

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **036780**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.12.21

(21) Номер заявки
201792364

(22) Дата подачи заявки
2017.11.26

(51) Int. Cl. **C12N 15/16** (2006.01)
C12N 15/74 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
A61K 38/22 (2006.01)
A61P 25/04 (2006.01)

(54) ПЛАЗМИДНАЯ ДНК, КОДИРУЮЩАЯ БЕТА-ЭНДОРФИН, БАКТЕРИАЛЬНЫЙ ПРОДУЦЕНТ, АНАЛЬГЕТИЧЕСКОЕ СРЕДСТВО

(43) **2019.05.31**

(96) **2017000128 (RU) 2017.11.26**

(71)(72)(73) Заявитель, изобретатель и патентовладелец:

**ДУХОВЛИНОВ ИЛЬЯ
ВЛАДИМИРОВИЧ (RU)**

(56) EP-A2-1363658

CHEN K.H. et al. Intrathecal coelectrotransfer of a tetracycline-inducible, three-plasmid-based system to achieve tightly regulated antinociceptive gene therapy for mononeuro-pathic rats. *J. Gene Med.*, 2008, 10(2), p. 208-2016 (реферат) [онлайн] [найдено 04.09.2018], Найдено из PubMed, PMID: 18064731

(57) Изобретение относится к области медицины, фармакологии, биотехнологии, молекулярной биологии, генной инженерии и может быть использовано для анальгезии. Предложена плазмидная ДНК для транзientной экспрессии полинуклеотида в клетках млекопитающих, содержащая прокариотические и эукариотические элементы, фрагмент, обеспечивающий усиленный захват плазмидной ДНК клетками, и полинуклеотид, кодирующий модифицированный для увеличения тропности к рецепторам бета-эндорфин, который оптимизирован по кодонному составу для экспрессии в клетках млекопитающих. Также предложена бактериальная клетка, продуцирующая заявленную плазмидную ДНК, и средство, обладающее анальгезирующим действием, для применения у млекопитающих, содержащее заявленную плазмидную ДНК. Технический результат от использования разработанной плазмидной ДНК и анальгетика на ее основе заключается в увеличении контролируемости синтеза именно бета-эндорфина, в увеличении эффективности плазмидной ДНК, с которой синтезируется бета-эндорфин, и в уменьшении ее количества для достижения анальгезии, в увеличении длительности анальгезии и в расширении спектра анальгетических средств.

B1

036780

036780

B1

Изобретение относится к области медицины, фармакологии, биотехнологии, молекулярной биологии, генной инженерии и может быть использовано для анальгезии.

Важно признать, что боль является не просто индикатором основного заболевания или процесса повреждения, а самостоятельной проблемой, наносящей большой урон отдельным людям и обществу в целом. Для улучшения качества жизни облегчение боли как таковой должно стать терапевтической целью.

Показано, что изменение концентрации бета-эндорфина в плазме крови находится в прямой зависимости от вида болевого синдрома, его интенсивности и эффективности анальгезии [Бета-эндорфин - маркер эффективности обезболивания при острой боли и хроническом болевом синдроме у онкологических больных / З.В. Павлова и др. // Проблемы клинической медицины. - 2007. - № 1. - С. 36-40. - ISSN 1817-8359]. Данный эндогенный опиоид способен уменьшать боль. Однако введение эндогенных опиоидов либо молекул на их основе может быть осложнено формированием антител на них, что может привести к побочным эффектам.

Известны рекомбинантные вирусы, несущие ген предшественника эндорфина либо эндорфина.

Известен вектор pRetro-Off-POMC на основе ретровируса, кодирующей проопиомеланокортин (POMC), предшественника бета-эндорфина, для осуществления синтеза бета-эндорфина в отсутствие доксициклина [[https://doi.org/10.1016/S1525-0016\(16\)40805-1](https://doi.org/10.1016/S1525-0016(16)40805-1)].

Однако доставка гена в организм с использованием вирусного вектора имеет ряд существенных недостатков, связанных с рисками инфицирования и специфичных реакций на сам вектор такой природы, например, может возникнуть воспалительная реакция, что исключает повторное введение вектора. Получение несет риски попадания в организм веществ, которые могут вызвать различные нежелательные эффекты, либо является сложным и экономически не выгодным. Также вирусные векторы обладают способностью реплицироваться, что снижает степень контроля над экспрессией целевого белка, что, в свою очередь, не всегда желательно и применимо, в особенности в отношении анальгезии.

Плазмидные ДНК являются более безопасным средством доставки целевого гена в организм. Показано, что плазмиды поддерживаются в виде эписомы и не интегрируют в геном, с них синтезируется и затем секретируется из клетки белок, в результате осуществляется неиммуногенное, безопасное использование данного белка для анальгезии. Синтезируемый в организме с плазмидной ДНК белок подвергается естественному посттрансляционному процессингу, а также обеспечивается правильный фолдинг белка за счет клеточных шаперонов. Данные модификации труднодостижимы при производстве белков, что может драматически сказаться на ряде их функций. Используются природные механизмы метаболизма и катаболизма действующего вещества, без образования токсичных продуктов, благодаря естественной природе плазмидной конструкции и кодируемого ею белка. Плазмидная ДНК не реплицируется после введения в организм млекопитающего, что позволяет осуществлять контроль над количеством синтезируемого белка и соответственно над анальгезией.

Следует также отметить, что производство, очистка и хранение ДНК препаратов экономически выгоднее, чем белковых, так как первые более стабильны, их можно нарабатывать в больших количествах и с меньшими затратами.

Известны следующие плазмидные ДНК, кодирующие бета-эндорфин.

