



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 170 104** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) МПК⁷ **A 61 K 48/00**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ**

(21), (22) Заявка: 98120477/14, 11.04.1997
(24) Дата начала действия патента: 11.04.1997
(30) Приоритет: 12.04.1996 US 08/631,334
(43) Дата публикации заявки: 10.09.2000
(46) Дата публикации: 10.07.2001
(56) Ссылки: US 5460831 A1, 24.10.1995. SU 880427 A, 15.11.1981. SU 1637808 A1, 30.03.1991. US 4588682 A, 13.05.1986.
(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу: 12.11.1998
(86) Заявка РСТ: US 97/07301 (11.04.1997)
(87) Публикация РСТ: WO 97/38729 (23.10.1997)
(98) Адрес для переписки: 103735, Москва, ул. Ильинка, 5/2, ООО "Союзпатент", Агурееву А.П.

(71) Заявитель: ДЗЕ РИДЖЕНТС ОФ ДЗЕ ЮНИВЕРСИТИ ОФ МИЧИГАН (US)
(72) Изобретатель: ГОУЛДСТЕЙН Стивен А. (US)
(73) Патентообладатель: ДЗЕ РИДЖЕНТС ОФ ДЗЕ ЮНИВЕРСИТИ ОФ МИЧИГАН (US)
(74) Патентный поверенный: Агуреев Александр Павлович

(54) СПОСОБЫ ПЕРЕНОСА ГЕНОВ IN VIVO ДЛЯ ЗАЖИВЛЕНИЯ РАН

(57) Изобретение относится к медицине, в частности к способу специфического "нацеливания" и переноса ДНК в репарационные клетки млекопитающих in vivo. Переносимая ДНК может включать любую ДНК, кодирующую нужный заживляющий белок, при этом репарационные клетки млекопитающих пролиферируют и мигрируют в область раны, где они активно поглощают и экспрессируют ДНК. Изобретение также

относится к фармацевтическим композициям, которые могут быть использованы при осуществлении данного изобретения для переноса нужной ДНК. Такие композиции включают любую подходящую матрицу в сочетании с нужной ДНК и наборы. Изобретение обеспечивает рациональный способ доставки белков, которые выбрасываются на месте их действия в физиологических количествах для заживления ран. 6 с. и 21 з.п.ф-лы, 12 ил.



RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 170 104** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) Int. Cl.⁷ **A 61 K 48/00**

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 98120477/14, 11.04.1997
(24) Effective date for property rights: 11.04.1997
(30) Priority: 12.04.1996 US 08/631,334
(43) Application published: 10.09.2000
(46) Date of publication: 10.07.2001
(85) Commencement of national phase: 12.11.1998
(86) PCT application:
US 97/07301 (11.04.1997)
(87) PCT publication:
WO 97/38729 (23.10.1997)
(98) Mail address:
103735, Moskva, ul. Il'inka, 5/2, OOO
"Sojuzpatent", Agureevu A.P.

(71) Applicant:
DZE RIDZheNTS OF DZE JuNIVERSITI OF
MICHIGAN (US)
(72) Inventor: GOULDSTEJN Stiven A. (US)
(73) Proprietor:
DZE RIDZheNTS OF DZE JuNIVERSITI OF
MICHIGAN (US)
(74) Representative:
Agureev Aleksandr Pavlovich

(54) **METHOD OF GENE TRANSFER IN VIVO FOR WOUND HEALING**

(57) Abstract:
FIELD: molecular biology, medicine, pharmacy. SUBSTANCE: invention relates to method of specific "targeting" and transfer of DNA in mammalian repair cells in vivo. DNA to be transferred can include any DNA encoding the required healing protein. Repairing mammalian cells proliferate and migrate to wound region where they absorb and express DNA actively. Invention relates

to also pharmaceutical compositions that can be used for transfer of required DNA. These compositions include any suitable matrix in combination with required DNA and kits. Invention provides rational method of proteins delivery which are released in the point of their action in physiological amounts required for wound healing. EFFECT: improved method of gene transfer, valuable medicinal properties. 27 cl, 8 dwg, 13 ex

1. ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к новому способу *in vivo* представления и прямого переноса ДНК, кодирующей нужный заживляющий белок в репарационных клетках млекопитающих. Данный способ включает имплантирование матрицы, содержащей нужную ДНК (в дальнейшем называемую "активированной геном матрицей"), в свежую рану. Репарационные клетки, обычно возникающие в жизнеспособной ткани, окружающей рану, пролиферируют и мигрируют в активированную генами матрицу, где они сталкиваются, поглощают и экспрессируют ДНК. Поэтому трансфецированные репарационные клетки действуют как биореакторы *in situ* (локализованные внутри раны), вырабатывающие агенты (РНК, кодированные ДНК, белки и т.д.), заживляющие рану.

Далее данное изобретение относится к фармацевтическим композициям, которые могут быть использованы при осуществлении изобретения, т.е. при переносе нужной ДНК. Такие композиции включают подходящую матрицу в сочетании с нужной ДНК.

2. УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

2.1. ЗАЖИВЛЕНИЕ РАН

Известные в настоящее время способы заживления ран включают введение заживляющих белков. Такие заживляющие белки могут включать регуляторные факторы, входящие в обычный процесс заживления, такие как системные гормоны, цитокины, факторы роста и другие белки, регулирующие пролиферацию и дифференциацию клеток. Факторы роста, цитокины и гормоны, обладающие в соответствии с описаниями такой ранозаживляющей способностью, включают, например, суперсемейство трансформирующего фактора- β роста (TGF- β) белков (Cox, D.A., 1995, Cell Biology International, 19:357-371), кислотный фибробластный фактор роста (FGF) (Slavin, J., 1995, Cell Biology International, 19:431-444), фактор, стимулирующий колонию макрофагов (M-CSF) и агенты, регулирующие кальций, такие как паратиреоидный гормон (PTH).

Использование заживляющих белков, т.е. цитокинов, для заживления ран связано с рядом проблем. Во-первых, очистка и/или рекомбинантное получение заживляющих белков зачастую является дорогим и длительным процессом. Однако несмотря на прилагаемые усилия, препараты, включающие очищенные белки, часто оказываются нестойкими при хранении и неудобными при использовании, при этом неустойчивость белков может привести к неожиданным воспалительным реакциям (на продукты распада белков), токсичным для хозяина.

Во-вторых, системная доставка заживляющих белков, т.е. цитокинов, может быть связана с серьезным нежелательным побочным действием в незатронутой ткани. Неэффективная доставка к специфическим клеткам и тканям организма требует введения больших доз белка для того, чтобы достаточное количество белка достигло соответствующей ткани-мишени. Из-за короткого периода полураспада в организме, вызванного протеолитическим распадом, введение белков также может быть

повторным, что может вызвать иммунную реакцию против заживляющих белков. Циркуляция больших доз заживляющих белков часто токсична благодаря плейотропному действию введенного белка и может вызвать серьезные побочные действия.

В-третьих, экзогенная доставка рекомбинантных белков является неэффективной. Делались попытки ограничить введение больших доз белка путем иммобилизации заживляющего белка на участке-мишени. Однако такой терапевтический подход осложняет повторное введение белка.

В-четвертых, у большого количества белков, таких как мембранные рецепторы, факторы транскрипции и внутриклеточные связывающие белки, биологическая активность зависит от правильной экспрессии и локализации в клетке. У многих белков правильная клеточная локализация происходит после трансляционного модифицирования белка внутри клеток. Поэтому такие белки не могут быть введены экзогенно таким образом, чтобы быть поглощенными и правильно локализованными внутри клетки.

Как показывают эти проблемы, современные способы использования рекомбинантных белков для заживления ран имеют ряд недостатков, поскольку они не имеют рационального способа доставки экзогенных белков. Эти белки, т.е. цитокины, обычно вырабатываются на месте их действия в физиологических количествах и эффективно доставляются к клеточным поверхностным сигнальным рецепторам.

2.2. ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ

Генная терапия изначально задумывалась как терапия по специфическому замещению генов с целью исправления наследуемых дефектов для доставки функционально активных заживляющих генов в клетки-мишени. Первоначальные разработки в соматической генной терапии основывались на косвенных средствах введения генов в ткани, называемых генной терапией *ex vivo*, т.е. клетки-мишени удаляют из организма, трансфецируют и инфицируют посредством векторов, несущих рекомбинантные гены, и имплантируют обратно в организм ("аутогенный перенос клеток"). В настоящее время существуют методы трансфекции для переноса ДНК в клетки *in vitro*, включая кальциево-фосфатное осаждение ДНК, трансфекцию

диэтиламиноэтилом-декстраном, электропорацию, перенос ДНК посредством липосом или трансдукцию с помощью рекомбинантных вирусных векторов. Такие протоколы, описывающие обработку *ex vivo*, были предложены для переноса ДНК во многие различные виды клеток, включая эпителиальные клетки (патент США 4868116; Morgan and Mulligan WO 87/00201; Morgan et al., 1987, Science 237: 1476-1479; Morgan and Milligan, патент США N 4980286), эндотелиальные клетки (WO 89/05345), гепатоциты (WO 89/07136; Wolff et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3344-3348; Ledley et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. 84: 5335-5339; Wilson and Mulligan, WO 89/07136; Wilson et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. 87: 8437-8441), фибробласты (Palmer et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci.

USA 84:1055-1059; Anson et al., 1987, Mol. Biol. Med. 4: 11-20; Rosenberg et al., 1988, Science 242:1575-1578; Naughton & Naughton, патент США 4 963 489), лимфоциты (Anderson et al., патент США N 5 399 346; Blaese, R. M., et al., 1995, Science 270:475-480) и кроветворные стволовые клетки (Lim, B., et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8892-8896; Anderson et al., патент США N 5399346).

Недавно был осуществлен прямой перенос генов *in vivo* препаратами, включающими захваченную липосомами ДНК (Ledley et al., 1987, J. Pediatrics 110: 1); или протеолипосомами, содержащими белки рецептора вирусных оболочек (Nicolau et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. США 80:1068); а также ДНК, присоединенные к комплексу полилизинного-гликопротеинового носителя. Кроме того, для доставки генов в клетки используют "генные шприцы" (Австралийский патент N 9068389). Высказывалось даже предположение о том, что "оголенная" ДНК или ДНК, связанная с липосомами, может быть включена в состав растворов жидкого носителя для инъектирования в межстеночное пространство для переноса ДНК в клетки (Felgner, WO 90/11092).

Возможно, одной из самых больших проблем, связанных с последними разработками методов генной терапии *ex vivo* или *in vivo*, является невозможность эффективного переноса ДНК в популяцию клеток-мишеней и достижения высокого уровня экспрессии генного продукта *in vivo*. Наиболее эффективной системой считаются вирусные векторы; рекомбинационные репликационно-дефективные вирусные векторы используют для трансдукции, т.е. инфицирования, клеток как *ex vivo*, так и *in vivo*. Такие векторы включают ретровирусные, аденовирусные и аденоассоциированные векторы, а также вирусные векторы герпеса. Несмотря на высокую эффективность передачи генов, основные недостатки, связанные с использованием вирусных векторов, включают неспособность многих вирусных векторов инфицировать неделимые клетки; проблемы, связанные с инсерционным мутагенезом; воспалительные реакции на вирус и выработку потенциального вируса-хелпера и/или выработку и передачу опасных вирусов другим пациентам.

