

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202291538 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.10.25

(22) Дата подачи заявки
2020.11.20

(51) Int. Cl. C07K 14/705 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)
C12N 5/02 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)

(54) ВОССТАНОВЛЕНИЕ ФАКТОРА РОСТА

(31) 62/938,879

(32) 2019.11.21

(33) US

(86) PCT/US2020/061486

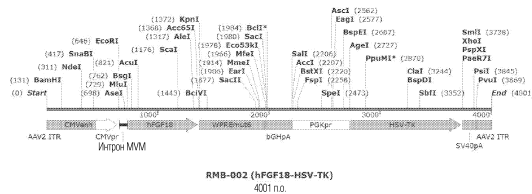
(87) WO 2021/102250 2021.05.27

(71) Заявитель:
РЕМЕДИУМ БАЙО, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Луппино Франческо (US)

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

(57) Изобретение относится к композициям и к способам для лечения заболеваний хряща с использованием экспрессионных векторов, включающих нуклеиновую кислоту, кодирующую ген-"самоубийцу", и полипептид фактора роста фибробластов 18 (FGF-18) или его функциональный фрагмент. Настоящее изобретение относится к экспрессионным векторам и к способам их применения для стимуляции пролиферации клеток, ответственных за продуцирование и сохранение тканей, т.е. таких клеток как хондроциты, кардиомиоциты и синовиоциты.



202291538

A1

A1

202291538

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-574843EA/032

ВОССТАНОВЛЕНИЕ ФАКТОРА РОСТА

Список последовательностей

Настоящая заявка содержит Список последовательностей, который был представлен в электронном виде в формате ASCII и в полном объеме включен в настоящее описание посредством ссылки. Указанная копия ASCII, созданная 19 ноября 2020 г. под названием «51518-003WO2_Sequence_Listing_11_19_20_ST25», имеет размер 13487 байт.

Родственные заявки

В настоящей заявке испрашивается преимущество приоритета предварительной заявки США № 62/938879, поданной 21 ноября 2019 г., которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки.

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к области терапевтического лечения заболеваний тканей, а в частности, заболеваний хрящей у пациентов, таких как человек.

Предпосылки создания изобретения

Факторы роста (например, фактор роста фибробластов 18) представляют собой белки, которые регулируют клеточную пролиферацию, миграцию, выживание, дифференцировку, отложение в тканях, метаболизм и сохранение клеток, а также многие другие биологические функции. В целом, уровни фактора роста в тканях снижаются с возрастом. Это снижение частично связано со снижением уровня экспрессии генов, опосредуемой одним из многих механизмов генетического сайленсинга, общим снижением плотности клеток (которая, как предполагается, представляет собой петлю положительной обратной связи со снижением уровня фактора роста), снижением эффективности и уровня трансляции, а также повышением числа стареющих клеток. Плотность клеток в тканях коррелирует с составом ткани и физико-химическими свойствами ткани. По меньшей мере некоторое снижение концентрации фактора роста ассоциировано с заболеванием, атрофией и дегенерацией тканей. В то время как добавление факторов роста, замена факторов роста или удаление дефектных факторов роста или восполнение отсутствия факторов роста представляют собой широко применяемые подходы к восстановлению хряща, разрушенного в результате остеоартрита, однако, по-прежнему существует потребность в усовершенствовании терапевтических подходов.

Описание сущности изобретения

Настоящее изобретение относится к экспрессионным векторам и к способам их применения для стимуляции пролиферации клеток, ответственных за продуцирование и сохранение клеток тканей, таких как хондроциты, кардиомиоциты и синовиоциты. Композиции и способы согласно изобретению могут быть использованы для лечения или профилактики заболеваний хряща, ассоциированных с заболеванием, атрофией и

дегенерацией тканей. В некоторых вариантах осуществления изобретения, заболевание хряща представляет собой остеоартрит.

В своем первом аспекте, настоящее изобретение относится к рекомбинантному экспрессионному вектору, включающему нуклеиновую кислоту, кодирующую ген-«самоубийцу», и полипептид фактора роста фибробластов 18 (FGF-18) или его функциональный фрагмент.

В некоторых вариантах первого аспекта изобретения, экспрессионный вектор представляет собой вирусный вектор.

В некоторых вариантах первого аспекта изобретения, экспрессионный вектор включает не-вирусную частицу и нуклеиновую кислоту, кодирующую (1) ген-«самоубийцу» и (2) полипептид FGF-18 или его функциональный фрагмент.

В некоторых вариантах первого аспекта изобретения, экспрессионный вектор включает гибридную вирусную и не-вирусную частицу и нуклеиновую кислоту, кодирующую (1) ген-«самоубийцу» и (2) полипептид FGF-18 или его функциональный фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, вирусный вектор выбран из аденоассоциированного вируса (AAV), аденовируса, парвовируса, коронавируса, рабдовируса, парамиксовируса, пикорнавируса, альфавируса, вируса герпеса, поксвируса, лентивируса и вируса семейства *Retroviridae*.

В некоторых вариантах любого из предшествующих аспектов, вирусный вектор представляет собой AAV.

В некоторых вариантах любого из предшествующих аспектов, AAV дополнительно включает капсид.

В некоторых вариантах любого из предшествующих аспектов, капсид включает природный капсид или сконструированный капсид (например, капсид, который содержит модифицированную последовательность).

В некоторых вариантах любого из предшествующих аспектов, сконструированный капсид конъюгирован с лигандом (например, для сообщения специфичности к клеткам определенного типа или модуляции иммуногенности).

В некоторых вариантах любого из предшествующих аспектов, встречающийся в природе капсид представляет собой капсид AAV1, AAV2, AAV2quad(Y-F), AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, rh10, rh39, rh43, rh74, Anc80, Anc80L65, DJ/8, DJ/9, 7m8, PHP.B, PHP.eB или PHP.S.

В некоторых вариантах любого из предшествующих аспектов, AAV представляет собой AAV2 или AAV5.

В некоторых вариантах любого из предшествующих аспектов, ген-«самоубийца» включает ген тимидинкиназы вируса простого герпеса-1 (HSV-TK), ген каспазы 9 (Casp9), ген цитозиндезаминазы, полипептид RQR85 или усеченный человеческий полипептид EGFR.

В некоторых вариантах любого из предшествующих аспектов, ген-«самоубийца» представляет собой ген HSV-TK.

В некоторых вариантах любого из предшествующих аспектов, ген-«самоубийца» представляет собой ген Casp9.

В некоторых вариантах любого из предшествующих аспектов, ген-«самоубийца» кодирует аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85% (например, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%) идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах любого из предшествующих аспектов, ген-«самоубийца» означает ген, который стимулирует экспрессию клеткой экспрессионного вектора, что приводит к запрограммированной гибели клеток.

В некоторых вариантах любого из предшествующих аспектов, ген-«самоубийца» означает ген, который стимулирует экспрессию экспрессионного вектора в клетке, что приводит к терминации транскрипции или трансляции экспрессионного вектора.

В некоторых вариантах любого из предшествующих аспектов, ген-«самоубийца» означает ген, который вызывает снижение уровня экспрессии экспрессионного вектора в клетке, которая экспрессирует этот экспрессионный вектор.

В некоторых вариантах любого из предшествующих аспектов, ген-«самоубийца» представляет собой индуцибельный ген-«самоубийцу».

В некоторых вариантах любого из предшествующих аспектов, индуцибельный ген-«самоубийца» представляет собой Casp9, активируемый рапамицином.

В некоторых вариантах любого из предшествующих аспектов, ген-«самоубийца» кодирует аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85% (например, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%) идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах любого из предшествующих аспектов, полипептид FGF-18 кодирует аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85% (например, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%) идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах любого из предшествующих аспектов, экспрессионный вектор дополнительно включает регулятор транскрипции, функционально связанный с нуклеиновой кислотой, кодирующей FGF-18 или его функциональный фрагмент.

В некоторых вариантах любого из предшествующих аспектов, экспрессионный вектор дополнительно включает не-вирусную частицу.

В некоторых вариантах любого из предшествующих аспектов, регулятор транскрипции включает любой один или более из ТАТА-бокса, элемента распознавания В, элемента распознавания фактора транскрипции ПВ и нижерасположенного промоторного элемента.

В некоторых вариантах любого из предшествующих аспектов, не-вирусная частица включает любой один или более компонентов, выбранных из липидной оболочки, фосфолипидного бислоя, липосомы, нойсомы, фуллерена, наночастицы на основе белка, нанокристалла, дендримера, органического/неорганического коллоида, ПЭГи илированной липосомы, полимерной мицеллы, обратной мицеллы, смешанной мицеллы, чувствительной мицеллы, многокомпонентной мицеллы или поли- или мономолекулярной дендритной мицеллы.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, включающей экспрессионный вектор согласно любому из предшествующих аспектов.

В некоторых вариантах любого из предшествующих аспектов, фармацевтическая композиция дополнительно включает фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или наполнитель.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания хряща, где указанный способ включает введение индивидууму фармацевтической композиции согласно любому из предшествующих аспектов.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции согласно любому из предшествующих аспектов для применения в целях лечения заболевания хряща.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к применению фармацевтической композиции согласно любому из предшествующих аспектов для лечения заболевания хряща.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к применению фармацевтической композиции согласно любому из предшествующих аспектов в целях приготовления лекарственного средства для лечения заболевания хряща. В некоторых вариантах любого из предшествующих аспектов, заболевание хряща представляет собой остеоартрит.

В некоторых вариантах любого из предшествующих аспектов, фармацевтическую композицию вводят внутривенно, внутрисуставно, субхондрально, интрасиновиально или внутривенно.

В некоторых вариантах любого из предшествующих аспектов, фармацевтическую композицию вводят в синовиальное соединение.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к способу стимуляции пролиферации клеток-хондроцитов или клеток-предшественников хондроцитов (например, путем повышения выживаемости клеток-хондроцитов или клеток-предшественников хондроцитов или путем усиления дифференцировки клеток-предшественников хондроцитов), где указанный способ включает контактирование клетки с экспрессионным вектором или с фармацевтической композицией согласно любому из предшествующих аспектов.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к экспрессионному вектору или к фармацевтической композиции согласно любому из предшествующих аспектов для применения в целях стимуляции пролиферации клеток-хондроцитов или клеток-предшественников хондроцитов (например, путем повышения выживаемости клеток-хондроцитов или клеток-предшественников хондроцитов или путем усиления дифференцировки клеток-предшественников хондроцитов).

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к к применению экспрессионного вектора или фармацевтической композиции согласно любому из предшествующих аспектов в целях стимуляции пролиферации клеток-хондроцитов (например, путем повышения выживаемости клеток-хондроцитов или клеток-предшественников хондроцитов или путем усиления дифференцировки клеток-предшественников хондроцитов). В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к применению экспрессионного вектора или фармацевтической композиции согласно любому из предшествующих аспектов в целях приготовления лекарственного средства для стимуляции пролиферации клеток-хондроцитов или клеток-предшественников хондроцитов (например, путем повышения выживаемости клеток-хондроцитов или клеток-предшественников хондроцитов или путем усиления дифференцировки клеток-предшественников хондроцитов).

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к способу стимуляции секреции внеклеточного матрикса для замены хряща (например, путем стимуляции пролиферации клеток-хондроцитов или клеток-предшественников хондроцитов, повышения выживаемости клеток хондроцитов или клеток-предшественников хондроцитов или усиления дифференцировки клеток-предшественников хондроцитов), где указанный способ включает контактирование клетки с экспрессионным вектором или с фармацевтической композицией согласно любому из предшествующих аспектов.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к экспрессионному вектору или к фармацевтической композиции согласно любому из предшествующих аспектов для стимуляции секреции внеклеточного матрикса для замены хряща (например, путем стимуляции пролиферации клеток-хондроцитов или клеток-предшественников хондроцитов, повышения выживаемости клеток хондроцитов или клеток-

предшественников хондроцитов или усиления дифференцировки клеток-предшественников хондроцитов).

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к применению экспрессионного вектора или фармацевтической композиции согласно любому из предшествующих аспектов для стимуляции секреции внеклеточного матрикса для замены хряща (например, путем стимуляции пролиферации клеток-хондроцитов или клеток-предшественников хондроцитов, повышения выживаемости клеток-хондроцитов или клеток-предшественников хондроцитов или усиления дифференцировки клеток-предшественников хондроцитов).

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к применению экспрессионного вектора или фармацевтической композиции согласно любому из предшествующих аспектов в целях приготовления лекарственного средства для стимуляции секреции внеклеточного матрикса для замены хряща.

В некоторых вариантах любого из предшествующих аспектов, клетки трансфецируют или трансдуцируют *ex vivo* для экспрессии экспрессионного вектора. В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к набору, включающему экспрессионный вектор или фармацевтическую композицию согласно любому из предшествующих аспектов, и вкладыш в упаковку, в котором имеется инструкция для пользователя по применению набора для осуществления способа согласно любому из предшествующих аспектов. В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к набору согласно предшествующим аспектам, где указанный набор дополнительно включает один или более из таких компонентов, как картонная коробка, пломба для контроля вскрытия, игла, шприц или предварительно заполненный шприц.

Краткое описание чертежей

На Фиг. 1 представлено схематическое изображение репрезентативного вирусного вектора на основе аденоассоциированного вируса 2 (AAV2) для непрерывной экспрессии безопасного по своей природе полипептида фактора роста фибробластов 18 (FGF18), опосредованной геном-«самоубийцей» тимидинкиназы вируса простого герпеса-1 (HSV-TK). Темные прямоугольники представляют последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие энхансер цитомегаловируса (CMV) (CMV_{enh}), функционально связанный с человеческим полипептидом FGF18 (hFGF18); мутантный посттранскрипционный регуляторный элемент 6 вируса гепатита сурка (WPRE_{mut6}; известно, что элемент ДНК существенно увеличивает уровни экспрессии, но без промоторной активности); сигнал полиаденилирования бычьего гормона роста (bGH_{pA}), ген-«самоубийцу» HSV-TK; мутированный сигнал раннего полиаденилирования SV40 (SV40_{pA}); и фланкирующие последовательности инвертированных концевых повторов AAV2 (ITR). Белые прямоугольники представляют промоторы CMV и фосфолицераткиназы (PGK) (CMV_{pr} и PGK_{pr}), соответственно. Жирная линия, соединяющая белые и темные прямоугольники, представляет интрон мышинового минут-вируса (MVM) для сообщения оптимизированной функциональности промотору CMV.

На Фиг. 2 представлено схематическое изображение репрезентативного вирусного вектора на основе AAV2 для непрерывной экспрессии безопасного по своей природе полипептида FGF-18, опосредованной геном-«самоубийцей» на основе рапамицин-активируемой каспазы 9 (gараCas9). Темные прямоугольники представляют последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие CMVenh, функционально связанный с полипептидом hFGF18; WPREmut6, bGHpA, ген-«самоубийцу» гараCas9, SV40pA и фланкирующий ITR AAV2. Белые прямоугольники представляют CMVpr и PGKpr, соответственно. Жирная линия, соединяющая белые и темные прямоугольники, представляет интрон MVM.

Определения

Используемый здесь термин «активность» относится к форме (формам) полипептида, которые сохраняют биологическую активность нативного или встречающегося в природе полипептида, где «биологическая» активность относится к биологической функции (например, функции фактора роста), сообщаемой нативным или встречающимся в природе полипептидом.

Используемый здесь термин «введение» относится к инъекции или введению индивидууму терапевтического средства (например, экспрессионного вектора) любым эффективным способом. Типичные способы введения описаны здесь и ниже (например, внутривенная, внутрисуставная, субхондральная, интрасиновиальная или внутривитреальная инъекция).

Используемый здесь термин «аллельный вариант» относится к одной из нескольких возможных встречающихся в природе альтернативных форм гена, занимающего данный локус на хромосоме организма или популяции организмов.

Используемый здесь термин «кардиомиоцит» относится к мышечной клетке (миоциту), из которой состоит сердечная мышца. Используемый здесь термин «заболевание хряща» относится к заболеванию, проявляющемуся у пациентов в виде разрушения хряща; сужения суставной щели; утолщения субхондральной кости; образования остеофитов или костных наростов; воспаления сустава, сопровождающегося отеком и болью; уменьшения плотности одного или более компонентов хрящевой ткани, компонентов суставной ткани, включая клетки, белки, протеогликаны и полисахариды; и других симптомов. Помимо механического повреждения, заболевания хряща также ассоциируются с повышением уровня провоспалительных цитокинов, таких как фактор некроза опухоли альфа, интерлейкин 6 (IL-6) и интерлейкин 1 (IL-1) бета. Эти цитокины могут диффундировать в хрящ и вызывать активацию протеазной активности, что приводит к разрушению множества макромолекул внеклеточного матрикса хряща металлопротеиназами матрикса, агреканазами, гиалуронидазами и другими ферментами, расщепляющими ткани.