Для осуществления контролируемой антиноцицептивной генной терапии вводят систему из трех плазмид, индуцируемую тетрациклином, кодирующих бета-эндорфин, тетрациклиновый активатор транскрипции и тетрациклиновый сайленсер транскрипции (PMID: 18064731). Введение плазмид электропереносом осуществлялось в спинной мозг. Доксициклин для регуляции экспрессии эндорфина вводили внутривентриально. Экспрессия эндорфина осуществлялась только при введении доксициклина. Предлагают также вводить систему из трех плазмид в полость позвоночного канала для облегчения боли в конечностях, вызванной сдавливанием седалищного нерва. Однако следует отметить, что синтез эндорфина в данном случае контролируется синтезом активатора транскрипции, который, в свою очередь, синтезируется под воздействием доксициклина, - данная система является сложно регулируемой. Также хотелось бы осуществлять введение более безопасным способом. Меньшее количество вариантов вводимых плазмид также является предпочтительным, поскольку снижает иммуногенность вводимого препарата ДНК и уменьшает риск, что какой-то компонент системы не будет работать.

Известна система из двух плазмид, кодирующих POMC и сайленсер, контролируемая доксициклином, также вводимая в спинной мозг электропереносом [PMID: 15116065]. Однако недостатки те же, что и у описанной выше системы.

Известно средство для уменьшения или супрессии боли у высших животных, в том числе человека, на основе в одном из вариантов экспрессионных конструкторов, содержащих CMV промотор; ген, кодирующий POMC, либо POMC, в котором фрагменты, кодирующие АКТГ и P-MSH, заменены на бета-эндорфин; сайт полиаденилирования [EP 1363658 A2]. Конструкторы могут быть кольцевыми или линейными. MIDGES дополнительно содержат интрон [cf. EP 0941318B1]. Известны и векторы для получения таких экспрессионных конструкторов - плазмиды pMOK и pNOK, содержащие в одном из вариантов ген, кодирующий бета-эндорфин в различных вариантах. Однако для введения животному используются конструкторы, содержащие последовательность, кодирующую POMC, как описано выше, не бета-эндорфин непосредственно. Введение осуществляется локально инъекционно.

В более поздней статье показано, что MIDGE (Non-viral, non-plasmid minimalistic, immunologically defined gene expression vectors), несущий ген, кодирующий POMC, не продемонстрировал анальгетический эффект [PMID:20003437].

Заявителями предложена плазмидная ДНК, несущая нуклеотидную последовательность, кодирующую непосредственно бета-эндорфин, с введенными мутациями для большей тропности к рецепторам, оптимизированную по кодонному составу для экспрессии в клетках млекопитающих, с введенной гетерологичной секреторной последовательностью, а также фрагмент, обеспечивающий сильное связывание с Toll-like рецептором 9 (TLR9) для большей трансформации клеток плазмидной ДНК. Такую плазмидную ДНК, анальгетик на ее основе можно вводить инъекционно локально либо системно.

Технический результат от использования разработанной плазмидной ДНК и анальгетика на ее основе заключается в увеличении контролируемости синтеза именно бета-эндорфина за счет того, что вводится вектор, несущий последовательность непосредственно бета-эндорфина, не предшественника, который в разных тканях процессируется по-разному.

Технический результат заключается и в увеличении эффективности плазмидной ДНК, с которой синтезируется бета-эндорфин, и уменьшении ее количества для достижения анальгезии. Данные технические результаты достигаются за счет большей тропности синтезируемого бета-эндорфина к рецептору благодаря введенным специфичным мутациям в ген, его кодирующий. Также они достигаются за счет более эффективной трансформации клеток благодаря наличию в плазмидной ДНК фрагмента, обеспечивающего сильное связывание с TLR. Данные технические результаты достигаются и за счет оптимизации по кодонному составу для экспрессии в клетках млекопитающих нуклеотидной последовательности, кодирующей бета-эндорфин, а также за счет того, что плазмидная ДНК содержит элементы, обуславливающие стабильность мРНК и, соответственно, увеличивающие время полужизни мРНК, в результате синтез белка с одной молекулы мРНК осуществляется большее количество раз, а также в результате увеличивается количество синтезируемого белка; благодаря чему синтез белка идет интенсивнее.

Кроме того, технический результат заключается в увеличении длительности анальгезии и достигается тем, что нуклеотидная последовательность, кодирующая бета-эндорфин, содержит элементы, обуславливающие стабильность мРНК и соответственно увеличивающие время полужизни мРНК, в результате синтез белка с одной молекулы мРНК осуществляется большее количество раз, а также в результате увеличивается количество синтезируемого белка; а также тем, что нуклеотидная последовательность бета-эндорфина оптимизирована по кодонному составу для экспрессии в клетках млекопитающих, в результате синтез белка идет интенсивнее.

При внедрении в практику это позволит существенно снизить количество вводимой плазмидной ДНК (в 10-50 раз) по сравнению с дозами, используемыми в настоящее время в отечественной и мировой практике при генной терапии.

Технический результат выражается также в расширении спектра анальгетических средств. При плохой переносимости или непереносимости аналогов предложенный анальгетик позволит осуществить анальгезию, за счет чего пациент получит возможность осуществить действия, которые не мог либо не хотел осуществить без анальгезии, например решиться на требуемую процедуру, а также улучшит качество жизни, например, получит меньше неприятных ощущений, чем без использования анальгетика, либо сможет облегчить острую либо хроническую боль. Указанный технический результат достигается тем, что используют анальгетик по настоящему изобретению.

Технический результат от использования продуцента разработанной плазмидной ДНК заключается в получении такой плазмидной ДНК.

По временным характеристикам можно выделить два типа боли:

острую боль - новую, недавнюю боль, неразрывно связанную с вызвавшим ее повреждением и, как правило, являющуюся симптомом какого-либо заболевания, исчезает при устранении повреждения [Eddy N.B., Leimbach D.J. // *Pharmacol. Exp. Ther.* - Mar; 107(3):385-93. - 1953] (в том числе пред- и послеоперационная, посттравматическая, при ожогах, острая боль во время рождения ребенка, боль, вызванная травмой спинного мозга, острая головная боль, боль при ВИЧ/СПИДе, кризисе серповидных клеток, при невралгии тройничного нерва, панкреатите и других болях в ЖКТ, при инфаркте миокарда и других крупных сердечных событиях, интервенционная боль (при диагностических и терапевтических процедурах), острая при хронической боли [WHO Normative Guidelines on Pain Management, Geneva June 2007], которая длится до 2-3 месяцев, причем может иррадиировать; и