Помимо низкой способности большей части видов клеток поглощать и экспрессировать чужую ДНК, многие популяции клеток-мишеней присутствуют в организме в таких небольших количествах, что эффективность представления ДНК специфически нацеленным видам клеток еще более снижается. В настоящее время не существует протокола или способа повышения эффективности, в котором ДНК нацеливалась бы на популяцию клеток-мишеней.

3. СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к новому способу специфического нацеливания и переноса ДНК в репарационные клетки млекопитающих, принимающие участие в заживлении ран для экспрессирования терапевтических продуктов в рану. Способ по данному изобретению включает введение активированной генами матрицы в свежую рану в организме. В таких условиях репарационные клетки локализуются у раны,

где они трансфецируются и в результате вырабатывают агенты, кодированные ДНК (РНК, белки и т.д.), улучшающие заживление раны.

Данное изобретение частично основано на открытии того факта, что репарационные клетки, принимающие активное участие в процессе заживления ран, пролиферируют и мигрируют из окружающей ткани в рану и инфильтрируют активированную генами матрицу. Матрица играет роль строительных лесов, способствующих вращению клеток, и, в свою очередь, передаче генов путем локального накопления репарационных клеток вблизи ДНК. Находясь в матрице, репарационные клетки удивительно эффективно поглощают ДНК и экспрессируют ее в виде продуктов транскрипции, т.е. белков, или продуктов транскрипции, т.е. антисенсов и рибозимов. Трансфецированные репарационные клетки в дальнейшем служат локальными биореакторами, усиливая выработку генного продукта *in vivo*.

Несмотря на то, что в данном способе может быть использовано любое количество последовательностей ДНК, предпочтительно последовательностями ДНК являются последовательности, кодирующие продукты трансляции, т.е. белки, или продукты транскрипции, т.е. антисенсы или рибозимы, которые (а) способствуют репарации тканей; или (б) способны прервать болезненный процесс, обеспечивая таким образом нормальное заживление ткани.

Данное изобретение устраняет недостатки используемых в настоящее время процедур для заживления ран, включающих введение заживляющих белков. Во-первых, устойчивая и нетоксичная ДНК может быть безопасно введена в больших дозах *in vivo*. Во-вторых, при возможности не требуется повторное введение. Клетки, поглощающие и экспрессирующие ДНК, обеспечивают запас генного продукта в области раны. В-третьих, данное изобретение может быть использовано таким образом, чтобы удовлетворить временным требованиям дозировки. Например, ДНК может быть представлена в векторах, интегрирующих в геном клетки-мишени. В этом случае все дочерние клетки содержат и экспрессируют перенесенную ДНК, действуя таким образом как непрерывный источник терапевтического агента. В противоположность этому, могут быть использованы неинтегрирующие системы, в которых ДНК не интегрирует в геном и ген не передается дочерним клеткам. В таком случае, когда процесс заживления раны завершен и генный продукт более не нужен, он не экспрессируется.

Данное изобретение иллюстрируется примерами, показывающими, что гены могут быть воспроизводимо перенесены и экспрессированы в большом количестве раненых мягких и твердых тканей *in vivo*. В частности, показано, что способ по данному изобретению снимает проблемы, связанные с имеющимися в настоящее время протоколами по генной терапии. Способ по данному изобретению обеспечивает перенос генов к соответствующему количеству репарационных клеток для достижения функционального действия, т. е. при отсутствии любого другого нацеливания или клеточной идентификации врачом. Способы *in vivo*

генной терапии требуют некоторой формы нацеливания, которая очень часто не срабатывает. В способе по данному изобретению нацеливание не представляет собой проблему. По аналогии, ДНК действует весьма похоже на "приманку" в "ловушке": ДНК сталкивается со случайными репарационными клетками, пролиферирующими, а затем мигрировавшими в активированную генами матрицу. Эти клетки, в свою очередь, обладают удивительной способностью захвата ДНК и экспрессирования ее в виде терапевтического агента.

В соответствии с одним из вариантов осуществления изобретения способ по данному изобретению может быть использован в качестве системы для доставки лекарственных препаратов путем переноса ДНК в репарационные клетки млекопитающих с целью стимулирования заживления мягких и твердых тканей, а также их регенерации. Репарационными клетками являются такие клетки, которые обычно прибывают в область заживляемой раны. Соответственно, не возникает трудности, связанной с получением подходящих клеток-мишеней, на которые должны воздействовать используемые терапевтические композиции. Все что требуется - это имплантация активированной генами матрицы в области раны. Природа этого биологического окружения такова, что соответствующие репарационные клетки активно поглощают и экспрессируют ДНК-"приманку" при отсутствии какого-либо дальнейшего нацеливания или клеточной идентификации, проводимой практическим врачом.

В другом варианте осуществления изобретения способ по данному изобретению, использующий как биологические, так и синтетические матрицы, может быть использован для переноса ДНК в репарационные клетки млекопитающих с целью стимулирования скелетной регенерации. В следующем варианте осуществления изобретения способ по данному изобретению, использующий как биологические, так и синтетические матрицы, может быть использован для переноса ДНК в репарационные клетки млекопитающих с целью стимулирования заживления связок и сухожилий. Далее, способ по данному изобретению, использующий как биологические, так и синтетические матрицы, может быть использован для переноса ДНК в репарационные клетки млекопитающих с целью стимулирования заживления скелетных мышц и/или кровеносных сосудов.

ДНК, используемая при осуществлении данного изобретения, может включать любые кодируемые ДНК трансляционные продукты (т.е. белки) или транскрипционные продукты (т.е. антисенсы или рибозимы), способствующие заживлению тканей или способные прервать процесс заболевания. Например, ДНК может включать гены, кодирующие терапевтически полезные белки, такие как факторы роста, цитокины, гормоны и т.д. Кроме того, ДНК может кодировать антисмысловые или рибозимные молекулы, которые могут ингибировать трансляцию белков, кодирующих мРНК, ингибирующих заживление раны или вызывающие воспаление.

ДНК, кодирующая нужный терапевтический

продукт, ассоциируется с матрицей или импрегнируется внутри нее, образуя активированную генами матрицу. После образования активированная генами матрица находится в организме млекопитающего в области раны.

Данное изобретение иллюстрируется примерами, показывающими эффективный перенос и экспрессию генов *in vivo* в заживающую и регенерирующую ткань.

3.1. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Следующие термины имеют в данном описании нижеприведенные значения.

"Активированная геном матрица" (GAM) означает в данном описании любой матричный материал, содержащий ДНК, кодирующую нужный терапевтический агент. Например, активированные генами матрицы располагаются в организме хозяина-млекопитающего в области раны, способствуя ее заживлению.

"Репарационная клетка" означает в данном описании любую клетку, стимулируемую к миграции и пролиферации в ответ на повреждение ткани. Репарационные клетки являются компонентом заживляющей ответной реакции раны. Такие клетки включают фибробласты, капиллярные эндотелиальные клетки, капиллярные перициты, мононуклеарные воспалительные клетки, сегментированные воспалительные клетки и гранулированные тканевые клетки.

"Область раны" означает любой участок в хозяине, возникающий в результате травматического повреждения тканей или же, наоборот, в результате повреждения тканей во время хирургических процедур.

4. ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фиг. 1А. Модель бедренной остеотомии несращения волокон. Хирургическим способом проводят 5-мм остеотомию бедра взрослых изъятых самцов крыс породы Sprague-Dawley. Показанные зазоры характерны для всей контрольной группы, при этом хозяевам-млекопитающим проводят либо только остеотомию (n=3), остеотомию с коллагеновой губкой (n=10) или остеотомию с коллагеновой губкой, содержащей контрольную (ген-маркер) плазмиду ДНК (n=23). Простой рентгеновский снимок, показывающий бедро контрольной крысы сразу же после операции. Зазор стабилизируют с помощью наружного фиксатора, состоящего из пластинки и 4 штифтов. Разрез кожи закрывают металлическими клипсами.

Фиг. 1В. Простой рентгеновский снимок, показывающий остеотомию бедра контрольной крысы через 9 недель после операции. Закругленные хирургические края (стрелки) возникают в результате реактивного костного образования и согласуются с классическим радиографическим проявлением несросшегося перелома.

Фиг. 1С. Гистологический разрез ткани зазора через 3 недели после операции, показывающий пролиферативные репарационные фибробласты и капилляры, внедренные в отечную внеклеточную матрицу. Также присутствует фокальный воспалительный инфильтрат, состоящий из лимфоцитов и макрофагов.

Фиг. 1D. Гистологический разрез 9-недельного контрольного зазора, показывающий плотную фиброзную ткань. 1

см = 20 μ м (C и D).

Фиг. 2. Схематическое изображение конструкции pGAM1, кодирующей мышинный BMP-4. Показано положение промотора CMV, последовательности, кодирующей BMP-4, эпитопа HA и сигнала полиаденилирования бычьего гормона роста.

Фиг. 3А. Экспрессия BMP-4 репарационными фибробластами. Экспрессию BMP-4, кодируемую плазмидой, выявляют на фиксированных по способу Bouins, деминерализованных, внедренных с помощью парафина срезах ткани, используя анти-HA антитело и иммуноперекисный метод, через 4 недели после имплантации активированной генами матрицы, содержащей плазмидную ДНК pGAM1. Стрелки указывают на примеры позитивного (красно-коричневого) окрашивания фибробластной цитоплазмы (микроснимок слева вверху). Эти клетки идентифицируют как фибробласты на основе морфологии веретен, росте пучка и позитивного иммуноокрашивания проколлагена, тип I (не показано). Серийные срезы, инкубированные с неиммунной сывороткой кролика или без первого антитела, являются отрицательными. Отрицательные результаты также получают на контрольных образцах с ложной операцией (только коллагеновая губка), инкубированных с анти-HA.11 антителом (микроснимок справа вверху). Ложное положительное окрашивание макрофагов, остеокластов и остеобластов постоянно наблюдают на контрольных срезах, инкубированных с антителом HA.11. Островок новообразовавшейся кости через 3 недели после переноса pGAM1 показан на микроснимке внизу слева. Новая кость связана с образованием грануляционной ткани. Увеличенный вид новообразовавшейся кости показан на микроснимке внизу справа. Стрелки показывают на предположительные остеобласты на поверхности новых костных трабекул. Ткани зазоров окрашивают, используя гематоксилин и эозин (верхний микроснимок или трихроматическим способом Gomori) (богатые коллагеном ткани окрашиваются в зеленый цвет, нижние микроснимки). 1 см - 20 мм (верхние микроснимки).

Фиг. 3В. Простые рентгенограммы животного (через 23 недели после операции). На рентгенограмме слева стрелки показывают приблизительное расположение остеотомического зазора, заполненного радиоплотной тканью. Следует отметить, что наружный фиксатор убран. Как показано на пестром рисунке, происходит ремоделирование кости. Кончики стрелок показывают дефекты в кости, прилежащей к зазору (последствие размещения штифтов). Два дистальных отверстия от штифтов к этому времени полностью зажили (не показано). Вся фотография, помещенная справа, показывает срез ткани, окрашенной трихроматическим способом Gomori с зазора животного (после умерщвления). Стрелки показывают на зазор, который теперь находится на поверхности хорошо интегрированной кортикальной части кости. Круглые дефекты в области костного мозга (или в области зазора) образуются в результате размещения самых глубоких штифтов фиксатора. Нарушение ткани в нижней части микрограммы является артефактом, возникшим в результате

обработки образца.

Фиг. 4А. Схематическое изображение конструкции pGAM2, кодирующей человеческий PTH1-34. Показано положение верхнего длинного концевой повтора, ведущего экспрессию PTH1-34 (стрелка), кодирующей последовательности PTH1-34, промотора SV40, ведущего неоэкспрессию (стрелка), неокодирующей последовательности, последовательностей pBR и нижнего длинного концевой повтора.

