

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202191987** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
2022.11.28

(22) Дата подачи заявки  
2021.08.13

(51) Int. Cl. *C12N 15/86* (2006.01)  
*A61K 35/00* (2006.01)  
*A61K 38/18* (2006.01)  
*A61P 9/00* (2006.01)  
*A61P 19/00* (2006.01)  
*C12N 5/078* (2010.01)

---

(54) **АДЕНОВИРУСНЫЙ ВЕКТОР С МОДИФИЦИРОВАННЫМ КАПСИДОМ И  
ПРИМЕНЕНИЕ ЕГО В МЕДИЦИНЕ**

---

(96) 2021000093 (RU) 2021.08.13

(71) Заявитель:  
**НИНИТЧУК ОЛЕГ ИВАНОВИЧ (RU)**

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

(72) Изобретатель:  
**Нестеренко Владимир Георгиевич,  
Нестеренко Алексей Владимирович,  
Швецов Андрей Борисович, Шмаров  
Максим Михайлович, Логунов  
Денис Юрьевич, Народицкий Борис  
Савельевич, Гинцбург Александр  
Леонидович, Исламов Рустем  
Робертович, Щербинин Дмитрий  
Николаевич, Алексеева Светлана  
Викторовна (RU)**

---

(57) Изобретение основано на использовании репликативно-дефектных аденовирусных векторов 5 серотипа с модифицированным капсидом с заменой фибера в его составе на фибер аденовируса человека 35 серотипа (Ad5/F35). Такая замена обеспечивает высокую эффективность трансдукции лейкоцитов, например, в аутологичном лейкоконцентрате. После обратного введения в организм пациента такой аутологичный генетически модифицированный лейкоконцентрат продуцирует сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF121) человека или морфогенетический белок кости (BMP2) человека в месте локализации ишемических и посттравматических повреждений, осуществляя быструю регенерацию поврежденных тканей.

**A1**

**202191987**

**202191987**

**A1**

**ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

2420-302182EA/092

**АДЕНОВИРУСНЫЙ ВЕКТОР С МОДИФИЦИРОВАННЫМ КАПСИДОМ И  
ПРИМЕНЕНИЕ ЕГО В МЕДИЦИНЕ****ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ**

[0001] Настоящее изобретение относится к области биотехнологии и может использоваться в клеточно-опосредованной генной терапии в регенеративной медицине. Изобретение основано на использовании репликативно-дефектных аденовирусных векторов 5 серотипа с модифицированным капсидом с заменой фибера в его составе на фибер аденовируса человека 35 серотипа (Ad5/F35). Такая замена обеспечивает высокую эффективность трансдукции лейкоцитов, например, в аутологичном лейкоконцентрате. После обратного введения в организм пациента такой аутологичный генетически модифицированный лейкоконцентрат продуцирует сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF121) человека или морфогенетический белок кости (BMP2) человека в месте локализации ишемических и посттравматических повреждений, осуществляя быструю регенерацию поврежденных тканей. Аденовирусные векторы по настоящему изобретению могут использоваться для создания фармацевтических композиций и лекарственных препаратов для применения в медицине.

**УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

[0002] Проблема преодоления негативных посттравматических и ишемических последствий остается одной из актуальных в фундаментальной и практической медицине. После переломов костей скелета или ишемии нижних конечностей возникают патологические клеточные, тканевые и органые изменения, нарушение трофики и иннервации органов мишеней, приводящие к ограничению двигательной активности и, таким образом, к снижению качества жизни пациента.

[0003] Действия используемых в клинической практике лекарственных препаратов для решения указанной проблемы направлены на симптоматическое лечение и не способны эффективно стимулировать естественные регенераторные процессы в костной и мышечной тканях. Симптоматическое лечение, как правило, является длительным, дорогостоящим и, из-за своей низкой эффективности, не исключает частичную или полную инвалидизацию пациента.

[0004] Поэтому в области медицины, связанной с проблемами посттравматических и ишемических последствий, в частности, репарации клеток, тканей и органов, существует необходимость поиска новых эффективных средств и методов лечения с использованием

биологически активных белковых молекул, специфически активирующих регенераторный потенциал в тканях-мишенях после травматического и/или ишемического повреждения.

[0005] В настоящее время для стимулирования регенерации тканей в практическую медицину активно внедряются генные и клеточные технологии. Активно разрабатываются методы клеточно-опосредованной генной терапии, а именно трансплантация генетически модифицированных клеток, сверхэкспрессирующих молекулы, стимулирующие регенерацию.

[0006] Ниже приведен краткий обзор, существующих средств и способов стимулирования регенерации тканей.

### **VEGF**

[0007] Хорошо известно, что важнейшим фактором восстановления тканей и органов, в частности, нервной, костной, мышечной (скелетной и сердечной) тканей и кожи после гипоксии, вызванной травматическими и ишемическими повреждениями, является активный рост сосудов или ангиогенез.

[0008] Основную роль в этом процессе отводят сосудистому эндотелиальному фактору роста (VEGF, **V**ascular **E**ndothelial **G**rowth **F**actor) и его рецепторам (Olsson, AK., Dimberg, A., Kreuger, J. et al. VEGF receptor signaling - in control of vascular function//2006. May; 7(5), pp.359–371). Семейство молекул VEGF включает в себя несколько факторов, участвующих в ангиогенезе: VEGF-A, B, C, D и плацентарный фактор роста (PlGF, **P**lacental **G**rowth **F**actor). VEGF-A, или просто VEGF, является основным представителем семейства. Он синтезируется в эпителиальных клетках, клетках соединительной ткани, мышечных и нервных клетках. Взаимодействуя с высокоаффинными рецепторными тирозинкиназами (Flt-1, Fetal Liver Kinase; и Flk-1, Feline Sarcoma Virus-Like Tyrosine Kinase), находящимися в плазмалемме эндотелиальных клеток, VEGF регулирует пролиферацию и дифференцировку эндотелиальных клеток, стимулируя, таким образом, рост кровеносных сосудов. Кроме того, установлено, что VEGF также является нейротрофическим фактором (M Sondell, F Sundler, M Kanje, Vascular endothelial growth factor is a neurotrophic factor which stimulates axonal outgrowth through the flk-1 receptor.//Eur J Neurosci. - 2000 Dec;12(12):4243-54). VEGF синтезируется нейрональными стволовыми клетками, зрелыми нейронами и глиальными клетками в различных анатомических областях ЦНС и его синтез значительно повышается в условиях гипоксии. Также было отмечено, что VEGF стимулирует пролиферацию нейробластов, астроцитов, шванновских клеток и рост аксонов, что способствует выживаемости нейронов *in vitro* и *in vivo*. (Ruiz de Almodovar C, Lambrechts D, Mazzone M, Carmeliet P. Role and therapeutic potential of VEGF in the nervous system//Physiol Rev. - 2009 Apr;89(2):607-48)