хроническую боль - продолжающуюся длительный период времени (свыше 2-3 месяцев) даже после устранения причины, ее вызвавшей, часто приобретает статус самостоятельной болезни, например воспалительного процесса [Eddy N.B., Leimbach D.J. // *Pharmacol. Exp. Ther.* - Mar; 107(3):385-93. - 1953], причем наблюдается снижение эффективности анальгетиков. К хронической боли можно отнести хроническую боль при злокачественной болезни (включая боль у больных раком, ВИЧ/СПИД, при боковом амиотрофическом склерозе (ALS), рассеянном склерозе, при конечной стадии отказа органа, расширенной хронической обструктивной болезни легких, расширенной застойной сердечной недостаточности, паркинсонизме) и хроническую боль, не связанную со злокачественной болезнью (хронические скелетно-мышечные боли, такие как спинная боль или боли в пояснице, при хроническом дегенеративном арт-

рите, остеоартрите, ревматоидном артрите, миофасциальная и ревматическая боли, хроническая головная боль, мигрень, боли в костях; невропатические боли (в том числе боли при нервных сжатиях, травмах, боли после повреждения нерва и ампутации), при диабетической невропатии, сложные региональные болевые синдромы (тип I и тип II), при спазмах скелетных мышц, при постгерпетической невралгии, хронические боли после хирургических вмешательств; висцеральная боль (при растяжении полости внутренностей и коликах); и хроническая боль при серповидно-клеточной анемии [WHO Normative Guidelines on Pain Management, Geneva June 2007].

С использованием предложенного анальгетика можно облегчить и нивелировать оба описанных типа боли.

Сущность изобретения

Предложена плазмидная ДНК для транзientной экспрессии полинуклеотида в клетках млекопитающих, содержащая прокариотические ориджин репликации и маркерный ген, эукариотические сильный промотор и лидерную последовательность мРНК, а также регуляторные последовательности для указанных элементов, от одного сайта для клонирования гена интереса и от одного сайта для посадки от одного праймера для анализа состава плазмидной ДНК, фрагмент для усиления захвата плазмидной ДНК клетками, охарактеризованный SEQ ID NO: 1, повторенный десятикратно последовательно, и полинуклеотид, представленный гетерологичной секреторной последовательностью, фрагментом, кодирующим модифицированный для увеличения тропности к рецепторам бета-эндорфин, охарактеризованный SEQ ID NO: 2, оптимизированными по кодонному составу для экспрессии в клетках млекопитающих, и терминирующей последовательностью. Фрагмент, охарактеризованный SEQ ID NO: 1, повторенный десятикратно последовательно, расположен между любыми двумя элементами плазмидной ДНК.

Также предложены бактериальная клетка, продуцирующая заявленную плазмидную ДНК и средство, обладающее анальгезирующим действием, для применения у млекопитающих, в том числе человека, содержащее заявленную плазмидную ДНК в эффективном количестве и фармацевтически приемлемый эксципиент.

Подробное описание изобретения

Плазмидная ДНК содержит существенные для организмов ее поддержания и использования элементы, вкпе с соответствующими регуляторными последовательностями. Регуляторные последовательности - нуклеотидные последовательности, способные повлиять на экспрессию гена на уровне транскрипции и/или трансляции, а также на механизмы, обеспечивающие существование и поддержание функционирования плазмидной ДНК.

Плазмидную ДНК экономически наиболее выгодно нарабатывать в прокариотических клетках, преимущественно бактериальных клетках. В связи с этим плазмидная ДНК по настоящему изобретению содержит элементы для поддержания и амплификации, преимущественно в больших количествах, в клетках бактерий. Такими существенными элементами являются бактериальные ориджин репликации, для поддержания в клетке со средней, предпочтительно высокой, копийностью, и маркерный ген для возможности селекции штамма-продуцента. Подходящий ориджин репликации представлен pM1 (der.), ColE1 (der.) и F1, pUC и F1, но не ограничивается ими. Подходящий маркерный ген представлен репортерным геном или геном устойчивости к антибиотику, например ампициллину, преимущественно канамицину, но не ограничивается ими.

Плазмидная ДНК по настоящему изобретению содержит элементы для эффективного функционирования в клетках млекопитающих.

Таким элементом является промотор с соответствующими регуляторными последовательностями из природных промоторов со своими регуляторными элементами (CaM kinase II, CMV, nestin, L7, BDNF, NF, MBP, NSE, p-globin, GFAP, GAP43, тирозингидроксилаза, субъединица 1 каинатного рецептора и субъединица В глутаматного рецептора и другие) либо синтетических промоторов с регуляторными последовательностями для получения необходимого характера экспрессии (соотношения продолжительности и уровня экспрессии) целевого гена на уровне транскрипции.

Промотор является важным компонентом плазмиды, который запускает экспрессию интересующего гена. Классические промоторы для плазмидных ДНК-компонентов препаратов - это CMV человека, немедленно-ранний или CMV-chicken- β actin (CAGG) промотор. Промоторы CMV используются для большинства ДНК-вакцин, так как они опосредуют высокие уровни конститутивной экспрессии в широком диапазоне тканей млекопитающих [Manthorpe M., Cornefert-Jensen F., Hartikka J., et al. Gene therapy by intramuscular injection of plasmid DNA: studies on firefly luciferase gene expression in mice. Hum. Gene Ther. 1993; 4(4):419-431] и не подавляют прочитывание downstream. Увеличение уровня экспрессии наблюдают при изменении CMV промотора, например, включением HTLV-1R-U5 downstream от промотора цитомегаловируса или при использовании химерного SV40-CMV промотора [Williams J.A., Carnes A.E., Hodgson C.P. Plasmid DNA vaccine vector design: impact on efficacy, safety and upstream production. Biotechnol. Adv. 2009; 27(4):353-370]. Альтернативой CMV промоторам служат тканеспецифические промоторы хозяина, которые позволяют избежать конститутивной экспрессии антигенов в неподходящих тканях, что в целом приводит к снижению иммуногенности [Cazeaux N., Bennisser Y., Vidal P.L., Li Z., Paulin D., Bahraoui E. Comparative study of immune responses induced after immunization

with plasmids encoding the HIV-1 Nef protein under the control of the CMV-IE or the muscle-specific desmin promoter. *Vaccine*. 2002; 20(27-28):3322-3331].