Фиг. 4В. Перенос и экспрессия гена PTH1-34 вызывает новообразование кости in vivo. Простая рентгенограмма показывает новый костный мостик 5-мм остеотомического зазора через 9 недель после имплантации в животное, получившее активированную генами матрицу, содержащую плазмиду ДНК pGAM2. Стрелки показывают на радиоплотную ткань в зазоре. Результаты, приведенные в данном случае, характерны для экспериментов с одним дополнительным животным.

Фиг. 5. Новое костное образование in vivo с помощью двухплазмидной активированной геном матрицы. (Верх) Простая рентгенограмма показывает новый костный мостик 5-мм зазора через 4 недели после имплантации в животное, получившее активированную генами матрицу, содержащую pGAM1 плюс плазмидную ДНК pGAM2. Стрелки показывают на радиоплотную ткань в зазоре (гистологически подтвержденную как кость). (Низ) Простая рентгенограмма зазора показана на фото вверху после удаления (пятью неделями ранее; в целом через 17 недель после операции) наружного фиксатора. Стрелки показывают расположение зазора, заполненного радиоплотной тканью, за исключением полосы недоминерализованной ткани вблизи проксимального хирургического края. Как показано на пестром участке, происходит экстенсивная реакция ремоделирования. Результаты, приведенные в данном случае, характерны для экспериментов с одним дополнительным животным.

Фиг. 6. Аденовирусно-опосредованный перенос генов в репарационные/регенерационные клетки in vivo. Имплантат UltraFiber™ замачивают в течение 6 минут в растворе вируса AdCMV1acZ (10^{10} - 10^{11} бляшкообразующие единицы или PFU/мл), а затем имплантируют на участок остеотомии. Дефекту дают возможность зажить в течение 3 недель, наблюдая в течение этого времени ход процесса заживления раны путем еженедельного рентгенографического исследования. Через 3 недели определяют, что 40% дефекта заполнено мозольной тканью. Хозяина-млекопитающего умерщвляют, ткани закрепляют фиксацией по методу Bouins, а затем деминерализуют в течение 7 дней, используя стандартные растворы муравьиной кислоты. Делают фотомикроснимки поперечного сечения новой кости (мозоль), образовавшегося на месте остеотомии через 3 недели после операции. Снимок слева вверху: следует отметить положительное (красное) β -гал цитоплазматическое окрашивание клеток мозольной ткани от аденовирусного имплантата UltraFiber™. Этот результат показывает, что рецепторы поверхности клеток, передающие инфекцию, а

следовательно, и вирусную трансдукцию, экспрессируются (по крайней мере одна популяция) мозольными клетками во время процесса заживления перелома. Снимок слева сверху: серийный отрицательный контроль среза, окрашенный носителем β -гал антитела плюс смесь неспецифических антител LgG кролика. Снимок внизу: следует отметить положительное (красное) β -гал ядерное окрашивание хондроцитов на участке остеотомии, заполненном UltraFiber™ и AdRSVntlacZ. Этот результат показывает полную специфичность анти- β -гал антитела и окончательно демонстрирует экспрессию продукта гена-маркера в остеотомическом зазоре.

Фиг. 7. Перенос гена плазмиды pGAM2 к репаративным фибробластам приводит к росту новой кости на модели остеотомии у крысы. Простая рентгенограмма показывает новый костный мостик 5-мм зазора через 6 недель после имплантации в животное, получившее активированную генами матрицу, содержащую pGAM1 плюс плазмидную ДНК pGAM2. Стрелки показывают на радиоплотную ткань в зазоре (гистологически подтвержденную как кость).

5. СВЕДЕНИЯ, ПОДТВЕРЖДАЮЩИЕ ОСУЩЕСТВИМОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к способу представления и переноса ДНК in vivo в репаративные клетки млекопитающих с целью экспрессирования терапевтических агентов. Способ по данному изобретению включает имплантирование или размещение активированной геном матрицы в область свежей раны.

Заживление ран обычно представляет собой координированную, стереотипную последовательность событий, включающих (а) разрыв ткани и потерю ее нормального строения; (б) некроз клеток и кровоизлияние; гемостаз (образование сгустков); (с) инфильтрацию сегментированных и мононуклеарных воспалительных клеток с сосудистым застоем и отеком тканей; (d) растворение сгустка, а также поврежденных клеток и тканей мононуклеарными клетками (макрофаги) и (е) образование грануляционной ткани (фиброплазия и ангиогенез). Эта последовательность клеточных явлений наблюдается в ранах в отношении всех тканей и органов в большом количестве видов млекопитающих (Gaillet et al., 1994, Curr. Opin. Cell. Biol. 6: 717-725). Поэтому вышеописанная клеточная последовательность является универсальной при заживлении всех тканей млекопитающих.

Данное изобретение основано на открытии того факта, что репаративные клетки, принимающие участие в процессе заживления раны, естественно пролиферируют и мигрируют в область повреждения тканей и инфильтруют активированную генами матрицу. Удивительно, что эти репаративные клетки, которые обычно трудно успешно трансфектировать in vitro или in vivo, чрезвычайно эффективно поглощают и экспрессируют ДНК при активировании пролиферации процессом заживления ран.

Используя эту особенность, способы по данному изобретению направлены на эффективный перенос одной или нескольких молекул ДНК, кодирующей терапевтические агенты, к пролиферирующим репаративным

клеткам. Способы включают введение активированной генами матрицы, содержащей продукты трансляции, кодируемые ДНК (т.е. заживляющие белки) или продукты транскрипции (т.е. антисенсы или рибозимы), в млекопитающее хозяина в области раны. Рана может возникнуть в результате травматического повреждения тканей или, наоборот, в результате повреждения тканей во время хирургических процедур.

Поскольку пролиферирующие репаративные клетки мигрируют в активированную генами матрицу и контактируют с ней, они поглощают и экспрессируют нужную ДНК, таким образом увеличивая количество терапевтического вещества, белка или РНК. При этом трансфектированные репаративные клетки служат локальными биореакторами, вырабатывающими терапевтические вещества, действующие на локальную репаративную среду. Например, факторы роста или цитокины, вырабатываемые трансфектированными репаративными клетками, связывают и стимулируют эффекторные клетки-мишени, экспрессирующие рецепторы поверхности родственных клеток, таким образом стимулируя и усиливая цепь физиологических явлений, обычно ассоциируемых с процессом заживления ран.

Альтернативно, репаративные клетки могут поглощать и экспрессировать белки, кодируемые ДНК, которые ингибируют активность антагонистов процесса заживления ран. ДНК может также кодировать антисмысловые или рибозимные молекулы РНК, которые могут быть использованы для ингибирования трансляции мРНК, кодирующих воспалительные белки или другие факторы, ингибирующие заживление ран или вызывающие излишний фиброз.

Активированная генами матрица по данному изобретению может быть использована в организме пациента в соответствии с различными способами. Например, при стимулировании заживления и регенерации ран матрицы помещают непосредственно в область раны, т.е. полую кость, поврежденную соединительную ткань и т.д. При заживлении кожи матрицы находят местное применение. При использовании для регенерации органов матрицы хирургическим путем помещают в рану на органе.

Поскольку способ по данному изобретению основан на естественной миграции и пролиферации репаративных клеток в область раны, а также инфильтрации в активированную генами матрицу, расположенную в области раны, с последующим поглощением ДНК, следует указать, что матрицы должны применяться в организме только после индуцирования процесса заживления ран.

Важной особенностью настоящего изобретения является тот факт, что репаративный процесс может быть проведен таким образом, чтобы привести к образованию либо рубцовой ткани и/или регенерации ткани. Например, сверхэкспрессия заживляющих белков в области раны может привести к регенерации поврежденной ткани без образования рубцовой ткани. Во многих случаях, например, таких как заживление

костей, такая регенерация желательна, потому что рубцовая ткань не лучшим образом предназначена для выполнения обычных механических функций. Альтернативно, может возникнуть необходимость образования вокруг шва рубцовой ткани для соединения изначально слабой ткани. Следовательно, способы по данному изобретению могут быть использованы для стимулирования ран с образованием рубцовой ткани или без него в зависимости от вида и уровня экспрессируемых заживляющих белков.

Прямой перенос плазмидной ДНК из матрицы в репарационную клетку млекопитающего путем стимулирования процесса заживления ран имеет ряд преимуществ. Во-первых, легкость получения и очистки конструкций ДНК говорит в его пользу по сравнению со стоимостью традиционного способа получения белка. Во-вторых, матрицы могут действовать как строительные леса, способствуя вращению и пролиферации клеток. Таким образом, они облегчают нацеливание репарационных клеток для переноса генов. В-третьих, прямой перенос генов может оказаться преимущественным способом доставки лекарственных веществ в молекулы, обычно подвергающиеся комплексной биосинтетической обработке, или в рецепторы, которые должны быть правильно размещены в клеточной мембране. Эти виды молекул окажутся недееспособными при экзогенной доставке в клетки.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям, включающим содержащие ДНК матрицы, используемые для заживления ран. Композиции по данному изобретению обычно состоят из биосовместимого или совместимого с костями матричного материала, содержащего ДНК, кодирующую нужный заживляющий белок.

Данное изобретение устраняет недостатки, связанные с используемыми в настоящее время рекомбинантно-белковыми методами заживления ран. Во-первых, прямой перенос генов является рациональным, что позволяет трансфецированным клеткам (а) вырабатывать физиологическое количество заживляющего белка, модифицированного в соответствии со специфической тканью и средой, и (b) доставлять этот белок к соответствующему сигнальному рецептору на поверхности клетки в соответствующих условиях. По вышеизложенным причинам ожидается, что экзогенная доставка таких молекул связана с серьезными проблемами по дозировке и доставке. Во-вторых, там, где это возможно, при использовании технологии активированной генами матрицы повторное введение не требуется: поглощение ДНК клетками может точно контролироваться с помощью хорошо разработанной технологии непрерывной доставки или, наоборот, интеграция трансфецированной ДНК может быть связана с длительной экспрессией рекомбинантного белка.

Способ по данному изобретению может быть универсально применен для заживления ран, включающих множество различных клеток, тканей и органов; репарационные клетки грануляционной ткани (Gaillet et al., 1994, Curr. Opin. Cell. Biol. 6: 717-725) "нацелены" при использовании способа по

данному изобретению. В данном случае изобретение демонстрируется на трех моделях животных (собака, крыса и кролик) и пяти тканях (костной, сухожилий, связок, кровеносно-сосудистой и скелетно-мышечной) с использованием трех генов-маркеров (β-галактозидаза, люцифераза и щелочная фосфатаза), трех систем промоторов (CMV, RSV, LTR и SV40), двух видов матриц (биологической и синтетической). Во всех случаях репарационные клетки, мигрировавшие в активированную генами матрицу, успешно трансфицируются. В частности, функциональный выход (рост костей) показан после переноса генов в репарирующие фибробласты плазмидной конструкции, кодирующей либо BMP-4, действующий как сигнально-трансдуцирующий переключатель для дифференциации и роста остеобластов (Wozney, 1992, Mol. Reprod. Dev. 32:160-167; Reddi, 1994, Curr. Opin. Genet. Deve. 4:737-744), либо PTH-34, рекрутирующий предшественники остеоклеток (Orloff, et al., 1992, Endocrinology 131:1603-1611; Dempster et al., 1995, Endocrin. Rev. 4:247-250).