[0009] В результате альтернативного сплайсинга гена, кодирующего VEGF, синтезируются молекулы, состоящие из 121, 145, 165, 189 или 206 аминокислот с разной способностью связываться со специфическими рецепторами VEGF (Olsson, AK., Dimberg, A., Kreuger, J. et al. VEGF receptor signaling - in control of vascular function// Nature Reviews Molecular Cell Biology. - 2006. May; 7(5), pp. 359–371). Преимущественно синтезируются VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>165</sub> и VEGF<sub>189</sub> и эти варианты находятся в фокусе интенсивных исследований для поиска новых средства для лечения ишемических поражений мозга в виду их особой важности в процессах нейроонтогенеза, ангиогенеза и нейропротекции (Wei Zhu, Ying Mao, Yao Zhao, Liang-Fu Zhou, Yang Wang, Jian-Hong Zhu, Yuan Zhu, Guo-Yuan Yang, Transplantation of vascular endothelial growth factor-transfected neural stem cells into the rat brain provides neuroprotection after transient focal cerebral ischemia, Neurosurgery, 2005 Aug; 57(2):325-33; discussion 325-33; Бокерия Л.А., Голухова Е.З., Еремеева М.В. и др. Использование человеческого гена VEGF<sub>165</sub> для терапевтического ангиогенеза у пациентов с коронарной болезнью: первые результаты//Вестник экспериментальной биологии и медицины. – 2005 июль.- с.106–112; Thomas Pufe, Wolf Petersen, Bernhard Tillmann, and Rolf Mentlein, The splice variants VEGF<sub>121</sub> and VEGF<sub>189</sub> of the angiogenic peptide vascular endothelial growth factor are expressed in osteoarthritic cartilage. - ARTHRITIS & RHEUMATISM. - Vol. 44, No. 5, May 2001, pp.1082–1088). Эти изоформы отличаются наличием или отсутствием гепарин-связывающих доменов, кодируемых экзонами 6 и 7. У VEGF<sub>121</sub> отсутствуют оба гепарин-связывающих домена, это диффузная растворимая форма. В VEGF<sub>165</sub> отсутствует экзон 6. VEGF<sub>189</sub> содержит оба гепарин-связывающих домена, и поэтому он тесно связан с клеточной поверхностью или внеклеточным матриксом. VEGF<sub>165</sub> и VEGF<sub>189</sub> могут высвободиться из внеклеточного матрикса с помощью пламина. Расщепление VEGF<sub>165</sub> и VEGF<sub>189</sub> плазмином приводит к образованию VEGF<sub>110</sub>, который легко диффундирует и по своим биологическим и биохимическим свойствам сходен с VEGF<sub>121</sub>.

### **BMP2**

[00010] Морфогенетический белок кости 2 (BMP2; **B**one **M**orphogenetic **P**rotein 2) относится к суперсемейству трансформирующего фактора роста  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (Bonnie Poon, Tram Kha, Sally Tran, Crispin R Dass, Bone morphogenetic protein-2 and bone therapy: successes and pitfalls// Journal of Pharmacy and Pharmacology, Volume 68, Issue 2. - February 2016, pp.139–147). BMP2 стимулирует дифференцировку остеобластов из клеток-предшественников при интрамембранном и энхондральном остеогенезе, стимулирует регенерацию хрящевой ткани. BMP-2 синтезируется остеобластами и связывается сначала

с высокоаффинным серин-треонин-киназным рецептором BRI, а затем рекрутирует BRII с образованием сигнального комплекса.

[00011] Рекомбинантный морфогенетический белок кости 2 человека (rhBMP-2) в настоящее время доступен в США для применения в ортопедии (Khan, S.N., & Lane, J.M. (2004). The use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) in orthopaedic applications. Expert Opinion on Biological Therapy, 4(5), 741–748. Но из-за проблем со стабильностью рекомбинантного белка в месте его введения, недостаточном понимании сроков и условий доставки BMP в лечебных целях, а также стоимости такого препарата, его применение крайне ограничено.

#### **Плазмидные векторы**

[00012] Поскольку процессы ангиогенеза и остеогенеза в ходе посттравматической регенерации костей скелета оказывают взаимное положительное влияние друг на друга, предполагается, что совместное воздействие двух ростовых факторов, а именно, VEGF и BMP2 будет более эффективно стимулировать посттравматический остеогенез. Так, для стимулирования роста кости известна смесь двух плазмидных векторов, несущих гены VEGF165 и BMP4 (Huang, Y.-C., Kaigler, D., Rice, K. G., Krebsbach, P. H., & Mooney, D. J. (2004). Combined Angiogenic and Osteogenic Factor Delivery Enhances Bone Marrow Stromal Cell-Driven Bone Regeneration. Journal of Bone and Mineral Research, 20(5), 848–857.).

[00013] Недостатком указанных векторов является их крайне низкая эффективность преткновения в клетки организма.

#### **Аденовирусные векторы**

[00014] В поисках решения недостатка использования плазмидных векторов, в последнее время для доставки генов, в частности, для доставки генов, кодирующих белки человека BMP-2 и VEGF121, активно используют аденовирусные векторы, которые демонстрируют большую эффективность проникновения в клетки организма по сравнению с плазмидными векторами. Наиболее изученным аденовирусным вектором является вектор, созданный на основе аденовируса человека 5 серотипа. Он эффективно опосредует перенос и экспрессию генов, легко очищается и подходит для инъекций в организм человека, так как его геном не интегрируется в клетки. На сегодняшний день, аденовирусные векторы самые безопасные и часто используемые генетические векторы.

[00015] Так, в литературе описано, что для повышения эндогенной продукции BMP2, аденовирусные векторы, несущие кДНК, кодирующую BMP-2, вводили непосредственно в костный дефект и остеотомическую щель во время операции (Egermann,

M., Lill, C. A., Griesbeck, K., Evans, C. H., Robbins, P. D., Schneider, E., & Baltzer, A. W. (2006). Effect of BMP-2 gene transfer on bone healing in sheep. Gene Therapy, 13(17), 1290–1299).

[00016] Кроме того, известна композиция для восстановления дефектов костной ткани на основе аденовирусных векторов, несущих кДНК BMP-2, и способ ее получения (патент РФ № 2620962, выдан 30 мая 2017). Также в патенте описан способ получения композиции и преимущества применения такой композиции для локального направленного введения вирусных частиц, для отсроченного высвобождения конструкции после завершения стадии воспаления и начала миграции и дифференцировка остеогенных предшественников.

[00017] Известна генетическая конструкция на основе аденовирусного вектора, несущего ген BMP, в частности BMP2 человека, и способ ее получения (патент CN101319228, выдан 10 декабря 2008). Изобретение позволяет использовать ген BMP для лечения дефектов костей больших сегментов, травм костей для их восстановления.

[00018] Описана генетическая конструкция на основе аденовирусного вектора, несущая ген VEGF121 и способ ее получения (патент CN1488757, выдан 14 апреля 2004). Предложенный аденовирусный вектор продемонстрировал удовлетворительные свойства для профилактики и лечения ишемических заболеваний и был предложен для применения в качестве лекарственного средства.

[00019] Также описан способ устранения дефектов и индукции васкуляризации в органах и тканях млекопитающего, предпочтительно в коже, который включает введение в ткани кожи рекомбинантного вируса, дефектного по репликации, предпочтительно аденовируса, который может нести ген фактора роста VEGF, в том числе VEGF<sub>121</sub> (US6486133, Wistar Institute of Anatomy and Biology, 26 ноября 2002). Описанный способ предусматривает инфицирование такими аденовирусными векторами ткани, подлежащей трансплантации, перед осуществлением трансплантации.

[00020] Все представленные аденовирусные векторы и способы имеют существенный недостаток, а именно, при непосредственном введении в организм человека эти конструкции в той или иной степени будут вызывать нежелательный иммунный ответ хозяина, что может нейтрализовать аденовирусный вектор и таким образом существенно снизить эффективность генной терапии.

### **СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ**

[00021] Кроме того, известно применение стволовых клеток для стимуляции репаративных процессов.

[00022] Так, для терапии костных повреждений применяли стволовые клетки костного мозга, модифицированные молекулами мРНК генов hBMP-2 и VEGF-A (Geng Y,

Duan H, Xu L, Witman N, Yan B, Yu Z, Wang H, Tan Y, Lin L, Li D, Bai S, Fritsche-Danielson R, Yuan J, Chien K, Wei M, Fu W. BMP-2 and VEGF-A modRNAs in collagen scaffold synergistically drive bone repair through osteogenic and angiogenic pathways//Commun Biol.- 2021 Jan 19;4(1):p.82).

