

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **039395**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.01.21

(21) Номер заявки
201700456

(22) Дата подачи заявки
2015.12.07

(51) Int. Cl. *C12N 15/12* (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
A61P 19/00 (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01)

**(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ГЕННОЙ КОНСТРУКЦИИ И ПЛАЗМИДНАЯ ДНК
С УВЕЛИЧЕННЫМ ВРЕМЕНЕМ ЖИЗНИ мРНК ТРАНСГЕНА VEGF В
КЛЕТКЕ МЛЕКОПИТАЮЩЕГО, ПЛАЗМИДНАЯ ДНК ГЕНА VEGF165, мРНК,
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ И ПРИМЕНЕНИЕ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК**

(31) 2015119768

(32) 2015.05.26

(33) RU

(43) 2018.06.29

(86) PCT/RU2015/000852

(87) WO 2016/190774 2016.12.01

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ
ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ
"НЕКСТГЕН" (RU)**

(72) Изобретатель:
Киселев Сергей Львович (RU)

(56) US-A-5587300

SHVALB P.G. et al. "Effektivnost i bezopasnost primeneniya preparata "Neovaskulgen" v kompleksnoi terapii patsientov s khronicheskoi ishemiei nizhnikh konechnostei (Iib-III faza klinicheskikh ispytaniy), Kletochnaya transplantologiya i tkanevaya inzheneriya, 2011, Vol. VI, № 3, p. 76-83

(57) Выявлены точечные изменения нуклеотидной последовательности 3'UTR гена vegf, которые существенно увеличивают время жизни продукта его транскрипции - мРНК в клетках млекопитающих. Экспериментальным путем выбрана генная конструкция с оптимальным перечнем выявленных мутаций, характеризующаяся наибольшим временем жизни мРНК. Подтвержден биологический эффект разработанной генной конструкции и фармацевтической композиции на ее основе in vitro и in vivo.

B1**039395****039395****B1**

Область техники

Изобретение относится к биотехнологии, а именно к разработке оптимизированных геннотерапевтических препаратов с высокой стабильностью и пролонгированной экспрессией трансгена *veg*f.

Современный уровень техники

Геннотерапевтические препараты.

Все большее значение в современной медицине приобретают геннотерапевтические препараты - группа лекарственных средств, действующим веществом которых являются генные конструкции - нуклеиновые кислоты, содержащие один или несколько генов, кодирующих терапевтические белки.

К настоящему времени в мире уже зарегистрированы и внедрены в клиническую практику 5 таких препаратов, а несколько сотен находятся на стадиях экспериментальных и клинических исследований. Общее количество клинических исследований в рамках генной терапии с 1989 г. превысило 1900 [1]. Один из 5 зарегистрированных геннотерапевтических препаратов - "Неоваскулген" (ОАО "Институт стволовых клеток человека") - разработан нами и внедрен в клиническую практику на территории России (РУ № ЛП-000671 от 28.09.11) и Украины (РУ № 899/13300200000 от 25.01.2013).

Таким образом, в условиях развития биотехнологии сформировался принципиально новый класс фармацевтических препаратов - геннотерапевтические лекарственные средства.

К наиболее безопасным вариантам генных конструкций, несущих трансген, относится плазмидная ДНК. Именно плазмидная ДНК с геном *veg*f является действующим веществом упомянутого выше геннотерапевтического препарата "Неоваскулген". Главной проблемой плазмидной ДНК как вектора для доставки трансгена в клетки-мишени абсолютным большинством исследователей признается низкая эффективность трансфекции: лишь 1-2% от общего количества молекул генных конструкций поступает в клетки и/или экспрессируется ими [2]. При этом количество молекул поступившей в клетку плазмидной ДНК и общее число трансфицированных клеток являются одними из основных факторов, напрямую определяющих уровень продукции терапевтического белка и, соответственно, биологический эффект лекарственного средства. В этой связи в условиях развития геннотерапевтических препаратов как нового фармакологического класса высоко актуальной является разработка методов, направленных на увеличение продукции терапевтического белка, кодируемого генной конструкцией при снижении количества вводимого в организм препарата или повышении эффективности действия. Это особенно важно для плазмидной ДНК, эффективность трансфекции которой крайне низкая.

Повышение общей концентрации терапевтического белка может быть обеспечено посредством двух основных подходов. Первый - наиболее очевидный - состоит в увеличении уровня трансфекции генных конструкций. Иными словами, чем большее количество плазмидной ДНК поступит в клетки-мишени, тем большая концентрация кодируемого ей белка будет продуцирована. В рамках данного подхода предложен целый ряд физических и химических методов. Однако физические методы увеличения уровня трансфекции требуют применения специального оборудования и не всегда безопасны и выполнимы в клинической практике. Химические же методы требуют изменения состава геннотерапевтического препарата, что требует дополнительных ресурсов для производства, а также может быть сопряжено с негативными эффектами добавленных компонентов.

Второй - альтернативный подход - заключается в продлении времени жизни продукта транскрипции введенной генетической конструкции - мРНК, что приводит к увеличению количества циклов трансляции и, соответственно, повышению результирующего количества терапевтического белка за счет его пролонгированной продукции. Фундаментальные основы данного подхода были сформированы за счет накопления сведений о регуляции времени жизни мРНК. Так, описан целый ряд регуляторных молекул, вовлеченных в модуляцию стабильности мРНК, такие как РНК-связывающие протеины и регуляторные РНК (микроРНК, длинные некодирующие РНК). Важно, что воздействие указанных веществ на мРНК опосредуется через связывание с ее 3'-нетранслируемой областью (3'UTR), содержащей специальные последовательности - дестабилизирующие элементы, в частности аденин-уридинобогатый элемент (AU-rich element). Ряд веществ, такие как AU-rich element RNA-binding protein 1 (AUF1), tristetraprolin (TTP), KH-type splicing regulatory protein (KSRP), связываясь со специфическими сайтами 3'UTR, индуцируют деградацию мРНК, тогда как другие, например polyadenylate-binding protein-interacting protein 2 (PAIP2), наоборот, обеспечивают стабилизацию мРНК [3, 4].

Координация процессов деградации и стабилизации мРНК имеет важное значение для нормального функционирования клеток, а некоторые патологические состояния воспалительного или онкологического генеза, по мнению ряда авторов, могут быть связаны с посттранскрипционной дисрегуляцией, приводящей либо к недостаточной, либо к избыточной продукции факторов роста, онкогенов и других биологически активных веществ [4]. В этой связи последовательность нуклеотидов 3'UTR имеет принципиальное значение для трансдукции регуляторных влияний, эффектором которых является мРНК, и детерминации времени жизни мРНК в целом.