Возможные регуляторные последовательности по отношению к промотору:

энхансер: для увеличения уровня экспрессии через улучшение взаимодействия РНК-полимеразы и ДНК;

инсулятор: для модулирования функций энхансера;

сайленсеры либо их фрагменты: для снижения уровня транскрипции, например, для тканеспецифической экспрессии;

5' нетранслируемая область до промотора: включая интрон.

Плазмидная ДНК по настоящему изобретению содержит от одной из вышеприведенных регуляторных последовательностей, в зависимости от варианта плазмидной ДНК, основанного на выборе промотора и желаемых параметрах экспрессии целевого гена. Опираясь на существующий уровень техники, на известные и очевидные варианты таких элементов и их использования, плазмидная ДНК по настоящему изобретению может содержать любые отвечающие вышеуказанным условиям комбинации, при которых с плазмидной ДНК осуществляется синтез бета-эндорфина в клетках млекопитающих. При использовании сайленсера либо инсулятора в составе конструкции можно регулировать экспрессию целевого гена, гена описанного бета-эндорфина, т.е. осуществляется контроль над количеством синтезируемого белка, и, в принципе, синтезом белка как таковым и, соответственно, над анальгезией: при необходимости есть возможность в короткий срок остановить либо уменьшить экспрессию гена. В последнем варианте возможно и осуществление тканеспецифической экспрессии при необходимости.

Иные регуляторные последовательности:

нетранслируемая область downstream от промотора, включая интрон, для повышения стабильности мРНК и увеличения экспрессии целевого гена.

Плазмидная ДНК по настоящему изобретению в одном из вариантов дополнительно содержит такой регуляторный элемент.

Плазмидная ДНК по настоящему изобретению содержит и такой важный элемент, как лидерную последовательность мРНК, содержащую последовательность Козак непосредственно перед стартовым кодоном ATG, для увеличения экспрессии [Kozak M. Recognition of AUG and alternative initiator codons is augmented by G in position +4 but is not generally affected by the nucleotides in positions +5 and +6. *EMBO J*. 1997; 16(9):2482-2492].

Плазмидная ДНК также содержит сайт, преимущественно сайты, разные для клонирования целевого гена, для осуществления правильной ориентации целевого гена в плазмидной ДНК и сайт, преимущественно сайты, для посадки праймеров для его секвенирования.

Плазмидная ДНК также содержит терминирующую последовательность, которая необходима для сохранения стабильности мРНК, надлежащего прекращения транскрипции и экспорта мРНК из ядра. На экспрессию генов можно повлиять путем изменения терминирующей последовательности, в том числе ее укорачиванием. Она содержит последовательность стоп-кодон, 3'-нетранслируемую область с сигналом и сайтом полиаденилирования, стоп-кодон, за счет которой сохраняется стабильность мРНК и осуществляется надлежащее прекращение транскрипции и экспорт мРНК из ядра.

Полиаденилирование (полиА) необходимо для стабилизации транскрипта. Изменение последовательности полиА может привести к увеличению уровня экспрессии гена [Norman J.A., Hobart P., Manthorpe M., Feigner P., Wheeler C. Development of improved vectors for DNA-based immunization and other gene therapy applications. *Vaccine*. 1997; 15(8):801-803]. В плазмиде pVAX1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) область терминатора бычьего гормона роста содержит область гомопурина, которая чувствительна к нуклеазе. Показано, что альтернативная полиА последовательность может значительно улучшить стабильность плазмиды к нуклеазе [Azzoni A.R., Ribeiro S.C., Monteiro G.A., Prazeres D.M.F. The impact of polyadenylation signals on plasmid nuclease-resistance and transgene expression. *J. Gene Med*. 2007; 9:392-402]. Введение двух стоп-кодонов позволяет увеличить эффективность терминатора транскрипции.

Терминирующая последовательность предложенной плазмидной ДНК представлена нативной, т.е. присущей целевому гену, либо иной, более сильной, которая представлена, например, терминирующей последовательностью бычьего гормона роста (BGH), но ею не ограничивается, и во втором варианте может содержать дополнительный стоп-кодон перед 3'-нетранслируемой областью.

Опираясь на существующий уровень техники, на известные и очевидные варианты такого элемента, плазмидная ДНК по настоящему изобретению может содержать любую отвечающую вышеуказанным условиям терминирующую последовательность, при которой с плазмидной ДНК осуществляется синтез бета-эндорфина в клетках млекопитающих.

Плазмидная ДНК содержит фрагмент, охарактеризованный SEQ ID NO: 1, повторенный десятикратно последовательно, который расположен между любыми двумя элементами плазмидной ДНК, т.е. не мешая функционированию каких-либо ее элементов. Данный фрагмент обеспечивает усиленный захват плазмидной ДНК клетками за счет тропности к Toll-like Receptor 9 (TLR9).

Плазмидная ДНК также содержит гетерологичную секреторную последовательность, оптимизированную по кодонному составу для экспрессии в клетках млекопитающих. В одном варианте изобретения

содержит, например, секреторную последовательность ТРА (tissue-type plasminogen activator isoform 1 preproprotein [Homo sapiens], NCBI Reference Sequence: NP000921.1), но ею не ограничивается. Преимущество использования секреторной последовательности ТРА - в обширном предшествующем клиническом опыте, а также в том, что показана ее высокая производительность в отношении экспрессии секретруемого белка с различных генов-мишеней.

Плазмидная ДНК содержит и фрагмент, кодирующий бета-эндорфин, модифицированный для увеличения тропности к рецепторам, охарактеризованный SEQ ID NO: 2, оптимизированный по кодонному составу для экспрессии в клетках млекопитающих.