[00023] Также для стимуляции ангиогенеза при ишемических заболеваний сердца известен способ получения генно-клеточного препарата на основе стволовых клеток крови пуповины модифицированных с помощью бицистронного плазмидного вектора, несущего два ангиогенных фактора VEGF164 и фактор роста тромбоцитов (PDGF, **P**latelet **D**erived **G**rowth **F**actor) (Das H, George JC, Joseph M, Das M, Abdulhameed N, et al. (2009) Stem Cell Therapy with Overexpressed VEGF and PDGF Genes Improves Cardiac Function in a Rat Infarct Model. PLOS ONE 4(10): e7325). Помимо недостатков использования стволовых клеток, описанных далее, использование плазмидных векторов для доставки рекомбинантных генов в организм в лечебных целях, крайне неэффективно из-за их низкой экспрессионной активности и времени существования, как указано выше.

[00024] В другом способе для модификации стволовых клеток крови пуповины использовали аденоассоциированные векторы (AAV), несущие рекомбинантные гены VEGF165 и ангиопротейна-1 [Chen H.K. et al. Combined cord blood stem cells and gene therapy enhances angiogenesis and improves cardiac performance in mouse after acute myocardial infarction // Eur. J. Clin. Invest. 2005. Vol. 35, №11. pp.677–686.]. Существенным недостатком препарата является возможная интеграция предложенного аденоассоциированного вирусного вектора в геном трансплантируемых клеток с последующей их опухолевой трансформацией.

[00025] Известен способ стимулирования остеогенеза с помощью мезенхимных стволовых клеток, трансдуцированных аденовирусным вектором, несущим ген BMP2 (Tsuda, H., Wada, T., Yamashita, T., & Hamada, H. (2005). Enhanced osteoinduction by mesenchymal stem cells transfected with a fiber-mutant adenoviral BMP2 gene. The Journal of Gene Medicine, 7(10), 1322–1334).

[00026] Однако стволовые клетки крови пуповины и мезенхимные стволовые клетки, применяемые в вышеописанных способах лечения, имеют существенные недостатки. Во-первых, получение стволовых клеток и их трансдукция *in vitro* значительно усложняет процедуру получения генно-клеточного препарата. Что касается пуповинной крови, то она собирается однократно после рождения ребенка и хранится в криобанке до момента использования этому же человеку (для предотвращения иммунологического конфликта), количество имеющихся стволовых клеток в ней очень ограничено и может хватить на единичные процедуры. Что касается мезенхимных стволовых клеток, которые

получают из клеток костного мозга, то процедура их извлечения является достаточно сложным хирургическим вмешательством. При этом следует не забывать, что все стволовые клетки из-за своей низкой дифференцировки потенциально несут опасность канцерогенеза.

[00027] В уровне техники существует необходимость повышения эффективности имеющихся средств, а также поиск новых средств и методов стимуляции репарации после посттравматических и ишемических событий. Изобретение, созданное авторами, решает перечисленные выше проблемы и предлагает новые более эффективные аденовирусные векторы, фармацевтические композиции на их основе и способы их применения в регенеративной медицине человека или животного.

### **ТЕХНИЧЕСКАЯ ЗАДАЧА**

[00028] Задачей авторов было создание векторов и фармацевтических композиций на их основе, способных эффективно использоваться в клеточно-опосредованной генной терапии ишемических и посттравматических повреждений и нейродегенеративных процессов с целью регенерации тканей (в том числе, скелетной, мышечной и нервной) за счет биологически активных факторов роста - сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF121) человека и/или морфогенетического белка кости (BMP2) человека.

[00029] Указанная задача была решена благодаря созданию репликативно-дефектного аденовируса с модифицированным капсидом за счет замены собственного фибера на фибер аденовируса 35 серотипа (Ad5/F35), экспрессирующим ген сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF121) человека или морфогенетического белка кости (BMP2) человека.

### **СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

[00030] Изобретение относится к новым аденовирусным векторам на основе репликативно-дефектного аденовируса с модифицированным капсидом за счет замены собственного фибера на фибер аденовируса 35 серотипа (Ad5/F35), экспрессирующим ген сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF121) человека или морфогенетического белка кости (BMP2) человека, к способам их получения и применения. Репликативно-дефектный аденовирусный вектор на основе аденовируса человека 5 серотипа с модифицированным капсидом (Ad5/F35), экспрессирующим ген сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF121) человека обозначена в настоящем изобретения как «Ad5/F35-VEGF121», а репликативно-дефектный аденовирусный вектор на основе аденовируса человека 5 серотипа с модифицированным капсидом (Ad5/F35), несущий ген

морфогенетического белка кости (BMP2) человека, в настоящем изобретении обозначен как «Ad5/F35-BMP2».

[00031] Кроме того, авторами настоящего изобретения было обнаружено, что для максимальной реализации своей активности и для предотвращения воздействия иммунных факторов организма, полученные аденовирусные векторы следует перед введением в организм пациента экранировать путем введения в лейкоциты периферической крови пациента *ex vivo*, то есть, путем получения аутологического генетически модифицированного лейкоконцентрата (ГМЛ).

[00032] В частности, в настоящем описании раскрыт аденовирусный вектор с модифицированным капсидом, содержащий геном аденовируса человека 5 серотипа с делетированными областями E1 и E3, в котором ген фибера заменен на ген фибера аденовируса человека 35 серотипа, со встроенной экспрессионной кассетой, несущей кодирующую часть гена BMP2 человека представленную нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:1.

[00033] Также раскрыт аденовирусный вектор с модифицированным капсидом, содержащий геном аденовируса человека 5 серотипа с делетированными областями E1 и E3, в котором ген фибера заменен на ген фибера аденовируса человека 35 серотипа, со встроенной экспрессионной кассетой, несущей кодирующую часть гена VEGF121 человека, представленную нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:2.

[00034] Кроме того, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей аденовирусный вектор с модифицированным капсидом, содержащий геном аденовируса человека 5 серотипа с делетированными областями E1 и E3, в котором ген фибера заменен на ген фибера аденовируса человека 35 серотипа, со встроенной экспрессионной кассетой, несущей кодирующую часть гена морфогенетического белка кости человека BMP2 представленную нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:1, где указанный аденовирусный вектор находится в количестве, эффективном для осуществления трансдукции лейкоцитов крови человека *ex vivo*.

[00035] Аналогично, фармацевтическая композиция может содержать аденовирусный вектор с модифицированным капсидом, содержащий геном аденовируса человека 5 серотипа с делетированными областями E1 и E3, в котором ген фибера заменен на ген фибера аденовируса человека 35 серотипа, со встроенной экспрессионной кассетой, несущей кодирующую часть гена фактора роста эндотелия сосудов VEGF121, представленную нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:2, в количестве эффективном для осуществления трансдукции лейкоцитов крови человека *ex vivo*.

[00036] Описанные фармацевтические композиции, помимо аденовирусного вектора содержат буферную систему, в частности, фармацевтически приемлемую буферную систему. В частности, буферный раствор может, например, содержать 5 мМ-50 мМ Tris HCl, от 50 мМ до 150 мМ NaCl, 0,5-2,0 мМ MgCl<sub>2</sub>, 3%-8% сахарозы, 0,005% до 0,1% полисорбата 80, 0,1-1% этанола, 50 мкМ – 750 мкМ ЭДТА, pH 7,0-8,0. В частности, буферный раствор может, например, включать 10 мМ-50 мМ Tris HCl, от 50 мМ до 80 мМ NaCl, 0,5-1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 3%-5% сахарозы, 0,01% до 0,1% полисорбата 80, 0,1-1% этанола, 30 мкМ – 200 мкМ ЭДТА, pH 8,0. В частности, Tris HCl может быть выбран из 5 мМ, 10 мМ, 15 мМ 30 мМ и 50 мМ; NaCl – 50 мМ, 75 мМ, 100мМ; 125 мМ; 150 мМ; MgCl<sub>2</sub> – 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 мМ, сахароза – 3%, 4%, 5%; 6%,7%,8% полисорбат 80 – 0,005%, 0,01%, 0,05%, 0,1%; этанол -0,1%, 0,5%, ЭДТА - 50 мкМ, 100 мкМ, 250 мкМ, 500 мкМ, 750 мкМ..