Используемый здесь термин «клетки определенного типа» относится к группе клеток, имеющих общий фенотип, который является статистически разделимым на основании данных об экспрессии генов. Так, например, клетки общего типа (например,

хондроциты или синовиоциты) могут иметь сходные структурные и/или функциональные свойства, такие как сходные паттерны активации генов и профили презентации антигена. Клетки общего типа могут включать клетки, выделенные из общей ткани (например, суставной ткани), и/или клетки, выделенные из общего органа, системы тканей, кровеносного сосуда или другой структуры и/или области в организме.

Используемый здесь термин «хондроцит» относится к клеточной популяции, которая составляет первичные клетки, обнаруживаемые в здоровом хряще. По своей функции, хондроциты продуцируют и поддерживают хрящевой матрикс, состоящий в основном из коллагена и протеогликанов.

Используемый здесь термин «ДНК с замкнутыми концами» относится к линейной дуплексной ДНК с ковалентно замкнутыми концами.

Используемый здесь термин «оптимизация по кодонам» относится к способу модификации последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с принципом, согласно которому частота встречаемости синонимичных кодонов (например, кодонов, кодирующих одну и ту же аминокислоту) в кодирующей ДНК смещена у различных видов. Такая вырожденность кодонов позволяет кодировать идентичный полипептид множеством нуклеотидных последовательностей. Последовательности, модифицированные таким образом, называются здесь «оптимизированными по кодонам». Этот процесс может быть осуществлен на любой из последовательностей, описанных в настоящей заявке, для повышения уровня экспрессии или повышения стабильности. Оптимизация по кодонам может быть проведена способом, описанным, например, в патентах США № 7561972, 7561973 и 7888112, каждый из которых в полном объеме включен в настоящее описание посредством ссылки. Последовательность, окружающая сайт инициации трансляции, может быть преобразована в консенсусную последовательность Козака в соответствии с известными способами. См., например, публикацию Kozak et al., *Nucleic Acids Res.* 15:8125-8148 (1989), которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки. Могут быть включены несколько стоп-кодонов.

Используемый здесь термин «комбинированная терапия» означает, что индивидууму вводят два (или более) различных агента или проводят два или более курсов лечения в рамках определенной схемы лечения конкретного заболевания или состояния. Схема лечения определяет дозы и периодичность введения каждого агента таким образом, чтобы эффекты отдельных агентов, вводимых индивидууму, перекрывались. В некоторых вариантах осуществления изобретения, доставка двух или более агентов может быть одновременной или конкурентной, и эти агенты могут быть объединены в одну композицию. В других вариантах осуществления изобретения, два или более агентов не входят в одну композицию и их вводят последовательно как часть назначаемой схемы лечения. В некоторых вариантах осуществления изобретения, введение двух или более агентов или проведение двух или более курсов лечения в комбинации осуществляют так, чтобы ослабление симптома или другого параметра, связанного с данным расстройством,

было более эффективным, чем это наблюдалось в случае введения одного агента или проведения только одного курса лечения или в отсутствии другого агента или без проведения другого курса лечения. Эффект двух видов лечения может быть частично аддитивным, полностью аддитивным или более чем аддитивным (например, синергическим). Последовательное или, по существу, одновременное введение каждого терапевтического агента может быть осуществлено любым подходящим способом, включая, но не ограничиваясь ими, пероральное введение, внутривенное введение, внутримышечное введение и прямое поглощение через ткани слизистой оболочки. Терапевтические агенты могут быть введены одним и тем же способом или различными способами. Так, например, первое терапевтическое средство из комбинации этих средств может быть введено путем внутривенной инъекции, а второе терапевтическое средство из этой комбинации может быть введено перорально.

Используемый здесь термин «ДНК в форме собачьей конуры» означает замкнутую линейную двухцепочечную ДНК, которая образуется посредством ферментативного расщепления конкатемерной ДНК.

Используемый здесь термин «экспрессировать» относится к одному или более из следующих событий: (1) продуцирования матрицы РНК из последовательности ДНК (например, посредством транскрипции); (2) процессинга РНК-транскрипта (например, в результате сплайсинга, редактирования, образования 5'-кэпа и/или процессинга у 3'-конца); (3) трансляции РНК в полипептид или белок; и (4) посттрансляционной модификации полипептида или белка. Экспрессия представляющего интерес гена у индивидуума может быть идентифицирована, например, путем детектирования: увеличения количества или концентрации мРНК, кодирующей соответствующий белок (как может быть оценено, например, с применением процедур детектирования РНК, известных специалистам в данной области, таких как количественная полимеразная цепная реакция и методы секвенирования РНК); и/или увеличения количества или концентрации соответствующего белка (как может быть оценено, например, с применением методов детектирования белка, известных специалистам, таких как Вестерн-блоттинг).

Используемый здесь термин «экспрессионный вектор» означает вектор на основе нуклеиновой кислоты, например, ДНК-вектор, такой как плаزمид, РНК-вектор, вирус или другой подходящий репликон (например, вирусный вектор). Было разработано множество векторов для доставки полинуклеотидов, кодирующих экзогенные белки, в прокариотические или эукариотические клетки. Примеры таких векторов экспрессии раскрыты, например, в WO 1994/011026, которая включена в настоящее описание посредством ссылки и относится к векторам, подходящим для экспрессии представляющего интерес гена. Экспрессионные векторы, подходящие для их применения в описанных здесь композициях и способах, содержат полинуклеотидную последовательность, а также, например, дополнительные элементы последовательности, используемые для экспрессии белков и/или интеграции этих полинуклеотидных

последовательностей в геном клетки млекопитающего. Некоторые векторы, которые могут быть использованы для экспрессии экспрессионных векторов, описанных в настоящей заявке, включают плазмиды, которые содержат регуляторные последовательности, такие как промоторные и энхансерные области, которые регулируют транскрипцию гена. Другие векторы, подходящие для экспрессии экспрессионных векторов, содержат полинуклеотидные последовательности, которые повышают скорость трансляции этих генов или повышают стабильность или ядерный экспорт мРНК после транскрипции гена. Эти элементы последовательности включают, например, 5'- и 3'-нетранслируемые области, IRES и сайт сигнала полиаденилирования, которые обеспечивают эффективную транскрипцию гена, переносимого экспрессионным вектором. Экспрессионные векторы, подходящие для их использования в описанных здесь композициях и способах, могут также содержать полинуклеотид, кодирующий маркер для отбора клеток, содержащих такой вектор. Примерами подходящего маркера являются гены, которые кодируют резистентность к антибиотикам, таким как ампициллин, хлорамфеникол, канамицин, ноурсеотрицин или зеоцин.

Используемые здесь термины «фактор роста фибробластов 18», «FGF-18» и «FGF18» относятся к белку, сохраняющему по меньшей мере одну биологическую активность человеческого белка FGF-18. Используемый здесь FGF-18 относится к FGF-18 в его нативной форме, в его зрелой форме, в рекомбинантной форме, а также в любой другой форме встречающихся в природе вариантов FGF-18 (например, вариантов сплайсинга, аллельных вариантов или вариантов, образующихся в результате посттрансляционных модификаций или из вторичных структур). Используемый здесь термин FGF-18 также относится к белку FGF-18, включая слитый белок, где такой гибридный белок сохраняет по меньшей мере одну биологическую активность человеческого белка FGF-18. Используемый здесь FGF-18 также относится к модифицированному белку FGF-18, где модификация, например, повышает резистентность к расщеплению или модулирует его аффинность связывания с одним или несколькими его рецепторами. Биологическая активность человеческого белка FGF-18, в частности, включает повышение уровня пролиферации хондроцитов или остеобластов (см. WO 98/16644) или образование хряща (см. WO 2008/023063). Нативный человеческий FGF-18 представляет собой белок, экспрессируемый хондроцитами суставного хряща. Человеческий FGF-18 был впервые обозначен как zFGF-5 и полностью описан в WO 98/16644. Человеческий FGF-18 имеет ген NCBI ID NO 8817. Пример последовательности нуклеиновой кислоты человеческого FGF-18 дикого типа представлен в NCBI RefSeq Acc. No. NM_003862.3 (SEQ ID NO: 3), а типичная аминокислотная последовательность FGF-18 дикого типа представлена в NCBI RefSeq Acc. No. NP_003853.1 (SEQ ID NO: 4).

Используемый здесь термин «его функциональный фрагмент» относится к полипептиду FGF-18, который может присутствовать в своей нативной форме, в своей зрелой форме, в рекомбинантной форме, в более короткой форме, чем полностью природные варианты FGF-18, или он может присутствовать в любой другой форме

встречающихся в природе вариантов FGF-18 (например, вариантов сплайсинга или аллельных вариантов) и сохраняет по меньшей мере одну биологическую активность человеческого белка FGF-18.

Используемый здесь термин «IRES» относится к внутреннему сайту связывания с рибосомой. В целом, последовательность IRES представляет собой последовательность, которая позволяет эукариотическим рибосомам связываться с транскриптом мРНК и инициировать трансляцию без связывания с 5'-кэпированным концом мРНК, содержащая последовательность IRES, продуцирует два продукта трансляции, один из которых инициируется с 5'-конца мРНК, а другой за счет внутреннего механизма трансляции, опосредованного IRES.

Под «уровнем» подразумевается уровень белка или нуклеиновой кислоты по сравнению с эталоном. Эталоном может быть любой подходящий эталон, определенный в настоящей заявке. Под «пониженным уровнем» или «повышенным уровнем» белка или нуклеиновой кислоты подразумевается снижение или повышение уровня белка или нуклеиновой кислоты по сравнению с эталонным значением (например, снижение или повышение приблизительно на 5%, приблизительно на 10%, приблизительно на 15%, приблизительно на 20%, приблизительно на 25%, приблизительно на 30%, приблизительно на 35%, приблизительно на 40%, приблизительно на 45%, приблизительно на 50%, приблизительно на 55%, приблизительно на 60%, приблизительно на 65%, приблизительно на 70%, приблизительно на 75%, приблизительно на 80%, приблизительно на 85%, приблизительно на 90%, приблизительно на 95%, приблизительно на 100%, приблизительно на 150%, приблизительно на 200%, приблизительно на 300%, приблизительно на 400%, приблизительно на 500% или более; уменьшение или увеличение более чем приблизительно на 10%, приблизительно на 15%, приблизительно на 20%, приблизительно на 50%, приблизительно на 75%, приблизительно на 100% или приблизительно на 200% по сравнению с эталоном; уменьшение или увеличение менее, чем приблизительно в 0,01 раза, приблизительно в 0,02 раза, приблизительно в 0,1 раза, приблизительно в 0,3 раза, приблизительно в 0,5 раза, приблизительно в 0,8 раза или менее или увеличение более, чем приблизительно в 1,2 раза, приблизительно в 1,4 раза, приблизительно в 1,5 раза, приблизительно в 1,8 раза, приблизительно в 2,0 раза, приблизительно в 3,0 раза, приблизительно в 3,5 раза, приблизительно в 4,5 раза, приблизительно в 5,0 раз, приблизительно в 10 раз, приблизительно в 15 раз, приблизительно в 20 раз, приблизительно в 30 раз, приблизительно в 40 раз, приблизительно в 50 раз, приблизительно в 100 раз, приблизительно в 1000 раз или более). Уровень белка может быть выражен в масс./об. (например, г/дл, мг/мл, мкг/мл, нг/мл) или в процентах от общего количества белка или нуклеиновой кислоты в образце.

Используемый здесь термин «зрелая форма» относится к полипептиду FGF-18, не имеющему лидерной последовательности, и может также включать другие модификации полипептида, такие как протеолитический процессинг у amino-конца (с лидерной

последовательностью или без нее) и/или у карбоксильного конца, отщепление менее крупного полипептида от более крупного предшественника, N-связанное и/или O-связанное гликозилирование и другие посттрансляционные модификации, известные специалистам в данной области.

Используемый здесь термин «миникольцо» относится к эписомным ДНК-векторам, которые продуцируются в виде циклического экспрессионного кластера, лишенного какого-либо остова бактериальной плазмидной ДНК.

Используемый здесь термин «мини-цепь ДНК» относится к вектору на основе линейной ковалентно замкнутой ДНК, который включает только представляющий интерес ген и необходимые эукариотические элементы экспрессии. Этот вектор не имеет иммуногенных бактериальных последовательностей.

Используемый здесь термин «наноплазидаTM» относится к ДНК-вектору с остовом длиной менее 500 п.о., без антибиотических маркеров и с ориджином репликации R6K. Его можно приобрести в корпорации Nature Technology.

Используемые здесь термины «нативный» или «встречающийся в природе», если они используются в связи с биологическими материалами, такими как молекулы нуклеиновых кислот, полипептиды, клетки-хозяева и т.п., относятся к молекулам, которые встречаются в природе и не были модифицированы человеком.

Используемый здесь термин «остеоартрит» означает заболевание хряща, которое возникает в том случае, когда гибкая ткань на концах костей изнашивается, что проявляется в виде боли и тугоподвижности суставов, припухлости суставов, уменьшения диапазона движений, слабости или онемения рук и ног, и других симптомов.

«Процент (%) идентичности последовательности» по отношению к последовательности эталонного полинуклеотида или полипептида определяют как процент нуклеиновых кислот или аминокислот в последовательности-кандидате, которые идентичны нуклеиновым кислотам или аминокислотам в последовательности эталонного полинуклеотида или полипептида, после выравнивания последовательностей и введения пробелов, если это необходимо для достижения максимального процента идентичности последовательностей. Выравнивание с целью определения процента идентичности последовательностей нуклеиновой кислоты или аминокислотных последовательностей может быть достигнуто различными способами, известными специалисту в данной области, например, с использованием общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как BLAST, BLAST-2 или Megalign. Специалисты в данной области могут определить подходящие параметры для выравнивания последовательностей, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей. Так, например, процентные значения идентичности последовательностей могут быть определены с использованием компьютерной программы BLAST для сравнения последовательностей. В качестве иллюстрации, процент идентичности последовательности данной нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности, A, по отношению к данной последовательности

нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности В (которая может быть альтернативно сформулирована как данная последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотная последовательность А, которая имеет определенный процент идентичности с данной последовательностью нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательностью В) вычисляют следующим образом:

$$100 \times (X/Y),$$

где X представляет собой количество нуклеотидов или аминокислот, оцененных как идентичные совпадения с помощью программы выравнивания последовательностей (например, BLAST) при выравнивании А и В с помощью этой программы, и где Y представляет собой общее количество нуклеиновых кислот в В. Следует принять во внимание, что если длина последовательности нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности А не равна длине последовательности нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности В, то процент идентичности последовательности А по отношению к В не будет равен проценту идентичности последовательности В по отношению к А.

Используемый здесь термин «фармацевтическая композиция» относится к композиции, содержащей описанную здесь нуклеиновую кислоту, в состав которой входит фармацевтически приемлемый эксципиент, и которая производится или продается с одобрения Государственных Регуляторных органов как часть терапевтической схемы лечения заболевания у индивидуума.

Используемый здесь термин «фармацевтически приемлемый» относится к таким соединениям, материалам, композициям и/или лекарственным формам, которые являются подходящими для контактирования с тканями индивидуума, такого как млекопитающее (например, человек), без какой-либо чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции и других опасных осложнений, соизмеримых с разумным соотношением польза/риск.

Используемый здесь термин «плазмида» означает внехромосомную кольцевую двухцепочечную молекулу ДНК, с которой могут быть лигированы дополнительные сегменты ДНК. Плазмида представляет собой тип вектора, то есть, молекулы нуклеиновой кислоты, способной переносить другую нуклеиновую кислоту, с которой она связана. Некоторые плазмиды способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они введены (например, бактериальные плазмиды, имеющие бактериальный ориджин репликации, и эписомные плазмиды млекопитающих). Другие векторы (например, неэписомные векторы млекопитающих) могут быть интегрированы в геном клетки-хозяина при введении в клетку-хозяина и, таким образом, реплицируются вместе с геномом хозяина. Некоторые плазмиды способны направлять экспрессию генов, с которыми они функционально связаны.

Используемый здесь термин «запрограммированная гибель клеток» означает гибель клеток, вызываемую событиями внутри клетки, такими как апоптоз или аутофагия.

Используемый здесь термин «промотор» относится к сайту распознавания на ДНК, который связывается с РНК-полимеразой. Полимераза управляет транскрипцией трансгена. Типичными промоторами являются промоторы, подходящие для их использования в описанных здесь композициях и способах. Кроме того, термин «промотор» может относиться к синтетическому промотору, который представляет собой регуляторную последовательность ДНК, не встречающуюся в природе в биологических системах. Синтетические промоторы содержат части встречающихся в природе промоторов в сочетании с полинуклеотидными последовательностями, не встречающимися в природе, и могут быть оптимизированы для экспрессии рекомбинантной ДНК с использованием трансгенов, векторов и клеток-мишеней различных типов.