Анализируя данные современного уровня техники, становится очевидным, что изменение последовательности нуклеотидов 3'UTR, особенно дестабилизирующих элементов, может обеспечить продление жизни мРНК. Более того, разработаны методы сайт-направленного мутагенеза, позволяющие технически выполнить необходимые изменения в генной конструкции и, соответственно, мРНК как продукта ее

транскрипции. Однако до сих пор нет точных, исчерпывающих и систематизированных данных о том, какие варианты последовательности 3'UTR, какие ее минорные сайты или их комбинации за какие аспекты функционирования мРНК отвечают [3]. Отчасти это связано с тем, что количество изоформ мРНК, отличающихся последовательностью нуклеотидов 3'UTR, варьирует в широких пределах, в том числе из-за альтернативных сплайсинга и полиаденилирования. При этом качественный и количественный состав дестабилизирующих элементов 3'UTR определяется также и кодирующей областью нуклеиновой кислоты. Все это в сочетании с тем фактом, что 3'UTR определяет не только время жизни мРНК, но и другие составляющие ее "физиологии", как транспорт из ядра клетки, цитоплазматическая локализация, эффективность трансляции и т.д., предопределяет сложности и во многом непредсказуемость моделирования времени жизни мРНК через изменение последовательности 3'UTR, что может выражаться как в увеличении времени жизни транскрипта, так и в снижении.

Несмотря на все трудности и недостаточную изученность вопроса детерминации, или "программирования", времени жизни мРНК через изменение последовательности 3'UTR, предпринимаются попытки эмпирически подобрать такие варианты изменений в соответствующей области конкретных вариантов генных конструкций, которые увеличили бы стабильность мРНК без негативного влияния на ее функционирование.

В частности, описан способ увеличения продукции трансгена за счет замены последовательности AU-rich элемента, представленной AUUUA, на другие варианты и их комбинации, ограниченные следующими: AUGUA, AUAUA, GUGUG, AGGGA, GAGAG [5]. Однако указанная последовательность дестабилизирующего элемента в 3'UTR характерна далеко не для всех генов (описана большинством исследователей для G-CSF), а, с другой стороны, ею не исчерпывается перечень дестабилизирующих элементов, в связи с чем продление жизни мРНК может быть нивелировано.

Другими авторами разработана специальная последовательность 3'UTR гена эритропоэтина, обеспечивающая пролонгированную продукцию трансгена, входящего в состав плазмидной ДНК. Последовательность строго конкретизирована и имеет длину 100 нуклеотидов [6].

Описаны также способы элиминации специфических последовательностей 3'UTR, ответственных за связывание с различными микроРНК, индуцирующими деградацию мРНК [7].

Однако большинство предлагаемых изменений последовательности 3'UTR относятся к протяженным делециям или заменам, что неизбежно сопряжено с риском возникновения негативных эффектов на метаболизм мРНК. Кроме того, предлагаемые решения крайне зависимы от кодирующей области гена, поэтому одни неприменимы, другие недостаточно эффективны для гена *vegf* и продления жизни продукта его транскрипции.

Стоящие же перед нами задачи сводились к необходимости увеличить продукцию VEGF таргетными клетками (на примере клеток человека линии HEK293, мультипотентных мезенхимных стромальных клеток, фибробластов человека и пр.), в которые проникла плазмидная ДНК, за счет увеличения продолжительности жизни специфической мРНК указанного гена с помощью оптимизации его 3'UTR.

VEGF и его биологическая роль.

VEGF - семейство биологически активных белков, впервые выделенных J. Folkman с соавт. в 1971 [8], которые считаются одними из основных ауто- и паракринных факторов регуляции васкуло-, ангио- (VEGF-A, B; PlGF) и лимфогенеза (VEGF-C, D); вырабатываются клетками всех тканей организма, включая эпителиальные.

В постнатальном периоде развития человека наибольшее влияние на формирование кровеносных сосудов оказывает VEGF-A (изоформы 121, 145, 148, 165, 183, 189, 206) [9]. Обнаружены три типа рецепторов VEGF. 1 и 2 тип вовлечены в ангиогенез, 3 - в образование лимфатических сосудов. При этом рецептор 1 типа обладает большей афинностью к VEGF, однако его тирозинкиназная активность гораздо ниже, чем у рецептора 2 типа, что расценивается как один из регуляторных механизмов, предотвращающих избыточную активность VEGF. Соответственно, именно через рецептор 2 типа в норме реализуются эффекты VEGF [10, 11]. После взаимодействия VEGF со специфическим рецептором 2 типа происходит аутофосфорилирование его внутриклеточных тирозиновых сайтов (Y951, 1054, 1059, 1175, 1214) киназных и карбокситерминального доменов [11], которые, в свою очередь, активируют ряд внутриклеточных белков, таких как фосфолипазы $C\gamma$, $C\beta 3$, адаптерные белки SRK, NCK, SHB, SCK и др., являющиеся первыми звеньями сложных каскадов трансдукции сигналов, изменяющих морфофункциональное состояние клеток-мишеней (главным образом, эндотелиальных). В частности, фосфолипаза $C\gamma$ гидролизует мембранный фосфолипид PIP_2 с образованием диацилглицерола и инозитол-1,4,5-трифосфата, увеличивающего внутриклеточное содержание кальция, которые вместе активируют протеинкиназу C, которая, в свою очередь, запускает последовательную активацию сигнального пути RAS-ERK, приводящего к индукции митоза. В результате повышается пролиферативная активность эндотелиальных клеток [10]. Фосфолипаза $C\beta 3$ участвует в полимеризации актина и формировании стресс-фибрилл, обеспечивающих миграцию и двигательную активность клеток, в целом [12]. Через активацию сигнального пути "фосфоинозитид-3-киназа - протеинкиназа B" (PI3K/АКТ) VEGF блокирует апоптоз, ингибируя каспазы 3, 7 и 9, тем самым повышая выживаемость клеток. Кроме того, ось PI3K/АКТ с помощью ионов кальция моду-

лирует работу эндотелиальной NO-синтазы, что сопровождается увеличением продукции NO и повышением проницаемости сосудов, что является необходимым звеном в ангиогенезе (фиг. 3) [13, 14]. Таким образом, VEGF через специфический рецептор 2 типа индуцирует активацию, миграцию, пролиферацию и дифференцировку эндотелиоцитов и их клеток-предшественниц, повышение выживаемости клеток, что в сочетании с модуляцией межклеточных взаимодействий и повышением проницаемости сосудов служит необходимыми условиями формирования капиллярноподобных структур с последующим ремоделированием в "зрелые" сосуды [10-16].

Учитывая роль VEGF как ключевого ангиогенного фактора, различные варианты кодирующего его гена используются для создания генных конструкций, показанных для лечения пациентов с заболеваниями сердечно-сосудистой системы ишемического генеза [17, 18]. Кроме того, неспецифический ангиогенный эффект таких генотерапевтических препаратов может оказать положительное влияние при других патологических состояниях, требующих активации репаративного процесса: травмы периферических нервов [19], синдром диабетической стопы [20], боковой амиотрофический склероз [21], повреждения костей скелета [22, 23] и др.

Что касается костной ткани, то как в случае первичного, так и вторичного остеогистогенеза именно сосуды, прорастающие в рыхлую волокнистую соединительную или хрящевую ткани, создают необходимые условия для дифференцировки резидентных клеток в остеобластическом направлении, а также для миграции камбиальных резервов (периваскулярно и с кровотоком). Помимо опосредованного через ангиогенез влияния VEGF оказывает и прямое стимулирующее действие на клетки остеобластического дифферона, которые не только продуцируют VEGF [24], но и экспрессируют его рецепторы 1 и 2 типов как в эмбриогенезе [25], так и в постнатальном периоде развития [26]. Показано, что под воздействием VEGF пролиферация камбиальных клеток костной ткани значительно увеличивается (до 70%), а также активируется миграция остеогенных клеток по градиенту концентрации VEGF [27-29].