[00037] При получении стерильной фармацевтической композиции, композицию фильтруют через систему фильтров, например, через систему фильтров с размером пор от 0,2 до 0,5 мкМ и разбавляют стерильным фармацевтически приемлемым буферным раствором.

[00038] Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может находиться в ампуле, герметично закрытой пробирке, флаконе или любом другом стерильном сосуде.

[00039] Также настоящее изобретение относится к набору, содержащему оба варианта фармацевтической композиции по настоящему изобретению, описанные выше, и инструкцию для применения.

[00040] Также изобретение относится к способу получения модифицированного лейкоконцентрата, где способ включает приведение лейкоконцентрата в контакт с фармацевтической композицией по настоящему изобретению, содержащей аденовирусный вектор по настоящему изобретению, несущий кодирующую часть гена VEGF121, и буферную систему, тем самым получая генетически модифицированный лейкоконцентрата.

[00041] Изобретение также относится к способу получения модифицированного лейкоконцентрата, где способ включает приведение лейкоконцентрата в контакт с фармацевтической композиции по настоящему изобретению, содержащей аденовирусный вектор по настоящему изобретению, несущий кодирующую часть гена BMP2, и буферную систему, тем самым получая генетически модифицированный лейкоконцентрат.

[00042] Еще один вариант способа включает получение модифицированного лейкоконцентрата, где способ включает приведение лейкоконцентрата в контакт с

фармацевтической композиции по настоящему изобретению, содержащей аденовирусный вектор по настоящему изобретению, несущий кодирующую часть гена BMP2, фармацевтической композицией по настоящему изобретению, содержащей аденовирусный вектор по настоящему изобретению, несущий кодирующую часть гена VEGF121, и буферную систему, тем самым получая генетически модифицированный лейкоконцентрат.

[00043] В одном из вариантов осуществления лейкоконцентрат может быть аутологичным лейкоконцентратом.

[00044] Также настоящее изобретение относится к набору содержащему обе фармацевтические композиции по настоящему изобретению и инструкцию для применения.

[00045] Настоящее изобретение также относится к способу регенерации тканей у пациента, включающему:

- (a) получение аутологического лейкоконцентрата у пациента,
- (b) обработку полученного лейкоконцентрата *ex vivo* фармацевтической композицией или фармацевтическими композициями по настоящему изобретению с получением генетически модифицированного лейкоконцентрата;
- (c) обратное введение пациенту генетически модифицированного лейкоконцентрата в количестве, эффективном для регенерации ткани.

[00046] В качестве пациента для описанного способа подходит человек или животное. Животным может быть любое млекопитающее, в том числе, приматы, собаки, кошки, лошади, крупный и мелкий рогатый скот, верблюды, свиньи. Описанный способ подходит для ускорения регенерации любых тканей, подвергшихся ишемическому и травматическому воздействию. В частности, вышеописанный способ может использоваться для стимулирования регенерации костной и хрящевой тканей (в частности, при переломах костей и наращивания костной ткани в ротовой полости) и соединительной и эпителиальной тканей (в частности, тканей кожи при косметологических процедурах), для восстановления кровоснабжения мышечной (в частности, сердечной мышечной ткани при сердечно-сосудистых заболеваниях и скелетной мышечной ткани при хронической и критической ишемии) и нервной ткани (в частности, головного мозга при инсультах).

[00047] Лейкоконцентрат может быть свежим лейкоконцентратом или полученным после размораживания. Кроме того, полученный лейкоконцентрат можно вводить любым удобным способом, выбранным из внутривенного, внутримышечного или подкожного, а также локально в область ткани, пораженной ишемией или получившей травматическое повреждение. Наконец, способ можно использовать однократно или

осуществлять курсовое введение. Курсовое введение предусматривает введение лейкоконцентрата один раз в 3-4 недели до полного излечения.

[00048] Также настоящее изобретение относится к применению аденовирусного вектора по настоящему изобретению для получения фармацевтической композиции для применения в медицине и в ветеринарии, в частности, в регенеративной медицине. В частности, область применения включает терапию, хирургию, в частности, хирургическую стоматологию и пластическую хирургию, а также косметологию.

### **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

[00049] Из уровня техники известно, что аденовирусные векторы на основе аденовируса человека 5 серотипа обладают низкой трансдуцирующей активностью в отношении лейкоцитов человека из-за отсутствия на их поверхности CAR рецептора, необходимого для связывания с фибром аденовируса [R. Mentel, G. Dopping, U. Wegner, W. Seidel, H. Liebermann, L. Dohner Adenovirus-receptor interaction with human lymphocytes J. Med. Virol., 51 (1997), pp.252-257]. Неэффективная трансдукция лейкоцитов аденовирусными векторами влечет за собой низкий уровень экспрессии генов BMP2 и VEGF121, что снижает терапевтический эффект. Для осуществления повышенной трансдукции лейкоцитов авторы изобретения осуществили модификацию капсида аденовирусного вектора, созданного на основе аденовируса человека 5 серотипа путем псевдотипирования, то есть замены собственного фибера на фибер аденовируса другого серотипа, использующего для связывания с клеточной поверхностью рецептор, отличный от CAR. Для проведения модификации капсида аденовирусного вектора на основе аденовируса человека 5 серотипа был выбран аденовирус человека 35 серотипа, рецептором для которого служит молекула CD46 [Zhang, Y., & Bergelson, J. M. (2005). Adenovirus Receptors. Journal of Virology, 79(19), 12125–12131], которая экспрессируется на поверхности лейкоцитарных клеток.

[00050] Преимуществами созданных в настоящем изобретении аденовирусных векторов является повышение эффективности уровня трансдукции лейкоцитов, выделенных из крови пациента, и как следствие, возможность обратного введения в организм пациента (аутотрансплантации) в качестве генетически модифицированного лейкоконцентрата для осуществления лечения. Эффективно трансдуцированные аденовирусными векторами лейкоциты, введенные в организм пациента, с высоким уровнем экспрессируют гены BMP2 и VEGF121 в месте терапевтического воздействия, что способствует быстрейшему восстановлению клеток, тканей и органов.

[00051] Лейкоциты периферической крови человека являются легко доступным пополняемым материалом для клеточно-опосредованной генной терапии и

могут безопасно извлекаться у пациента путем простой процедуры забора крови. Собственные (аутологичные) лейкоциты крови не способны вызвать у пациента иммунологический конфликт, а также являясь высоко дифференцированными, не несут риска канцерогенеза.

[00052] Применение аденовирусных векторов осуществляется в составе фармацевтических композиций, дополнительно включающих фармацевтически приемлемый буферный раствор. Аденовирусные векторы с модифицированным капсидом Ad5/F35 -VEGF121 и Ad5/F35-BMP2 используют для стимулирования ангиогенеза при ишемических заболеваниях. Аденовирусный вектор с модифицированным капсидом Ad5/F35-BMP2 индивидуально или в сочетании с аденовирусным вектором с модифицированным капсидом Ad5/F35-VEGF121 можно использовать для стимулирования остеогенеза.

[00053] Изобретение проиллюстрировано фигурами и более подробно раскрыто в примерах ниже.

#### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ**

[00054] На **фиг.1** показана схема плазмиды pAd5-F35-*frt*: **черным цветом** - полный геном рекомбинантного аденовируса человека пятого серотипа, с делецией регионов E1 и E3; **серым цветом** - экспрессионная кассета, состоящая из CMV-промотора, Flp-рекомбиназы и SV40-терминатора; инвертированные терминальные повторы (ITR) аденовирусного генома; сайт рекомбинации *frt*, по которому происходит рекомбинация в клетках HEK293 между плазмидой pAd5-F35-*frt* и шатт-вектором pGamal.

[00055] На **фиг.2** показана схема шаттл-вектора pGamal: инвертированные терминальные повторы (ITR) аденовирусного генома; сигнал упаковки аденовирусного генома – *Encaps*; минимальный CMV-промотор и терминатор SV40, между которыми располагается полилинкер для клонирования гена интереса; экспрессионную кассету, состоящую из CMV-промотора, полилинкера для клонирования гена интереса и SV40-терминатора; сайт рекомбинации *frt*, по которому происходит рекомбинация в клетках HEK293 между плазмидой pAd5-F35-*frt* и шатт-вектором pGamal.

[00056] На **фиг.3** показаны репликативно-дефектные (отсутствует E1 область аденовируса) аденовирусные векторы на основе аденовируса человека 5 серотипа с модифицированным капсидом (наличие гена фибера аденовируса человека 35 серотипа), несущие ген VEGF121 человека. Обозначения: «-» Контроль отрицательный; «+» Контроль положительный; «1» – проба; «M» – маркер молекулярного веса. На треках представленной электрофореграммы наличие черной поперечной полосы в пробе, соответствующей полосе положительного контроля искомого молекулярного веса, при отсутствии черной полосы в

отрицательном контроле, обозначает положительный результат ПЦР реакции (генетическая последовательность есть).

Праймеры:

Adeno: AdH01/AdH02; АСТАСААУАТТГГСТАССАГГ/  
СААААСАТАААГААГКГТГГГС, ПЦР-продукт = 440 п.о.

Е1 область аденовирусного генома (должна отсутствовать): E1bF/pIV-R;  
GATGTGACCGAGGAGCTGAG/GCTGGGAACATAGCCAACCT, ПЦР-продукт = 1034 п.о.

35 fiber: Ad-35-for/Ad35-rev; GGGCTTGTTAATGGCTACGTG/  
GGGGGATGTGGTCAGCGTAGC, ПЦР-продукт = 441 п.о.

[00057] Ген VEGF121: pSVO21/pSVP21; СТТГСТСТАТСТТТСТТТГГ/  
GCTGCTCTACCTCCACCATG, ПЦР-продукт = 372 п.о.

[00058] На **фиг.4** репликативно-дефектные (отсутствует Е1 область аденовируса) аденовирусные векторы на основе аденовируса человека 5 серотипа с модифицированным капсидом (наличие гена фибера аденовируса человека 35 серотипа), несущие ген BMP-2 человека. Обозначения: «-» Контроль отрицательный; «+» Контроль положительный; «2» – проба; «М» – маркер молекулярного веса. На треках представленной электрофореграммы наличие черной поперечной полосы в пробе, соответствующей полосе положительного контроля искомого молекулярного веса, при отсутствии черной полосы в отрицательном контроле, обозначает положительный результат ПЦР реакции (генетическая последовательность есть).

Праймеры:

Adeno: AdH01/AdH02; АСТАСААУАТТГГСТАССАГГ/  
СААААСАТАААГААГКГТГГГС, ПЦР-продукт = 440 п.о.

Е1 область аденовирусного генома (должна отсутствовать): E1bF/pIV-R;  
GATGTGACCGAGGAGCTGAG/GCTGGGAACATAGCCAACCT, ПЦР-продукт = 1034 п.о.

35 fiber: Ad-35-for/Ad35-rev; GGGCTTGTTAATGGCTACGTG/  
GGGGGATGTGGTCAGCGTAGC, ПЦР-продукт = 441 п.о.

Ген BMP-2: BMP2-F/BMP2-R, АGAGACCCACCCCCAGCAGG/  
GCAGTCCACCGCATCACAGC, ПЦР-продукт = 460 п.о.

### **ПРИМЕРЫ**

**Пример 1. Получение аденовирусных векторов с модифицированным капсидом Ad5/F35-BMP2 и Ad5/F35-VEGF121**

[00059] Способ получения аденовирусного вектора с модифицированным капсидом на основе аденовируса человека 5 серотипа с фибром от аденовируса человека 35 серотипа, а также дальнейшее получение двух аденовирусных векторов, несущих

целевые трансгены BMP2 или VEGF121 (Ad5/F35-BMP2 и Ad5/F35-VEGF121, соответственно) включает в себя три этапа:

[00060] **Этап I.** Создание технологии получения аденовирусных векторов на основе аденовирусов человека 5 серотипа с модифицированным капсидом, который содержит фибер аденовируса человека 35 серотипа.

[00061] С целью получения аденовирусных векторов на основе аденовирусов человека пятого серотипа (Ad5) с фибром аденовируса человека 35 серотипа (Ad5/F35), был использован способ получения, описанный Graham в 2000 году (P Ng, DT Cummings, CM Evelegh, FL Graham. Yeast recombinase FLP functions effectively in human cells for construction of adenovirus vectors. Biotechniques. 2000 Sep;29(3):524-6, 528). Согласно этому способу, для конструирования аденовирусного вектора, необходимо было получить две плазмиды: 1) плазмиду несущую геном рекомбинантного аденовируса и 2) Шаттл-вектор, несущий экспрессионную кассету. Все работы по клонированию проводили с использованием общеизвестных стандартных методик, описанных в руководствах для специалистов данной области (Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Vols 1,2 and 3 // Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001, 2100 pp.).

[00062] В итоге были сконструированы две плазмиды. Первая плазида, несущая геном рекомбинантного аденовируса и ген фибера аденовируса человека 35 серотипа pAd5-F35-*frt*, см. Фигуру 1, в своем составе содержит:

- 1) полный геном рекомбинантного аденовируса человека 5 серотипа, с делецией регионов E1 и E3
- 2) экспрессионную кассету, состоящую из CMV-промотора, F1p-рекомбиназы и SV40-терминатора;
- 3) инвертированные терминальные повторы (ITR) аденовирусного генома
- 4) сайт рекомбинации *frt*, по которому происходит рекомбинация в клетках HEK293 между плазмидой pAd5-F35-*frt* и шатт-вектором pGamal.

[00063] Второй сконструированной плазмидой, необходимой для получения аденовирусных векторов Ad5/F35, является шатт-вектор pGamal, см. Фигуру 2, который содержит:

- 1) инвертированные терминальные повторы (ITR) аденовирусного генома;
- 2) сигнал упаковки аденовирусного генома – *Encap*;
- 3) минимальный CMV-промотор и терминатор SV40, между которыми располагается полилинкер для клонирования гена интереса;
- 4) экспрессионную кассету состоящую из CMV-промотора, полилинкера для клонирования гена интереса и SV40-терминатора;

5) сайт рекомбинации *frt*, по которому происходит рекомбинация в клетках НЕК293 между плазмидой pAd5-F35-*frt* и шатт-вектором pGamal.

[00064] Таким образом, были получены плазмиды, при совместной трансфекции которых в перmissive клетках НЕК293 происходит рекомбинация по сайту *frt*, с образованием рекомбинантного генома аденовируса, способного к образованию вирионов и к размножению.

[00065] **Этап II.** Получение плазмид, несущих гены BMP2 или VEGF121.

[00066] В плазмиду pGamal были клонированы два гена – BMP2 и VEGF121. Синтез нуклеотидных последовательностей кодирующих участков генов BMP2 и VEGF121 был выполнен компанией ЗАО Евроген и присланы в составе плазмид pGamal. Нуклеотидные и аминокислотные последовательности приведены в списке последовательностей.