Оптимизация по кодонному составу проведена для увеличения экспрессии таргетного гена за счет увеличения эффективности считывания информации с данной мРНК на рибосомах. Она может быть осуществлена вручную либо с использованием специализированного программного обеспечения, например на сайте molbiol.ru, на основе аминокислотной последовательности белка.

Плазмидная ДНК также может дополнительно содержать исходные для кДНК указанного гена элементы, обуславливающие стабильность данной мРНК, такие как терминирующую последовательность (3'-нетранслируемая область, содержащая сигнал и сайт полиаденилирования, а также сигнал терминации транскрипции - стоп-кодон). Соответственно, в данном случае в остане плазмидной ДНК отсутствуют либо не функционируют аналогичные элементы.

Плазмидная ДНК для доставки гена, обуславливающего анальгезию, сочетает в себе такие свойства ДНК-вакцины на основе плазмидной ДНК, как высокий уровень экспрессии гена интереса в клетках млекопитающих, и такие свойства вектора для генной терапии, как отсутствие иммуногенности и длительность экспрессии гена, однако, например, за счет увеличения стабильности мРНК. Такая ДНК не встраивается в геном и не реплицируется в клетках млекопитающих.

Подходящие векторы для экспрессии в клетках млекопитающих представлены известными среднему специалисту в данной области и описанными в литературе [Hartikka J., Sawdey M., Cornefert-Jensen F., Margalith M., Barnhart K., Nolasco M., Vahlsing H.L., Meek J., Marquet M., Hobart P., Norman J., Manthorpe M. An improved plasmid DNA expression vector for direct injection into skeletal muscle. *Hum Gene Ther.* 1996 Jun 20; 7(10):1205-17 и др.], а также плазмидами, которые могут быть созданы средним специалистом в данной области с использованием рекомендаций по элементам векторов ["Cloning Vectors", ed. Pouwls et al., Elsevier, Amsterdam - New York-Oxford, 1985, ISBN 0444904018, Williams J.A., Carnes A.E., Hodgson C.P. Plasmid DNA vaccine vector design: impact on efficacy, safety and upstream production. *Biotechnol Adv.* 2009 Jul-Aug; 27(4):353-70. doi: 10.1016/j.biotechadv.2009.02.003. Epub 2009 Feb 20. Review и др.]. Предпочтительными плазмидными ДНК для использования у человека являются векторы, проверенные на людях, содержащие описанные выше элементы с соответствующими регуляторными последовательностями, возможно, модифицированные для соответствия заявленным критериям, что позволяет уменьшить количество требуемых исследований для регистрации средства. Однако возможно и использование иных плазмидных ДНК, содержащих требуемые описанные элементы. Для плазмидной ДНК для применения у млекопитающих, кроме человека, требования менее строгие, в связи с чем возможно использование более широкого спектра плазмид.

Последовательность расположения описанных элементов в плазмидной ДНК понятна среднему специалисту в данной области.

Предложен продуцент плазмидной ДНК на основе бактериальной клетки (на основе клеток, преимущественно, *Escherichia coli*, но не ограничиваясь ими). Среднему специалисту в данной области понятно, что, используя плазмидную ДНК согласно изобретению и бактериальную клетку, например, коммерческую, но ею не ограничиваясь, можно создать продуцент плазмидной ДНК, например, стандартными методами, например трансфекцией, электропорацией или пушкой с частицами. Для уменьшения вероятности возникновения мутаций благодаря метилированию плазмидной ДНК предпочтительно использовать штамм микроорганизма, не содержащий метилазу в геноме.

Также предложено анальгетическое средство на основе охарактеризованной плазмидной ДНК в эффективном количестве, также содержащее фармацевтически приемлемый эксципиент, для применения у млекопитающих, в частности человека. Фармацевтически приемлемые носители или буферные растворы известны из уровня техники и включают те, которые описаны в различных текстах, таких как, например, Remington's Pharmaceutical Sciences.

Данная фармацевтическая композиция предназначена для лечения, облегчения и/или профилактики боли, в частности острой или хронической боли, нарушений чувствительности.

Возможно и использование иных технологий доставки плазмидной ДНК в клетки различных тканей, например безыгольного шприца, позволяющего осуществить доставку в клетки различных тканей живых животных [Furth et al., *Analytical Biochemistry*, 205, 365-368, (1992)].

Показано, что в норме мышечные волокна не экспрессируют антигены МНС, однако при воспалении, связанном с инфекцией, или в присутствии интерферона гамма мышечные волокна способны продуцировать антигены в составе комплекса с МНС первого класса либо даже второго класса Meckert, P.C., Hontebeyrie-Joskowicz, M., Chambo, J., Levin, M., and Laguens, R.P. (1991). Trypanosoma cruzi: Aberrant expression of class II major histocompatibility complex molecules in skeletal and heart muscle

cells of chronically infected mice. *Exp. Parasitol.* 72, 8-14; Hohlfield and ENGEL, A.G. (1984), The immunobiology of muscle. *Immunol. Today* 15, 269-274.; Mantegazza, R., and Bernasconi, P. (1994). Cellular aspects of myositis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 6, 568-574, Hartikka J., Sawdey M., Cornefert-Jensen F., Margalith M., Barnhart K., Nolasco M., Vahlsing H.L., Meek J., Marquet M., Hobart P., Norman J., Manthorpe M. An improved plasmid DNA expression vector for direct injection into skeletal muscle. *Hum Gene Ther.* 1996 Jun 20; 7(10):1205-17], в связи с чем предпочтительным является введение плазмидной ДНК, при котором травмирование мышечной ткани минимизировано.

Авторами настоящего изобретения проведены лабораторные исследования, подтверждающие возможность реализации группы охарактеризованных изобретений. Полученные результаты исследований проиллюстрированы примерами 1-3.

Пример 1. Получение плазмидных ДНК, кодирующих модифицированный бета-эндорфин.