В последние годы помимо канонического - рецепторного - механизма действия VEGF появились данные о принципиально ином механизме, который обозначают как "интракринный". Подтверждением этому стали результаты исследований, продемонстрировавших, что прогениторные клетки, коммитированные в остеобластическом направлении (экспрессирующие *Osx*), синтезируют VEGF не только "на экспорт", но и для обеспечения собственной дифференцировки в остеобластическом направлении [30].

Таким образом, VEGF обладает широким спектром действия на клетки эндотелиальной и мезенхимальных клеточных линий. Основной его биологический эффект связан с индукцией формирования кровеносных и лимфатических сосудов, однако, по всей видимости, для VEGF характерны и другие механизмы прямого действия на клетки различных дифферонов через рецепторные и интракринные механизмы.

В этой связи генная конструкция ДНК с геном *veg*f, характеризующаяся увеличенным временем жизни мРНК транскрипта *veg*f в клетке млекопитающего, стала бы эффективным инструментом в разработке лекарственных препаратов и ген-активированных медицинских изделий, предназначенных не только для лечения пациентов с заболеваниями сердечно-сосудистой системы, но и другой патологией, при которой локальное повышение уровня VEGF в affected. area обеспечило бы усиление репаративного процесса.

Перечень чертежей

Фиг. 1 - динамика продукции (накопления) мРНК культурами клеток, трансфицированными различными вариантами генных конструкций: 1 - Seq#1 (исходная генная конструкция), 2 - Seq#2, 3 - Seq#3, 4 - Seq#4, 5 - Seq#5, 6 - Seq#6, 7 - Seq#7, 8 - Seq#8, 9 - Seq#9, 10 - Seq#10, 11 - Seq#11.

Фиг. 2 - динамика продукции (накопления) мРНК гена *veg*f трансфицированной культурой клеток: А - исходная генная конструкция (Seq#1); В - оптимизированная генная конструкция Seq#11. Результаты представлены как кратное увеличение по сравнению с уровнем продукции мРНК эндогенного VEGF.

Фиг. 3 - динамика продукции мРНК гена *veg*f трансфицированной культурой клеток: А - эндогенная продукция (культура нетрансфицированных клеток); В - исходная генная конструкция (Seq#1); С - оптимизированная генная конструкция Seq#11.

Фиг. 4 - белок VEGF, выделенный из клеточных культур, трансфицированных генными конструкциями, 4 сут. после трансфекции: А - оптимизированной генной конструкцией Seq#11; В - исходной генной конструкцией (Seq#11); С - контроль, культура нетрансфицированных клеток. Вестерн-блоттинг, нормализация по β -актину.

Фиг. 5 - изменение уровня кровотока в ишемизированной конечности на разных сроках наблюдения: - Non ChLI control, - ChLI non treated, - Water for injection, -Seq#11 (200 мкг $\times$ 1 и 14 д), - Seq#11 (100 мкг $\times$ 14 д).

Фиг. 6 - ишемизированная мышца через 35 сут. после операции и введения: А - воды для инъекций, В - Seq#11 (200 мкг $\times$ 1 и 14 д).

Фиг. 7 - CD34⁺-cells/muscle fibers ratio. 1 - non ChLI control; 2 - ChLI non treated; 3 - water for injection; 4 - Seq#11 (100 мкг $\times$ 14 д).

Фиг. 8 - дефекты теменных костей кроликов, 30 сут. после имплантации остеопластических мате-

риалов: А - кальциевый фосфат с плазмидной ДНК Seq#11, В - кальциевый фосфат без плазмидной ДНК.
Фиг. 9 - карта оптимизированной последовательности Seq#11.

Краткое описание настоящего изобретения

С использованием методов сайт-направленного мутагенеза и количественного ПЦР анализа молекул РНК в клетке нами были проанализированы конструкции, несущие различные изменения последовательности нуклеотидов 3'UTR терапевтического гена *veg*f, по сравнению с исходной генной конструкцией (Seq#1, разработана нами ранее). Примеры влияния некоторых изменений приведены в табл. 1. Как видно из приведенных данных, некоторые изменения нуклеотидной последовательности (делеции или замены) сказывались на продолжительности жизни положительным образом (например делеция С 1079), другие не оказывали никакого влияния (например, делеция С 1100) или приводили к уменьшению жизни мРНК (например, делеция С 1090). При этом разница в продолжительности жизни мРНК гена *veg*f в клетке в крайних случаях (делеция С 1079 - увеличение; делеция С 1090 - уменьшение) составляла в среднем более 6 ч при средней жизни мРНК 6 ч.

На втором этапе исследования все изменения, оказывающие положительное влияние, были использованы для создания ряда вариантов генных конструкций, несущих от четырех до десяти "положительных" мутаций в различных комбинациях, т.е. отличающихся последовательностью нуклеотидов на отрезке 1070-1600 (Seq#2-11).

На основании полученных данных нами была выбрана и синтезирована оригинальная 3'UTR концевая часть гена *veg*f, которая в совокупности с кодирующей частью гена обеспечивала увеличение продолжительности жизни транскрипта гена на 70% (Seq#11), в которую были сведены некоторые мутации, оказавшие в совокупности наибольшее положительное влияние, а именно делеция С 1079, делеция Т 1111, замена А на С 1144, делеция А 1148, делеция С 1155, делеция А 1173, делеция С 1185, замена G на С 1536.

Полученный вариант генетической конструкции характеризуется максимальным временем жизни мРНК и, соответственно, наибольшей общей продукцией белка VEGF, превышающей таковую, характерную для исходной генных конструкций (Seq#1).

На основе разработанной оптимизированной генной конструкции и адъювантов, обеспечивающих криопротекцию, стабилизацию pH и получение изотонического раствора для инъекций, были созданы фармацевтические композиции, обладающие выраженной ангиогенной активностью.

Разработанные фармацевтические композиции предназначены для применения в случае заболеваний и патологических состояний, в лечении которых требуется стимуляция ангиогенеза (ишемия тканей) или репаративной регенерации тканей, которая может быть осуществлена через активацию ангиогенеза (восстановление целостности периферических нервов, костей скелета и др.).

Для производства разработанных фармацевтических композиций создан бактериальный (*E.colli*) штамм-продуцент генной конструкции Seq#11, депонированный во Всероссийской коллекции микроорганизмов в соответствии с Будапештским Договором по международному депонированию микроорганизмов с целью патентования. Номер депонирования штамма VKM В-2967D. Справку о Международном депонировании штамма прилагаем.

Подробное описание настоящего изобретения

Сайт-направленный мутагенез 3'UTR гена *veg*f был выполнен с использованием QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, США), согласно инструкции производителя.

В результате сайт-направленного мутагенеза исходной плазмидной ДНК (Seq#1) нами были получены различные варианты изменений в 3'UTR гена *veg*f. Полученные варианты плазмидной ДНК с геном *veg*f, отличающиеся последовательностью 3'UTR, были использованы для трансфекции клеток линии HEK293 с последующим определением динамики накопления продукта экспрессии генной конструкции - мРНК гена *veg*f.