Используемый здесь термин «вариант сплайсинга» относится к молекуле нуклеиновой кислоты, обычно РНК, которая образуется посредством альтернативного процессинга последовательностей интронов в транскрипте РНК.

Используемый здесь термин «индивидуум» относится к любому организму, которому может быть введена композиция согласно изобретению, например, в экспериментальных, диагностических, профилактических и/или терапевтических целях. Типичными индивидуумами являются любые животные (например, млекопитающие, такие как мыши, крысы, кролики, приматы, не являющиеся человеком, и человек). Индивидууму может потребоваться лечение, или он может нуждаться в лечении, получать лечение, получать лечение в будущем, или таким индивидуумом является человек или животное, находящиеся под наблюдением квалифицированного специалиста по поводу конкретного заболевания или состояния. В некоторых вариантах осуществления изобретения, таким индивидуумом является человек.

Используемый здесь термин «ген-самоубийца» относится к гену, который вызывает запрограммированную гибель клеток; к гену, который терминирует транскрипцию или трансляцию экспрессионного вектора; к гену, который снижает уровень экспрессии экспрессионного вектора посредством РНК-интерференции; или к гену, который кодирует поверхностные белки (например, такие как RQR85 и усеченный полипептид рецептора человеческого эпидермального фактора роста).

Используемый здесь термин «синовиоцит» относится к фибробласто-подобному синовиоциту, который представляет собой специализированный тип клеток, находящихся внутри суставов в синовиальной оболочке, которая продуцирует гликопротеины синовиальной жидкости, необходимые для смазки суставов.

Используемый здесь термин «регулятор транскрипции» относится к индуцибельному элементу, который может регулировать экспрессию белка, например FGF-18, в ответ на раздражитель (например, на воспаление, цитокины, низкие уровни внеклеточных факторов роста, инфекцию, гипоксию, низкие или высокие уровни железа, низкие или высокие уровни ферритина, низкие или высокие уровни ампициллина, низкие или высокие уровни изопропил- β -d-1-тиогалактопиранозида, доксициклина, оксида азота,

синтазы оксида азота (NOS); паракринную, эндокринную или аутокринную передачу сигналов или на внешние раздражители, вызывающие дегенерацию тканей, или инфекцию, вызывающую структурные изменения в непосредственной близости от клетки, несущей экспрессионный вектор).

Используемые здесь термины «трансдукция» и «трансдуцирование» относятся к способу введения экспрессионного вектора, например, конструкции вирусного вектора или ее части, в клетку, и к последующей экспрессии трансгена, кодируемого конструкцией экспрессионного вектора или его части в клетке.

Используемый здесь термин «трансфекция» относится к любому из множества методов, обычно применяемых для введения экзогенной ДНК в прокариотические или эукариотические клетки-хозяева, например, к методам электропорации, липофекции, осаждения фосфатом кальция, трансфекции посредством диэтиламиноэтил (DEAE)-декстрана, NUCLEOFECTIOTM, сжатия пор, сонопорации, оптической трансфекции, MAGNETOFECTIOTM, импалефекции, бомбардировки золотыми частицами и т.п.

Используемые здесь термины «лечить», «лечение» или «терапия» означают как терапевтическое лечение, так и профилактические или превентивные меры, целью которых является предотвращение или замедление (уменьшение) нежелательного физиологического состояния, расстройства или заболевания, или получение полезных или желаемых клинических результатов. Благоприятные или желаемые клинические результаты включают, но не ограничиваются ими, ослабление симптомов; уменьшение тяжести состояния, расстройства или заболевания; стабилизированное (то есть, не ухудшающееся) состояние, расстройство или заболевание; задержку начала развития или замедление развития состояния, расстройства или прогрессирования заболевания; ослабление тяжести состояния, расстройства или патологического состояния или ремиссию (частичную или полную), независимо от того, поддаются ли они обнаружению или нет; улучшение по меньшей мере одного измеримого физического параметра, необязательно различимого пациентом; или ослабление или устранение состояния, расстройства или заболевания. Лечение включает получение клинически значимого ответа без чрезмерных уровней побочных эффектов. Лечение также включает увеличение продолжительности жизни по сравнению с ожидаемой продолжительностью жизни в отсутствии лечения.

Используемый здесь термин «U-богатый мотив» относится к цепи последовательно расположенных нуклеиновых кислот, в которой по меньшей мере 80% последовательно расположенных нуклеиновых кислот представляют собой урацил (U).

Преимущества

Экспрессионные векторы и способы их применения, приведенные в качестве примеров в настоящей заявке, обеспечивают несколько преимуществ по сравнению с каноническими методами лечения, которые обычно включают повторные внутрисуставные инъекции полипептида FGF-18 для стимуляции пролиферации хондроцитов и соответствующего хряща. Эти схемы лечения необходимо постоянно повторять, чтобы

поддерживать прирост хряща, поскольку после прекращения инъекций, потеря хряща быстро возобновляется. Во-первых, эти композиции и способы позволяют осуществлять непрерывную терапевтическую экспрессию FGF-18 в суставе без необходимости проведения многократных курсов лечения. Во-вторых, описанные здесь экспрессионные векторы кодируют «ген-самоубийцу», который служит в качестве механизма «защитного выключателя» для предотвращения перепроизводства или для обеспечения условного снижения уровня экспрессии FGF-18. Таким образом, экспрессионные векторы и способы их применения, представленные в настоящей заявке, позволяют преодолевать ограничения в случае традиционного добавления FGF-18 путем трансфекции клеток синовиального соединения (например, синовиоцитов и/или хондроцитов) генетической последовательностью полипептида FGF-18, которая по своей природе является безопасной, где указанная трансфекция опосредуется индуцибельным «геном-самоубийцей» и сообщает непрерывные терапевтические регенеративные свойства, опосредуемые экспрессией FGF-18.

Подробное описание

Композиции и способы, описанные в настоящей заявке, включают экспрессионные векторы (например, нуклеиновые кислоты, кодирующие «ген-самоубийцу» и полипептид фактора роста фибробластов 18 (FGF-18) или его функциональный фрагмент, доставляемые аденоассоциированным вирусом (AAV)) для лечения заболеваний хряща. В некоторых вариантах осуществления изобретения, заболевание хряща представляет собой остеоартрит. FGF-18 восстанавливает хрящ после разрушения (например, разрушения хряща при остеоартрите).

«Ген-самоубийца»

Экспрессионные векторы согласно изобретению содержат нуклеиновую кислоту, кодирующую «ген-самоубийцу» (например, ген, способный вызывать апоптоз клетки, несущей экспрессионный вектор, кодирующий «ген-самоубийцу»; ген, который терминирует транскрипцию или трансляцию самого экспрессионного вектора, или ген, снижающий уровень экспрессии экспрессионного вектора посредством кодирования интерферирующей молекулы РНК).

В некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к «гену-самоубийце», который представляет собой ген, способный вызывать апоптоз клетки, несущей экспрессионный вектор, кодирующий этот «ген-самоубийцу». В некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к «гену-самоубийце», выбранному из одного или более генов, выбранных из следующего списка, включающего гены: аденовируса (*ADV*) *E1A*, *ADV E4*, *ADV E4orf6*, вируса гепатита В (*HBV*) *HBx*, вируса папилломы человека (*HPV*) *E1^E4*, *HPV E6*, *HPV E7*, полиовируса (*PLV*) *2Apro*, *PLV 2B*, *PLV 3A*, *PLV 3Cpro*, вируса птичьего энцефаломиелимита (*AEV*) *2C*, *AEV VP3*, вируса лейкоза крупного рогатого скота (*BLV*) *G4*, вируса ящура (*FMDV*) *VP1*, вируса гепатита С (*HCV*) *NS3*, *HCV NS4A*, вируса иммунодефицита человека типа 1 (*ВИЧ-1*) *Env*, *ВИЧ-1 Nef*, протеазы *ВИЧ-1*, *Tat ВИЧ-1*, *Vpr ВИЧ-1*, вируса Т-клеточного лейкоза человека типа

1 (HTLV-1) p13(II), вируса гриппа А (IAV) PB1-F2, коронавируса SARS (SARS-CoV) 7A, вируса везикулярного стоматита (VSV) M, VSV P, вируса кожной саркомы рыб семейства окуневых (WDSV) OrfC, капсида вируса Западного Нила (WNV), WNV NS2B, WNV NS3, Akt2, Pik3r2, Tnfrsf1a, Pp3cb, Ppp1r13b, Ikbkb, Prkar2a, c-Myc, CHOP, TRAF-2, ATF-4, XBP-1spl, MnSOD, IκB-альфа, Hsp70, Hsp26, Fas, CD40, СЕВР-бета, СЕВР-дельта, D-связывающего фактора, IL-15, IL-10, MCP-1, ICAM-1, МНС-1-родственных генов, Stat-1, IRF-1, IRF-7, c-jun, p53, AP-1, HRK, Fas-L, Bim, Bak, Bax, PIDD, Bid, Araf-1, TRAILR2, PUMA, NOXA, GZMB, каспазы 6 (CaspP6), каспазы 3 (CaspP3), каспазы 7 (CaspP7) и TRAIL-R. В некоторых вариантах осуществления изобретения, «ген-самоубийца» может представлять собой один или несколько генов, ассоциированных с компонентами протеасомы.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, «ген-самоубийца» представляет собой ген цитозиндезаминазы, ген, кодирующий полипептид RQR85, или ген, кодирующий усеченный полипептид рецептора человеческого эпидермального фактора роста.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, «ген-самоубийца» представляет собой ген, который терминирует транскрипцию или трансляцию экспрессионного вектора. В некоторых вариантах осуществления изобретения, «ген-самоубийца» представляет собой нуклеазу, где такая нуклеаза нарушает транскрипцию или трансляцию экспрессионного вектора. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеаза представляет собой белок, ассоциированный с кластеризованным регуляторным перемежающимся коротким палиндромным повтором (CRISPR). В некоторых вариантах осуществления изобретения, CRISPR-ассоциированный белок представляет собой CRISPR-ассоциированный белок 9. В некоторых вариантах осуществления изобретения, CRISPR-ассоциированный белок представляет собой CRISPR-ассоциированный белок 12a. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеаза представляет собой эффекторную нуклеазу, подобную активатору транскрипции (TALEN), мегануклеазу или нуклеазу «цинковые пальцы» (ZFN). В некоторых вариантах осуществления изобретения, индуцибельный «ген-самоубийца» представляет собой руководящую РНК (рРНК) в системе редактирования генов, опосредованной нуклеазой.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, «ген-самоубийца» представляет собой ген, который снижает уровень экспрессии экспрессионного вектора посредством кодирования интерферирующей молекулы РНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, «ген-самоубийца» представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты (например, молекулу ДНК или молекулу РНК, например, молекулу мРНК или молекулу ингибирующей РНК (например, короткую интерферирующую РНК (киРНК), микроРНК (миРНК) или короткую шпилечную РНК (кшРНК)), или гибридную молекулу ДНК-РНК).

I. Индуцибельный «ген-самоубийца»

В некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к

индуцибельному «гену-самоубийце» (например, «гену-самоубийце», активируемому небольшой молекулой).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, индуцибельный «ген-самоубийца» представляет собой ген HSV-TK (например, см. Dey, Dilip, and Gregory RD Evans. «Suicide gene therapy by herpes simplex virus-1 thymidine kinase (HSV-TK)». *Targets in Gene Therapy* (2011): 65).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, индуцибельный «ген-самоубийца» кодирует аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85% (например, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%) идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, индуцибельный «ген-самоубийца» представляет собой активируемый рапамицином Casp9 (например, см. Stavrou, Maria, et al. «A rapamycin-activated caspase 9-based suicide gene» *Molecular Therapy* 26.5 (2018): 1266-1276).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, индуцибельный «ген-самоубийца» кодирует аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85% (например, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%) идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2.

В некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к системе индуцибельных «генов-самоубийц», включающей «ген-самоубийцу» тимидинкиназы; элемент, отвечающий на цитозиндезаминазу/5-фторцитозин; элемент, отвечающий на вирус простого герпеса/ганцикловир (HSV-tk/GCV); карбоксилэстеразу/иринотекан; вирус ветряной оспы; тимидинкиназу/6-метоксипури-арабинонуклеозид; нитроредуктазу Nfsb/5-(азиридин-1-ил)-2,4-динитробензамид; карбоксипептидазу-G2/4-[(2-хлорэтил)(2-метилоксиэтил)амино]бензоил-L-глутаминовую кислоту; и цитохром-р450-ифосфамид или цитохром-р450-циклофосфамид.

II. Опосредуемая нуклеазой дизрупция экспрессионного вектора

В некоторых вариантах осуществления изобретения, «ген-самоубийца» может представлять собой нуклеазу или рННК. При этом, может быть использована любая подходящая нуклеаза. В некоторых вариантах осуществления изобретения, «ген-самоубийца» представляет собой компонент системы редактирования генов, опосредованного нуклеазой. Так, например, «ген-самоубийца» вводит изменение (например, вставку, делецию (например, нокаут), транслокацию, инверсию, одну точковую мутацию или другую мутацию) в ген, что делает возможным транскрипцию или

трансляцию экспрессионного вектора. Репрезентативными примерами систем редактирования генов являются система CRISPR, мегануклеазы, ZFN и TALEN. Методы на основе CRISPR, ZFN и TALEN описаны, например, Gaj et al. *Trends Biotechnol.* 31.7(2013):397-405.

Так, например, подходящим инструментом для дизрупции и/или интеграции генов-мишеней в геном клетки является система CRISPR/Cas, которая изначально была идентифицирована как адаптивный защитный механизм у бактерий и археобактерий против вирусной инфекции. Система CRISPR/Cas включает последовательности палиндромных повторов в плазмидной ДНК и белок Cas (например, Cas9 или Cas12a). Эта комбинация ДНК и белка направляет сайт-специфическое расщепление ДНК последовательности-мишени посредством встраивания чужеродной ДНК в локусы CRISPR. Полинуклеотиды, содержащие эти чужеродные последовательности и повторяющиеся спейсерные элементы локуса CRISPR, в свою очередь, транскрибируются в клетке-хозяине с образованием рРНК, которая впоследствии может гибридизоваться с последовательностью-мишенью и локализовать нуклеазу Cas в этом сайте. Таким образом, в чужеродном полинуклеотиде может происходить высокоэффективное сайт-специфическое опосредованное Cas расщепление ДНК, поскольку взаимодействие, которое способствует локализации Cas в непосредственной близости к молекуле ДНК-мишени, регулируется гибридизацией РНК:ДНК. В результате можно разработать систему CRISPR/Cas для расщепления представляющей интерес молекулы ДНК-мишени (например, гена, который обеспечивает транскрипцию или трансляцию экспрессионного вектора). Этот метод был применен для редактирования эукариотических геномов (см. публикацию Hwang et al. *Nature Biotechnology* 31:227 (2013), которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки) и может быть применен в качестве эффективного способа сайт-специфического редактирования клеточных геномов для расщепления ДНК перед включением гена, кодирующего ген-мишень. Использование CRISPR/Cas для модулирования экспрессии генов описано, например, в патенте США № 8697359, который включен в настоящее описание посредством ссылки.