1.1. Рассчитывали последовательность нуклеотидов гена, коллинеарную последовательности аминокислот кодируемого им бета-эндорфина, модифицированного для большей тропности к рецепторам, охарактеризованного SEQ ID NO: 2, с фланкированием целевого гена сайтами рестрикции, а также с добавлением последовательности Козак перед старт-кодоном для инициации трансляции, после старт-кодона - сигнальной последовательности, например, TPA (MDAMKRGGLCCVLLLCGAVFVSPS), либо представленной а.о. MLLLLLLLLLALALA, для секреции синтезируемого белка из эукариотической клетки, с одновременной оптимизацией по кодонному составу для экспрессии в клетках человека, использован инструмент на сайте molbiol.ru.

Рассчитанную нуклеотидную последовательность синтезировали химическим методом с помощью синтезатора ДНК ASM-800 (БИОСЦЕТ, Россия).

1.2. Осуществляли химический синтез ДНК, охарактеризованной SEQ ID NO: 1, десятикратно повторенной последовательно, с фланкированием такой ДНК сайтами рестрикции для клонирования в плазмидной ДНК.

1.3. Осуществляли клонирование синтезированных фрагментов ДНК в плазмиды pVAX1 (Invitrogen), pVR1012 (Vical), pcDNA3.1+ (Invitrogen). Также получили вектор pcDNA3.1+, неспособный к экспрессии неомицина, за счет рестрикции данного вектора рестриктазой NsiI, в области SV40 промотора (-71 п.о.). В полученном векторе также клонировали полученные фрагменты. Фрагмент, обуславливающий тропность к TLR9, помещали между разными элементами плазмидной ДНК.

1.4. На реакцию лигирования брали 3 мкл раствора синтезированной ДНК, 1 мкл раствора готового вектора, 5 мкл буфера для лигирования $\times 2$ и 1 мкл T4-лигазы. Реакцию проводили при 20°C в течение 2 ч.

После этого смесь прогревали при 95°C в течение 10 мин и очищали от солей диализом на нитроцеллюлозных фильтрах с диаметром пор 0,025 мкм (Millipore, США). Диализ проводили против раствора, содержащего 0,5 мМ ЭДТА в 10% глицерине, в течение 10 мин.

1.5. Затем трансформировали клетки *E.coli* штамма DH10B/R (F-mcrA, Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC), ϕ 80dlacZAM15, Δ lacX74, deoR, recA1, endA1, araD139, Δ (ara, leu)769, galU, galK λ -, rpsL, nupG) либо XL1-Blue (recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZAM15 Tn10 (Tetr)]) полученными плазмидными ДНК методом электропорации с использованием электропоратора MicroPulser (BioRad). Данный штамм не содержит метилазу, что позволяет минимизировать возможность возникновения мутаций в ДНК, в том числе в клонированном в плазмиде, поддерживаемой в данном штамме, гене. К 12 мкл компетентных клеток добавляли 1 мкл диализованной лигазной смеси, помещали между электродами порационной ячейки и обрабатывали импульсом тока.

После трансформации клетки помещали в 1мл SOC-среды (2% бакто-триптон, 0.5% дрожжевой экстракт, 10 мМ NaCl, 2.5 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂, 10 мМ MgSO₄, 20 мМ глюкоза) и инкубировали в течение 40 мин при 37°C.

1.6. Проводили выявление клонов клеток *E.coli*, содержащих полученную плазмидную ДНК, на селективной среде, содержащей LB-агар, 50 мкг/мл канамицина либо ампициллина (для плазмидных ДНК на основе pcDNA3.1+).

Из выросших клонов выделяли плазмидную ДНК. Выделение плазмидной ДНК проводили с использованием набора Wizard Minipreps DNA Purification System (Promega, США). Очищенную рекомбинантную плазмидную ДНК проверяли с помощью секвенирования.

1.7. Секвенирование клонированных фрагментов проводили по методу Сэнджера с использованием набора Applied Biosystems BigDye® Terminator (BDT) v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США) по прилагающейся к нему инструкции. Для мечения продуктов реакции использовали меченные флуоресцентным красителем ddNTP, причем каждому ddNTP соответствовал свой краситель. Для секвенирования использовали немеченные специфические для плазмид праймеры. Проводили ПЦР-реакцию, затем реакционную смесь очищали от свободных меченых ddNTP по инструкции к набору BigDye X-Terminator Purification Kit (Applied Biosystems, США) и разделяли продукты реакции секвенирования с использованием капиллярного секвенатора Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) и реактива 3500/3500xL Genetic Analyzer Polymer "POP-6™" (Applied Biosystems,

США).

Результаты разделения продуктов реакции секвенирования регистрировались путем сканирования лазером и детекции четырех флуоресцентных красителей, включенных во все типы ddNTP.

1.8. Компьютерный анализ последовательностей ДНК проводили с помощью персонального компьютера с использованием программ Chromas и BioEdit. Нуклеотидные последовательности исследованных фрагментов ДНК были выровнены относительно рассчитанных, была продемонстрирована идентичность синтезированных фрагментов рассчитанным. В результате были отобраны клоны клеток *E.coli*, содержащие полноразмерные последовательности таргетных генов в составе плазмид.

Пример 2. Нарботка плазмидных ДНК, кодирующих модифицированный бета-эндорфин, для проведения исследования на лабораторных животных.

Отдельную колонию клеток штамма *E.coli* - продуцента плазмидной ДНК, выращенную на LB-агаре в чашке Петри с добавлением канамицина (либо ампициллина), помещали в 10 мл селективной среды. Клетки растили в течение ночи при 37°C в условиях постоянного перемешивания (250 об/мин). Полученные клетки собирали центрифугированием при 4000g. Дальнейшее выделение и очистку плазмидной ДНК осуществляли с использованием набора EndoFree Plasmid Mega Kit (Qiagen), позволяющего получить апирогенную ДНК. Выделенную плазмидную ДНК анализировали электрофорезом в 0,8%-ном агарозном геле, измеряли ее концентрацию с помощью флуориметрии.

В качестве контрольного раствора использовали воду без добавления тестируемого препарата. В ячейку для измерения оптической плотности объемом 2 мл вносили 1,950 мл воды и 0,05 мл тестируемого раствора, перемешивали и измеряли оптическую плотность при длине волны 260 нм. Определение концентрации ДНК проводили по формуле

$$C(\text{мкг/мл})=40A_{260}K,$$

где A_{260} -оптическая плотность препарата, измеренная при длине волны 260 нм;

K (мкг/мл)- для ДНК 50 мкг/мл (50 мкг/мл двухцепочечной ДНК в воде);

40 - разведение тестируемого препарата.