Таблица 1

Примеры некоторых проведенных изменений нуклеотидной последовательности и их влияние на продолжительность жизни мРНК

Позиция*	Изменение	Исходный нуклеотид	Скорректированный нуклеотид	Влияние на время жизни мРНК
1071	делеция	C	-	увеличение
1079	делеция	C	-	увеличение
1090	делеция	C	-	уменьшение
1100	делеция	C	-	нет влияния
1111	делеция	T	-	увеличение
1113	замена	G	C	нет влияния
1144	замена	A	C	увеличение
1146	делеция	G	-	уменьшение
1148	делеция	A	-	увеличение
1150	делеция	C	-	нет влияния
1155	делеция	C	-	увеличение
1158	делеция	C	-	уменьшение
1173	делеция	A	-	увеличение
1175	делеция	C	-	уменьшение
1183	делеция	G	-	увеличение
1184	делеция	C	-	уменьшение
1185	делеция	C	-	увеличение
1187	замена	A	C	нет влияния
1536	замена	G	C	увеличение

* Примечание: нумерация нуклеотидов приведена по исходной эталонной последовательности генной конструкции Seq#1.

Для этого клетки НЕК293 в количестве 2×10^5 помещали в лунки 6-луночного планшета с культуральной средой DMEM/F-12 с добавлением 10% FBS. После прикрепления клеток в культуральную среду вносили 10 мкг одного из полученных вариантов плазмидной ДНК (в 100 мкл воды для инъекций). В качестве негативного контроля использовали 100 мкл воды для инъекций без плазмидной ДНК, что позволяло оценить уровень продукции мРНК эндогенного vegf. Для определения уровня экспрессии гена vegf методом РТ-ПЦР из клеток через 6, 12, 24, 36 и 48 ч после трансфекции выделяли общую РНК на колонках с помощью набора PureLink RNA Mini Kit (Invitrogen, США), согласно инструкции производителя. Кратко, осажденные клетки тщательно лизировали в объеме 350 мкл лизирующего буфера в присутствии 1% β -меркаптоэтанола. Добавляли равный объем 70% этанола, вортиксовали и переносили на колонки. Центрифугировали 1 мин при 12,4 тыс. об/мин. Сливали отцентрифугированную жидкость. Добавляли на мембрану 600 мкл промывочного раствора 1, центрифугировали 15 с при 12,4 тыс. об/мин, убирали жидкость. Добавляли на мембрану 500 мкл промывочного раствора 2, центрифугировали при тех же условиях, убирали жидкость. Повторяли отмывку с промывочным раствором 2. Переносили колонки в новые пробирки и центрифугировали 1 мин при 12,4 тыс. об/мин. Переносили колонки в пробирки для сбора РНК. Непосредственно на мембрану вносили 15 мкл воды, без РНКаз, инкубировали 1 мин при комнатной температуре, центрифугировали 90 с при 12,4 тыс. об/мин. До дальнейшего применения пробы хранились при температуре -80°C . Далее проводили синтез первой цепи кДНК с помощью реактивов компании Promega (США). Уровень экспрессии таргетных генов (в моль) определяли по сравнению с экспрессией гена домашнего хозяйства β -актина с помощью набора для проведения ПЦР в реальном времени в присутствии SYBR Green I и референсного красителя ROX (Синтол, Россия) На фиг. 1 приведен пример одной из нуклеотидных замен, обеспечивающих увеличение жизни мРНК.

Постановка реакции обратной транскрипции:

- 1) на льду к 10 мкл РНК добавляли 2,5 мкл Random Hexamer, инкубировали 5 мин при 70°C ;
- 2) убирали лед;
- 3) осаждали капли;
- 4) приготавливали смесь для каждого образца:
5 мкл буфера для обратной транскриптазы MMLV 5X 1,25 дНТП,
1,25 RNase Inhibitor,
1 мкл MMLV транскриптазы,
4 мкл H_2O ;
- 5) добавляли по 12,5 мкл смеси в каждую пробирку, инкубировали 1 ч при 37°C ;
- 6) останавливали реакции инкубацией при 75°C в течение 5 мин.

Все образцы кДНК хранились при температуре -80°C.

Для выполнения ПЦР в реальном времени использовали прямые и обратные праймеры к vegf и β -actin (табл. 2). Реакционную смесь для ПЦР в реальном времени в присутствии SYBR Green I применяли согласно инструкции производителя. Измерения проводили на приборе CFX90 Touch Real-time PCR Detection System.

Таблица 2

Праймеры для выполнения ПЦР

Ген	Прямой праймер	Обратный праймер
VEGF	ACATTGTTGGAAGAAGCAGCC C	AGGAAGGTCAACCACTCACACA
β -actin	CGCCCCAGGCACCAGGGC	GGCTGGGGTGTGAAGGT

В результате проведенных исследований были выявлены мутации, положительно влияющие на время жизни мРНК (делеция С 1071, делеция С 1079, делеция Т 1111, замена А на С 1144, делеция А 1148, делеция С 1155, делеция А 1173, делеция G 1183, делеция С 1185, замена G на С 1536 и др.). Указанные изменения в различных комбинациях из 4-10 мутаций были сведены в синтетические конструкции, включающие кодирующую часть гена vegf и 3'UTR, оптимизированные по отношению к гену vegf. Основные из полученных вариантов представлены Seq#2-11. Чтобы выбрать наиболее оптимальный вариант из разработанных генных конструкций, было выполнено сравнительное исследование, в ходе которого определяли динамику накопления мРНК трансфицированными клетками с помощью ПЦР-РТ, как указано выше. Результаты основных десяти генных конструкций в виде кратности увеличения концентрации мРНК на сроках 24 и 48 ч после трансфекции представлены на фиг. 1.

Как следует из графика, в некоторых случаях комбинации нескольких мутаций, каждая из которых в отдельности оказывала положительное влияние на время жизни мРНК, не сопровождалась значимым увеличением накопления мРНК, по сравнению с исходной генной конструкцией (Seq#1). Среди генных конструкций, характеризовавшихся увеличением времени жизни мРНК, отсутствие снижения концентрации определялось только в случае Seq#11, тогда как в остальных случаях уровень мРНК снижался через 48 ч после трансфекции по сравнению с показателем на сроке 24 ч. В этой связи именно данная генная конструкция была выбрана как наиболее оптимальная и подвергнута дальнейшим сравнительным исследованиям.

На фиг. 2 приведен результат ПЦР-РТ конструкции Seq#11 в сравнении с неоптимизированной последовательностью Seq#1. На приведенном графике видно, что уже через 12 ч уровень мРНК гена VEGF оптимизированной конструкции превышал значение параметра в контроле, где для трансфекции была использована исходная плазмидная ДНК. Важно, что динамика прироста концентрации мРНК в обеих группах совпадала с пиком на отметке в 24 ч после трансфекции. Однако только в случае исходной генной конструкции наблюдалось постепенное снижение уровня мРНК, обусловленное быстрой биодegradацией молекул, тогда как в случае оптимизированной конструкции (Seq#11) определялась фаза "плато" длительностью не менее 6 ч с последующим плавным снижением концентрации мРНК. При этом на крайней временной точке разница между группами по данному показателю составила 190%.