Система CRISPR была модифицирована для ее использования при редактировании генов (например, при замене, сайленсинге и/или активации некоторых генов) у эукариот. См., например, Wiedenheft et al., *Nature* 482: 331, 2012. Так, например, такая модификация системы включает введение в эукариотическую клетку плазмиды, содержащей специально сконструированный CRISPR и один или несколько подходящих белков Cas. Локус CRISPR транскрибируется в РНК и процессируется белками Cas (например, Cas9) в небольшие РНК, которые содержат повторяющуюся последовательность, фланкированную спейсером. РНК служат в качестве руководящих РНК для направления белков Cas для сайленсинга специфических последовательностей ДНК/РНК в зависимости от последовательности спейсера. См., например, Horvath et al., *Science* 327: 167, 2010; Makarova et al., *Biology Direct* 1:7, 2006; Pennisi, *Science* 341: 833, 2013. В некоторых

примерах, система CRISPR включает белок Cas9, то есть, нуклеазу, которая разрезает обе цепи ДНК.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, в системе CRISPR для ее применения согласно изобретению, например, в соответствии с одним или несколькими способами, описанными в настоящей заявке, спейсеры CRISPR получают из последовательности гена-мишени, например, из последовательности гена, которая обеспечивает транскрипцию или трансляцию экспрессионного вектора.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, «ген-самоубийца» включает рРНК для использования в системе CRISPR в целях редактирования генов. В некоторых вариантах осуществления изобретения, «ген-самоубийца» содержит мегануклеазу или мРНК, кодирующую мегануклеазу, которая нацелена на (например, расщепляет ее) последовательность нуклеиновой кислоты (например, последовательность ДНК) гена, который обеспечивает транскрипцию или трансляцию экспрессионного вектора. В некоторых вариантах осуществления изобретения, «ген-самоубийца» содержит ZFN или мРНК, кодирующую ZFN, которая нацелена на (например, расщепляет ее) последовательность нуклеиновой кислоты (например, последовательность ДНК) гена, который обеспечивает транскрипцию или трансляцию экспрессионного вектора. В некоторых вариантах осуществления изобретения, «ген-самоубийца» содержит TALEN или мРНК, кодирующую TALEN, которая нацелена на (например, расщепляет ее) последовательность нуклеиновой кислоты (например, последовательность ДНК) гена, который обеспечивает транскрипцию или трансляцию экспрессионного вектора. В некоторых вариантах осуществления изобретения, «ген-самоубийца» содержит Cas (например, Cas9) или мРНК, кодирующую Cas (например, Cas9), которая нацелена на (например, расщепляет ее) последовательность нуклеиновой кислоты (например, последовательность ДНК) гена, который обеспечивает транскрипцию или трансляцию экспрессионного вектора.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, система CRISPR используется для редактирования (например, для добавления или удаления пары оснований) гена-мишени, например гена, который обеспечивает транскрипцию или трансляцию экспрессионного вектора. В других вариантах осуществления изобретения, система CRISPR используется для введения преждевременного стоп-кодона, например, для снижения уровня экспрессии гена-мишени. В других вариантах осуществления изобретения, система CRISPR используется для обратимого отключения гена-мишени, например, аналогично РНК-интерференции. В некоторых вариантах осуществления изобретения, система CRISPR используется для направления Cas (например, Cas9) на промотор гена-мишени, например, гена, который обеспечивает транскрипцию или трансляцию экспрессионного вектора, что тем самым будет стерически блокировать РНК-полимеразу.

В некоторых вариантах осуществления изобретения может быть создана система CRISPR для редактирования гена, который обеспечивает транскрипцию или трансляцию

экспрессионного вектора с применением технологии, описанной, например, в публикации США № 20140068797; Cong, *Science* 339: 819, 2013; Tsai, *Nature Biotechnol.*, 32:569, 2014; и патенты США №№: 8871445; 8865406; 8795965; 8771945; и 8697359.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, метод интерференции CRISPR (CRISPRi) может быть применен для подавления транскрипции специфических генов, например, гена, который обеспечивает транскрипцию или трансляцию экспрессионного вектора. В CRISPRi, сконструированный белок Cas9 (например, dCas9 без нуклеазы или слитый белок dCas9, например, слитый белок dCas9-KRAB или dCas9-SID4X) может спариваться с последовательность-специфической руководящей РНК (оцрРНК). Комплекс рРНК Cas9-5 может блокировать РНК-полимеразу, что будет препятствовать продолжению транскрипции. Этот комплекс также может блокировать инициацию транскрипции посредством предотвращения связывания с фактором транскрипции. Метод CRISPRi является специфичным с минимальными нецелевыми эффектами и является мультиплексным, например, он может одновременно ингибировать более одного гена (например, под действием множества рРНК). Кроме того, метод CRISPRi допускает обратимую репрессию генов.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, CRISPR-опосредованная активация генов (CRISPRa) может быть использована для активации транскрипции, например, одного или нескольких генов, описанных в настоящей заявке, например, гена, который ингибирует ген, обеспечивающий транскрипцию или трансляцию экспрессионного вектора. В методике CRISPRa, слитые белки dCas9 обеспечивают рекрутинг активаторов транскрипции. Так, например, dCas9 может быть использован для рекрутинга полипептидов (например, доменов активации), таких как VP64 или домен активации p65 (p65D), и он может быть использован вместе с оцрРНК (например, одной оцрРНК или несколькими оцрРНК) для активации гена или генов, например, эндогенного(ых) гена(ов). Множество активаторов могут быть подвергнуты рекрутингу с использованием множества оцрРНК, что может повысить эффективность активации. Может быть использовано множество доменов активации, а также один или несколько доменов активации. Помимо конструирования dCas9 для рекрутинга активаторов, для такого рекрутинга активаторов могут быть также конструированы оцрРНК. Так, например, аптамеры РНК могут быть включены в оцрРНК для рекрутинга белков (например, доменов активации), таких как VP64. В некоторых примерах, для активации транскрипции может быть использована система синергических медиаторов активации (SAM). В SAM, к оцрРНК добавляют аптамеры MS2. Аптамер MS2 обеспечивает рекрутинг белка оболочки MS2 (MCP), слитый с p65AD и фактором теплового шока 1 (HSF1). Методики CRISPRi и CRISPRa более подробно описаны, например, в публикации Dominguez et al., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17:5, 2016, которая включена в настоящее описание посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, рРНК или Cas (например, Cas9) могут быть использованы в системе CRISPR для введения модификации в ген

(например, в ген, который обеспечивает транскрипцию или трансляцию экспрессионного вектора). В других примерах, мегануклеаза, ZFN и/или TALEN могут быть использованы для модификации гена (например, гена, который обеспечивает транскрипцию или трансляцию экспрессионного вектора). Примерами модификаций являются инсерции, делеции (например, нокауты), транслокации, инверсии, отдельные точковые мутации или другие мутации. Модификация может быть введена в ген в клетке, например, *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления изобретения, модификация снижает уровень и/или активность (например, обеспечивает нокдаун или нокаут) гена, который обеспечивает транскрипцию или трансляцию экспрессионного вектора, например, такой модификацией является негативный регулятор функции. В еще одном примере, модификация вызывает дефект (например, мутацию, вызывающую дефект) в гене, который обеспечивает транскрипцию или трансляцию экспрессионного вектора.

Альтернативные методы дизрупции ДНК-мишени путем сайт-специфического расщепления геномной ДНК перед включением представляющего интерес гена в клетку включают использование мегануклеаз, ZFN и TALEN. В отличие от системы CRISPR/Cas, эти ферменты не содержат руководящего полинуклеотида для локализации в специфической последовательности-мишени. Вместо этого, специфичность к мишени регулируется ДНК-связывающими доменами в этих ферментах. Использование мегануклеаз, ZFN и TALEN для редактирования генома описано, например, в публикациях Urnov et al. *Nature Reviews Genetics* 11:636 (2010); и Joung et al. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 14:49 (2013), описание которых включено в настоящую заявку посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления изобретения, ген, обеспечивающий транскрипцию или трансляцию экспрессионного вектора, может быть разрушен в клетках, содержащих экспрессионный вектор, с применением описанных здесь методов редактирования генов.

III. Гены-самоубийцы, которые снижают уровень экспрессии экспрессионного вектора посредством кодирования интерферирующей молекулы РНК.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, «ген-самоубийца» представляет собой ингибирующую молекулу РНК, которая, например, действует по пути РНК-интерференции (РНКи). Ингибирующая молекула РНК может снижать уровень экспрессии (например, уровень белка или уровень мРНК) гена, который обеспечивает транскрипцию или трансляцию экспрессионного вектора. Так, например, ингибирующая молекула РНК включает киРНК, кшРНК и/или миРНК, которые нацелены на ген, обеспечивающий транскрипцию или трансляцию экспрессионного вектора. киРНК представляет собой двухцепочечную молекулу РНК, которая обычно имеет длину приблизительно 19-25 пар оснований. кшРНК представляет собой молекулу РНК, содержащую шпилечный виток, который снижает экспрессию генов-мишеней посредством РНКи. кшРНК могут быть доставлены в клетки в форме плазмид (например, вирусных или бактериальных векторов) путем трансфекции, электропорации или трансдукции. МикроРНК представляет собой некодирующую молекулу РНК, которая

обычно имеет длину приблизительно 22 нуклеотида. миРНК связываются с сайтами-мишенями на молекулах мРНК и подавляют мРНК, например, посредством расщепления мРНК, дестабилизации мРНК или ингибирования трансляции мРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, ингибирующая молекула РНК снижает уровень и/или активность функции гена, который обеспечивает транскрипцию или трансляцию функции экспрессионного вектора. В других вариантах осуществления изобретения, ингибирующая молекула РНК снижает уровень и/или активность ингибитора позитивного регулятора функции.

Ингибирующая молекула РНК может быть модифицирована, например, так, чтобы она содержала модифицированные нуклеотиды, например, 2'-фтор, 2'-О-метил, 2'-дезокси, неблокированную нуклеиновую кислоту, 2'-гидрокси, фосфоротиоат, 2'-тиоуридин, 4'-тиоуридин или 2'-дезоксиуридин. Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, авторы лишь отмечают, что определенная модификация может повышать резистентность к нуклеазам и/или стабильность в сыворотке или снижение иммуногенности.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, ингибирующая молекула РНК снижает уровень и/или активность или функции гена, который обеспечивает транскрипцию или трансляцию экспрессионного вектора. В некоторых вариантах осуществления изобретения, ингибирующая молекула РНК ингибирует экспрессию гена, который обеспечивает транскрипцию или трансляцию экспрессионного вектора. В некоторых вариантах осуществления изобретения, ингибирующая молекула РНК повышает степень дизрупции гена, который обеспечивает транскрипцию или трансляцию экспрессионного вектора. Ингибирующая молекула РНК может быть химически синтезирована или транскрибирована *in vitro*. Получение и применение ингибирующих терапевтических средств на основе некодирующих РНК, таких как рибозимы, РНКазы Р, киРНК и миРНК, также известны специалистам в данной области, например, как описано в публикации Sioud, RNA Therapeutics: Function, Design, and Delivery (Methods in Molecular Biology). Humana Press 2010.

Элемент безопасности

В некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей элемент безопасности (например, ген, способный вызывать подавление экспрессии, подавление транскрипции, подавление трансляции, ослабление эффективности, старение клетки, несущей конструкцию, или апоптоз клетки, несущей экспрессионный вектор).

В некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к элементу безопасности, который может транскрибировать интерферирующую молекулу РНК, такую как короткая интерферирующая РНК, микроРНК или короткая шпилечная РНК; или длинную некодирующую РНК, предназначенную для интерференции мРНК FGF-18 посредством РНК-индуцированного комплекса сайленсинга, Drosha- или Dicer-опосредованного механизма, или просто посредством секвестрации или дестабилизации мРНК FGF-18; или под действием рибозим-опосредованной системы расщепления FGF-

18.

В некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к элементу безопасности, который может кодировать белки-репрессоры, специфичные к нуклеиновой кислоте, кодирующей FGF-18 или его функциональный фрагмент.

В некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к элементу безопасности, который может кодировать общие белки-репрессоры для облегчения старения клеток.

В некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к переключателю безопасности, который представляет собой один или несколько общих репрессоров, выбранных из: гена, кодирующего один или несколько белков, состоящих из множества массивов; гена, кодирующего один или несколько связывающих элементов PRE TF; гена, кодирующего NRR (EAR-r); гена, кодирующего AtERF4; гена, кодирующего HAD-19; или гена, кодирующего один или несколько белков семейства гистоновых деацетилаз.

Полипептид фактора роста фибробластов 18 или его функциональный фрагмент

Экспрессионные векторы согласно изобретению содержат нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид фактора роста фибробластов 18 (FGF-18) или его функциональный фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, экспрессионный вектор кодирует полипептид FGF-18 или его функциональный фрагмент, где полипептид FGF-18 имеет последовательность, которая по меньшей мере на 85% (например, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%) идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, экспрессионный вектор кодирует полипептид FGF-18, который может находиться в своей нативной форме, в своей зрелой форме, в рекомбинантной форме или в любых встречающихся в природе вариантах FGF-18 (например, в вариантах сплайсинга или в аллельных вариантах).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, экспрессионный вектор кодирует полипептид FGF-18 или вариант его посттрансляционной модификации, где полипептид FGF-18 включает одну или несколько природных посттрансляционных модификаций, которые встречаются в варианте посттрансляционной модификации FGF-18.

Регулятор транскрипции

В некоторых вариантах осуществления изобретения, экспрессионные векторы согласно изобретению содержат регулятор транскрипции, функционально связанный с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей FGF-18 или его функциональный фрагмент, которые действуют в ответ на раздражитель (например, на

внутренние раздражители, воспаление, цитокины, низкие уровни внеклеточных факторов роста, инфекцию, гипоксию, низкие или высокие уровни железа, низкие или высокие уровни ферритина, низкие или высокие уровни ампициллина, низкие или высокие уровни изопропил-β-d-1-тиогалактопиранозида, доксициклина, оксида азота, синтазы оксида азота (NOS); паракринную, эндокринную или аутокринную передачу сигналов; внешние раздражители или внешние раздражители, вызывающие дегенерацию тканей, или инфекцию, вызывающую структурные изменения в непосредственной близости от клетки, несущей экспрессионный вектор).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, регулятор транскрипции представляет собой один или несколько элементов, выбранных из списка, включающего: промотор, репрессор, ТАТА-бокс, элемент распознавания В, элемент распознавания В фактора транскрипции II и нижерасположенный промоторный элемент.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, регулятор транскрипции представляет собой один или несколько промоторов, выбранных из списка, включающего: промотор *lacUV5*; промотор семейства генов *FGF*; промотор семейства генов трансформирующего фактора роста; промотор семейства генов гиалуронан-синтазы; промотор, отвечающий на воспаление; промотор, который индуцируется цитокинами; промотор *tac*; промотор *trc*; промотор *prpBCDE* (*prpB*) *Salmonella enterica*; промотор изоцитратлиазы (*aceA*)/малатсинтазы (*aceB*); промотор глюконатпермеазы (*gntP*)/промотор глюкокиназы (*gntK*); промотор *CJ10×2*; промотор *tac-M*; промотор периплазматического белка *ABC*, переносящего мальтозу-*ABC* (*malE1*); промотор *GIT1* (*git1*) *ARF* GTPазо-активирующего белка; промотор *BCL-2*-ассоциированного агониста клеточной гибели (*BAD*); промотор *Squamosa*, связывающийся с белком, подобным фактору транскрипции (*SPL*); промотор *4-N14*; гибридный промотор энхансера интерлейкина 1/интерлейкина 6; промотор простагландин-эндопероксид-синтазы 2 (*COX-2*); индуцибельный промотор цитокина; промотор хемокинового лиганда 10 (*CXCL10*) мотива *C-X-C*; промотор *Lac/LacUV5*; промотор *T7*; промотор *NOS*; промотор убихитина 1; промотор рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы (*rbcS*); индуцируемый арабинозой промотор *araBAD* (*araPBAD*); промотор рамнозы *BAD* *Escherichia coli* (*rhaPBAD*); промотор *pL/pR* фага лямбда, промотор белка холодового шока *A* (*cspA*) *Escherichia Coli*; промотор вируса мозаики цветной капусты; промотор *35S* вируса мозаики цветной капусты; промотор антитоксина *SokC* (*SokC*) небольшой регуляторной РНК; промотор неохарактеризованного липопротейна *YafT* (*yafT*); промотор предполагаемой интегразы (*pintF*); промотор ангидромуропептид-пермеазы (*ampG*); промотор кислой (поли)фосфатазы (*appY*); промотор липазы; промотор кислой лизосомы (*lipA*); ранний промотор цитомегаловируса (*CMV*); альфа-промотор фактора элонгации-1 (*EF1*); промотор *EF1*; промотор *CAG*; промотор тимидинкиназы вируса простого герпеса-1; человеческий промотор бета-актина; промотор обезьяньего вакуолизирующего вируса 40 (*SV40*); промотор вируса мышинных стволовых клеток; промотор фосфоглицераткиназы (*PGK*); промотор убихитина *C* (*UbC*); или любой другой известный конститутивный или

индуцибельный промотор.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, промотор представляет собой промотор PGK.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, промотор представляет собой промотор CMV.