[00067] Таким образом были получены плазмиды pGamal- BMP2 и pGamal-VEGF121.

[00068] **Этап III.** Получение аденовирусных векторов с модифицированным капсидом, несущих целевые гены BMP2 и VEGF121.

[00069] На данном этапе были получены репликативно- дефектные аденовирусные векторы с модифицированным капсидом, на основе генома аденовируса человека 5-го серотипа, содержащие генетические конструкции, созданные на этапе II.

[00070] Все нижеописанные работы по трансфекции эукариотических клеток и наращивания вирионов, проводили с использованием общеизвестных стандартных методик, описанных в руководствах для специалистов данной области.

[00071] Котрансфекцию плазмидами pAd5-F35 совместно с pGamal- BMP2, или pAd5-F35 совместно с pGamal-VEGF121, проводили на перmissive клеточной культуре клеток эмбриональной почки человека линии 293 НЕК. Клетки линии 293 НЕК содержат в своем геноме встроенную область E1 генома аденовируса человека 5 серотипа, благодаря чему в них может происходить размножение репликативно- дефектных аденовирусных векторов 5 серотипа. Через несколько суток после трансфекции наблюдали цитопатическое действие (ЦПД) вируса. Полученные аденовирусные векторы Ad5/F35-BMP2 или Ad5/F35-VEGF121, в виде вирусодержащей жидкости с титром  $10^8$  БОЕ/мл, хранили при температуре минус 70 С (БОЕ-бляшкообразующие единицы).

[00072] Таким образом, авторы получили репликативно – дефектные (отсутствует E1 область аденовируса) аденовирусные векторы, созданные на основе аденовируса человека 5 серотипа с модифицированным капсидом (собственный фибер заменен на фибер от аденовируса человека 35 серотипа), несущие кодирующие части генов

BMP2 или VEGF121 человека, что говорит о соответствии данных аденовирусных векторов заявляемым по изобретению требованиям, и было подтверждено результатами ПЦР (Фигура 3 и Фигура 4).

**Пример 2. Получение фармацевтических композиций, содержащих аденовирусные векторы с модифицированным капсидом Ad5/F35-BMP2 или Ad5/F35-VEGF121.**

[00073] Для получения фармацевтической композиции, содержащей аденовирусные векторы Ad5/F35-BMP2 или Ad5/F35-VEGF121, использовали культуру клеток почки эмбриона человека НЕК 293, адаптированную для роста в суспензии. Клеточную суспензию, полученную в примере 1, использовали для дальнейшего наращивания титра аденовирусных векторов с целью достижения эффективного количества в фармацевтической композиции и возможности ее использования в медицине.

[00074] Волновой биореактор, содержащий 4500,0 мл суспензии перmissive клеточной культуры 293НЕК заражали вируссодержащей жидкостью из примера 1 после размораживания объемом 500,0 мл, содержащей аденовирусные векторы Ad5/F35-BMP2 или Ad5/F35-VEGF121 с титром  $5 \times 10^7$  -  $10^8$  БОЕ/мл. Для наращивания аденовирусных векторов и достижения титра  $10^8$  -  $10^9$  БОЕ/мл, их культивировали в течение 48 часов. Затем клеточную массу очищали с помощью общеизвестных методов ультрафильтрации и высокоэффективной жидкостной хроматографии в несколько этапов:

- 1) Осаждение клеточной массы центрифугированием;
- 2) Перемораживание осадка;
- 3) Обработка бензоназой;
- 4) Центрифугирование для удаления клеточного дебриса;
- 5) Ультрафильтрация супернатанта;
- 6) Анионообменная хроматография;
- 7) Эксклюзионная хроматография;
- 8) Нормальная фильтрация.

[00075] Для стерилизации полученные фармацевтические композиции фильтровали через систему фильтров с размером пор 0,22 мкм и разбавляли стерильным фармацевтически приемлемым буферным раствором, с получением препарата с заданной активностью  $1 \times 10^9$  -  $5 \times 10^9$  БОЕ аденовирусных векторов Ad5/F35-BMP2 или Ad5/F35-VEGF121 на 1 мл.

[00076] Буферный раствор может, например, содержать 5 мМ-50 мМ Tris HCl, 50 мМ до 150 мМ NaCl, 0,5-2,0 мМ MgCl<sub>2</sub>, 3%-8% сахарозы, 0,005% до 0,1% полисорбата 80, 0,1-1% этанола, 50 мкм – 750 мкм ЭДТА, pH 7,0-8,0. В частности, Tris HCl может быть

выбран из 5 мМ, 10 мМ, 15 мМ 30 мМ и 50 мМ; NaCl – 50 мМ, 75 мМ, 100мМ; 125 мМ; 150 мМ; MgCl<sub>2</sub> – 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 мМ, сахароза – 3%, 4%, 5%; 6%,7%,8% полисорбат 80 – 0,005%, 0,01%, 0,05%, 0,1%; этанол -0,1%, 0,5%, ЭДТА - 50 мкМ, 100 мкМ, 250 мкМ, 500 мкМ, 750 мкМ.

[00077] В результате работ были получены две различные фармацевтические композиции, содержащие:

1. Аденовирусный вектор с модифицированным капсидом Ad5/F35 -BMP2, на основе аденовируса человека 5 серотипа с фибром аденовируса человека 35 серотипа, несущий кодирующую часть гена BMP2 в эффективном количестве в фармацевтически приемлемом буферном растворе;

2. Аденовирусный вектор с модифицированным капсидом Ad5/F35 -BMP2, на основе аденовируса человека 5 серотипа с фибром аденовируса человека 35 серотипа, несущий кодирующую часть гена VEGF121 в эффективном количестве в фармацевтически приемлемом буферном растворе.

[00078] Изобретенные фармацевтические композиции могут использоваться для изготовления по GMP-технологии лекарственных препаратов в стеклянных флаконах, ампулах и могут применяться путем прямой генной терапии или для получения аутологического генетически модифицированного лейкоконцентрата.

### **Пример 3. Способ применения аденовирусных векторов, описанных в примере 1**

[00079] Аденовирусные векторы, полученные в примере 1, использовали для получения генетически модифицированного аутологичного лейкоконцентрата для лечения ишемических, травматических повреждений и нейродегенеративных заболеваний по способу, раскрытому в патенте № 2716013, «Способ изготовления средства для клеточно-опосредованной генной терапии и средство для клеточно-опосредованной генной терапии». Способ персонифицированной прецизионной генной терапии с помощью аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного генетическим материалом, применяется для временной продукции рекомбинантных биологически активных белковых молекул с лечебным действием.

[00080] Аденовирусный вектор Ad5/F35 - VEGF121 используют как нейропротекторный фактор или как ангиогенный фактор по конкретному назначению для изготовления аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного геном VEGF121. Изготовленный аутологичный лейкоконцентрат, обогащенный геном VEGF121, применяется для персонифицированной прецизионной генной терапии для стимулирования ангиогенеза при ишемической болезни сердца, хронической и критической ишемии

скелетных мышц конечностей, ишемическом инсульте головного мозга или для стимуляции ангиогенеза и нейропротекции при нейротравмах, инсультах и нейродегенеративных заболеваниях (сосудистые деменции, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, боковой амиотрофический склероз).

[00081] Аденовирусный вектор Ad5/F35 - BMP2 используют как остеогенный фактор, стимулирующий образование и рост костной и хрящевой ткани, для изготовления аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного геном BMP2, по способу, описанному в патенте на изобретение №2716013 «Способ изготовления средства для клеточно-опосредованной генной терапии и средство для клеточно-опосредованной генной терапии». Изготовленный аутологичный лейкоконцентрат, обогащенный геном BMP2, применяется для персонифицированной прецизионной генной терапии для стимулирования посттравматической репарации костей скелета и хрящевой ткани в общей медицинской практике и, в частности, в спортивной медицине, стоматологии или ремоделировании костной ткани в ортопедии.