5.1. АКТИВИРОВАННАЯ ГЕНАМИ МАТРИЦА

Любой биосовместимый матричный материал, содержащий ДНК, кодирующую нужное терапевтическое вещество, такое как продукт трансляции, т.е. заживляющие белки, или продукты транскрипции, т.е. антисенсы или рибозимы, может быть получен и использован в соответствии с данным изобретением.

Активированные генами матрицы по данному изобретению могут быть получены из любого биосовместимого материала. Такие материалы могут включать, но не ограничиваются ими, биоразлагаемые или небiorазлагаемые материалы, изготовленные в виде "подмостков", поддерживающих присоединение и рост клеток, порошки или гели. Матрицы могут быть изготовлены из синтетических полимеров или натуральных белков, таких как коллаген, других внеклеточных матричных белков или иных структурных макромолекул.

ДНК, внедренная в матрицу, может кодировать любой из различных заживляющих белков в зависимости от предполагаемого терапевтического применения. Такие белки могут включать факторы роста, цитокины, гормоны или любые другие белки, способные регулировать рост, дифференцирование или физиологическую функцию клеток. ДНК может также кодировать антисмысловые или рибозимные молекулы, ингибирующие трансляцию белков, которые ингибируют заживление ран и/или вызывают воспаление.

Нет необходимости интегрировать перенесенную ДНК в геном клетки-мишени; на самом деле, использование неинтегрирующейся ДНК в активированной генами матрице является предпочтительным вариантом осуществления данного изобретения. Таким образом, после завершения процесса заживления раны и прекращения необходимости в генном продукте этот продукт не экспрессируется.

Терапевтические наборы, содержащие биосовместимую матрицу и ДНК, являются еще одним аспектом данного изобретения. В некоторых случаях наборы содержат заранее приготовленные активированные генами

матрицы, таким образом давая возможность врачу непосредственно вводить матрицу в организм. Альтернативно, указанные наборы могут содержать компоненты, необходимые для получения активированной генами матрицы. В таких случаях врач может соединять компоненты для получения активированных генами матриц, которые могут быть затем использованы для терапевтических целей путем введения в организм. В соответствии с вариантом осуществления данного изобретения матрицы могут быть использованы для нанесения покрытий на хирургические материалы, такие как шовные материалы или имплантаты. В соответствии со следующим вариантом осуществления данного изобретения активированные генами матрицы могут включать готовые к использованию губки, трубки, перевязочные средства, лиофилизированные компоненты, гели, накладки или порошки и прокладки из тефлы.

5.1.1. МАТРИЧНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

В соответствии с одним из аспектов данного изобретения получают композиции, в которых ДНК, кодирующая нужное терапевтическое вещество, связана или импрегнирована внутри матрицы для получения активированной генами матрицы. Состав матрицы предназначен для (i) облегчения врастания репаративных клеток (нацеливания); и (ii) принятия ДНК (доставка). После получения активированной генами матрицы ее сохраняют для будущего использования или немедленно помещают в область раны.

Тип матриц, которые могут быть использованы в композициях, устройствах и способах по данному изобретению, практически неограничен и может включать как биологические, так и синтетические матрицы. Матрица обладает всеми характеристиками, обычно связываемыми с биосовместимостью, поскольку она имеет форму, не вызывающую побочного, аллергического или другого нежелательного действия при введении в млекопитающее-хозяина. Такие матрицы могут быть изготовлены как из натуральных, так и синтетических материалов. Матрицы могут не быть биоразлагаемыми в тех случаях, когда желательно постоянное присутствие структур в организме, или биоразлагаемыми в тех случаях, когда экспрессия заживляющего белка требуется всего лишь на короткий период времени. Матрицы могут иметь вид губок, имплантатов, трубок, прокладок из тефлы, перевязочных средств, повязок, прокладок, лиофилизированных компонентов, гелей, накладок, порошков или мельчайших частиц. Кроме того, матрицы могут быть изготовлены таким образом, чтобы обеспечивать непрерывную выработку ДНК в течение длительных периодов времени.

Выбор матричного материала зависит от конкретных обстоятельств и области обрабатываемой раны. Могут быть использованы матрицы, описанные в патенте США 5270300, приводимом в данном описании в качестве ссылки. Как хорошо известно специалистам в данной области, при выборе матрицы учитываются физические и химические характеристики, такие как, например, биосовместимость, биологическая

разлагаемость, прочность, ригидность, свойства интерфейса и даже косметический внешний вид. Соответствующие матрицы как доставляют молекулу ДНК, так и выполняют роль "подмостков" in situ, через которые могут мигрировать репаративные клетки млекопитающих.

В тех случаях, когда матрицы должны действовать в течение длительного периода времени, могут быть использованы бионеразлагаемые матрицы, такие как агломерированный гидроксиапатит, биостекло, алюминаты, другие биокерамические и металлические материалы, особенно титан. Подходящая керамическая система доставки описана в патенте США 4596574, приводимая в данном описании в качестве ссылки. Состав биокерамических материалов может быть изменен, как, например, кальций-алюминат-фосфат; и они могут быть обработаны для модификации конкретных физических и химических характеристик, таких как размер пор, размер частиц, форма частиц и биологическая разлагаемость. Могут быть также использованы полимерные матрицы, включая полимеры акрилового эфира и молочной кислоты, как описано в патентах США 4521909 и 4563489, соответственно, каждый из которых приводится в данном описании в качестве ссылки. Конкретные примеры используемых полимеров включают ортоэфиры, ангидриды, пропилен-кофумараты либо полимер одной или нескольких мономеров γ -гидроксикарбоновой кислоты, например, γ -гидроксизолотой кислоты (гликолевая кислота) и/или γ -гидроксипропионовой кислоты (молочная кислота).

Особо важным аспектом настоящего изобретения является его применение в связи с ортопедическими имплантатами и интерфейсами, а также искусственными суставами, включая сами имплантаты и функциональные части имплантата, такие как, например, хирургические винты, штифты и т.п. Предполагается, что в предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения металлическая поверхность или поверхности имплантата, или его части, такой как титановая поверхность, покрывается материалом, обладающим аффинностью по отношению к нуклеиновым кислотам, наиболее предпочтительно, гидроксил апатитом, а нанесенный позднее металл далее покрывают геном или нуклеиновой кислотой, подлежащей переносу. Имеющиеся химические группы абсорбирующего материала, такого как гидроксил апатит, могут быть использованы в готовом виде для контроля его аффинности по отношению к нуклеиновым кислотам, как известно специалистам в данной области.

Предполагается, что в предпочтительных вариантах осуществления изобретения биоразлагаемая матрица окажется наиболее полезной. Биоразлагаемой матрицей обычно считают матрицу, способную вновь абсорбироваться организмом. Потенциальные биоразлагаемые матрицы, используемые в связи с веществами, устройствами и способами по данному изобретению, включают, например, биоразлагаемый и химически определенный сульфат кальция, трикальций фосфат, гидроксиапатит, полимолочную кислоту, полиангидриды,

матрицы очищенных белков и полуочищенные внеклеточные матричные композиции.

Другие биосовместимые биоразлагаемые полимеры, которые могут быть использованы, хорошо известны специалистам и включают в качестве примеров, а не ограничения, полиэфиры, такие как полигликолиды, полилактиды и сополимеры полимолочной-полигликолевой кислоты ("PLGA") (Langer and Folkman, 1976, Nature, 263: 797-800); полиэфиры, такие как поликапролактон ("PCL"); полиангидриды; полиалкил цианоакрилаты, такие как н-бутил цианоакрилат и изопропилцианоакрилат; полиакриламиды; поли-(ортоэфиры); полифосфазены; полипептиды; полиуретаны, а также смеси таких полимеров.

Следует отметить, что буквально каждый полимер, который известен в настоящее время или который будет разработан в будущем, подходящий для непрерывного или контролируемого выделения нуклеиновых кислот, может быть использован в данном изобретении.

В предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения биосовместимым биоразлагаемым полимером является сополимер гликолевой кислоты и молочной кислоты ("PLGA"), имеющий соотношение между единицами молочной и гликолевой кислоты приблизительно от 100/0 до 25/75. Средняя молекулярная масса ("MW") полимера обычно колеблется от приблизительно 6000 до 700000 и, предпочтительно, от приблизительно 30000 до 120000, как показывает гель-хроматография с использованием промышленно выпускаемого полистирола, имеющего стандартный молекулярный вес и характеристическую вязкость от 0,5 до 10,5.

Продолжительность периода постоянного и контролируемого выделения нуклеиновых кислот из матрицы в соответствии с настоящим изобретением в большей степени будет зависеть от молекулярной массы полимера и композиционного соотношения молочной кислоты к гликолевой кислоте. В основном более высокое отношение молочной кислоты к гликолевой кислоте такое как, например, 75/25, будет способствовать более длительному периоду контролируемого постоянного выделения нуклеиновых кислот, с другой стороны, более низкое отношение молочной кислоты к гликолевой кислоте будет способствовать более быстрому выделению нуклеиновых кислот. Предпочтительное соотношение молочной кислоты к гликолевой кислоте составляет 50/50.

Продолжительность периода постоянного или контролируемого выделения также зависит от молекулярной массы полимера. В целом полимер с более высокой молекулярной массой обеспечивает более длительный период контролируемого или постоянного выделения. В случае получения, например, матриц, обеспечивающих контролируемое или постоянное выделение в течение приблизительно трех месяцев при соотношении молочной кислоты к гликолевой кислоте 100/0, предпочтительная средняя молекулярная масса полимера составляет приблизительно от 7000 до 25000; при 90/10 - приблизительно от 6000 до 30000; и при 80/20 - приблизительно от 12000 до 30000.

Другим видом биоматериала, который

может быть использован, является подслизистая основа тонких кишок (SIS). Материал для трансплантата SIS может быть получен из сегмента тощей кишки взрослых свиней. Отделение образцов ткани может быть проведено в соответствии с обычными способами отбора культур тканей, как описано в Badybak et al., 1989, J. Surg. Res. 47:74-80. Материал SIS получают путем удаления мезентериальной ткани, инверсии сегмента с последующим удалением слизистой оболочки и поверхностной подслизистой основы методом механической абразии. После придания сегменту первоначальной ориентации серозный и мышечный слои промывают и хранят для дальнейшего использования.

Другим конкретным примером подходящего материала является фиброзный коллаген, который после экстракции и частичной очистки от ткани может быть лиофилизирован, а затем стерилизован. Матрицы также могут быть получены из сухожильного или дермального коллагена, а также из различных промышленных материалов, выпускаемых, например, Sigma and Collagen Corporation. Коллагеновые матрицы могут быть также получены в соответствии с описаниями патентов США 4394370 и 4975527, каждый из которых приводится в данном описании в качестве ссылки.

Кроме того, для осуществления данного изобретения могут быть использованы решетки, изготовленные из коллагена и гликозаминогликана (GAG), как описано в Yannas & Burke, патент США 4505266. Матрица из коллагена и гликозаминогликана может служить эффективной поддерживающей структурой, в которую могут мигрировать репаративные клетки. В качестве матричного материала может быть использована коллагеновая матрица, например, описанная в Bell, патент США 4485097.

Различные коллагеновые материалы могут также представлять собой минерализованный коллаген. Например, для изготовления матриц может быть использован материал для имплантатов из фиброзного коллагена, называемый UltraFiber™ и выпускаемый Norian Corp. (1025 Terra Bella Ave., Mountain View, CA 94043). Патент США 5231169, приводимый в данном описании в качестве ссылки, описывает получение минерализованного коллагена через образование кальциево-фосфатного минерала при слабом перемешивании in situ в присутствии диспергированных коллагеновых фибрилл. Такой состав может быть использован для доставки сегмента нуклеиновой кислоты в область костной ткани. Минерализованный коллаген может быть использован, например, как часть терапевтического набора, содержащего активированную генами матрицу, для репарации переломов.