В итоге определили, что получили плазмидные ДНК с концентрацией 3-5 мг/мл. Выход плазмидной ДНК составил от 3,5 до 5 мг из 1 л питательной среды.

О чистоте полученного препарата плазмидной ДНК судили по отношению оптической плотности препарата, измеренной при длине волны 260 нм, к оптической плотности препарата, измеренной при длине волны 280 нм (A_{260}/A_{280}), и отношению оптической плотности препарата, измеренной при длине волны 260 нм к оптической плотности препарата, измеренной при длине волны 230 нм (A_{260}/A_{230}). Измерения проводили в водном растворе, в качестве контрольного раствора использовали воду без добавления тестируемого препарата.

Для чистых препаратов ДНК характерно $A_{260}/A_{280}>1,80$ и $A_{260}/A_{230}>1,80$. Определенные в эксперименте значения соответствовали значениям отношений A_{260}/A_{280} и A_{260}/A_{230} для чистых препаратов, для всех полученных препаратов плазмидной ДНК.

Также проводили количественное определение примесей белка в полученных препаратах плазмидных ДНК с помощью microBCA assay [Smith, P.K., et al., Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analyt. Biochem.* 150, 76-85 (1985)], измеряя оптическую плотность образующихся окрашенных белковых комплексов с медью и бицинхониновой кислотой при длине волны 562 нм. Чувствительность метода microBCA assay составляет 0.5-20 мкг/мл белка. Концентрация тотального белка ни в одном из исследуемых препаратов плазмидной ДНК не превышала норму.

Определяли и содержание бактериального липополисахарида в препаратах плазмидных ДНК с использованием геле-тромб варианта ЛАЛ-теста, с чувствительностью >0,25 EU/мл (ToxinSensor, GenScript, США). ЛАЛ-реагентом служил лизат амебоцитов подковообразного краба *Limulus polyphemus*. ЛАЛ-реактив специфически реагирует с бактериальными эндотоксинами, в результате ферментативной реакции происходит изменение реакционной смеси, пропорциональное концентрации эндотоксина. Результаты оценивали по наличию или отсутствию плотного тромба на дне пробирки путем переворачивания пробирки. Гель-тромб не образовался при исследовании образца, разведенного в 10 раз, для препаратов всех полученных плазмидных ДНК, т.е. при чувствительности метода 2,5 EU/мл, что, учитывая концентрацию плазмидной ДНК в образце, говорит о допустимом показателе очистки от эндотоксинов.

Пример 3. Определение анальгетического эффекта плазмидной ДНК, кодирующей модифицированный бета-эндорфин.

3.1. Тест "Горячая пластина".

Проводили исследование анальгетической активности плазмидных ДНК, кодирующих модифицированный бета-эндорфин, с использованием теста "Горячая пластина" (hot plate).

Тест "Горячая пластина" (Hot plate) проводили для измерения порога острой болевой чувствительности и потенциального анальгезирующего эффекта изучаемых препаратов плазмидной ДНК [Вальдман А.В., Игнатов Ю.Д. Центральные механизмы боли. - Л.: Наука. - 1976]. Тест является базисным для исследования анальгетической активности, его используют для выявления анальгетически ак-

тивных соединений.

При помещении на горячую поверхность с достижением порога болевой чувствительности со стороны животного наблюдаются двигательные реакции беспокойства: одергивание лап, облизывание подушечек лап и подпрыгивание. В данном тесте учитывали латентное время с момента помещения животного на горячую поверхность до первого облизывания лап. Данная методика позволяет определять показатели: анальгетическая активность тестируемого объекта, пиковое время анальгезии, длительность анальгезии.

В исследовании использовали мышей линии BALB/C, самок, массой 15-22 г, возраста 18 недель. В опыте были сформированы экспериментальные и контрольные группы животных, в каждой группе по 3 мыши. В качестве положительного контроля использовали анальгин (50 мг/кг), морфин гидрохлорид (10 мг/кг), а также плазмидную ДНК pcDNA3.1+, кодирующую нативный бета-эндорфин (YGGFMTSEKSQTPLVTLFKNAIPKNAAYKKGE), с секреторной последовательностью TPA, без оптимизации по ко донному составу для экспрессии в клетках мелкокпитающих.

Вводили по 5 мг/кг плазмидных ДНК.

Использовали прибор Hot plate-метр (Hotplate Analgesia Meter, Columbus Instruments, USA).

До начала испытания в течение 10 мин давали тест-системам акклиматизироваться в комнате для проведения исследования. Животных использовали однократно, так как повторное помещение животного на термостатируемую пластину вызывает незамедлительную реакцию на касание поверхности. Устанавливали температуру термостата 55°C. После инъекции исследуемого вещества животное аккуратно помещали на нагревательную пластину и в тот же момент нажимали кнопку "старт" на панели прибора. Отмечали латентное время облизывания передних и задних лап (с момента помещения животного на поверхность прибора до первого облизывания). После этого нажимали на кнопку "стоп" и убирали животное с горячей поверхности. Иные поведенческие реакции игнорировали. Для уменьшения вероятности теплового повреждения подушечек лап максимальное время эксперимента не превышало 60 с. Для определения пикового времени анальгетического действия препарата измеряли латентное время облизывания передних и задних лап у контрольной группы (физраствор) (точка 0) и через 2, 12 и 24 ч после введения препарата у тестируемых групп. Поверхность прибора протирали салфеткой, смоченной дезинфектантом (0,5% хлоргексидин-биглюконат на 70% этаноле), перед помещением на нее очередного животного [Методические рекомендации для обучаемых. Фармацевтический факультет ГОУ ВПО ММА им. И.М. Сеченова Росздрава. - Москва. - 2006].

Проводили анализ данных определения анальгетической активности препарата. Для плазмидной ДНК, показавшей наилучший результат, определяли ED₅₀, т.е. дозу, необходимую для проявления 50%-ной анальгетической активности препарата.