Разработанная плазмидная ДНК, несущая ген vegf, была исследована *in vitro* для количественной оценки продукции белка VEGF клетками HEK273. При этом концентрация терапевтического белка определялась в культуральной среде с помощью ELISA через 6, 12, 24, 48, 72 и 96 ч после трансфекции клеток. Оказалось, что накопленная концентрация терапевтического белка в культуральной среде клеток, трансфицированных генной конструкцией, значительно превышала значение параметра в контроле, в том числе в группах с альтернативными вариантами разработанных генных конструкций, характеризовавшихся неоптимальной последовательностью 3'UTR гена vegf и стандартным временем жизни мРНК транскрипта (фиг. 3). Важно, что максимальный прирост концентрации VEGF в культуральной среде обеих групп трансфицированных клеток (увеличение в 2,3-2,4 раза) наблюдался через 36 ч после начала эксперимента, что соответствовало данным ПЦР-РТ с пиковой концентрацией мРНК генных конструкций на временной точке 24 ч. В дальнейшем, если концентрация белка VEGF в среде трансфицированных оптимизированной генной конструкцией клеток продолжала нарастать высокими темпами, то в группе с исходной плазмидной ДНК прирост существенно замедлялся, незначительно превышая прирост в контрольной группе (культура без трансфекции).

Определение накопленной концентрации белка VEGF в культуральной среде позволяет судить о динамике его продукции клетками и количественном приросте на каждом контрольном сроке, однако не позволяет оценить внутриклеточную концентрацию белка на каждой из временных точек. При этом особенно важным в комплексной оценке времени жизни мРНК генных конструкций является определение уровня белка VEGF в клетках на крайних сроках наблюдения. В этой связи клетки после 4 сут. культивирования были подвергнуты Вестерн-блоттинг анализу по стандартной методике с использованием антител к белку VEGF. Концентрация белка оказалась наибольшей в лизате клеток, трансфицированных оптимизированной генной конструкцией Seq#11 (фиг. 4). При этом уровень белка в случае клеток, трансфицированных исходной конструкцией, на данном сроке наблюдения незначительно превышал эндогенную концентрацию (контроль).

Более того, кондиционированная среда клеток, трансфицированных оптимизированными генными конструкциями, характеризовалась статистически значимо большей ангиогенной активностью, определенной в стандартном тесте HUVEC tube formation assay.

Сопоставляя результаты проведенных исследований, можно заключить, что мРНК оптимизированной генной конструкции (Seq#11) характеризовалась большим временем жизни, что привело к более длительной продукции высоких концентраций терапевтического белка VEGF вплоть до крайних сроков наблюдения. Исходная же генная конструкция характеризовалась меньшей стабильностью мРНК, коротким и менее выраженным биологическим эффектом.

Таким образом, основной технический результат настоящего изобретения состоит в увеличении общей продукции терапевтического белка за счет увеличения времени жизни мРНК, достигнутой посредством выявления оптимальных изменений последовательности 3'UTR гена *vegf*. Неожиданным стал тот факт, что замена всего одного нуклеотида в целевой области оказала столь выраженный эффект на продолжительность жизни мРНК и, соответственно, продукцию терапевтического белка. Во всех известных работах в данной области исследователи выполняли другие изменения, с вовлечением гораздо большего количества нуклеотидов. Учитывая недостаточную изученность функционального предназначения каждого сайта в 3'UTR мРНК, наиболее благоприятными с точки зрения безопасности и нивелирования влияния на другие аспекты метаболизма мРНК являются именно минимальные, точечные изменения, в случае, если они позволяют добиться нужного эффекта. Важно отметить, что длина последовательности 3'UTR гена *vegf* составляет не менее 250 нуклеотидов, следовательно, общее количество только единичных, точечных мутаций в виде замены одного нуклеотида на другой составляет не менее 750. Принимая во внимание другие возможные варианты изменений (делеции, дупликации, инсерции), а также с учетом задействования более одного сайта, количество вариантов генных конструкций, отличающихся 3'UTR гена *vegf*, составляет сотни тысяч. Таким образом, выявление нескольких вариантов изменений последовательности, приводящих к увеличению продолжительности жизни мРНК без негативного влияния на другие аспекты ее функционирования равносильно выигрышу в лотерею.

Учитывая опыт в разработке геннотерапевтических препаратов нами были созданы фармацевтические композиции на основе разработанных оптимизированных генных конструкций и фармакологически приемлемых вспомогательных веществ, представленных по меньшей мере одним криопротектантом, обладающим свойствами наполнителя, и стабилизатором pH, в эффективных количествах обеспечивающих получение изотонического раствора плазмидной ДНК для инъекций.

Состав фармацевтической композиции, обеспечивающий сохранение свойств оптимизированной плазмидной ДНК, представляет собой:

плазмидная ДНК от 0,1 до 10 мг/мл, предпочтительно от 0,5 до 4 мг/мл, наиболее предпочтительно от 0,8 до 1,2 мг/мл,

глюкоза (декстроза) от 200 до 400 мМ, предпочтительно от 250 до 350 мМ, наиболее предпочтительно от 280 до 320 мМ,

фосфат натрия (смесь тризамещенного, двузамещенного и однозамещенного фосфатов натрия) в концентрации от 3 до 30 мМ, предпочтительно от 5 до 20 мМ, наиболее предпочтительно от 8 до 12 мМ, pH раствора от 7,0 до 9,0, предпочтительно от 7,2 до 8,5, наиболее предпочтительно от 7,4 до 8,2.

Состав одного из вариантов фармацевтической композиции следующий:

плазмидная ДНК по Seq#11 - 1,2 мг;

декстрозы моногидрат - 60 мг;

натрия гидрофосфата додекагидрат - 3,94 мг;

натрия дигидрофосфата дигидрат - 0,16 мг.

Данный вариант был использован в исследованиях, описанных в примерах.

Разработанные генные конструкции и фармацевтические композиции на их основе были исследованы *in vivo* в экспериментальных моделях, воспроизводящих основные патофизиологические и патоморфологические симптомы, характерные для заболеваний, являющихся известными показаниями к применению плазмидной ДНК с геном *vegf*.

Пример 1. Модель хронической ишемии нижних конечностей.

Исследование было выполнено на иммунодефицитных мышах (n=90), которым для моделирования хронической ишемии нижней конечности (ХИНК) выполнялось пересечение правой бедренной артерии в паховой области. Введение фармацевтической композиции на основе плазмидной ДНК по Seq#11 выполнялось в двух вариантах: 100 мкг однократно на 14-е сут. и по 200 мкг двукратно на 1-е и 14-е сут. - в проксимальный и дистальный участок послеоперационной раны. Контролем служили три группы животных: здоровые, оперированные но без введения каких-либо веществ; оперированные с введением воды для инъекций. Животных выводили из эксперимента через 7, 21, 35 сут. после операции, конечности подвергали гистологическому исследованию с определением количества сосудов и отношения числа эндотелиоцитов к мышечным волокнам. На сроках 1, 7, 14, 21, 28 и 35 сут. выполняли лазерную сканирующую доплерометрию для определения уровня кровотока (blood flow perfusion rate) в ишемизированной и здоровой конечности.