Было идентифицировано по крайней мере 20 различных форм коллагена, и каждый из этих коллагенов может быть использован при осуществлении данного изобретения. Например, коллаген может быть очищен от гиалинового хряща при отделении от диартроидальных суставов или пластинок роста. Коллаген типа II, очищенный от гиалинового хряща, изготавливается

промышленным способом и может быть приобретен, например, в Sigma Chemical Company, St. Louis. Коллаген типа I из хвостового сухожилия крыс может быть приобретен, например, в Collagen Corporation. Также может быть использован любой вид рекомбинантного коллагена, который может быть получен из коллаген-экспрессирующей рекомбинантной клетки-хозяина, включая бактериальные дрожжи, клетки млекопитающих и насекомых. При использовании коллагена в качестве матричного материала предпочтительным может оказаться удаление того, что называют "телопетидом", расположенным в конце коллагеновой молекулы и, как известно, вызывающим воспалительную реакцию.

Коллаген, используемый в данном изобретении, может быть при желании дополнен минералами, такими как кальций, например, в виде фосфата кальция. Коллаген как нативного, так и рекомбинантного типа может быть дополнен минералами путем смешивания, сорбции или соединения другого вида.

5.1.2. ДНК

Данные способы и композиции могут использовать различные виды молекул ДНК. Молекулы ДНК могут включать геномные, кДНК, одноцепочечную ДНК, двухцепочечную ДНК, трехцепочечную ДНК, олигонуклеотиды и Z-ДНК.

Молекулы ДНК могут кодировать различные факторы, способствующие заживлению ран, включая внеклеточные, клеточно-поверхностные и внутриклеточные РНК и белки. Примеры внеклеточных белков включают факторы роста, цитокины, заживляющие белки, гормоны и пептидные фрагменты гормонов, ингибиторы цитокинов, факторы роста и дифференциации пептидов, интерлейкины, хемокины, интерфероны, колониестимулирующие факторы и ангиогенные факторы. Примеры таких белков включают, но не ограничиваются ими, суперсемейство молекул TGF- β , включая изоформ TGF- β и костные морфогенетические белки (BMP), латентные связующие белки TGF- β , LTBP; кератиноцитный фактор роста (KGF); гепатоцитный фактор роста (HGF); тромбоцитарный фактор роста (PDGF); инсулиноподобный фактор роста (IGF); основные факторы роста фибробластов (FGF-1, FGF-2 и т.д.); сосудисто-эндотелиальный фактор роста (VEGF); фактор VIII и фактор IX; эритропоэтин (EPO); тканевый активатор плазминогена (TPA); активины и ингибины. Гормоны, которые могут быть использованы при осуществлении данного изобретения, включают гормон роста (GH) и паратиреоидный гормон (PTH). Примеры внеклеточных белков также включают внеклеточные матричные белки, такие как коллаген, ламинин и фибронектин. Примеры клеточно-поверхностных белков включают семейство клеточно-адгезивных молекул (например, интегрины, селектины, члены семейства Ig, такие как N-CAM и L1, и кадгеринины); сигнальные рецепторы цитокинов, такие как рецепторы TGF- β , тип I и тип II, и рецептор FGF; а также несигнальные корецепторы, такие как бетагликан и синдекан. Примеры внутриклеточных РНК и белков включают семейство сигнальных

трансдуцирующих киназ, цитоскелетные белки, такие как талин и винкулин, цитокин-связывающие белки, такие как семейство латентных связующих белков TGF- β , а также ядерные трансдействующие белки, такие как факторы транскрипции и стимуляции.

Молекулы ДНК могут также кодировать белки, блокирующие патологические процессы, таким образом обеспечивая беспрепятственный естественный процесс заживления ран. Примеры блокирующих факторов включают рибозимы, нарушающие функцию РНК, и ДНК, которые, например, кодируют ингибиторы тканей ферментов, нарушающих целостность тканей, например, ингибиторы металлопротеиназ, ассоциируемых с артритом.

Сегмент ДНК, кодирующий нужный белок, может быть получен, используя различные методы молекулярной биологии, обычно известные специалистам в данной области. Например, кДНК или библиотеки геномов могут быть подвергнуты скринингу, используя затравки или зонды с последовательностями, основанными на известных нуклеотидных последовательностях. Для выработки фрагмента ДНК, кодирующего нужный белок, также может быть использована цепная полимеразная реакция (PCR). Альтернативно, фрагмент ДНК может быть получен из торговой сети.

Гены с последовательностями, отличающимися от последовательностей, описанных в литературе, также входят в объем данного изобретения, настолько, насколько измененный или модифицированный ген все еще кодирует белок, прямым или косвенным образом стимулирующий заживление ран. Эти последовательности включают последовательности, вызванные точечными мутациями, вырожденного генетического кода или естественно встречающимися аллельными вариантами, а также модификации, произведенные генной инженерией, т.е. рукой человека.

Методы внесения изменений в нуклеотидные последовательности, предназначенных для изменения функциональных свойств кодируемых белков или полипептидов, хорошо известны в данной области. Такие модификации включают делецию, инсерцию или замену оснований, что приводит к изменениям в аминокислотной последовательности. Изменения могут быть проведены с целью увеличения активности кодируемого белка, повышения его биологической устойчивости или периода полураспада, изменения профиля его гликозилирования, определения температурной чувствительности или изменения профиля экспрессии белка и т.п. Все подобные модификации нуклеотидных последовательностей входят в объем данного изобретения.

ДНК, кодирующая нужные продукты трансляции или транскрипции, может быть рекомбинантно встроена в многочисленные векторные системы, обеспечивающие широкомасштабную репликацию ДНК с целью получения активированных генами матриц. Эти векторы могут быть сконструированы таким образом, чтобы содержать необходимые элементы для направления и

транскрипции и/или трансляции последовательности ДНК, поглощенной репарационными клетками вблизи раны *in vivo*.

Используемые векторы включают, но не ограничиваются ими, векторы, полученные из рекомбинантной бактериофаговой ДНК, плазмидной ДНК или космидной ДНК. Например, могут быть использованы плазмидные векторы, такие как pBR322, pUC 19/18, pUC 118, 119 и серия векторов M13 mp. Бактериофаговые векторы могут включать λ gt10, λ gt11, λ gt18-23, λ ZAP/R, а также серию бактериофаговых векторов EMBL. Используемые космидные векторы включают, но не ограничиваются ими, pJB8, pCV 103, pCV 107, pCV 108, pTM, pMCS, pNNL, pHSG274, COS202, COS203, pWE15, pWE16 и серию векторов харомиды 9. Векторы, обеспечивающие транскрипцию РНК *in vitro*, такие как векторы SP6, также могут быть использованы для получения больших количеств РНК, которая может входить в состав матрицы. Альтернативно, могут быть сконструированы рекомбинантные вирусные векторы, включающие, но не ограниченные ими, векторы, полученные из вирусов, таких как вирус герпеса, ретровирусы, вакцинные вирусы, аденовирусы, адено-ассоциируемые вирусы или бычий папилломный вирус. Несмотря на то, что могут быть использованы интегрирующие вирусы, предпочтительными для заживления ран являются неинтегрирующие системы, не передающие генный продукт дочерним клеткам в течение многих поколений. Таким образом, генный продукт экспрессируется во время процесса заживления ран, и по мере того, как ген разбавляется в последующих поколениях, количество экспрессируемого генного продукта снижается.

Методы, хорошо известные специалистам в данной области, могут быть использованы для конструирования векторов экспрессии, содержащих последовательность, кодирующую белок и оперативно связанную с соответствующими транскрипционными/трансляционными регуляторными сигналами. Эти методы включают методы рекомбинантной ДНК *in vitro* и синтетические методы (см., например, методы, описанные в Sambrook, et al., 1992, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, N. Y.; Ausubel et al., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates & Wiley Interscience, N.Y.).

Гены, кодирующие нужные белки, могут быть оперативно связаны с множеством различных элементов промотора/энхансера. Элементы экспрессии этих векторов могут варьировать по своей силе и специфичности. В зависимости от используемой системы хозяин/вектор может быть использован любой из многочисленных подходящих элементов транскрипции и трансляции. Форма промотора может быть такой, чтобы естественно соединяться с нужным геном. Напротив, ДНК может быть поставлена под контроль рекомбинантного или чужеродного промотора, т. е. промотора, обычно неассоциируемого с этим геном. Например, конкретные элементы промотора/энхансера ткани могут быть использованы для регулирования экспрессии перенесенной ДНК в конкретных видах клеток.

Примеры описанных транскрипционных регуляторных участков, обладающих тканевой специфичностью, которые могут быть использованы, включают, но не ограничиваются ими, контрольный участок гена эластазы I, активный в панкреатических ацинарных клетках (Swift et al., 1984, Cell 38:639-646; Ornitz et al., 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409; MacDonald, 1987, Hepatology 7:42S-51S); контрольный участок гена инсулина, активного в панкреатических бета-клетках (Hanahan, 1985, Nature 315:115-122); контрольный участок гена иммуноглобулина, активного в лимфоидных клетках (Grosschedl et al., 1984, Cell 38: 647-658; Adams et al., 1985, Nature 318:533-538; Alexander et al., 1987, Mol. Cell. Biol. 7:1436-1444); регуляторный участок гена альбумина, активного в печени (Pinkert et al., 1987, Genes and Devel. 1:268-276), регуляторный участок гена альфа-фетобелка, активного в печени (Krumlauf et al., 1985, Mol. Cell. Biol. 5:1639-1648; Hammer et al., 1987, Science 235:53-58); регуляторный участок гена альфа-1-интитрипсина, активного в печени (Kelsey et al., 1987, Genes and Devel. 1:161-171); регуляторный участок гена бета-глобина, активного в миелоидных клетках (Magram et al., 1985, Nature 315: 338-340; Kollias et al., 1986, Cell 46:89-94); регуляторный участок гена миелинового основного белка, активного в олигодендроцитных клетках в мозгу (Readhead et al., 1987, Cell 48:703-712); регуляторный участок гена миозинового легкой цепи-2, активной в скелетной мышце (Shani, 1985, Nature 314: 283-286) и регуляторный участок гена высвобождения гонадотропного гормона, активного в гипоталамусе (Mason et al., 1986, Science 234:1372-1378). Могут быть использованы промоторы, отделенные от генома вирусов, растущих в клетках млекопитающих (например, RSV, вирус вакцины 7,5K, SV40, HSV, аденовирусы MLP, MMTV, LTR и промоторы CMV), а также промоторы, продуцированные рекомбинантной ДНК или полученные синтетическими методами.

В некоторых случаях промоторные элементы могут представлять собой конститутивные или индуцируемые промоторы и могут быть использованы в соответствующих условиях для обеспечения высокого уровня или регулируемой экспрессии нужного гена. Экспрессия генов под контролем конститутивных промоторов не требует присутствия конкретного субстрата для индуцирования экспрессии генов и происходит при всех условиях клеточного роста. Напротив, экспрессия генов, контролируемых индуцируемыми промоторами, отвечает на присутствие или отсутствие индуцирующего агента.