Дополнительные компоненты или модификации

Следует отметить, что гены могут быть использованы вместе с интронами (например, вместе с природными интронами, интронами мышинных минут-вирусов или с синтетическими интронами) или без них, и/или только с субпопуляцией интронов (например, природных интронов, интронов мышинных минут-вирусов или синтетических интронов), и/или с оптимизированной по кодонам нуклеотидной последовательностью в экспрессионном векторе.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид FGF-18 или его функциональный фрагмент, может дополнительно включать одну или более последовательностей секреции, так, чтобы полипептид был нацелен на соответствующий клеточный компартмент или внеклеточное пространство.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность секреции представляет собой одну или несколько аминокислотных последовательностей, выбранных из списка, включающего:

Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:
SWSHPQFEK	5
GCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDV	6
ICTVPEVSSVFIFPPKPKDV	7
KPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDV	8
SVFIFPPKPKDV	9
PPKPKDV	10
PCICTVPEVSSVFIEFPPKPKDV	11
MWWRLWWLLLLLLLLWPMVWA	12
METDTLLLWVLLLWVPGSTG	13
MDMRVPAQLLGLLLWLRGARC	14
MPLLLLPLWAGALA	15
MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPS	16
MLLLLLLLLLLALALA	17
MLLLLLLGLRLQLSLG	18
MGVKVLFALICIAVAEA	19
MKWVTFISLLFLFSSAYS	20

MAFLWLLSCWALLGTTFG	21
MQLLSCIALILALV	22
MNLLLILTFVAAAVA	23
MALWMRLLPLLALLALWGPDPAAAF	24
MYSAPSACTCLCLHFLLLCFQVQVLVA	25

В некоторых вариантах осуществления изобретения, экспрессионный вектор может также включать энхансер.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, экспрессионный вектор может также включать промотор.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, промотор представляет собой конститутивный промотор.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, промотор представляет собой индуцибельный промотор.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, индуцибельный промотор представляет собой один или несколько индуцибельных промоторов, выбранных из списка, включающего: lacUV5, tac, trc, prpB, aceA/aceB, gntP/gntK, CJ10×2, tac-M, malE1, git1, BAD, SPL, 4-N14, CXCL10, Lac/LacUV5, T7, araPBAD, rhaPBAD, pL/pR, cspA, COX-2, гибридный промотор энхансера IL-1/IL-6, промотор CASI (например, синтетический промотор, который включает энхансерные элементы CMV и UbC и промотор куриного b-актина), промотор коллагена типа II или промотор, индуцируемый цитокинами.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, промотор реагирует на раздражитель, который является ортогональным, полуортогональным и/или противоположным регулятору транскрипции.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, экспрессионный вектор может также включать один или несколько сайленсеров, реагирующих на раздражитель, который является ортогональным, полуортогональным и/или противоположным гену-«самоубийце».

В некоторых вариантах осуществления изобретения, сайленсер может представлять собой один или несколько сайленсеров, выбранных из списка генов, включающих: CBX, Bcl6, E2F6, PDGFA 5'SHS, T39, Jarid2, REST, YY1, PRE-2-S5, Gal4-CBX4, Myh6 PNR, ZEBB, Gfi1/1b, Elk-3, ETV6/7, Stat5, Gata3, Runx1, Sp1/Klf, Xist, COOLAIR или HOTAIR, Meg3 или Fendrr.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, экспрессионный вектор может также включать сигнал полиаденилирования (например, природный сигнал полиаденилирования, сигнал полиаденилирования бычьего гормона роста или синтетический сигнал полиаденилирования).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, сигнал полиаденилирования представляет собой общую консенсусную последовательность полиаденилирования млекопитающих или ее вариант, включая U-богатый фрагмент, за которым следует

приблизительно от 0 до 20 нуклеотидов (например, от 1 до 19 нуклеотидов, от 2 до 18 нуклеотидов, от 3 до 17 нуклеотидов, от 4 до 16 нуклеотидов, от 5 до 15 нуклеотидов, от 6 до 14 нуклеотидов, от 7 до 13 нуклеотидов, от 8 до 12 нуклеотидов, от 9 до 11 нуклеотидов или приблизительно 10 нуклеотидов), за которыми следует полуконсервативная консенсусная последовательность АТААА, а за ней следуют приблизительно от 15 до 30 нуклеотидов (например, от 16 до 29 нуклеотидов, от 17 до 28 нуклеотидов, от 18 до 27 нуклеотидов, от 19 до 26 нуклеотидов, от 20 до 25 нуклеотидов, от 21 до 24 нуклеотидов или от 22 до 23 нуклеотидов), за которыми следует цитозин (С)А, а за ним следуют от 0 до 20 нуклеотидов (например, от 1 до 19 нуклеотидов, от 2 до 18 нуклеотидов, от 3 до 17 нуклеотидов, от 4 до 16 нуклеотидов, от 5 до 15 нуклеотидов, от 6 до 14 нуклеотидов, от 7 до 13 нуклеотидов, от 8 до 12 нуклеотидов, от 9 до 11 нуклеотидов или приблизительно 10 нуклеотидов), а за ними следуют элемент, специфичный для дифференцировки, G или U или U-богатый фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, экспрессионный вектор может также включать терминирующую область.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательности терминации могут представлять собой один или несколько стоп-кодонов или терминирующих последовательностей, выбранных из списка нуклеиновых кислот, кодирующих стоп-кодон или терминирующую последовательность, включая: TAG, TAA, TGA или TTTATT.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, экспрессионный вектор может также включать один или несколько экзонов и/или интронов альтернативного сплайсинга, проксимальные регуляторные элементы и/или расположенные ниже последовательности.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, экспрессионный вектор может также включать один или несколько цис-регуляторных модулей.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, экспрессионный вектор может также включать посттранскрипционный регуляторный элемент (WPRE) вируса гепатита сурка (WHP).

Доставка

Любой подходящий экспрессионный вектор может быть использован в сочетании с композициями и способами согласно изобретению для конструирования и сборки компонентов нуклеиновой кислоты, кодирующей ген-«самоубийцу» и полипептид FGF-18 или его функциональный фрагмент. В одном варианте осуществления изобретения, экспрессионный вектор представляет собой вирусный вектор, несущий нуклеиновую кислоту, кодирующую ген-«самоубийцу», и полипептид FGF-18 или его функциональный фрагмент. Способы сборки рекомбинантных векторов известны специалистам в данной области. См., например, публикацию Griffiths, A. J., et al. «Making recombinant DNA». An Introduction to Genetic Analysis. 7th edition. New York: WH Freeman. Эта публикация доступна на сайте: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21881> (2000).

I. Вирусные векторы для экспрессии терапевтических нуклеиновых кислот

Вирусные геномы обеспечивают богатый источник векторов, которые могут быть использованы для эффективной доставки экзогенных генов в клетки млекопитающих (например, хондроциты, клетки-предшественники хондроцитов и синовиоциты). Вирусные геномы являются особенно подходящими векторами для доставки генов, поскольку полинуклеотиды, содержащиеся в таких геномах, обычно включаются в ядерный геном клетки млекопитающего посредством генерализованной или специализированной трансдукции. Эти процессы происходят как часть естественного цикла репликации вируса и не требуют добавления белков или реагентов для индуцирования интеграции генов. Примерами вирусных векторов являются ретровирус (например, вирусный вектор семейства *Retroviridae*), аденовирус (например, Ad5, Ad26, Ad34, Ad35 и Ad48), парвовирус (например, аденоассоциированные вирусы), коронавирусы, РНК-вирусы с минус-цепью, такие как ортомиксовирус (например, вирус гриппа), рабдовирус (например, вирус бешенства и вирус везикулярного стоматита), парамиксовирус (например, вирус кори и вирус Сендай), РНК-вирусы с плюс-цепью, такие как пикорнавирус и альфавирус, и вирусы на основе двухцепочечной ДНК, включая аденовирус, вирус герпеса (например, вирус простого герпеса типа 1 и 2, вирус Эпштейна-Барра, цитомегаловирус) и поксвирус (например, вирус осповакцины, модифицированный вирус осповакцины Анкара (MVA), вирус оспы домашней птицы и вирус оспы канареек). Другими вирусами являются, например, вирус Норуолк, тогавирус, флавивирус, реовирусы, паповавирус, гепаднавирус, вирус папилломы человека, «пенистый» вирус человека и вирус гепатита. Примерами ретровирусов являются: вирус лейкоза-саркомы птиц, вирусы птиц С-типа, вирусы млекопитающих С-типа, В-типа и D-типа, онкоретровирусы, вирусы группы HTLV-BLV, лентивирусы, альфа-ретровирусы, гамма-ретровирусы, спумавирусы (Coffin, J. M., *Retroviridae: The viruses and their replication*, *Virology*, Third Edition (Lippincott-Raven, Philadelphia, (1996))). Другими примерами являются вирусы лейкоза мышей, вирусы саркомы мышей, вирус опухоли молочной железы мышей, вирус лейкоза крупного рогатого скота, вирус лейкоза кошек, вирус саркомы кошек, вирус птичьего лейкоза, вирус Т-клеточного лейкоза человека, эндогенный вирус павиана, вирус лейкоза человекообразной обезьяны, обезьяний вирус Мейсона-Пфайзера, обезьяний вирус иммунодефицита, вирус саркомы обезьян, вирус саркомы Рауса и лентивирусы. Другие примеры векторов описаны, например, в патенте McVey et al., (в патенте США 5801030), который включен в настоящее описание посредством ссылки.

IA. Вирусные капсидные белки

Описанные здесь нуклеиновые кислоты и векторы могут быть включены в рекомбинантный вирион для облегчения введения нуклеиновой кислоты или вектора в клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения, вирусный капсидный белок представляет собой природный капсид или сконструированный капсидный белок (например, капсид, который содержит модифицированную последовательность).

Капсидные белки вирусного вектора составляют внешнюю часть вириона, не содержащую нуклеиновой кислоты, и кодируются нуклеиновой кислотой. В одном варианте осуществления изобретения, вирусные капсидные белки по своей структуре могут состоять из одного или нескольких белков из нижеследующего списка, включающего: капсидный белок AAV, включая природный и/или синтетический серотип, капсидный белок лентивируса одного или нескольких серотипов, капсидный белок ретровирусов одного или нескольких серотипов, капсидный белок герпесвирусов одного или нескольких серотипов, капсидный белок аденовирусов одного или нескольких серотипов, капсидный белок парвовирусов одного или нескольких серотипов, капсидный белок рабдовирусов одного или нескольких серотипов, капсидный белок реовирусов одного или нескольких серотипов, капсидный белок ортомиксовирусов одного или нескольких серотипов, капсидный белок буньявирусов одного или нескольких серотипов, капсидный белок флавивирусов одного или нескольких серотипов, капсидный белок ретровирусов одного или нескольких серотипов, капсидный белок парамиксовирусов одного или нескольких серотипов, капсидный белок потивирусов одного или нескольких серотипов, капсидный белок коронавируса одного или нескольких серотипов, капсидный белок калицивирусов одного или нескольких серотипов, капсидный белок папилломавирусов одного или нескольких серотипов, капсидный белок поксвирусов одного или нескольких серотипов, капсидный белок полиомавирусов одного или нескольких серотипов, или любые другие известные капсидные белки вирусов или вирионов одного или нескольких серотипов.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, природный вирусный капсидный белок модифицируют (например, путем конъюгирования для экспрессии не-вирусных пептидов на поверхности природных вирусных капсидных белков для нацеливания на клетки определенного типа или путем конъюгирования для экспрессии слитых белков, а именно, конъюгирования вирусного капсидного белка, эукариотических белков или белковых фрагментов для сужения функции тропизма).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, сконструированный капсидный белок вируса конъюгируют с лигандом (например, для сообщения специфичности к клеткам определенного типа или модуляции иммуногенности).

IV. Ретровирусные векторы

Вектор для доставки, используемый в способах и композициях, описанных в настоящей заявке, может представлять собой ретровирусный вектор. Один тип ретровирусного вектора, который может быть использован в способах и композициях, описанных в настоящей заявке, представляет собой лентивирусный вектор. Лентивирусные векторы (LV), принадлежащие к субпопуляции ретровирусов, трансдуцируют широкий спектр делящихся и неделящихся клеток с высокой эффективностью, что обеспечивает стабильную и длительную экспрессию трансгена. Обзор стратегий оптимизации для упаковки и трансдукции LV представлен в публикации

Delenda, *The Journal of Gene Medicine* 6: S125 (2004), которая включена в настоящее описание посредством ссылки.

Применение методов переноса генов на основе лентивирусов основано на получении *in vitro* рекомбинантных лентивирусных частиц, несущих в высокой степени deletированный вирусный геном, в котором присутствует представляющий интерес трансген. В частности, рекомбинантный лентивирус выделяют путем коэкспрессии *in-trans* в перmissive клеточной линии (1) упаковывающих конструкций, то есть, вектора, экспрессирующего предшественники Gag-Pol вместе с Rev (альтернативно экспрессированными *in-trans*); (2) вектора, экспрессирующего рецептор оболочки, обычно имеющей гетерологичную природу; и (3) вектора для переноса, состоящего из вирусной комплементарной ДНК (кДНК), лишенной всех открытых рамок считывания, но сохраняющей последовательности, которые необходимы для репликации, инкапсидирования и экспрессии, и в которые встроены последовательности, подлежащие экспрессии.

LV, используемый в описанных здесь способах и композициях, может включать один или более из 5'-концевого повтора (LTR), сигнальной последовательности ВИЧ, 5'-сайта сплайсинга (SD) сигнала Psi ВИЧ, элемента дельта-GAG, элемента, восприимчивого к Rev (RRE), 3'-сайта сплайсинга (SA), фактора элонгации (EF), 1-альфа-промотора и 3'-самоинактивирующегося LTR (SIN-LTR). Лентивирусный вектор включает, но необязательно, центральный полипуриновый путь (сРРТ) и посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурка (WPRE), как описано в патенте США No. 6136597, который включен в настоящее описание посредством ссылки, поскольку он относится к WPRE. Лентивирусный вектор может дополнительно включать остов рНР', который может включать, например, элементы, указанные ниже.

Лентиген LV, описанный в публикации Lu et al., *Journal of Gene Medicine* 6:963 (2004), может быть использован для экспрессии молекул ДНК и/или трансдукции клеток. LV, используемый в описанных здесь способах и композициях, может включать 5'-концевой повтор (LTR), сигнальную последовательность ВИЧ, 5'-сайт сплайсинга Psi-сигнала ВИЧ (SD), дельта-GAG-элемент, Rev-чувствительный элемент (RRE), 3'-сайт сплайсинга (SA), фактор элонгации (EF), 1-альфа-промотор и 3'-самоинактивирующийся LTR (SIN-LTR). Специалисту в данной области будет очевидно, что одна или несколько из этих областей могут быть, но необязательно, заменены другой областью, выполняющей аналогичную функцию.

Энхансерные элементы могут быть использованы для повышения уровня экспрессии модифицированных молекул ДНК или повышения эффективности интеграции лентивирусов. LV, используемый в описанных здесь способах и композициях, может включать последовательность *nef*. LV, используемый в способах и композициях, описанных в настоящей заявке, может включать последовательность сРРТ, которая усиливает интеграцию вектора. сРРТ действует как второй источник синтеза (+)-цепи ДНК и вводит частичное перекрытие цепи в середине своего нативного генома ВИЧ.

Введение последовательности сРРТ в остов вектора-переносчика в высокой степени усиливает транспорт в ядро и увеличивает общее количество генома, интегрированного в ДНК клеток-мишеней. LV, используемый в способах и композициях, описанных в настоящей заявке, может включать посттранскрипционный регуляторный элемент сурка (WPRE). WPRE действует на уровне транскрипции посредством стимуляции экспорта транскриптов в ядро и/или повышения эффективности полиаденилирования растущей цепи транскрипта, что тем самым увеличивает общее количество мРНК в клетках. Добавление WPRE к LV приводит к существенному повышению уровня экспрессии трансгена из нескольких различных промоторов как *in vitro*, так и *in vivo*. LV, используемый в способах и композициях, описанных в настоящей заявке, может включать как последовательность сРРТ, так и последовательность WPRE. Вектор может также включать последовательность IRES, которая обеспечивает экспрессию множества полипептидов с одного промотора.

В дополнение к последовательностям IRES могут быть использованы и другие элементы, которые обеспечивают экспрессию нескольких полипептидов. Вектор, используемый в способах и композициях, описанных в настоящей заявке, может включать несколько промоторов, обеспечивающих экспрессию более, чем одного полипептида. Вектор, используемый в способах и композициях, описанных в настоящей заявке, может включать сайт расщепления белка, обеспечивающий экспрессию более, чем одного полипептида. Примеры сайтов расщепления белка, которые обеспечивают экспрессию более, чем одного полипептида, описаны в публикациях Klump et al., *Gene Ther.* 8:811 (2001), Osborn et al., *Molecular Therapy* 12:569 (2005), Szymczak and Vignali, *Expert Opin Biol Ther.* 5:627 (2005) и Szymczak et al., *Nat Biotechnol.* 22:589 (2004), описание которых включено в настоящую заявку в качестве ссылки, поскольку оно относится к сайтам расщепления белка, которые обеспечивают экспрессию более, чем одного полипептида. Специалисту в данной области будет очевидно, что могут быть использованы и другие элементы, которые обеспечивают экспрессию нескольких полипептидов, и которые будут идентифицированы в будущем, и эти элементы могут быть использованы в векторах, подходящих для их использования в композициях и способах, описанных в настоящей заявке.

Вектор, используемый в способах и композициях, описанных в настоящей заявке, может представлять собой вектор, имеющий клиническую чистоту.