Оказалось, что независимо от дозы и режима введения уровень кровотока в ишемизированной ко-

нечности увеличивался только в экспериментальных группах через 7 сут. после введения разработанного геннотерапевтического препарата. Уровень кровотока увеличивался, достигая к крайнему сроку наблюдения значений, близких к параметру здоровых животных. В контрольных группах оперированных животных уровень кровотока оставался на низком уровне без положительной динамики (фиг. 5).

Функциональные результаты были подтверждены данными гистологического исследования. В экспериментальных группах было выявлено большее количество сосудов (фиг. 6), а также большее отношение CD34⁺-клеток (эндотелиоцитов) к мышечным волокнам (фиг. 7).

Пример 2. Модель костного дефекта критического размера.

Разработанная генная конструкция по Seq#11 была объединена с матриксом из кальциевого фосфата по ранее разработанному протоколу.

1. Подготовка носителя:

а) отмывка (инкубирование в 0,5М фосфатного буфера в объеме 1 мл при температуре 37°C при постоянном встряхивании в течение 12 ч);

б) уравнивание (обработка 10 мМ фосфатного буфера в объеме 1 мл при температуре 37°C при постоянном встряхивании, 3 раза по 10 мин);

в) высушивание (инкубирование при температуре 37°C до полного высыхания - 3 ч).

2. Нанесение нуклеиновой кислоты (инкубирование с раствором плазмидной ДНК по Seq#11 в 10 мМ фосфатном буфере в концентрации 1 мкг/мл при температуре 37°C и постоянном встряхивании в течение 12 ч).

3. Обработка полученного комплекса "носитель-генная конструкция":

а) отмывка (обработка 5 мМ раствором фосфата в объеме 1 мл 3 раза);

б) высушивание (инкубирование при температуре 37°C до полного высыхания - 3 ч).

Полученный ген-активированный костный графт был исследован в ортотопических условиях. Исследование было выполнено на кроликах породы Шиншилла (n=15). Каждому животному выполнялись два одинаковых симметричных полнослойных дефекта обеих теменных костей, диаметром по 10 мм, которые являются "критическими" для кроликов, так как естественный восстановительный процесс, без каких-либо оптимизирующих влияний не завершается полной консолидацией. В дефекты правых теменных костей имплантировали ген-активированный остеопластический материал (экспериментальная группа), состоящий из кальциевого фосфата и плазмидной ДНК Seq#11, в дефекты левых теменных костей - носитель без плазмидной ДНК (контрольная группа). Животных выводили из эксперимента через 30, 60 и 90 сут., результаты оценивали с использованием компьютерной томографии и гистологических методов.

В связи с исходно высокой плотностью выбранного носителя (около 1800 HU) и длительностью его биорезорбции (более 6 мес.) объективно оценить признаки репаративного остеогенеза в сравнительном аспекте не удалось. Однако по данным гистологического исследования только в случае применения ген-активированного остеопластического материала признаки остеогенеза наблюдались уже через 30 сут. после операции в центральной части дефекта (фиг. 8).

Как видно на фиг. 8, гранулы материала, расположенные в центральной части дефекта, выполненного рыхлой волокнистой соединительной тканью, являлись источником репаративного остеогенеза, тогда как в контроле кальциевый фосфат без плазмидной ДНК был окружен только рыхлой волокнистой соединительной тканью без признаков образования костной ткани. Полученные данные свидетельствуют о том, что введение плазмидной ДНК Seq#11 в область костного дефекта критических размеров привело к выраженной индукции репаративного остеогенеза, что может быть обусловлено как опосредованным через ангиогенез действием, так и прямым влиянием VEGF на клетки мезенхимальной линии.

Таким образом, представленные выше примеры иллюстрируют тот факт, что разработанная оптимизированная генная конструкция и фармацевтическая композиция на ее основе обладают выраженной ангиогенной активностью, что позволяет рассчитывать на эффективность ее использования в лечении ишемических заболеваний сердечно-сосудистой системы. Кроме того, оптимизированная генная конструкция с геном *veg*f может оказаться эффективной в лечении других патологических состояний, требующих активации репаративного процесса, таких как повреждения кожи и опорно-двигательного аппарата, травмы периферических нервов, синдром диабетической стопы, боковой амиотрофический склероз.

Литература.

1. Gene therapy clinical trials worldwide. <http://www.abedia.com/wiley/years.php>.
2. Grigorian A.S., Schevchenko K.G. Some possible molecular mechanisms of VEGF encoding plasmids functioning. *Cell. Transpl. Tiss. Engin.* 2011. VI (3): 24-8.
3. Baboo S., Cook P.R. "Dark matter" worlds of unstable RNA and protein. *Nucleus* 2014; 5(4): 281-6.
4. Vislovukh A., Vargas T.R., Poleskaya A. et al. Role of 3'-untranslated region translational control in cancer development, diagnostics and treatment. *World J. Biol. Chem.* 2014; 5(1): 40-57.
5. Malter J. Method to increase regulatory molecule production. US patent №5,587,300; 24.12.1996.
6. Sytkowski A.J., Grodberg J. Erythropoietin DNA having modified 5' and 3' sequences and its use to prepare EPO therapeutics. US patent №6,153,407; 28.11.2000
7. Mauro V.P., Chappell S.A., Zhou W. et al. Reengineering mRNA primary structure for enhanced protein production. US patent application №2012/0053333 A1; 01.03.2012.
8. Folkman J., Merler E., Abernathy C. et al. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J. Exp. Med.* 1971; 133(2): 275-88.
9. Goel H.L., Mercurio A.M. VEGF targets the tumour cell. *Nat. Rev. Cancer.* 2013; 13(12): 871-82.
10. Koch S., Claesson-Welsh L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2012; 2(7): a006502.
11. Matsumoto T., Bohman S., Dixelius J. et al. VEGF receptor-2 Y951 signaling and a role for the adapter molecule TSAd in tumor angiogenesis. *EMBO J.* 2005; 24(13): 2342-53.
12. Bhattacharya R., Kwon J., Li X. et al. Distinct role of PLCbeta3 in VEGF-mediated directional migration and vascular sprouting. *J. Cell Sci.* 2009; 122(Pt 7): 1025-34.
13. Coultas L., Chawengsaksophak K., Rossant J. Endothelial cells and VEGF in vascular development. *Nature* 2005; 438(7070): 937-45.
14. Olsson A.K., Dimberg A., Kreuger J. et al. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2006; 7(5): 359-71.
15. Ma X.N., Li Q.P., Feng Z.C. Research progress in cytokines and signaling pathways for promoting pulmonary angiogenesis and vascular development. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi.* 2013; 15(9): 800-5.
16. Арутюнян И.В., Кананыхина Е.Ю., Макаров А.В. Роль рецепторов VEGF-A165 в ангиогенезе. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия* 2013; VIII(1): 12-8.
17. Cherviakov Iu.A., Staroverov I.N., Nersesian E.G. et al. The opportunities for genic therapy of chronic obliterating diseases of lower limbs arteries. *Khirurgiia (Mosk).* 2014; (4): 40-5.
18. Willyard C. Limb-saving medicines sought to prevent amputation. *Nature Medicine* 2012; 18(3): 328.
19. Hillenbrand M., Holzbach T., Matiassek K. et al. Vascular endothelial growth factor gene therapy improves nerve regeneration in a model of obstetric brachial plexus palsy. *Neurol Res.* 2015; 37(3): 197-203.
20. Kessler J.A. Vascular endothelial growth factor gene transfer for diabetic polyneuropathy. *Ann Neurol.* 2009; 65(4): 362-4.
21. Zavalishin I.A., Bochkov N.P., Suslina Z.A. et al. Gene therapy of amyotrophic lateral sclerosis. *Булл Exp Biol Med.* 2008; 145(4): 483-6.
22. Zhao D.M., Yang J.F., Wu S.Q. et al. Effect of vascular endothelial growth factor 165 gene transfection on repair of bone defect: experiment with rabbits. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2007; 87(25): 1778-82.
23. Geiger F., Bertram H., Berger I. et al. Vascular endothelial growth factor gene-activated matrix (VEGF165-GAM) enhances osteogenesis and angiogenesis in large segmental bone defects. *J. Bone Miner. Res.* 2005; 20(11): 2028-35.
24. Neve A., Cantatore F.P., Corrado A. et al. In vitro and in vivo angiogenic activity of osteoarthritic and osteoporotic osteoblasts is modulated by VEGF and vitamin D3 treatment. *Regul. Pept.* 2013; 184: 81-4.
25. Marini M., Sarchielli E., Toce M. et al. Expression and localization of VEGF receptors in human fetal skeletal tissues. *Histol. Histopathol.* 2012; 27(12): 1579-87.
26. Tombran-Tink J., Barnstable C.J. Osteoblasts and osteoclasts express PEDF, VEGF-A