Для достаточной трансляции инсценированных последовательностей, кодирующих белок, также необходимы конкретные сигналы инициации. Эти сигналы включают кодон инициации антииммунитарного глобулина (ATG) и прилегающие последовательности. В тех случаях, когда в подходящие векторы экспрессии инсценируется вся кодирующая последовательность, включая кодон инициации и прилегающие

последовательности, необходимость в дополнительных контрольных сигналах трансляции может отпасть. Однако в случаях инсерции всего лишь части кодирующей последовательности могут быть даны экзогенные контрольные сигналы трансляции, включая кодон инициации АТГ. Более того, кодон инициации должен находиться в фазе с рамкой считывания последовательностей, кодирующей белок, для обеспечения трансляции всей вставки. Эти экзогенные контрольные сигналы трансляции и кодоны инициации могут иметь различное происхождение как натуральное, так и синтетическое. Эффективность и регуляция экспрессии могут быть усилены путем включения последовательностей аттенуации транскрипции, элементов энхансера и т.д.

Помимо последовательностей ДНК, кодирующих нужные заживляющие белки, в объем настоящего изобретения входит применение рибозимов или антисмысловых молекул ДНК, которые могут быть перенесены в репарационные клетки млекопитающих. Такие рибозимы или антисмысловые молекулы могут применяться для ингибирования кодирующих белков РНК генов, которые ингибируют процесс заболевания и заживления ран, обеспечивая тем самым возможность для репарации тканей.

Экспрессия антисмысловых молекул РНК непосредственно блокирует трансляцию мРНК путем связывания с нацеленной мРНК и предотвращения трансляции белка. Для блокирования трансляции белков также может быть использована экспрессия рибозимов, представляющих собой ферментативные молекулы РНК, способные катализировать конкретное расщепление РНК. Механизм действия рибозимов включает последовательную специфическую гибридизацию рибозимной молекулы до комплементарной РНК-мишени с последующим эндонуклеолитическим расщеплением. В объем данного изобретения входит конструирование мотивов рибозимных молекул, имеющих форму головки молотка, которые специфично и эффективно катализируют эндонуклеотическое расщепление последовательностей РНК. Молекулы РНК могут быть выработаны путем транскрипции последовательностей ДНК, кодирующих молекулу РНК.

В объем данного изобретения также входит применение множественных генов, объединенных на единой генетической конструкции под контролем одного или нескольких промоторов, или полученных в виде отдельных конструкций одинакового или различного типа. Таким образом, может быть использована почти бесконечная комбинация различных генов и генетических конструкций. Определенные генетические комбинации могут быть сконструированы или их использование может каким-либо другим образом обеспечивать синергетическое действие на стимулирование и регенерацию клеток; любые и все подобные комбинации входят в объем настоящего изобретения. В самом деле, в научной литературе описаны многие виды синергетического действия, поэтому рядовой специалист в данной области может легко идентифицировать подобные синергетические комбинации генов или даже комбинации ген-белок.

5.1.3. ПОЛУЧЕНИЕ АКТИВИРОВАННЫХ ГЕНАМИ МАТРИЦ

В предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения материал для матриц или имплантатов входит в соприкосновение с ДНК, кодирующей нужный терапевтический продукт, путем замачивания матричного материала в маточном растворе рекомбинантной ДНК. Количество ДНК и продолжительность времени контакта, необходимого для проникновения ДНК в матрицу, зависит от вида используемой матрицы и может быть легко определено рядовым специалистом в данной области без излишних экспериментов. Альтернативно, ДНК может быть инкапсулирована внутри матрицы из синтетических полимеров, таких как, например, блок-сополимеры полимолочной-полигликолевой кислоты (см. Langer and Folkman, 1976, Nature 263:797-800, приводимый в данном описании в качестве ссылки). Опять же, эти параметры могут быть легко определены рядовым специалистом без излишних экспериментов. Например, количество конструкции ДНК, наносимой на матрицу, определяют с учетом различных биологических и медицинских факторов. Необходимо принимать во внимание конкретный ген, матрицу, область раны, возраст, пол и диету хозяина-млекопитающего, а также любые другие клинические факторы, которые могут повлиять на заживление раны, такие как уровень сыворотки различных факторов и гормонов.

В дополнительных вариантах осуществления данного изобретения композиции как биологических, так и синтетических матриц и ДНК могут быть лиофилизированы вместе для получения сухого фармацевтического порошка. Перед имплантированием в организм активированная генами матрица может быть регидратирована или, наоборот, активированная генами матрица может быть регидратирована естественным путем после внедрения в организм.

В некоторых случаях медицинские средства, такие как имплантаты, шовные материалы, повязки для ран и т.д., могут быть покрыты композициями, содержащими нуклеиновые кислоты по данному изобретению, с использованием обычных способов покрытия, хорошо известных в данной области. Такие способы включают, в виде примера, а не ограничения, погружение средства в композицию, содержащую нуклеиновую кислоту, нанесение на него указанной композиции кистью и/или распыление композиции по данному изобретению. Средство затем высушивают при комнатной температуре или в сушильной камере, необязательно при пониженном давлении. Предпочтительный метод покрытия шовных материалов приведен в примерах.

В отношении шовных материалов, покрытых полимерной матрицей, содержащей плазмидную ДНК, заявители обнаружили, что нанесение композиции, содержащей в целом приблизительно 0,01-10 мг плазмидной ДНК, предпочтительно, приблизительно 1-5 мг плазмидной ДНК, на шовный материал длиной 70 см, используя приблизительно 5-100, предпочтительно 5-50 и наиболее предпочтительно 15-30 слоев, обеспечивает

терапевтически эффективное и равномерное покрытие.

В особо предпочтительном варианте данное изобретение обеспечивает (предусматривает) покрытые шовные материалы, особенно шовные материалы, покрытые полимерной матрицей, содержащей нуклеиновые кислоты, кодирующие заживляющие белки, стимулирующие заживление ран in vivo.

Шовные материалы, которые могут быть покрыты в соответствии со способами и веществами по данному изобретению, включают любой шовный материал естественного или синтетического происхождения. Типичные шовные материалы включают, в виде примера, а не ограничения, шелк, хлопок, лен, полиолефины, такие как полиэтилен и полипропилен; полиэфиры, такие как полиэтилентерефталат; гомополимеры и сополимеры эфиров гидроксикарбоновой кислоты; коллаген (простой или хромированный); кетгут (простой или хромированный); и заместители шовных материалов, такие как цианоакрилаты. Шовные материалы могут иметь любую удобную форму, такую как плети или жгуты, и различные размеры, обычно используемые в данной области.

Преимущества покрытых шовных материалов, особенно шовных материалов, покрытых полимерной матрицей, содержащей нуклеиновые кислоты, кодирующие заживляющие белки, которые стимулируют заживление ран, касаются буквально всех областей хирургического применения для людей и животных.

5.2. ПРИМЕНЕНИЕ АКТИВИРОВАННОЙ ГЕНАМИ МАТРИЦЫ

Данное изобретение может найти свое применение во многих случаях заживления ран в медицине для людей, включающих, но не ограничивающихся, заживление костей и сухожилий, связок, кровеносных сосудов, скелетных мышц и кожи. Например, при использовании технологии активированной генами матрицы, факторы роста цитокина, вырабатываемые трансфицированными репарационными клетками, воздействуют на другие клетки в ране через связывание сигнальных рецепторов на поверхности клеток, таким образом стимулируя и усиливая цепь физиологических явлений, обычно ассоциируемых с процессом заживления ран. Конечным результатом является ускорение заживления и регенерации тканей.

Способ по данному изобретению также применим в тех случаях, когда клинической целью является блокирование процесса заболевания и обеспечение возможности таким образом естественного процесса заживления, или когда целью является замена функции генетически дефективного белка.

Раны могут возникать в результате травматического повреждения или, наоборот, от повреждения тканей в результате хирургической процедуры. Активированная генами матрица по данному изобретению может быть перенесена в организм пациента с использованием различных методов. Например, матрицы могут быть перенесены непосредственно в область раны руками врача либо в виде терапевтического имплантата или материала с покрытием (например, шовный материал, стент, имплантат с покрытием и

т.д.). Матрицы могут быть использованы локально или имплантированы хирургическим способом в область нормальной ткани для воздействия на больную ткань на некотором расстоянии.

Процесс заживления ран представляет собой координированную последовательность явлений, включающую, например, кровоизлияние, образование сгустков, растворение сгустка с одновременным удалением поврежденной ткани и осаждением грануляционной ткани в виде исходного репарационного материала. Грануляционная ткань представляет собой смесь фибробластов и капиллярных кровеносных сосудов. Процесс заживления ран включает различные клеточные популяции, включая эндотелиальные клетки, стволовые клетки, макрофаги и фибробласты. Известно, что регуляторные факторы, принимающие участие в заживлении ран, включают системные гормоны, цитокины, факторы роста, внеклеточные матричные белки и другие белки, регулирующие рост и дифференциацию.

Способы переноса ДНК и матричные композиции по данному изобретению могут найти широкое применение в качестве способа переноса лекарственного средства для стимулирования заживления тканей и регенерации различных видов тканей, включающих, но не ограничивающихся ими, репарацию костей, кожи, соединительных тканей, регенерацию органов или регулирование образования и развития сосудов и/или ангиогенеза. Активированные генами матрицы могут быть также использованы для лечения пациентов с плохой заживляющей способностью, возникшей, например, в результате старения или диабета. Матрицы также могут быть использованы для лечения медленно заживающих ран по естественным причинам, например, у пожилых и у людей, не поддающихся обычному лечению, например, у людей с хроническими ранами кожи.

Одной из важных особенностей настоящего изобретения является то, что образование рубцовой ткани в области раны может регулироваться путем селективного использования активированных генами матриц. Образование рубцовой ткани может регулироваться путем контроля уровня экспрессируемых заживляющих белков. При лечении ожогов или соединительной ткани особенно желательно предотвратить образование рубцовой ткани.

Способы по данному изобретению включают имплантацию или трансплантацию матриц, содержащих нужную ДНК, в хозяина. Процедуры трансплантации матриц могут включать хирургическое имплантирование или инъектирование матриц в хозяина. В случае инъектирования матриц их набирают в шприц и вводят пациенту в области раны. В области раны могут быть сделаны многократные инъекции. Альтернативно, матрицы могут быть имплантированы в область раны хирургическим путем. Количество матриц, необходимых для достижения цели данного изобретения, т. е. стимулирования заживления ран и регенерации, варьируется в зависимости от размера, возраста и массы хозяина.

Важной особенностью данного изобретения является то, что когда бы

активированная генами матрица ни переносилась в хозяина, будь то инъекция или хирургический способ, местное повреждение ткани должно быть достаточным для индуцирования процесса заживления раны. Это необходимое условие для индуцирования миграции и пролиферации нацеленных репаративных клеток млекопитающих в область активированной генами матрицы.

Конкретные варианты осуществления изобретения описаны в нижеследующих разделах.

