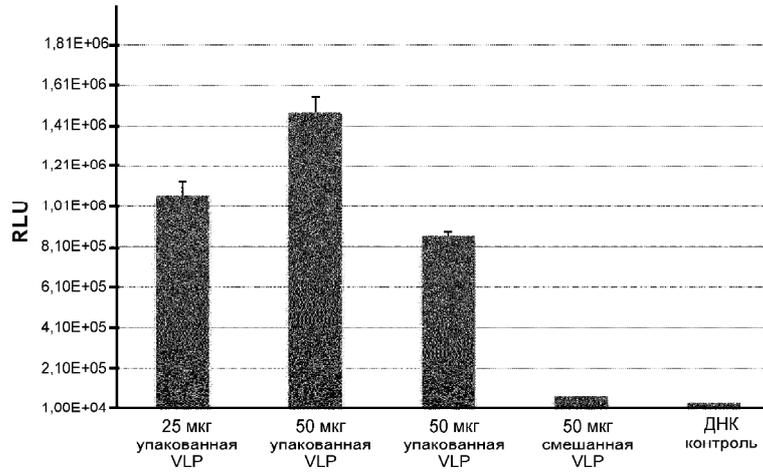
Фиг. 3

Билюминистентный сигнал в голове после внутривенного применения VLP в сравнении с контрольной группой VLP



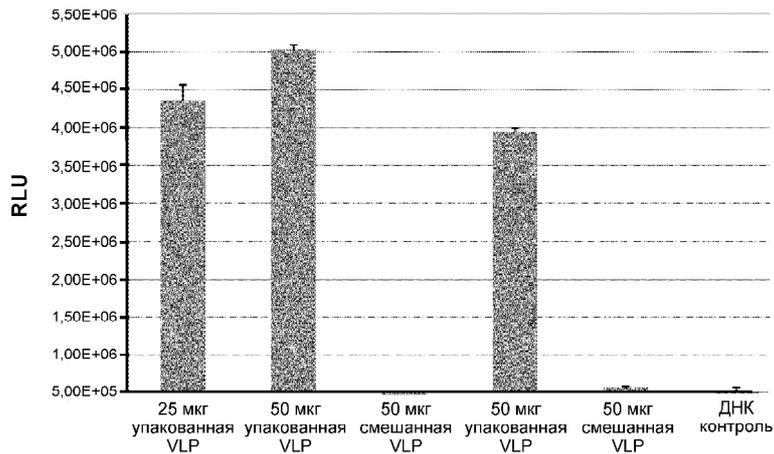
Фиг. 4

Трансдукция I

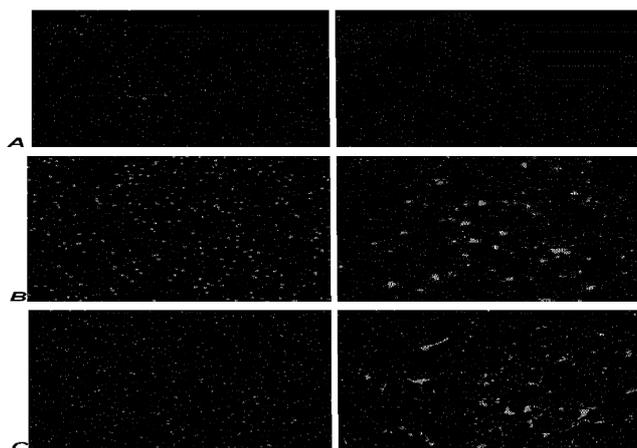


Фиг. 5A

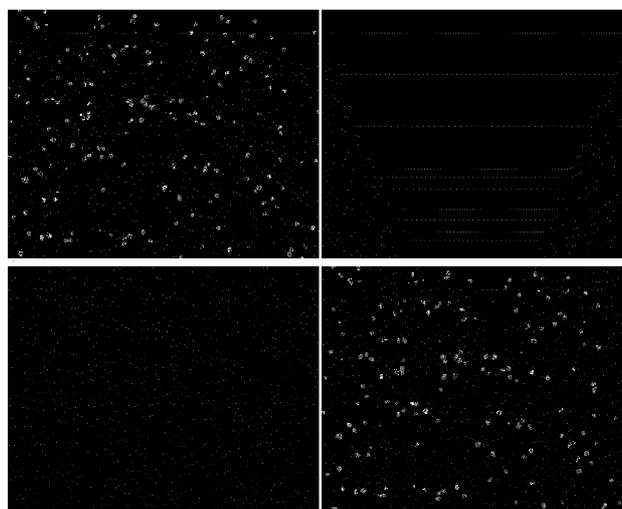
Трансдукция II



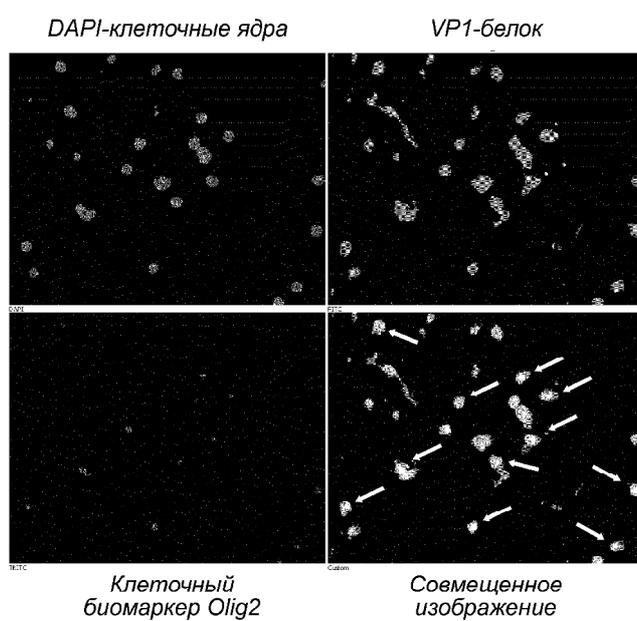
Фиг. 5B



Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8