- isoforms, and VEGF receptors: possible mediators of angiogenesis and matrix remodeling in the bone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004; 316(2): 573-9.
27. Mayr-Wohlfart U., Waltenberger J., Hausser H. et al. Vascular endothelial growth factor stimulates chemotactic migration of primary human osteoblasts. *Bone* 2002; 30(3): 472-7.
28. D' Alimonte I., Nargi E., Mastrangelo F. et al. Vascular endothelial growth factor enhances in vitro proliferation and osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents.* 2011; 25(1): 57-69.
29. Yang Y.Q., Tan Y.Y., Wong R. et al. The role of vascular endothelial growth factor in ossification. *Int. J. Oral Sci.* 2012; 4(2): 64-8.
30. Berendsen A.D., Olsen B.R. How vascular endothelial growth factor-A (VEGF) regulates differentiation of mesenchymal stem cells. *J. Histochem. Cytochem.* 2014; 62(2): 103-8.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения генной конструкции, характеризующейся увеличенным временем жизни мРНК трансгена *veg*f в клетке млекопитающего, согласно которому указанную клетку трансфицируют генной конструкцией, в которой 3'-некодирующая область гена *veg*f модифицирована посредством одной или нескольких точечных делеций гуанина либо аденина и/или замен гуанина либо аденина на цитозин, затем определяют время жизни мРНК для каждой совокупности точечных модификаций, данные анализируют и выбирают генную конструкцию, содержащую 3'-некодирующую область с совокупностью точечных модификаций, показавшую наилучший результат по увеличению жизни мРНК.

2. Способ по п.1, где 3'-некодирующая область мРНК является некодирующей областью гена, выбранного из *veg*f121, *veg*f145, *veg*f165, *veg*f185.

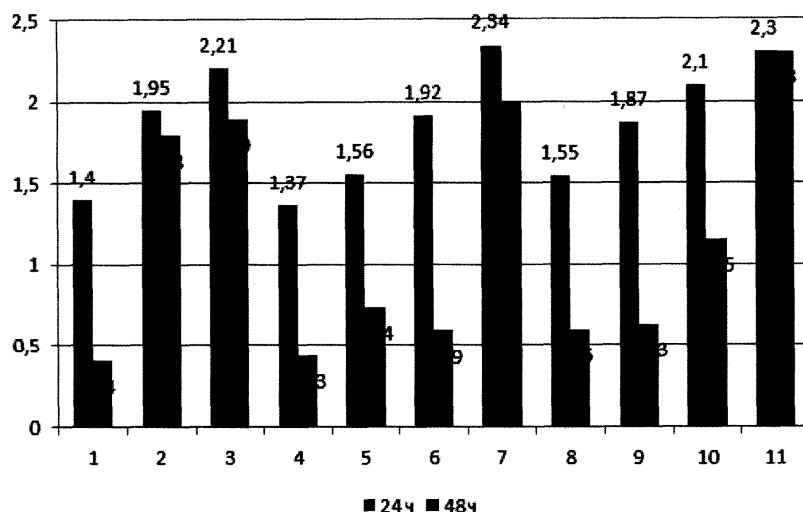
3. Плазмидная ДНК, полученная способом по п.1, в которой 3'-некодирующая область гена *veg*f, выбранного из изоформ 121, 145, 165, 185, модифицирована посредством одной или нескольких точечных делеций гуанина либо аденина и/или замен гуанина либо аденина на цитозин.

4. Плазмидная ДНК гена *veg*f165, представленная последовательностью Seq#11, полученная способом по п.1, отличающаяся тем, что содержит следующие модификации относительно Seq#1: делецию C1079, делецию T1111, замену A1144C, делецию A1148, делецию C1155, делецию A1173, делецию A1185, замену G1536C.

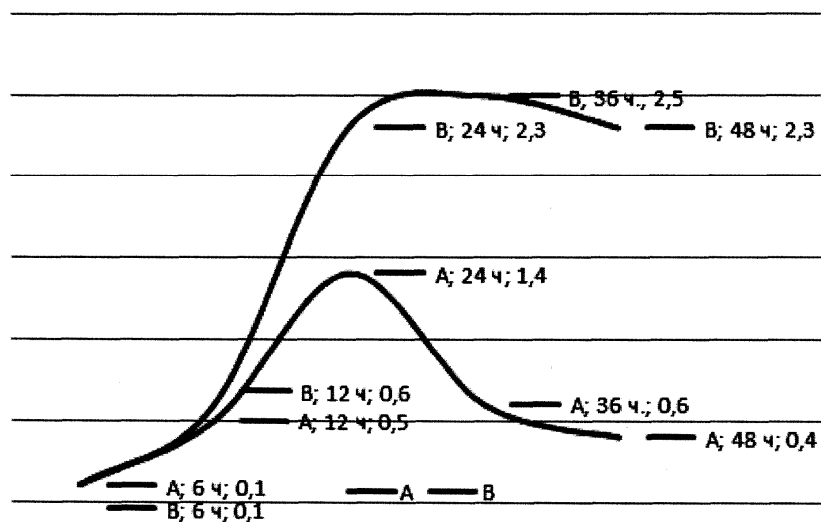
5. мРНК, содержащая 3'-некодирующую область, соответствующую плазмидной ДНК по п.4.

6. Фармацевтическая композиция для регенерации соединительной, мышечной, нервной тканей, включающая плазмидную ДНК по п.4 или 5 и по меньшей мере один криопротектор и стабилизатор pH.