[00082] Аденовирусные векторы Ad5/F35 VEGF121 и Ad5/F35-BMP2 могут быть использованы в равном соотношении ( $\frac{1}{2}$  Ad5/F35 -VEGF121 и  $\frac{1}{2}$  Ad5/F35 -BMP2) для изготовления аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного генами VEGF121 и BMP2, по способу, описанному в патенте на изобретение №2716013 «Способ изготовления средства для клеточно-опосредованной генной терапии и средство для клеточно-опосредованной генной терапии». Изготовленный аутологичный лейкоконцентрат, обогащенный генами VEGF121 и BMP2, применяется для персонифицированной прецизионной генной терапии для стимулирования посттравматической репарации костей скелета и хрящевой ткани в общей медицинской практике и, в частности, в спортивной медицине, стоматологии или ремоделировании костной ткани в ортопедии. Предполагается, что аутологичный лейкоконцентрат, генетически модифицированный с помощью аденовирусных векторов Ad5/F35 -BMP2 и Ad5/F35 -VEGF121 в равном соотношении, усилит регенераторный ответ костной ткани за счет сочетанного действия VEGF121, обеспечивающего рост новых сосудов (улучшение трофики) и BMP2, активирующего дифференцировку прогениторных остеогенных клеток.

[00083] Приведенные примеры применения предполагаемого изобретения показывают его полезность в практической медицине для лечения людей. Центры заготовки крови могут производить аутологичный лейкоконцентрат, обогащенный генетическим материалом, по способу, раскрытому в патенте на изобретение №2716013 «Способ изготовления средства для клеточно-опосредованной генной терапии и средство для клеточно-опосредованной генной терапии», используя аденовирусные векторы и

фармацевтические композиции, раскрытые в настоящем изобретении. Аутологичный лейкоконцентрат, обогащенный генетическим материалом, можно также получать на базе криобанков из крови пуповины для применения у новорожденных.

[00084] Используемая концентрация аденовирусного вектора Ad5/F35-VEGF121 и аденовирусного вектора Ad5/F35-BMP2 для изготовления аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного генетическим материалом, а также используемое количество лейкоконцентрата для аутоинфузии позволяют регулировать уровень продукции рекомбинантных VEGF121 и/или BMP2 у пациента.

[00085] Предложенный способ клеточно-опосредованной генной терапии предполагает возможность многократного приготовления и многократной инфузии аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного генетическим материалом, пациенту (например, внутривенно, внутримышечно или подкожно) в лечебных целях по конкретному назначению. При необходимости аутологичный лейкоконцентрат, обогащенный генетическим материалом, замораживают для хранения и последующего применения.

[00086] Настоящее изобретение не ограничено приведенными примерами. Настоящее изобретение можно использовать в промышленном производстве лекарственных препаратов, содержащих аденовирусные векторы (Ad5/F35-BMP2 или Ad5/F35-VEGF121) и применять их в практической медицине для изготовления аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного генетическим материалом, посредством использования известных стандартных технических устройств и оборудования.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Аденовирусный вектор с модифицированным капсидом, содержащий геном аденовируса человека 5 серотипа с делетированными областями E1 и E3, в котором ген фибера заменен на ген фибера аденовируса человека 35 серотипа, со встроенной экспрессионной кассетой, несущей кодирующую часть гена BMP2 человека представленную нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:1.

2. Аденовирусный вектор с модифицированным капсидом, содержащий геном аденовируса человека 5 серотипа с делетированными областями E1 и E3, в котором ген фибера заменен на ген фибера аденовируса человека 35 серотипа, со встроенной экспрессионной кассетой, несущей кодирующую часть гена VEGF121 человека, представленную нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:2.

3. Фармацевтическая композиция, содержащая аденовирусный вектор по п.1, где указанный аденовирусный вектор находится в количестве, эффективном для осуществления трансдукции лейкоцитов крови человека *ex vivo*.

4. Фармацевтическая композиция, содержащая аденовирусный вектор по п.2, где указанный аденовирусный вектор находится в количестве, эффективном для осуществления трансдукции лейкоцитов крови человека *ex vivo*.

5. Фармацевтическая композиция по п.3 или 4, также содержащая буферный раствор, включающий 5 мМ-50 мМ Tris HCl, от 50 мМ до 150 мМ NaCl, 0,5-2,0 мМ MgCl<sub>2</sub>, 3%-8% сахарозы, 0,005% до 0,1% полисорбата 80, 0,1-1% этанола, 50 мкМ – 750 мкМ ЭДТА, pH 7,0-8,0.

6. Фармацевтическая композиция по п.5, где композиция является стерильной.

7. Набор, содержащий фармацевтическую композицию по п.3 и п.4 и инструкцию для применения.

8. Способ получения модифицированного лейкоконцентрата, где способ включает приведение лейкоконцентрата в контакт с фармацевтической композицией по п.3, тем самым получая генетически модифицированный лейкоконцентрат.

9. Способ получения модифицированного лейкоконцентрата, где способ включает приведение лейкоконцентрата в контакт с фармацевтической композицией по п.4, тем самым получая генетически модифицированный лейкоконцентрат.

10. Способ получения модифицированного лейкоконцентрата, где способ включает приведение лейкоконцентрата в контакт с фармацевтической композицией по п.3 и п.4, тем самым получая генетически модифицированный лейкоконцентрат.

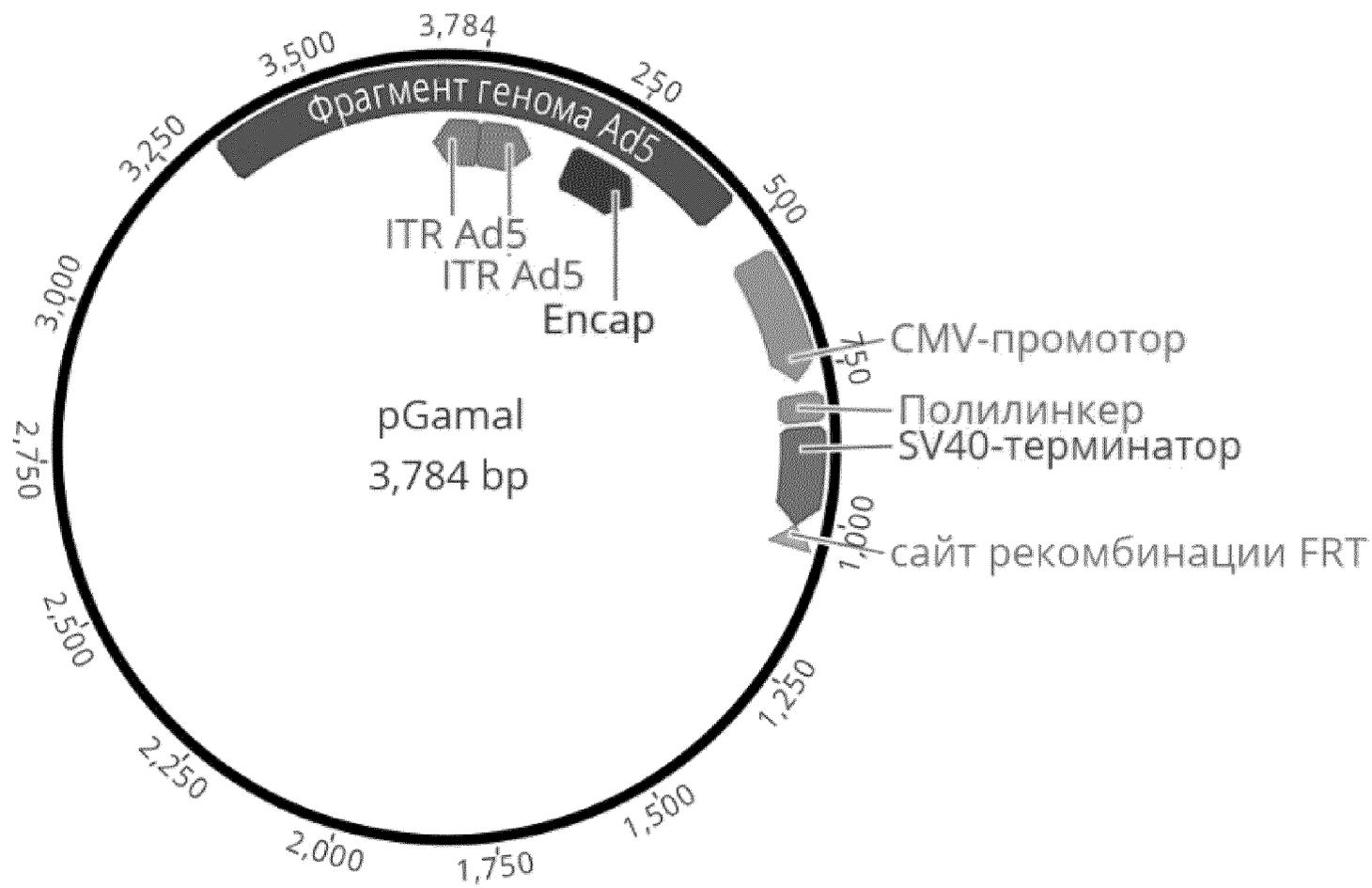
11. Способ по любому из пп.8-10, где лейкоконцентрат является аутологичным лейкоконцентратом.