IC. Аденоассоциированные вирусные векторы

Нуклеиновые кислоты, используемые в композициях и способах, описанных в настоящей заявке, могут быть включены в векторы и/или в вирионы рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) для облегчения их введения в клетку (например, в хондроциты, в предшественники хондроцитов и в синовиоциты). Векторы AAV могут быть использованы в центральной нервной системе, и соответствующие промоторы и серотипы обсуждаются в публикации Pignataro et al., *J. Neural. Transm.*, 125: 575 (2018), которая включена в настоящее описание посредством ссылки, поскольку она относится к

промоторам и серотипам AAV, подходящим для генотерапии ЦНС. Промотор AAV, используемый в композициях и способах, описанных в настоящей заявке, может включать один или несколько промоторов фосфолицераткиназы или цитомегаловируса. Векторы гAAV, применяемые в композициях и способах, описанных в настоящей заявке, представляют собой рекомбинантные конструкции нуклеиновых кислот (например, нуклеиновые кислоты, способные экспрессироваться в хондроцитах, в клетках-предшественниках хондроцитов и в синовиоцитах), которые включают: (1) гетерологичную последовательность, подлежащую экспрессии, и (2) вирусные последовательности, которые облегчают интеграцию и экспрессию гетерологичных генов. Вирусные последовательности могут включать такие последовательности AAV, которые необходимы в цис-положении для репликации и упаковки (например, функциональные последовательности инвертированных концевых повторов (ITR)) ДНК в вирион. Такие векторы гAAV могут также содержать маркерные или репортерные гены. Подходящие векторы гAAV имеют один или несколько генов AAV WT, которые были полностью или частично делетированы, но сохраняют функциональные фланкирующие последовательности ITR. ITR AAV могут относиться к любому серотипу, подходящему для конкретного применения. Способы применения векторов гAAV описаны, например, в публикациях Tai et al., *J. Biomed. Sci.* 7:279 (2000) и Monahan and Samulski, *Gene Delivery* 7:24 (2000), описание каждой из которых включено в настоящую заявку посредством ссылки, поскольку оно относится к векторам AAV для доставки генов.

ICI. Капсидный белок аденоассоциированного вирусного вектора

Описанные здесь нуклеиновые кислоты и векторы могут быть включены в вирион гAAV для облегчения введения нуклеиновой кислоты или вектора в клетку. Капсидные белки AAV составляют внешнюю, не-нуклеиновокислотную часть вириона и кодируются геном сар AAV. Ген сар кодирует три белка вирусной оболочки, VP1, VP2 и VP3, которые необходимы для сборки вириона. Конструирование вирионов гAAV описано, например, в патентах США 5173414; 5139941; 5863541; 5869305; 6057152; и 6376237; а также в публикациях Rabinowitz et al., *J. Virol.* 76:791 (2002) и Bowles et al., *J. Virol.* 77:423 (2003), описание каждого из которых включено в настоящую заявку посредством ссылки, поскольку оно относится к векторам AAV для доставки генов.

Вирионы гAAV, которые могут быть использованы в сочетании с композициями и способами, описанными в настоящей заявке, включают вирионы, полученные из AAV различных серотипов, включая AAV 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 и rh74. Конструирование и применение векторов AAV и белков AAV различных серотипов описано, например, в публикациях Chao et al., *Mol. Ther.* 2:619 (2000); Davidson et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:3428 (2000); Xiao et al., *J. Virol.* 72:2224 (1998); Halbert et al., *J. Virol.* 74:1524 (2000); Halbert et al., *J. Virol.* 75:6615 (2001); и Auricchio et al., *Hum. Molec. Genet.* 10:3075 (2001), описание каждой из которых включено в настоящую заявку посредством ссылки, поскольку оно относится к векторам AAV для доставки генов.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, вирусный вектор представляет собой AAV2.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, вирусный вектор представляет собой AAV5.

Векторами rAAV, которые также могут быть использованы в описанных здесь композициях и способах, являются псевдотипированные векторы rAAV. Псевдотипированные векторы включают векторы AAV данного серотипа, псевдотипированные капсидным геном, полученным из серотипа, отличающегося от данного серотипа (например, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9 и AAV10 и т.п.). Методы, включающие конструирование и использование псевдотипированных вирионов rAAV, известны специалистам в данной области и описаны, например, Duan et al., *J. Virol.* 75:7662 (2001); Halbert et al., *J. Virol.* 74:1524 (2000); Zolotukhin et al., *Methods*, 28:158 (2002); и Auricchio et al., *Hum. Molec. Genet.* 10:3075 (2001).

Вирионы AAV, которые имеют мутации в капсиде вириона, могут быть использованы для инфицирования клеток определенных типов более эффективно, чем немутированные вирионы капсида. Так, например, подходящие мутанты AAV могут иметь мутации для встраивания лиганда в целях облегчения нацеливания AAV на клетки определенных типов. Конструирование и характеристика мутантов капсида AAV, включая инсерционные мутанты, аланин-скринирующие мутанты и мутанты с эпитопной меткой, описаны Wu et al., *J. Virol.* 74:8635 (2000). Другие вирионы rAAV, которые могут быть использованы в способах, описанных в настоящей заявке, включают капсидные гибриды, которые были получены путем молекулярного отбора вирусов, а также путем перестановки экзонов. См., например, Soong et al., *Nat. Genet.*, 25:436 (2000) и Kolman and Stemmer, *Nat. Biotechnol.* 19:423 (2001).

Фрагменты AAV, необходимые для сборки в экспрессионные векторы, включают белки сар, включая vp1, vp2, vp3 и гипервариабельные области, белки гер, включая гер 78, гер 68, гер 52 и гер 40, и последовательности, кодирующие эти белки. Эти фрагменты могут быть легко использованы в различных векторных системах и клетках-хозяевах. Такие фрагменты могут быть использованы отдельно, в комбинации с другими последовательностями или фрагментами серотипа AAV или в комбинации с элементами из других вирусных последовательностей AAV или не-AAV. Используемые здесь искусственные серотипы AAV включают, но не ограничиваются ими, AAV с неприродным капсидным белком. Такой искусственный капсид может быть создан любым подходящим способом с использованием выбранной последовательности AAV (например, фрагмента капсидного белка vp1) в комбинации с гетерологичными последовательностями, которые могут быть получены из различных AAV выбранных серотипов, несмежных частей AAV того же серотипа, из вирусного источника, отличающегося от AAV, или из не-вирусного источника. AAV искусственного серотипа может представлять собой, но не ограничивается ими, псевдотипированный AAV,

химерный капсид AAV, рекомбинантный капсид AAV или «гуманизированный» капсид AAV. В настоящей заявке могут быть использованы псевдотипированные векторы, в которых капсид одного AAV используется вместе с ITR из AAV, имеющего другой капсидный белок.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, вирусный капсидный белок включает лигированное производное (например, синтетическое, биологическое или полусинтетическое производное).

II. Способы доставки экзогенных нуклеиновых кислот в клетки-мишени

Методы, которые могут быть применены для введения полинуклеотида, такого как ДНК или РНК, включая оптимизированную по кодонам ДНК или РНК, в клетку млекопитающего (например, в хондроциты, клетки-предшественники хондроцитов и синовиоциты), хорошо известны специалистам в данной области. Так, например, для пермеабиллизации клеток млекопитающих (например, человеческих клеток-мишеней) может быть применена электропорация путем приложения электростатического потенциала к представляющей интерес клетке. Клетки млекопитающих, такие как клетки человека, подвергнутые воздействию внешнего электрического поля указанным способом, впоследствии становятся предрасположенными к поглощению экзогенных нуклеиновых кислот (например, нуклеиновых кислот, способных экспрессироваться, например, в хондроцитах, в клетках-предшественниках хондроцитов и в синовиоцитах). Электропорация клеток млекопитающих подробно описана, например, в публикации Chu et al., *Nucleic Acids Research* 15:1311 (1987), которая включена в настоящее описание посредством ссылки. В аналогичной методике, NUCLEOFECTION™, используют приложенное электрическое поле, так, чтобы это приводило к стимуляции поглощения экзогенных полинуклеотидов ядром эукариотической клетки. NUCLEOFECTION™ и протоколы, применяемые для выполнения этой методики, подробно описаны, например, в публикации Distler et al., *Experimental Dermatology* 14:315 (2005), а также в заявке США 2010/0317114, описание каждой из которых включено в настоящее описание посредством ссылки.

Дополнительным методом, подходящим для трансфекции клеток-мишеней, является метод сжатия пор. Этот метод вызывает быструю механическую деформацию клеток, позволяющую стимулировать поглощение экзогенной ДНК через мембранные поры, которые образуются в ответ на приложенную нагрузку. Эта технология выгодна тем, что для доставки нуклеиновых кислот в клетку, такую как человеческая клетка-мишень, не требуется вектор. Сжатие пор подробно описано, например, в публикации Sharei et al., *Journal of Visualized Experiments* 81:e50980 (2013), которая включена в настоящее описание посредством ссылки.

Еще одним методом, подходящим для трансфекции клеток-мишеней, является липофекция. Этот метод включает загрузку нуклеиновых кислот в липосому, которая часто представляет собой катионные функциональные группы, такие как четвертичные или протонированные амины, обращенные к внешней стороне липосомы. Это

способствует электростатическим взаимодействиям между липосомой и клеткой за счет анионной природы клеточной мембраны, что в конечном итоге приводит к поглощению экзогенных нуклеиновых кислот, например, посредством прямого слияния липосомы с клеточной мембраной или эндоцитоза комплекса. Липофекция подробно описана, например, в патенте США 7442386, который включен в настоящее описание посредством ссылки. Подобные методы, в которых используются ионные взаимодействия с клеточной мембраной для стимуляции поглощения чужеродных нуклеиновых кислот, включают контактирование клетки с комплексом «катионный полимер-нуклеиновая кислота». Типичные катионные молекулы, которые связываются с полинуклеотидами для сообщения положительного заряда, благоприятного для взаимодействия с клеточной мембраной, представляют собой активированные дендримеры (описанные, например, в публикации Dennig, *Topics in Current Chemistry* 228:227 (2003), которая включена в настоящее описание посредством ссылки), полиэтиленимин и DEAE-декстран, применение которых в качестве трансфекционного агента подробно описано, например, в публикации Gulick et al., *Current Protocols in Molecular Biology* 40:1:9.2:9.2.1 (1997), которая включена в настоящее описание посредством ссылки.

Другим подходящим инструментом для индуцирования поглощения экзогенных нуклеиновых кислот клетками-мишенями является лазерная трансфекция, также называемая оптической трансфекцией, то есть, метод, который включает воздействие на клетку электромагнитного излучения на определенной длине волны, так, чтобы это обеспечивало мягкую проницаемость клеток и позволяло полинуклеотидам проходить через клеточную мембрану. Биологическая активность этого метода аналогична, а в некоторых случаях, превосходит электропорацию.

Еще одним методом, который может быть применен для доставки генетического материала в клетки-мишени, является импалефекция. Этот метод основан на использовании наноматериалов, таких как углеродные нановолокна, углеродные нанотрубки и нанопроволоки. Игольчатые наноструктуры синтезируются перпендикулярно поверхности субстрата. ДНК, содержащая ген, предназначенный для внутриклеточной доставки, присоединена к поверхности наноструктуры. Затем чип с массивами этих игл прижимают к клеткам или к ткани. Клетки, пронизанные наноструктурами, могут экспрессировать доставленный(е) ген(ы). Пример этого метода описан в публикации Shalek et al., *PNAS* 107:25 1870 (2010), которая включена в настоящее описание посредством ссылки.

Для доставки нуклеиновых кислот в клетки-мишени может быть также использована MAGNETOFECTIION™. Принцип MAGNETOFECTIION™ заключается в связывании нуклеиновых кислот с катионными магнитными наночастицами. Магнитные наночастицы изготавливают из полностью биоразлагаемого оксида железа и покрывают специальными катионными запатентованными молекулами, тип которых варьируется в зависимости от цели применения. Их ассоциация с генными векторами (ДНК, киРНК, вирусным вектором и т.п.) достигается за счет индуцированной солью коллоидной

агрегации и электростатического взаимодействия. Затем, магнитные частицы концентрируют на клетках-мишенях под влиянием внешнего магнитного поля, создаваемого магнитами. Эта методика подробно описана в публикации Scherer et al., *Gene Therapy* 9:102 (2002), которая включена в настоящее описание посредством ссылки. Еще одним инструментом, который может быть применен для мягкой и эффективной трансфекции клеток-мишеней, являются магнитные шарики, поскольку в этой методике используется приложенное магнитное поле для управления поглощением нуклеиновых кислот. Эта технология подробно описана, например, в заявке на патент США 2010/0227406, которая включена в настоящее описание посредством ссылки.

Еще одним методом, который может быть применен для индуцирования поглощения экзогенных нуклеиновых кислот клетками-мишенями, является сонопорация, то есть, метод, который включает использование звука (обычно на ультразвуковых частотах) для изменения проницаемости клеточной плазматической мембраны, проницаемости клеток и обеспечения проникновения полинуклеотидов через клеточную мембрану. Этот метод подробно описан, например, в публикации Rhodes et al., *Methods in Cell Biology* 82:309 (2007), которая включена в настоящее описание посредством ссылки.

Микровезикулы представляют собой еще один потенциальный носитель, который может быть использован для модификации генома клетки-мишени в соответствии с описанными здесь способами. Так, например, микровезикулы, которые были индуцированы посредством совместной сверхэкспрессии гликопротеина VSV-G, например, с геном-модифицирующим белком, таким как нуклеаза, могут быть использованы для эффективной доставки белков в клетку, которые впоследствии катализируют сайт-специфическое расщепление эндогенной полинуклеотидной последовательности и подготавливают геном клетки к ковалентному включению представляющего интерес полинуклеотида, такого как ген или регуляторная последовательность. Использование таких везикул, также называемых Гезикулами, для генетической модификации эукариотических клеток подробно описано, например, в публикации Quinn et al., *Genetic Modification of Target Cells by Direct Delivery of Active Protein* [abstract]. In: *Methylation changes in early embryonic genes in cancer* [abstract], in: *Proceedings of the 18th Annual Meeting of the American Society of Gene and Cell Therapy*; 2015 May 13, Abstract No. 122.

Экзосомы, внеклеточные везикулы, миникольцевая ДНК, наноплазмидаTM, ДНК с миницепью, ДНК в форме собачьей конуры и ДНК с замкнутыми концами представляют собой другие потенциальные носители, которые могут быть использованы для модификации генома клетки-мишени в соответствии с описанными здесь способами.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, экспрессионный вектор включает последовательность нуклеиновой кислоты, которая содержит модифицированную последовательность нацеливания на ядро.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, экспрессионный вектор включает последовательность нуклеиновой кислоты, которая является кольцевой (например, для эффективной экспрессии).

IIA. Не-вирусная частица

В некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к экспрессионному вектору, который включает не-вирусную частицу. В некоторых вариантах осуществления изобретения, не-вирусная частица представляет собой любую одну или несколько частиц, выбранных из группы, включающей: липидную наночастицу, липидную оболочку, фосфолипидный бислой, липосому, нойсому, фуллерен, наночастицу на основе белка, нанокристалл, дендример, органический/неорганический коллоид, ПЭГилированную липосому, полимерную мицеллу, обратную мицеллу, смешанную мицеллу, чувствительную мицеллу, многокомпонентную мицеллу или поли- или мономолекулярную дендритную мицеллу.

В некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к экспрессионному вектору, который включает не-вирусную частицу, лигированную с одним или несколькими химическими фрагментами для специфического нацеливания на клетки определенного типа или для оптимизации клеточного или тканевого тропизма.

IIВ. Вирусные капсидные белки

В некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к экспрессионному вектору, который включает вирусный капсидный белок для облегчения введения нуклеиновой кислоты или вектора в клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения, вирусный капсидный белок представляет собой природный капсид или сконструированный капсидный белок (например, капсид, который содержит модифицированные последовательности).

Капсидные белки вирусного вектора составляют внешнюю часть вириона, не содержащую нуклеиновой кислоты, и кодируются нуклеиновой кислотой. В одном варианте осуществления изобретения, вирусные капсидные белки по своей структуре могут состоять из одного или нескольких белков из нижеследующего списка, включающего: капсидный белок AAV, включая природный и/или синтетический серотип, капсидный белок лентивируса одного или нескольких серотипов, капсидный белок ретровирусов одного или нескольких серотипов, капсидный белок герпесвирусов одного или нескольких серотипов, капсидный белок аденовирусов одного или нескольких серотипов, капсидный белок парвовирусов одного или нескольких серотипов, капсидный белок рабдовирусов одного или нескольких серотипов, капсидный белок реовирусов одного или нескольких серотипов, капсидный белок ортомиксовирусов одного или нескольких серотипов, капсидный белок буньявирусов одного или нескольких серотипов, капсидный белок флавивирусов одного или нескольких серотипов, капсидный белок ретровирусов одного или нескольких серотипов, капсидный белок парамиксовирусов одного или нескольких серотипов, капсидный белок потивирусов одного или нескольких серотипов, капсидный белок коронавируса одного или нескольких серотипов, капсидный

белок калицивирусов одного или нескольких серотипов, капсидный белок папилломавирусов одного или нескольких серотипов, капсидный белок поксвирусов одного или нескольких серотипов, капсидный белок полиомавирусов одного или нескольких серотипов, или любые другие известные капсидные белки вирусов или вирионов одного или нескольких серотипов.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, природный вирусный капсидный белок модифицируют (например, путем конъюгирования для экспрессии не-вирусных пептидов на поверхности природных вирусных капсидных белков для нацеливания на клетки определенного типа или путем конъюгирования для экспрессии слитых белков, а именно, конъюгирования вирусного капсидного белка, эукариотических белков или белковых фрагментов для сужения функции тропизма).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, сконструированный капсидный белок вируса конъюгируют с лигандом (например, для сообщения специфичности к клеткам определенного типа или модуляции иммуногенности).