5.3. РЕГЕНЕРАЦИЯ КОСТЕЙ

Кости имеют существенную способность регенерироваться после перелома. Сложная, но упорядоченная последовательность репарации переломов включает гемостаз, растворение сгустка, вращение грануляционной ткани, образование мозоли и ремоделирование мозоли в оптимизированную структуру (A.W. Ham., 1930, J. Bone Joint Surg. 12, 827-844). Клетки, участвующие в этом процессе, включают тромбоциты, воспалительные клетки, фибробласты, эндотелиальные клетки, перicytes, остеокласты и остеогенные предшественники. Недавно было идентифицировано несколько пептидных факторов роста и дифференциации, которые, похоже, контролируют клеточные явления, ассоциируемые с образованием и репарацией костей (Erlebacher, A., et al., 1995, Cell 80, 371-378). Например, костные морфогенетические белки (BMP) представляют собой растворимые внеклеточные факторы, контролирующие участие остеогенных клеток: гены BMP обычно экспрессируются культивируемыми фетальными остеобластами (Harris, S. E. , et al. , 1994, J. Bone Min. Res. 9, 389-394) и остеобластами во время скелетогенеза мышинных эмбрионов (Lyons, K.M., et al., 1989, Genes Dev. 3, 1657-1668; Lyons, K.M., et al., 1990, Development 190, 833-844; Jones, M.C., et al., 1991, Development 111, 531-542), рекомбинантные белки BMP инициируют дифференциацию клеток-предшественников хрящей и костей (Yamaguchi, A., et al. , 1991, J. Cell Biol. 113, 681-687; Ahrens, M., et al., 1993, J. Bone Min. Res. 12, 871-880; Gitelman, S.E., et al., 1994, J. Cell Biol. 126, 1595-1609; Rosen, V., et al., 1994, J. Cell Biol. 127, 1755-1766), доставка рекомбинантных BMP индуцирует последовательность образования костей подобную эндохондральному образованию костей (Wozney, J.M., 1992, Mol. Reprod. Dev. 32, 160-167; Reddi, A.H., 1994, Curr. Opin. Genet. Dev. 4, 737-744), и экспрессия гена BMP-4 оказывается нерегулируемой на ранней стадии процесса репарации переломов (Nakase, T., et al., 1994, J. Bone Min. Res. 9, 651-659). Остеогенный белок-1, член семейства молекул, родственных BMP (Ozkaynak, E. , et al., 1990, EMBO J. 9, 2085-2093), способен на подобное действие *in vitro* и *in vivo* (Sampath, T.K., et al., 1992, J. Biol. Chem. 267, 20352-20362; Cook, S. D. , et al., (1994) J. Bone Joint Surg. 76-A, 827-838). Было показано, что TGF- β также стимулирует образование хрящей и костей *in vivo* (Centrella, M., et al., 1994, Endocrine Rev. 15, 27-38; Sumner, D.R., et al., 1995, J. Bone Joint Surg. 77A, 1135-1147). Наконец,

паратиреоидный гормон (PTH) является гормоном из 84 аминокислот, повышающим концентрацию Ca^{+2} в плазме и внеклеточной жидкости. В скелетных тканях интермиттирующее введение фрагмента PTH, удовлетворяющего структурным требованиям по биологической активности (aa 1-34), производит настоящее анаболическое действие: многочисленные исследования *in vivo* и *in vitro* убедительно доказывают, что введение PTH1-34 животным (включая крыс) приводит к разобщенному высококачественному образованию костей благодаря совместному ингибирующему действию на остеокласты и стимулирующему действию на остеогенные клетки (Dempster, D. W. , et al., 1993, Endocrine Rev. 14, 690-709). Известно, что пептид PTH1-34 взаимодействует синергетически с BMP-4, регулируя экспрессию функциональных рецепторов PTH на поверхности клеток при дифференциации остеобластов *in vitro* (Ahrens, M. , et al., 1993, J. Bone Min. Res. 12, 871-880).

Как рекомбинантные белки факторы роста и дифференциации пептидов, такие как BMP и TGF- β 1, представляют собой многообещающие терапевтические альтернативы для репарации переломов (Wozney, J.M., 1992, Mol. Reprod. Dev. 32, 160-167; Reddi, A.H., 1994, Curr. Opin. Genet. Dev. 4, 737-744; Centrella, M. , et al., 1994, Endocrine Rev. 15, 27-38; Sumner, D.R., et al., 1995, J. Bone Joint Surg. 77-A, 1135-1147). Однако для стимулирования значительного новообразования костей у животных требуются сравнительно большие дозы (микрограммы), вызывая опасение, что лечение людей в будущем может оказаться дорогим и с повышенным риском относительно токсичности.

В одном из вариантов осуществления изобретения активированные генами матрицы хирургически имплантируют в 5-мм область остеотомии в крысе, представляющей собой модель сложного, незаживающего перелома у людей. Изобретатели обнаружили, что перенос генов в репаративные клетки в остеотомическом зазоре может быть легко осуществлен.

Дефекты в процессе репарации и регенерации костей ассоциируются со значительными осложнениями в клинической ортопедической практике, например, фиброзное несращение после перелома костей, неудачи с интерфейсом имплантатов и большие неудачи с аллотрансплантатами. Многие сложные переломы в настоящее время лечат с использованием аутоотрансплантатов, однако этот метод неэффективен и связан с осложнениями.

Естественно, любой новый метод, предназначенный для стимулирования репарации костей, представляет собой большую ценность при лечении переломов костей. Значительную часть сломанных костей все еще лечат наложением гипса, позволяя естественным механизмам осуществлять репарацию костей. Несмотря на то, что в последние годы в лечении переломов наблюдается прогресс, разработка новых процессоров, стимулирующих или дополняющих механизмы репарации ран, внесут значительный вклад в эту область.

Настоящее изобретение может быть

использовано для переноса гена роста костей для ускорения репарации переломов. Другие важные аспекты этой технологии включают использование переноса генов для лечения пациентов со "слабыми костями" при таких заболеваниях, как остеопороз; для ускорения плохого заживления, возникшего по неизвестным причинам, например, фиброзное несращение; для улучшения интеграции имплантата и функции искусственных суставов; для стимулирования заживления других скелетных тканей, таких как Ахиллесово сухожилие, а также в качестве адъюванта для репарации больших дефектов.

Известно, что костная ткань обладает способностью к репарации и регенерации, при этом существует определенное понимание клеточной и молекулярной основы этих процессов. Инициация нового костного образования включает коммитирование, клональную экспансию и дифференциацию репарационных клеток. После инициации костному образованию способствуют различные факторы роста полипептидов. Новообразованную кость затем поддерживает серия локальных и системных факторов роста и дифференциации.

В настоящее время было клонировано несколько генов костного морфогенетического белка (Wozney et al., 1988; Rosen et al., 1989, *Connect. Tissue Res.*, 20:313-319; суммировано в Alper, 1994), и эта работа представляет BMP в виде членов суперсемейства трансформирующего фактора- β (TGF- β) роста, основанных на гомологиях последовательности ДНК. Клонирование различных генов BMP привело к обозначению отдельных генов BMP и белков как BMP-1 до по крайней мере BMP-8. Обычно считают, что BMP 2-8 являются остеогенными, в то время как BMP-1 может быть более генерализованным морфогеном; Shimell et al., 1991, *Cell*, 67:469-481). BMP-3 также называют остеогеном (Luyten et al., 1989, *J. Biol. Chem.*, 264: 13377-13380), а BMP-7 также называют OP-1 (Ozkaynak et al., 1990, *EMBO J.*, 9:2085-2093). Каждый из TGF и BMP влияет на клетки путем сложных клеточно-специфических взаимодействий с семействами рецепторов на поверхности клеток (Roberts & Sporn, 1989, M.B. Sporn and A.B. Roberts, Eds., Springer-Verlag, Heidelberg, 95 (Part 1); Aralkar et al., 1991).

Было также показано, что трансформирующие факторы роста (TGF) играют главную роль в регулировании заживления тканей, действуя на пролиферацию клеток, экспрессию генов и синтез матричных белков (Roberts & Sporn, 1989, M. B. Sporn and A.B. Roberts, Eds., Springer-Verlag, Heidelberg, 95 (Part 1)). Например, TGF- β 1 и TGF- β 2 могут инициировать как хондрогенез, так и остеогенез (Joyce et al., 1990, *J. Cell. Biol.*, 110:195-2007; Izumi et al., 1992, *J. Bone Min. Res.*, 7:115-111; Jingushi et al., 1992, *J. Orthop. Res.*, 8:364-371).

Помимо TGF и BMP при осуществлении данного изобретения могут быть использованы другие факторы/гормоны роста для воздействия на новое костное образование после перелома. Например, фактор роста фибробласта, инъецированный в область перелома у крысы (Jingushi et al., 1990) в виде многократных высоких доз (1,0

мг 50/мл), приводит к значительному увеличению хрящевой ткани в зазоре перелома, в то время как более низкие дозы не оказывают действия.

В одном из аспектов данного изобретения могут быть также использованы гормоны, регулирующие кальций, такие как паратиреоидный гормон. РТН представляет собой гормон из 84 аминокислот, регулирующий кальций, основная функция которого заключается в повышении концентрации Ca^{+2} в плазме и внеклеточной жидкости. Было также показано, что интактный РТН стимулирует реабсорбцию Ca^{+2} в костях на протяжении свыше 30 лет, и известно, что гормон увеличивает количество и активность остеокластов. Исследования с нативным гормоном и синтетическими пептидами показывают, что N-конец молекулы (aa-1-34) удовлетворяет структурным требованиям по биологической активности (Tregear et al., 1973; Hermann-Erlee et al., 1976, *Endocrine Research Communications*, 3:21-35; Riond, 1993, *Clin. Sci.*, 85:223-228).

В соответствии с одним из вариантов осуществления изобретения активированные генами матрицы имплантируют хирургическим путем в область перелома кости. Такие хирургические процедуры могут включать прямую инъекцию препарата GAM в область перелома, хирургическую репарацию комплексного перелома или артроскопическую хирургию. В тех случаях, когда для репарации сломанной кости используют активированные генами матрицы, репарационные клетки млекопитающих естественно мигрируют и пролиферируют в область костного повреждения.

К своему удивлению, авторы настоящего изобретения обнаружили, что перенос генов в репарационные клетки в регенерирующей ткани в остеотомическом зазоре может быть легко осуществлен. В настоящее время предпочтительные способы обеспечения переноса генов обычно включают использование фиброзно-коллагенового имплантирующего материала, замоченного в растворе ДНК незадолго до переноса в ту область, в которой желательно ускорение роста кости, или использование препарата плазмидной ДНК, инкапсулированного в синтетическую матрицу, такую как блок-сополимер гликолевой и молочной кислоты. Как показывают исследования, приведенные в данном описании, имплантируемый материал облегчает нацеленное поглощение экзогенных плазмидных конструкций клетками в остеотомическом зазоре, которые явно участвуют в регенерации/репарации костей. После клеточного поглощения трансгены направляют экспрессию рекомбинантных полипептидов, как показывает экспрессия *in vivo* функциональных продуктов гена-маркера.

Дальнейшие исследования, приведенные в данном описании, показывают, что перенос остеотропных генов приводит к клеточной экспрессии рекомбинантной остеотропной молекулы, при этом указанная экспрессия непосредственно связана со стимулированием образования новой кости. Конкретно, вектор переноса гена, кодирующий для BMP-4, и вектор переноса гена, кодирующий фрагмент человеческого РТН1-34, по отдельности или вместе стимулируют образование новой кости.

После рассмотрения сравнительно большого количества генов-кандидатов, в том числе вектора переноса генов, кодирующих фрагмент паратиреоидного гормона человека, hPTH1-34, стимулирующий образование новой кости у крыс породы Sprague-Dawley, показал, что человеческий пептид может эффективно связывать рецептор PRH/PTHrP на поверхности клеток остеобластов крыс.