12. Способ регенерации тканей у пациента, включающий:
- (a) получение аутологического лейкоконцентрата у пациента,
  - (b) обработку полученного лейкоконцентрата *ex vivo* фармацевтической композицией по п.3 и/или фармацевтической композицией по п.4 с получением генетически модифицированного лейкоконцентрата;
  - (c) обратное введение пациенту генетически модифицированного лейкоконцентрата в количестве, эффективном для регенерации ткани.
13. Способ по п.12, где пациентом является человек или животное.
14. Способ по п.13, где животное является млекопитающим.
15. Способ по п.12, где ткань включает костную ткань, мышечную ткань, нервную ткань, соединительную ткань, эпителиальную ткань.
16. Способ по любому из пп.12-15, где введение осуществляют курсом один раз в 3-4 недели до полного излечения.
17. Способ по любому из пп.12-16, где лейкоконцентрат вводят локально в место поражения.
18. Применение аденовирусного вектора по п.1 или аденовирусного вектора по п.2 для получения фармацевтической композиции.
19. Применение фармацевтической композиции по любому из пп.3-4 или набора по п.8 в медицине.
20. Применение фармацевтической композиции по любому из пп.3-4 или набора по п.7 в ветеринарии.

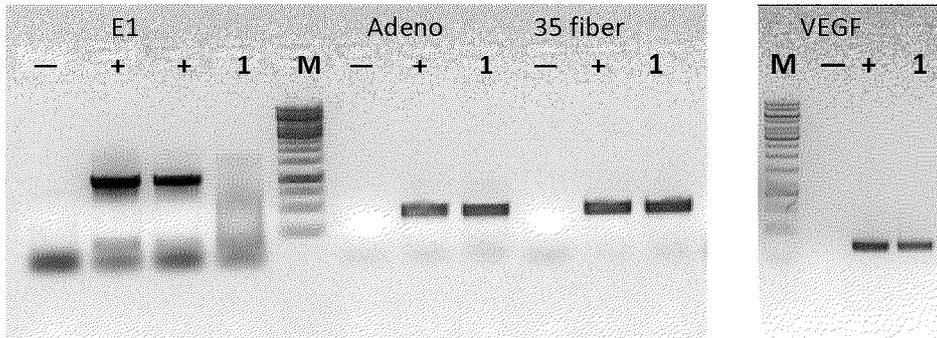
По доверенности



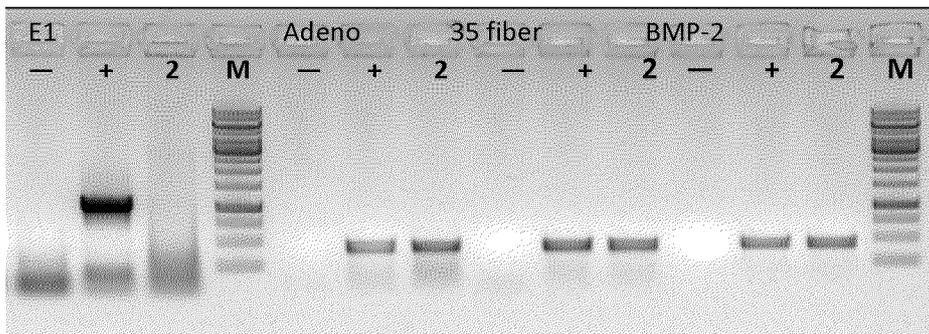
Фигура 1



Фигура 2



Фигура 3



Фигура 4

**ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ**  
(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

**202191987**

**А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:**

см. дополнительный лист

**C12N 15/86** (2006.01)

**A61K 35/00** (2006.01)

**A61K 38/18** (2006.01)

**A61P 9/00** (2006.01)

**A61P 19/00** (2006.01)

**C12N 5/078** (2010.01)

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

**Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:**

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)

C12N15/86, A61K 35/00, A61K 38/18, A61P 9/00, A61P 19/00, C12N 5/078

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)

ЕРАPATIS, Patentscope, Espacenet, USPTO, SIPO, J-PlatPat, RUPTO, Embase, PubMed, Google

**В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ**

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
Y	WO 2011068903 A1 (BAYLOR COLLEGE MEDICINE [US] и др.), 2011.06.09 реферат, абзацы: [005], [0042], [0054], [0076], [0080], [0119]	1,3,5,6,8,11-20
Y	KC294426, 2013.03.16 [онлайн] [найдено 2021.02.01], найдено в <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/search/all/?term=KC294426.1">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/search/all/?term=KC294426.1</a>	1,3,5,6,8,11-20
Y	CN 1796566 A (BENYUAN ZHENYANG GENE TECH CO[CN]), 2006.07.05, фиг.3, 7, 8, пример 6	2,4,5,6,9,11-20
Y	US 2003/0096754 A1 (POLLITT N. STEPHEN, АБРАХАМ JUDITH A и др.), 2003.05.22, SEQ ID NO:1	2,4,5,6,9,11-20
Y	RU 2716013 C2 (ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ "КАЗАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ" МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ), 2020.03.05, стр.6, последний абзац-стр.7 абзац 2, формула	1-20
Y	CHIN-YU LIN et al., "Acceleration and augmentation of femoral segmental bone healing by adipose-derived stem cells engineered with hybrid baculovirus vectors conferring sustained transgene expression", Molecular Therapy, vol.19, suppl.1, May, 2011, s28	7,10

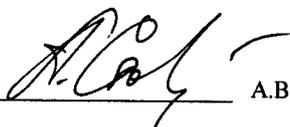
последующие документы указаны в продолжении

\* Особые категории ссылочных документов:  
«А» - документ, определяющий общий уровень техники  
«D» - документ, приведенный в евразийской заявке  
«E» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее  
«O» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.  
"P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения  
«X» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности  
«Y» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории  
«&» - документ, являющийся патентом-аналогом  
«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: **01/02/2022**

Уполномоченное лицо:  
Заместитель начальника Управления экспертизы  
Начальник отдела химии и медицины

  
А.В. Чебан