III. Репрезентативные экспрессионные векторы для экспрессии терапевтических нуклеиновых кислот

В некоторых вариантах осуществления изобретения, экспрессионный вектор представляет собой вирусный вектор (например, AAV2), включающий нуклеиновую кислоту, кодирующую ген-«самоубийцу», и полипептид FGF-18 или его функциональный фрагмент. Так, например, вирусный вектор может включать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую энхансер цитомегаловируса (CMV) (CMVenh), функционально связанный с человеческим полипептидом FGF18 (hFGF18); мутантный посттранскрипционный регуляторный элемент 6 вируса гепатита сурка (WPREmut6; известно, что элемент ДНК существенно увеличивает уровни экспрессии, но без промоторной активности); сигнал полиаденилирования бычьего гормона роста (bGHpA), ген-«самоубийцу» HSV-TK; мутированный сигнал раннего полиаденилирования SV40 (SV40pA); и фланкирующие последовательности инвертированных концевых повторов AAV2 (ITR) (Фиг.1). Альтернативно, например, вирусный вектор может включать последовательность нуклеиновой кислоты CMVenh, функционально связанную с полипептидом hFGF18, WPREmut6, bGHpA, геном-«самоубийцей» garaCas9, SV40pA и фланкирующим ITR AAV2 (фиг. 2).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, экспрессионный вектор модифицируют (например, для удаления ITR и помещают экспрессионный вектор в миникольцо или любую другую конфигурацию, которая может быть оптимально нацелена на ядро для эффективной экспрессии с интеграцией или без нее).

IV. Устройства для доставки терапевтических нуклеиновых кислот

Доставка согласно изобретению может быть осуществлена с помощью устройства для доставки лекарственного средства, такого как, но не ограничивающегося ими, генный пистолет, предварительно заполненный шприц, автоинжектор, аэрозольный спрей, аэрозольный баллончик или пластырь-инжектор, или такое лекарственное средство может

храниться в ампуле, в картридже, в капсуле, во флаконе, в герметичном предварительно заполненном контейнере или в герметичном предварительно заполненном аэрозольном контейнере для последующего введения с помощью другого подходящего средства.

Доставка может быть осуществлена в ткани-мишени, в периферические или в дистальные ткани или органы. Таким образом, конструкция может быть экспрессирована в клетке, которая является мишенью для экспрессируемого белка или фермента в аутокринном веществе. Альтернативно, конструкция может экспрессироваться клетками в периферических органах; клетками, находящимися вокруг, рядом или в смеси с клетками и тканями, которые являются конечной мишенью для экспрессируемого белка. И наконец, конструкция может экспрессироваться клетками, находящимися вне ткани или органа-мишени, и может воздействовать эндокринно на одну или несколько тканей, органов или клеток-мишеней. В частности, в объем настоящего изобретения входят, но не ограничиваются ими, конструкции, которые могут быть доставлены в синовиальное соединение и могут быть нацелены на хондроциты для экспрессии FGF-18 и доставки FGF-18 в соседние хондроциты или в клетки, выстилающие суставную капсулу, для экспрессии FGF-18 и доставки FGF-18 в проксимальные хондроциты.

Приготовление и дозирование фармацевтических композиций

Экспрессионный вектор (например, нуклеиновая кислота), описанный в настоящей заявке, может быть включен в состав фармацевтических композиций для введения пациенту, такому как человек, страдающий заболеванием хряща или подверженный риску его развития, в биологически совместимой форме, подходящей для введения *in vivo*. Фармацевтическая композиция, содержащая, например, экспрессионный вектор, описанный в настоящей заявке, такой как AAV2 или AAV5, включающий нуклеиновую кислоту, кодирующую ген-«самоубийцу», и полипептид FGF-18 или его функциональный фрагмент, обычно включает фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель. Фармацевтическая композиция может включать (например, состоять из них), например, стерильный физиологический раствор и нуклеиновую кислоту. Стерильный физиологический раствор обычно представляет собой физиологический раствор фармацевтической чистоты. Фармацевтическая композиция может включать (например, состоять из них), например, стерильную воду и нуклеиновую кислоту. Стерильная вода обычно представляет собой воду фармацевтической чистоты. Фармацевтическая композиция может включать (например, состоять из них), например, буфер (например, забуференный фосфатом физиологический раствор (PBS), 2-(N-морфолино)этансульфоновую кислоту (MES), 2,2-бис(гидрокси-метил)-2,2',2"-нитрилотриэтанол (BIS-TRIS), диглицин (Gly-Gly), физиологический раствор, 2-амино-2-метил-1-пропанол (AMP) или N-(2-гидрокси-1,1-бис(гидрокси-метил)этил)глицин (трицин)) и нуклеиновую кислоту. Буфер обычно представляет собой буфер фармацевтической чистоты.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, фармацевтические композиции включают один или несколько экспрессионных векторов и одно или

несколько наполнителей. В некоторых вариантах осуществления изобретения, наполнители выбраны из воды, растворов солей, спирта, полиэтиленгликолей, желатина, лактозы, амилазы, стеарата магния, талька, кремниевой кислоты, вязкого парафина, гидроксиметилцеллюлозы и поливинилпирролидона.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, экспрессионные векторы могут быть смешаны с фармацевтически приемлемыми активными и/или инертными веществами для приготовления фармацевтических композиций или составов. Композиции и способы приготовления фармацевтических композиций зависят от ряда критериев, включая, но не ограничиваясь ими, способ введения, тяжесть заболевания или вводимую дозу.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, фармацевтические композиции, включающие экспрессионный вектор, содержат любые фармацевтически приемлемые соли ингибитора, сложные эфиры ингибитора или соли таких сложных эфиров. В некоторых вариантах осуществления изобретения, фармацевтические композиции, включающие экспрессионный вектор, при их введении индивидууму (например, человеку), способны обеспечивать (прямо или опосредованно) биологически активный метаболит или его остаток. Соответственно, например, настоящее изобретение также относится к фармацевтически приемлемым солям ингибиторов, пролекарствам, фармацевтически приемлемым солям таких пролекарств и другим биоэквивалентам. Подходящие фармацевтически приемлемые соли включают, но не ограничиваются ими, соли натрия и калия. В некоторых вариантах осуществления изобретения, пролекарства включают одну или несколько групп конъюгатов, присоединенных к экспрессионному вектору, где группа конъюгата расщепляется эндогенными нуклеазами в организме.

Липидные фрагменты были использованы в терапии нуклеиновыми кислотами различными способами. В некоторых таких способах, нуклеиновую кислоту вводят в предварительно полученные липосомы или липоплексы, состоящие из смесей катионных липидов и нейтральных липидов. В некоторых способах, комплексы ДНК с моно- или поликатионными липидами образуются в отсутствие нейтрального липида. В некоторых вариантах осуществления изобретения, липидный фрагмент выбирают для улучшения распределения фармацевтического средства в конкретной клетке или ткани. В некоторых вариантах осуществления изобретения, липидный фрагмент выбирают для улучшения распределения фармацевтического средства в жировой ткани. В некоторых вариантах осуществления изобретения, липидный фрагмент выбирают для улучшения распределения фармацевтического средства в мышечной ткани.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, фармацевтические композиции включают систему доставки. Примеры систем доставки включают, но не ограничиваются ими, липосомы и эмульсии. Некоторые системы доставки могут быть применены для приготовления определенных фармацевтических композиций, включая композиции, содержащие гидрофобные соединения. В некоторых вариантах

осуществления изобретения используются определенные органические растворители, такие как диметилсульфоксид.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, фармацевтические композиции включают одну или несколько тканеспецифичных молекул для доставки, предназначенных для доставки одного или нескольких фармацевтических агентов согласно изобретению в ткани или клетки определенных типов. Так, например, в некоторых вариантах осуществления изобретения, фармацевтические композиции включают липосомы, покрытые тканеспецифическим антителом.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, фармацевтические композиции включают систему соразтворителей. Некоторые из таких систем соразтворителей включают, например, бензиловый спирт, неполярное поверхностно-активное вещество, смешивающийся с водой органический полимер и водную фазу. В некоторых вариантах осуществления изобретения, такие системы соразтворителей используют для гидрофобных соединений. Неограничивающим примером такой системы соразтворителей является система соразтворителей VPD, которая представляет собой раствор абсолютного этанола, включающий 3% масс./об. бензилового спирта, 8% масс./об. неполярного поверхностно-активного вещества Polysorbate 80™ ((x)-сорбитан-моно-9-октадеценоатполи(окси-1,2-этандиила)) и 65% масс./об. полиэтиленгликоля 300. Количество таких систем соразтворителей могут значительно варьироваться без существенного изменения их свойств, таких, как растворимость и токсичность. Кроме того, компоненты соразтворителя могут варьироваться, например, вместо полисорбата 80™ ((x)-сорбитанмоно-9-октадеценоатполи(окси-1,2-этандиила)) могут быть использованы и другие поверхностно-активные вещества; размер фракции полиэтиленгликоля может варьироваться; вместо полиэтиленгликоля могут быть использованы другие биосовместимые полимеры, например, поливинилпирролидон; и вместо декстрозы могут быть использованы другие сахара или полисахариды.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, фармацевтическую композицию приготавливают для введения путем инъекции (например, внутривенной, внутрисуставной, субхондральной, интрасиновиальной или интрахондральной). В некоторых таких вариантах осуществления изобретения, фармацевтическая композиция включает носитель и приготавливается в водном растворе, таком как вода или физиологически совместимые буферы, такие как раствор Хэнкса, раствор Рингера или физиологический солевой буфер. В некоторых вариантах осуществления изобретения, могут быть включены и другие ингредиенты (например, ингредиенты, которые сообщают растворимость или служат в качестве консервантов). В некоторых вариантах осуществления изобретения, суспензии для инъекций приготавливают с использованием соответствующих жидких носителей, суспендирующих агентов и т.п. Некоторые фармацевтические композиции для инъекций приготавливают в виде унифицированной лекарственной формы, например, в ампулах или в контейнерах с дробными дозами. Некоторые фармацевтические композиции для инъекций представляют собой суспензии,

растворы или эмульсии в масляных или водных носителях и могут содержать такие агенты, как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие агенты. Некоторые растворители, подходящие для использования в фармацевтических композициях для инъекций, включают, но не ограничиваются ими, липофильные растворители и жирные масла, такие как кунжутное масло, синтетические сложные эфиры жирных кислот, такие как этилолеат или триглицериды, и липосомы.

Доза фармацевтической композиции, вводимая индивидууму для лечения заболевания хряща (например, остеоартрита), как описано в настоящей заявке, может зависеть, например, от морфологии и/или профиля экспрессии гиалинового хряща, от конкретного индивидуума, способов приготовления фармацевтического препарата, способов введения (например, времени введения), возраста, массы тела и пола индивидуума, тяжести заболевания хряща, подвергаемого лечению, и в зависимости от того, проходил ли данный индивидуум комбинированную терапию или нет. Доза вводимой фармацевтической композиции может составлять, например, от 0,1 до 1,0 мг (например, от 0,2 до 0,9 мг, от 0,3 до 0,8 мг, от 0,4 до 0,6 мг или приблизительно 0,5 мг). Фармацевтическая композиция может быть введена в любой подходящей дозе. Неограничивающие примеры доз составляют от приблизительно 0,3 мг фармацевтической композиции до приблизительно 0,7 мг фармацевтической композиции (например, от приблизительно 0,31 мг фармацевтической композиции до приблизительно 0,69 мг фармацевтической композиции, от приблизительно 0,33 мг фармацевтической композиции до приблизительно 0,67 мг фармацевтической композиции, от приблизительно 0,38 мг фармацевтической композиции до приблизительно 0,62 мг фармацевтической композиции, от приблизительно 0,48 мг фармацевтической композиции до приблизительно 0,58 мг фармацевтической композиции или приблизительно 0,53 мг фармацевтической композиции). Дополнительные репрезентативные дозы составляют от приблизительно 0,1 мг фармацевтической композиции до приблизительно 3,0 мг фармацевтической композиции (например, от приблизительно 0,2 мг фармацевтической композиции до приблизительно 2,9 мг фармацевтической композиции, от приблизительно 0,4 мг фармацевтической композиции до приблизительно 2,7 мг фармацевтической композиции). мг фармацевтической композиции, от приблизительно 0,9 мг фармацевтической композиции до приблизительно 2,2 мг фармацевтической композиции, от приблизительно 1,4 мг фармацевтической композиции до приблизительно 1,7 мг фармацевтической композиции или приблизительно 1,55 мг фармацевтической композиции).

Фармацевтическая композиция может быть введена в любой подходящей дозе, так, чтобы количество доставленных вирусных частиц составляло от приблизительно $1,0 \times 10^9$ ВГ/мл до приблизительно $4,5 \times 10^{11}$ ВГ/мл (например, от приблизительно $1,1 \times 10^9$ ВГ/мл до приблизительно $4,4 \times 10^{11}$ ВГ/мл, приблизительно от $1,5 \times 10^9$ ВГ/мл до приблизительно $4,0 \times 10^{11}$ ВГ/мл, приблизительно от $2,5 \times 10^9$ ВГ/мл до приблизительно $3,0 \times 10^{11}$ ВГ/мл или приблизительно $9,1 \times 10^{10}$ ВГ/мл).

Композиции, описанные в настоящей заявке, могут быть введены в количестве, достаточном для ослабления одного или нескольких патологических признаков заболевания хряща (например, остеоартрита). Введение композиций, описанных в настоящей заявке, может способствовать улучшению морфологии хондроцитов и/или профиля экспрессии, так, чтобы они больше напоминали морфологию и/или профиль экспрессии, соответственно, внеклеточного матрикса, связанного с гиалиновым хрящом; улучшению морфологии и/или профиля экспрессии синовиоцитов, так, чтобы они больше напоминали морфологию и/или профиль экспрессии, соответственно, внеклеточного матрикса, связанного с гиалиновым хрящом; увеличению пролиферации хондроцитов; увеличению пролиферации предшественников хондроцитов; увеличению толщины хряща или увеличению общей толщины хряща бедренно-большеберцового сустава. Уровень FGF-18 может быть оценен для сравнения уровня гена и/или белка FGF-18 у индивидуумов до и после лечения в образце ткани с применением стандартных методов, например, иммуноферментного анализа, Вестерн-блот-анализа, иммуногистохимического анализа или количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскриптазой. В зависимости от результатов оценки, индивидууму может быть назначено дополнительное лечение.

Наборы

Композиции, описанные в настоящей заявке, могут быть приготовлены в наборе для их применения в целях лечения заболеваний хряща. Набор может включать один или несколько экспрессионных векторов или фармацевтических композиций, описанных в настоящей заявке. Набор может включать вкладыш в упаковку, в котором имеется инструкция для пользователя, например, врача, по применению набора для осуществления любого из описанных здесь способов. Набор может включать, но необязательно, шприц или другое устройство для введения композиции. Набор может включать, но необязательно, картонную коробку, пломбу для контроля вскрытия, иглу или предварительно заполненный шприц. В некоторых вариантах осуществления изобретения, набор может включать одно или несколько дополнительных терапевтических средств.

Комбинированная терапия

Экспрессионный вектор, описанный в настоящей заявке, может быть введен в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами для лечения заболеваний хряща. Одно или несколько дополнительных терапевтических средств могут включать нестероидное противовоспалительное средство (например, пироксикам, ибупрофен, целекоксиб, аспирин, этодолак, мелоксикам, диклофенак, индометацин и напроксен), анальгетик (например, капсаицин и ацетаминофен), пищевую добавку (например, s-аденозилметионин и гиалуроновую кислоту), или наркотическое средство (например, трамадол) или их комбинации.

ПРИМЕРЫ

Нижеследующие примеры, которые приводятся лишь для иллюстрации, а не для ограничения раскрытия изобретения, представлены для того, чтобы специалист в данной

области мог правильно применить, разработать и оценить описанные здесь композиции и способы. Эти примеры приводятся лишь в иллюстративных целях и не должны рассматриваться как ограничение объема настоящего изобретения.