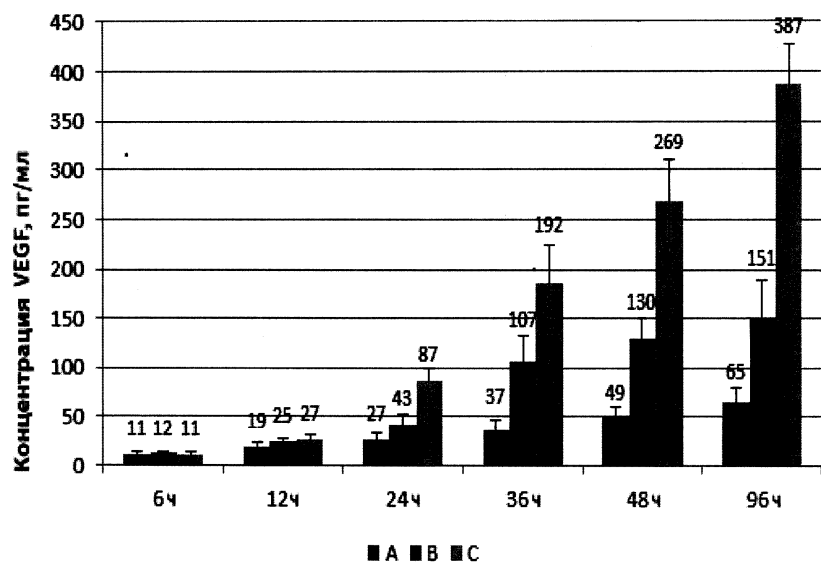
7. Применение плазмидной ДНК по п.5 в регенерации соединительной, нервной, мышечной, костной тканей.



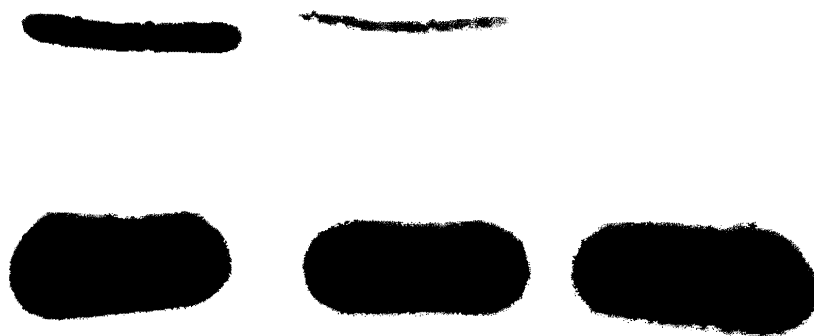
Фиг. 1



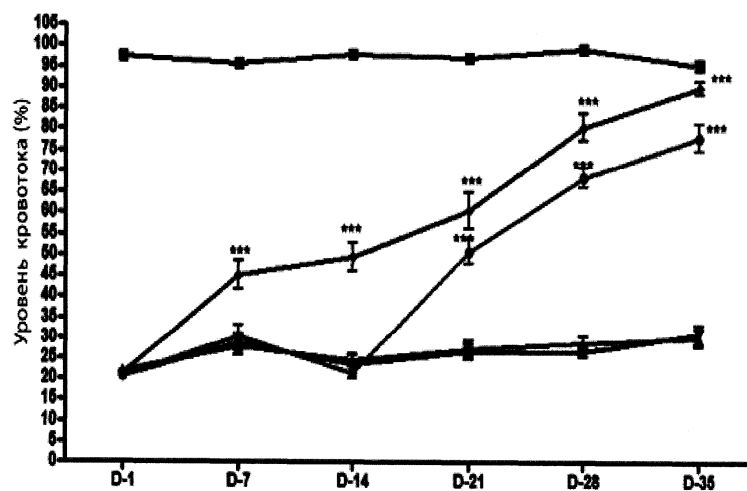
Фиг. 2



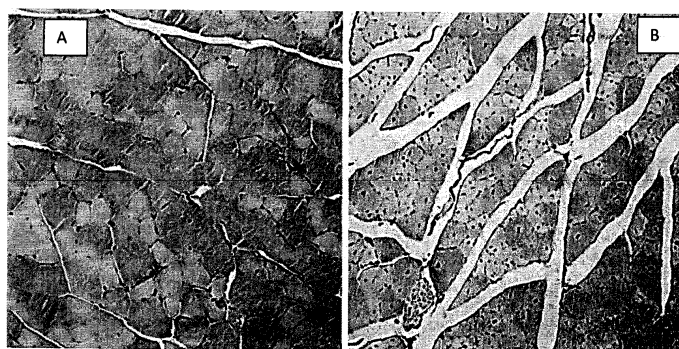
Фиг. 3



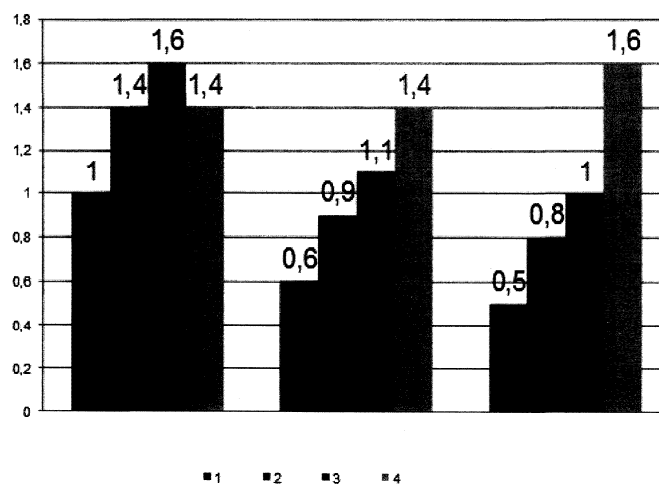
Фиг. 4



Фиг. 5



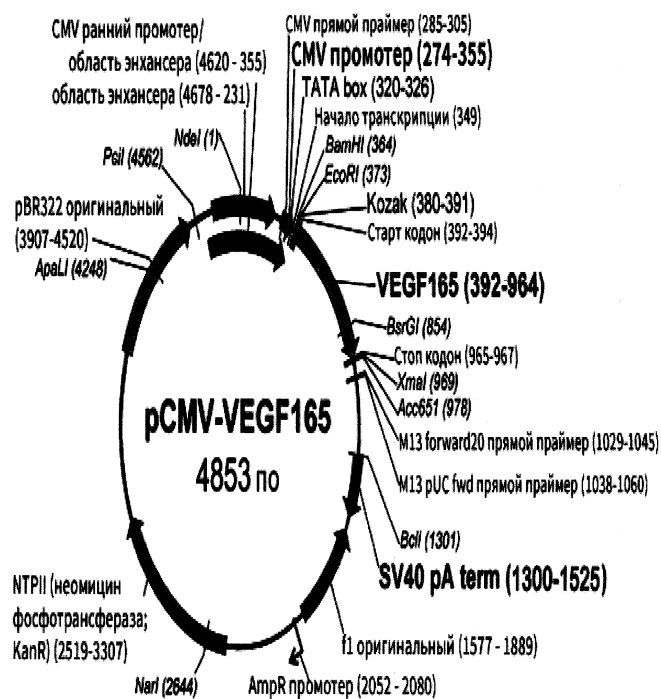
Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2