Препараты всех исследуемых плазмидных ДНК, кодирующих модифицированный бета-эндорфин, проявляют выраженное анальгезирующее действие, не уступающее по эффективности морфину и превышающее анальгетическую активность анальгина, а также плазмидной ДНК, кодирующей нативный бета-эндорфин. В среднем, наблюдали небольшую степень анальгезии через 2 ч после введения плазмид, затем анальгезия усиливалась, и через 12 и 24 ч наблюдали одинаковый высокий уровень анальгезии, что говорит о поддержании эффекта.

В эксперименте с применением различных доз плазмидной ДНК, показавшей наилучший результат в предыдущем опыте (pVAX1, со вторым использованным вариантом секреторной последовательности и фрагментом, опосредующим связывание с TLR9, помещенным рядом с ориджином репликации), продемонстрирован дозозависимый характер анальгезии в интервале от 0,2 до 10 мг/кг. При этом по прошествии 12 ч показатели при использовании такой плазмидной ДНК в минимальной концентрации 0,2 мг/кг были практически идентичны показателям в группе использования морфина гидрохлорида 10 мг/кг. Через 24 ч показатель в группе плазмидной ДНК в минимальной концентрации превысил таковой группы использования морфина гидрохлорида 10 мг/кг, практически в 2,5 раза. Действие анальгина наблюдали только по прошествии 2 ч после введения анальгетика, ответ через 12 и 24 ч был аналогичен таковому в контрольной группе. При использовании указанной выше плазмидной ДНК в концентрации 5 и 10 мг/кг наблюдали значительное увеличение латентного периода по сравнению с группой с минимальной концентрацией плазмидной ДНК, при этом различие между этими двумя группами было небольшое.

3.2. Исследование концентрации бета-эндорфина в сыворотке мышей.

Поскольку изменение концентрации бета-эндорфина в плазме крови может служить критерием оценки эффективности обезболивания [Бета-эндорфин - маркер эффективности обезболивания при острой боли и хроническом болевом синдроме у онкологических больных / З.В. Павлова и др. // Проблемы клинической медицины. - 2007. - № 1. - С. 36-40. - ISSN 1817-8359], проводили исследование концентрации бета-эндорфина в сыворотке исследуемых мышей после введения разработанных плазмидных ДНК, с использованием набора ELISA Kit for Beta-Endorphin (bEP) Mus musculus (Mouse) CEA806Mu (Life science Inc.).

Уровень бета-эндорфина значительно поднимался при введении разработанных плазмидных ДНК, при том что при введении плазмидной ДНК без вставки целевого гена и в контрольной группе значительное увеличение уровня бета-эндорфина не наблюдали, на протяжении всего эксперимента. В группе,

где использовали плазмидную ДНК, кодирующую нативный бета-эндорфин, уровень бета-эндорфина был ниже, чем в экспериментальных группах.

Таким образом, продемонстрированы возможность создания различных вариантов плазмидной ДНК, кодирующей модифицированный бета-эндорфин, их получения с использованием бактериального продуцента, а также анальгетическое действие такой плазмидной ДНК, в любом из вариантов, соответствующих указанным критериям, причем даже в минимальной концентрации 0,2 мг/кг (меньше во много раз, чем морфина гидрохлорида). Показан и высокий уровень синтеза бета-эндорфина, а также большая эффективность, чем у плазмидной ДНК, кодирующей нативный бета-эндорфин и не содержащей фрагмент, обуславливающий связывание с TLR9. Также продемонстрирована безопасность применения таких плазмидных ДНК: животные не погибли, побочные эффекты не наблюдали.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Плазмидная ДНК для транзientной экспрессии полинуклеотида в клетках млекопитающих, содержащая прокариотические ориджин репликации и маркерный ген, эукариотические сильный промотор и лидерную последовательность мРНК, а также регуляторные последовательности для указанных элементов, от одного сайта для клонирования гена интереса и от одного сайта для посадки от одного праймера для анализа состава плазмидной ДНК, фрагмент для усиления захвата плазмидной ДНК клетками, охарактеризованный SEQ ID NO:1, повторенный десятикратно последовательно, и полинуклеотид, представленный гетерологичной секреторной последовательностью, соединенной с фрагментом, кодирующим модифицированный для увеличения тропности к рецепторам бета-эндорфин, охарактеризованный SEQ ID NO:2, оптимизированными по кодонному составу для экспрессии в клетках млекопитающих, и терминирующей последовательностью.

2. Плазмидная ДНК по п.1, отличающаяся тем, что представляет собой плазмидную ДНК из pcDNA3.1(+), pVAX1, VR1012, несущую описанные в п.1 повторенный десятикратно последовательно фрагмент, охарактеризованный SEQ ID NO: 1, и оптимизированную по кодонному составу для экспрессии в клетках человека гетерологичную секреторную последовательность, соединенную с фрагментом, кодирующим бета-эндорфин, охарактеризованный SEQ ID NO: 2.

3. Плазмидная ДНК по п.2, отличающаяся тем, что секреторная последовательность представляет собой таковую ТРА, оптимизированную по кодонному составу для экспрессии в клетках человека.

4. Бактериальная клетка, продуцирующая плазмидную ДНК по любому из пп.1-3, кодирующую модифицированный для увеличения тропности к рецепторам бета-эндорфин.

5. Бактериальная клетка по п.4, отличающаяся тем, что представлена штаммом бактерий *Escherichia coli* DH10B/R, содержащим плазмидную ДНК pcDNA3.1(+), которая несет описанные в п.1 повторенный десятикратно последовательно фрагмент, охарактеризованный SEQ ID NO: 1, и оптимизированную по кодонному составу для экспрессии в клетках человека секреторную последовательность ТРА, соединенную с фрагментом, кодирующим бета-эндорфин, охарактеризованный SEQ ID NO: 2.

6. Средство, обладающее анальгезирующим действием, для применения у млекопитающих, содержащее плазмидную ДНК по любому из пп.1-3 в эффективном количестве и фармацевтически приемлемый эксципиент.