Пример 1: Лечение заболевания хряща у человека с использованием вирусного вектора

В соответствии с описанными здесь способами, индивидууму, такому как человек, может быть введена фармацевтическая композиция (например, вирусный вектор AAV2 или AAV5, включающий нуклеиновую кислоту, кодирующую ген-«самоубийцу», и полипептид FGF-18 или его функциональный фрагмент и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или наполнитель; Фиг. 1 и 2) для лечения заболевания хряща у индивидуума. С этой целью пациенту вводят фармацевтическую композицию (например, вирусный вектор AAV2 или AAV5, включающий нуклеиновую кислоту, кодирующую ген-«самоубийцу», и полипептид FGF-18 или его функциональный фрагмент, а также фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или наполнитель). Фармацевтическую композицию вводят индивидууму внутривенно, внутрисуставно, субхондрально, интрасиновиально или интрахондрально. Фармацевтическая композиция может быть введена внутривенно, внутрисуставно, субхондрально, интрасиновиально или интрахондрально и билатерально в синовиальное соединение. Фармацевтическая композиция может быть введена в любой подходящей дозе. Неограничивающие примеры доз составляют приблизительно от 0,1 мг до 0,5 мг, например, 0,1 мг, 0,2 мг, 0,3 мг, 0,4 мг и 0,5 мг фармацевтической композиции. Индивидууму может быть введена доза приблизительно от 0,5 мг до приблизительно 1,0 мг фармацевтической композиции, например, индивидууму может быть введена доза приблизительно 1,0 мг фармацевтической композиции.

Пример 2: Лечение заболевания хряща у человека с использованием лентивирусного вектора

В соответствии с описанными здесь способами, индивидууму, такому как человек, может быть введена фармацевтическая композиция (например, лентивирусный вектор, включающий нуклеиновую кислоту, кодирующую ген-«самоубийцу», и полипептид FGF-18 или его функциональный фрагмент и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или наполнитель) для лечения заболевания хряща у индивидуума. С этой целью пациенту вводят фармацевтическую композицию (например, лентивирусный вектор, включающий нуклеиновую кислоту, кодирующую ген-«самоубийцу», и полипептид FGF-18 или его функциональный фрагмент, а также фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или наполнитель). Фармацевтическую композицию вводят индивидууму внутривенно, внутрисуставно, субхондрально, интрасиновиально или интрахондрально. Фармацевтическая композиция может быть введена внутривенно, внутрисуставно, субхондрально, интрасиновиально или интрахондрально и билатерально в синовиальное соединение. Фармацевтическая композиция может быть введена в любой подходящей дозе. Неограничивающие примеры доз составляют приблизительно от 0,1 мг

до 0,5 мг, например, 0,1 мг, 0,2 мг, 0,3 мг, 0,4 мг и 0,5 мг фармацевтической композиции. Индивидууму может быть введена доза приблизительно от 0,5 мг до приблизительно 1,0 мг фармацевтической композиции, например, индивидууму может быть введена доза приблизительно 1,0 мг фармацевтической композиции.

Пример 3: Лечение заболевания хряща у человека с использованием не-вирусной частицы

В соответствии со способами, раскрытыми в настоящей заявке, индивидууму, такому как человек, может быть введена фармацевтическая композиция (например, экспрессионный вектор, включающий миникольцевую ДНК и не-вирусную частицу (например, липидную наночастицу), содержащую нуклеиновую кислоту, кодирующую ген-«самоубийцу», и полипептид FGF-18 или его функциональный фрагмент и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или наполнитель) для лечения заболевания хряща у индивидуума. С этой целью пациенту вводят фармацевтическую композицию (например, экспрессионный вектор, включающий миникольцевую ДНК и не-вирусную частицу (например, липидную наночастицу), включающую нуклеиновую кислоту, кодирующую ген-«самоубийцу», и полипептид FGF-18 или его функциональный фрагмент и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или наполнитель). Фармацевтическую композицию вводят индивидууму внутривенно, внутрисуставно, субхондрально, интрасиновиально или интрахондрально. Фармацевтическая композиция может быть введена внутривенно, внутрисуставно, субхондрально, интрасиновиально или интрахондрально и билатерально в синовиальное соединение. Фармацевтическая композиция может быть введена в любой подходящей дозе. Неограничивающие примеры доз составляют приблизительно от 0,001 мг/кг до 1,0 мг/кг, например, 0,001 мг/кг, 0,002 мг/кг, 0,003 мг/кг, 0,004 мг/кг, 0,005 мг/кг, 0,015 мг/кг, 0,055 мг/кг, 0,155 мг/кг, 0,500 мг/кг и 1,0 мг/кг фармацевтической композиции. Индивидуум может получать дозу от приблизительно 0,001 мг/кг до приблизительно 1,0 мг/кг фармацевтической композиции, например, индивидуум может получать дозу приблизительно 1 мг/кг фармацевтической композиции.

Другие варианты осуществления изобретения

Все публикации, патенты и патентные заявки, упомянутые в настоящем описании, включены в настоящее изобретение посредством ссылки так, как если бы каждая независимая публикация или патентная заявка были конкретно и отдельно включена в настоящее описание посредством ссылки.

Хотя настоящее изобретение описано на конкретных вариантах его осуществления, однако, следует отметить, что в него могут быть внесены дополнительные модификации, и эта заявка охватывает любые варианты, применения или адаптации изобретения, в соответствии, в целом, с принципами настоящего изобретения, включая такие отклонения от изобретения, относящиеся к известной или общепринятой практике в данной области, к которой относится настоящее изобретение, и эта заявка охватывает все вышеупомянутые основные признаки, изложенные в формуле изобретения.

Другие варианты осуществления изобретения представлены в формуле изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантный экспрессионный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую (1) ген-«самоубийцу» и (2) полипептид фактора роста фибробластов 18 (FGF-18) или его функциональный фрагмент.
2. Экспрессионный вектор по п. 1, где экспрессионный вектор представляет собой вирусный вектор.
3. Экспрессионный вектор по п. 1, где экспрессионный вектор содержит не-вирусную частицу.
4. Экспрессионный вектор по п. 1, где экспрессионный вектор содержит гибридную вирусную и не-вирусную частицу.
5. Экспрессионный вектор по п. 2, где вирусный вектор выбран из группы, состоящей из аденоассоциированного вируса (AAV), аденовируса, парвовируса, коронавируса, рабдовируса, парамиксовируса, пикорнавируса, альфавируса, вируса герпеса, поксвируса, лентивируса и вируса семейства Retroviridae.
6. Экспрессионный вектор по п. 5, где вирусный вектор представляет собой AAV.
7. Экспрессионный вектор по п. 2, где вирусный вектор дополнительно содержит капсид.
8. Экспрессионный вектор по п. 7, где капсид содержит природный капсид или сконструированный капсид.
9. Экспрессионный вектор по п. 8, где сконструированный капсид конъюгирован с лигандом.
10. Экспрессионный вектор по п. 8, где природный капсид представляет собой капсид AAV1, AAV2, AAV2quad(Y-F), AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, rh10, rh39, rh43, rh74, Anc80, Anc80L65, DJ/8, DJ/9, 7m8, PHP.B, PHP.eB или PHP.S.
11. Экспрессионный вектор по п. 6, где AAV представляет собой AAV2 или AAV5.
12. Экспрессионный вектор по любому из пп. 1-11, где ген-«самоубийца» содержит ген тимидинкиназы вируса простого герпеса-1 (HSV-TK), ген каспазы 9 (Casp9), ген цитозиндезаминазы, полипептид RQR85 или усеченный полипептид рецептора человеческого эпидермального фактора роста.
13. Экспрессионный вектор по п. 12, где ген-«самоубийца» представляет собой ген HSV-TK.
14. Экспрессионный вектор по п. 12, где ген-«самоубийца» представляет собой ген Casp9.
15. Экспрессионный вектор по любому из пп. 1-14, где ген-«самоубийца» кодирует аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1.
16. Экспрессионный вектор по любому из пп. 1-15, где ген-«самоубийца» представляет собой ген, который вызывает запрограммированную гибель клетки, экспрессирующей экспрессионный вектор.

17. Экспрессионный вектор по любому из пп. 1-15, где ген-«самоубийца» представляет собой ген, который стимулирует экспрессию экспрессионного вектора в клетке с последующей терминацией транскрипции или трансляции экспрессионного вектора.

18. Экспрессионный вектор по любому из пп. 1-15, где ген-«самоубийца» представляет собой ген, который вызывает снижение уровня экспрессии экспрессионного вектора в клетке, которая экспрессирует экспрессионный вектор.

19. Экспрессионный вектор по любому из пп. 1-18, где ген-«самоубийца» представляет собой индуцибельный ген-«самоубийцу».

20. Экспрессионный вектор по п. 19, где индуцибельный ген-«самоубийца» представляет собой Casp9, активируемый рапамицином.

21. Экспрессионный вектор по любому из пп. 1-20, где ген-«самоубийца» кодирует аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2.

22. Экспрессионный вектор по любому из пп. 1-21, где полипептид FGF-18 кодирует аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3.

23. Экспрессионный вектор по любому из пп. 1-22, где экспрессионный вектор дополнительно содержит регулятор транскрипции, функционально связанный с нуклеиновой кислотой, кодирующей FGF-18 или его функциональный фрагмент.

24. Экспрессионный вектор по любому из пп. 1-23, где экспрессионный вектор дополнительно содержит не-вирусную частицу.

25. Экспрессионный вектор по любому из пп. 23-24, где регулятор транскрипции содержит любой один или более из ТАТА-боксов, элемента распознавания -элемента В, элемента распознавания В фактора транскрипции II и нижерасположенного промоторного элемента.

26. Экспрессионный вектор по п. 24, где не-вирусная частица включает любое одно или более из: липидной оболочки, фосфолипидного бислоя, липосомы, нойсомы, фуллерена, наночастицы на основе белка, нанокристалла, дендримера, органического/неорганического коллоида, ПЭГилированной липосомы, полимерной мицеллы, обратной мицеллы, смешанной мицеллы, чувствительной мицеллы, многокомпонентной мицеллы или поли- или мономолекулярной дендритной мицеллы.

27. Фармацевтическая композиция, содержащая экспрессионный вектор по любому из пп. 1-16.

28. Фармацевтическая композиция по п. 27, где фармацевтическая композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или наполнитель.

29. Способ лечения заболевания хряща, где указанный способ включает введение индивидууму фармацевтической композиции по любому из пп. 27-28.

30. Способ по п. 29, где заболевание хряща представляет собой остеоартрит.

31. Способ по любому из пп. 29-30, где фармацевтическую композицию вводят внутривенно, внутрисуставно, субхондрально, интрасиновиально или интрахондрально.

32. Способ по любому из пп. 29-31, где фармацевтическую композицию вводят в синовиальное соединение.

33. Способ стимуляции пролиферации клеток-хондроцитов или клеток-предшественников хондроцитов, включающий контактирование клетки с экспрессионным вектором по любому из пп. 1-26 или с фармацевтической композицией по пп. 27-28.

34. Способ стимуляции секреции внеклеточного матрикса для замены хряща, где указанный способ включает контактирование клетки с экспрессионным вектором по любому из пп. 1-26 или с фармацевтической композицией по пп. 27-28.

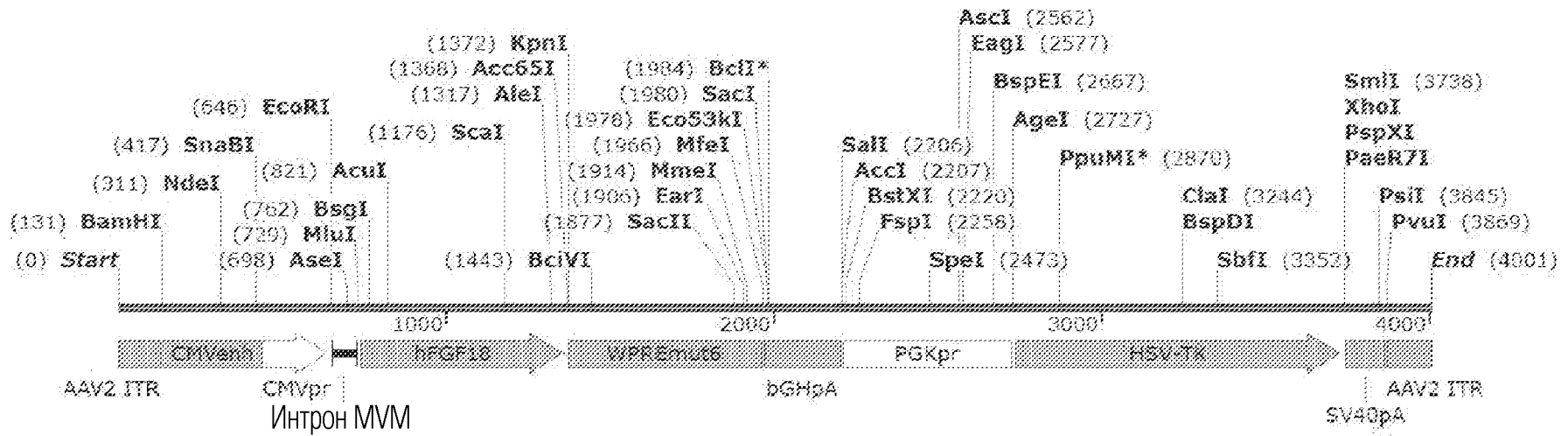
35. Способ по любому из пп. 33-34, где клетки трансфецируют или трансдуцируют *ex vivo* для экспрессии экспрессионного вектора.

36. Набор, содержащий экспрессионный вектор по любому из пп. 1-26 или фармацевтическую композицию по любому из пп. 27-28 и вкладыш в упаковку, где вкладыш в упаковку содержит инструкцию для пользователя по применению этого набора для осуществления способа по любому из пп. 29-25.

37. Набор по п. 36, где набор дополнительно содержит одну или более из: картонной коробки, пломбы для контроля вскрытия, иглы, шприца или предварительно заполненного шприца.

По доверенности

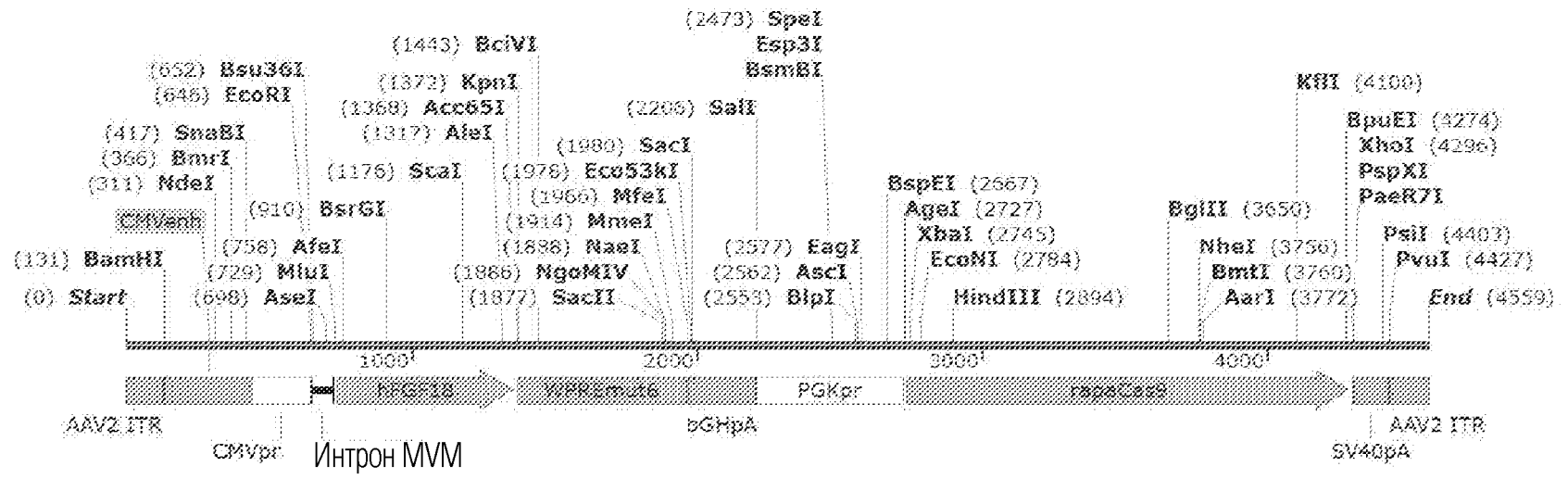
ФИГ. 1



RMB-002 (hFGF18-HSV-TK)

4001 п.о.

ФИГ. 2



RMB-001 (hFGF18-rapaCas9)
4359 п.о.