5.4. МЯГКИЕ ТКАНИ

Настоящее изобретение может быть также использовано для стимулирования роста или регенерации мягких тканей, таких как связки, сухожилия, хрящи и кожа. Скелетная соединительная ткань, поврежденная в результате травмы, может быть подвергнута лечению с использованием матриц, содержащих гены, кодирующие различные факторы роста. Соединительная ткань обычно состоит из клеток и внеклеточной матрицы, организованных в виде характерного строения ткани. Повреждение ткани может нарушить это строение и стимулировать реакцию заживления раны. Способы по данному изобретению особенно хорошо подходят для стимулирования роста и регенерации соединительной ткани, поскольку важно, чтобы поврежденная ткань регенерировалась без образования рубцовой ткани, так как рубцовая ткань может помешать нормальной механической функции соединительной ткани.

Для ускорения репарации мягких тканей могут быть использованы различные факторы роста, включающие, но не ограничивающиеся ими, членов суперсемейства TGF- β (например, самого TGF- β), которые стимулируют экспрессию генов, кодирующих для внеклеточных матричных белков и других цитокинов, таких как эпидермальный фактор роста и PDGF. Примеры других используемых генов включают (a) цитокины, такие как факторы роста и дифференциации пептидов, интерлейкины, хемокины, интерфероны, колониестимулирующие факторы; (b) ангиогенетические факторы, такие как FGF и васкулярно-эндотелиальный фактор роста (VEGF); (c) внеклеточные матричные белки, такие как коллаген, ламинин и фибронектин; (d) семейство клеточно-адгезионных молекул (например, интегрины, селектины, члены семейства Ig, такие как N-CAM и LI, а также кадгерин); (e) сигнальные рецепторы цитокинов на поверхности клеток, такие как рецепторы TGF- β и FGF, тип I и тип II; (f) несигнальные корецепторы, такие как бетагликан и синдекан; (g) семейство киназ, трансдуцирующих сигналы; (h) цитоскелетные белки, такие как талин и винкулин; (i) цитокин-связывающие белки, такие как семейство латентных TGF- β -связывающих белков; и (j) ядерные трансдействующие белки, такие как факторы транскрипции.

После получения такие матрицы могут быть затем перенесены в хозяина-млекопитающее в области раны соединительной ткани. Активированные генами матрицы могут быть инъецированы непосредственно в область повреждения соединительной ткани. Альтернативно, для доставки матриц в область раны соединительной ткани могут быть использованы хирургические методы, такие как артроскопическая хирургия.

5.5. РЕГЕНЕРАЦИЯ ОРГАНОВ

Настоящее изобретение может быть также

использовано для стимулирования репарации и регенерации ткани органа. Орган, поврежденный травмой или хирургической операцией, может быть подвергнут лечению с использованием способов по данному изобретению. В случае с печенью последняя может быть повреждена из-за избыточного употребления алкоголя или из-за инфекции различного вида инфекционными агентами, такими как вирусы семейства гепатитовых. Подобным образом, почка может неправильно функционировать в результате повреждения, вызванного ее заболеванием. Слизистые мембраны пищевода, желудка или двенадцатиперстной кишки могут содержать язвы, вызванные присутствием кислоты и пепсина в желудочных соках. Язвы также могут возникать в результате колонизации желудочно-кишечных клеток бактериями *Helicobacter pylori*. Вышеприведенные органы и заболевания служат всего лишь примерами, на самом деле, способы по данному изобретению могут быть использованы для лечения заболеваний или для стимулирования регенерации органов в любом органе пациента.

Матрицы, содержащие ДНК, кодирующую цитокины, которые стимулируют пролиферацию и дифференциацию клеток и/или регулируют морфогенез тканей, могут быть трансплантированы в соответствующую область органа. Такие факторы могут включать, но не ограничиваются ими, семейство трансформирующего фактора роста белков, тромбоцитарный фактор роста (PDGF), инсулиноподобный фактор роста (IGF) и фибробластный фактор роста (FGF). В некоторых случаях может оказаться необходимой экспрессия факторов роста и/или цитокинов, стимулирующих пролиферацию видов клеток, специфичных для данного органа, т.е. гепатоцитов, клеток почек или сердца и т.д. Например, фактор роста гепатоцитов может быть экспрессирован для стимулирования процесса заживления раны в печени. Для лечения язв, возникающих в результате инфекции *Helicobacter*, активированные генами матрицы могут содержать ДНК, кодирующую антимикробные белки.

Активированные генами матрицы по данному изобретению могут быть хирургическим путем имплантированы в орган, подлежащий лечению. Альтернативно, для переноса активированной генами матрицы в организм могут быть применены лапароскопические хирургические процедуры. В тех случаях, когда лечению подлежит повреждение тканей, естественный процесс заживления ран стимулирует миграцию и пролиферацию репарационных клеток в трансплантированные матрицы. Альтернативно, если активированные генами матрицы переносят в неповрежденные органы, например, когда матрицы имплантируют для экспрессии заживляющих белков, не участвующих в заживлении раны, процесс ее заживления может быть стимулирован путем индукции повреждения тканей.

5.6. РЕГУЛИРОВАНИЕ АНГИОГЕНЕЗА

Настоящее изобретение также может быть использовано для регулирования, образования и распределения кровеносных сосудов, или васкулогенеза и ангиогенеза,

соответственно. Оба эти физиологических процесса играют важную роль в заживлении ран и регенерации органов.

Вначале в области раны осаждается грануляционная ткань, представляющая собой смесь коллагена, матрицы и кровеносных сосудов, которая обеспечивает фиксацию раны во время репарации тканей. Образование новых кровеносных сосудов включает пролиферацию, миграцию и инфильтрацию сосудистых эндотелиальных клеток, и, как известно, регулируется различными факторами роста полипептидов. Некоторые полипептиды, обладающие активностью, способствующей росту эндотелиальных клеток, были идентифицированы, включая кислотные и основные фибробластные факторы роста (FGF), васкулярно-эндотелиальный фактор роста (VEGF) и плацентарный фактор роста (PDGF).

Для стимулирования образования и распределения кровеносных сосудов ДНК, кодирующая такие факторы роста, может быть внедрена в матрицы, а эти матрицы могут быть имплантированы в хозяина. В некоторых случаях может возникнуть необходимость индуцирования процесса заживления раны путем повреждения тканей.

Может также возникнуть необходимость ингибирования пролиферации образования кровеносных сосудов, как, например, при ангиогенезе, связанном с ростом твердых опухолей, рост которых основан на васкуляризации. Ангиогенез опухолей может быть ингибирован путем переноса ДНК, кодирующих отрицательные ингибиторы ангиогенеза, такие как тромбоспондин или ангиостатин. В конкретных вариантах осуществления данного изобретения ДНК, кодирующая, например, тромбоспондин или ангиостатин, может быть внедрена в матрицу с последующим ее имплантированием в организм пациента в области опухоли.

5.7. РЕПАРАЦИЯ КОЖИ

Настоящее изобретение также может быть использовано для стимулирования роста и репарации ткани кожи. При ранениях, включающих повреждение большой площади кожи, особенно в случаях обширных ожогов, важно, чтобы кожа росла очень быстро с целью предотвращения инфекций, снижения потери жидкости и уменьшения площади потенциального рубцевания. Повреждения кожи, вызванные ожогами, проколами, порезами и/или ссадинами, могут подвергаться лечению с использованием активированных генами матриц по данному изобретению. Нарушения кожи, такие как псориаз, атонический дерматит или повреждения кожи, вызванные грибковыми, бактериальными и вирусными инфекциями, или лечением рака кожи, таким как меланома, могут быть также подвергнуты лечению с использованием способов по данному изобретению.

Для лечения повреждений и нарушений кожи могут быть использованы матрицы, содержащие ДНК, кодирующую цитокины, которые стимулируют пролиферацию и дифференциацию клеток кожи, включая центральные базальные стволовые клетки, кератиноциты, меланоциты, клетки Лангерганса и Меркеля. Активированные генами матрицы выполняют две функции:

защиту раны от инфекции и обезвоживания, а также доставку ДНК, поглощаемую репарационными клетками. Активированные генами матрицы по данному изобретению могут включать кожные накладки, кожу трупов, перевязочные средства, марлевые прокладки, коллагеновые решетки, описанные, например, в патентах США 4505266 или 4485097, кремы или гели для местного применения. Перед внесением матриц в область раны поврежденная кожа или омертвевшие ткани могут быть удалены. ДНК, вводимая в матрицы, может кодировать множество различных факторов роста, включая кератиноцитный фактор роста (KGF) или эпидермальный фактор роста (EGF). ДНК, кодирующая IL-1, который был показан как потенциальный индуктор миграции и пролиферации эпителиальных клеток как часть процесса заживления, может быть также внедрена в матрицы по данному изобретению.

6. ПРИМЕР: ИМПЛАНТИРУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЙ ДЛЯ ПЕРЕНОСА КОСТНОГО ГЕНА

Для переноса генов в область репарации и/или регенерации костей in vivo могут быть использованы различные имплантируемые материалы. Эти материалы замачивают в растворе, содержащем ДНК или ген, переносимый на участок нового роста кости. Альтернативно, ДНК может быть внедрена в матрицу в виде предпочтительного способа.

Одним из конкретных примеров подходящего материала является фиброзный коллаген, который может быть лиофилизирован после экстракции и частичной очистки от ткани, а затем стерилизован. Другим предпочтительным коллагеном является коллаген типа II, при этом наиболее предпочтительным коллагеном является либо рекомбинантный коллаген типа II, либо минерализованный коллаген типа II. Перед помещением в область остеотомии имплантируемые материалы замачивают в растворах ДНК (или вируса) в стерильных условиях. Замачивание может продолжаться в течение любого соответствующего и удобного периода времени, например, от 6 минут до замачивания на ночь. Раствор ДНК (например, плазмиды) представляет собой стерильный водный раствор, такой как стерильная вода или приемлемый буфер, с концентрацией в целом составляющей приблизительно 0,5-1,0 мг/мл. Плазмидами, предпочитаемыми в настоящее время, являются pGL2 (Промега), pSV40 β -gal, pAd.CMVlacZ и pсДНК3.

7. ПРИМЕР: ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКА IN VIVO ПОСЛЕ ТРАНСГЕННОЙ ЭКСПРЕССИИ

7.1. ТРАНСГЕН β -ГАЛАКТОЗИДАЗЫ

Бактериальная β -галактозидаза может быть обнаружена иммуногистохимическим методом. Образцы остеотомической ткани фиксируют в деминерализованном фиксаторе Bouins, а затем разделяют пополам вдоль продольной плоскости. Одну половину каждого образца заливают парафином для последующей иммуногистохимической идентификации бактериального белка β -галактозидазы.

Для иммуногистохимии поперечные срезы (толщиной 2-3 мм) переносят на слайды для микроскопа, покрытые поли-L-лизинном, и фиксируют в ацетоне при 0°C в течение, по крайней мере, 20 минут. Срезы подвергают регидратации в забуференном фосфатом

физиологическом растворе (PBS). Активность эндогенной пероксидазы гасят путем погружения срезов ткани в 0,1% перекись водорода (в 95% метаноле) при комнатной температуре в течение 10 минут, затем погашенные срезы промывают 3 х в забуференном фосфатом физиологическом растворе. В некоторых случаях срезы сводов черепа деминерализуют погружением в 4% этилендиаминтетрауксусную кислоту (EDTA), 5% поливинилпирролидон и 7% сахарозу, pH 7,4, на 24 часа при 4°C. Перед нанесением антител деминерализованные срезы промывают три раза. Первичные антитела используют без разбавления в виде надосадочной жидкости гибридомы. Очищенные антитела наносят на срезы ткани в концентрации 5 мг/мл. Первичные антитела определяют с помощью биотинилированных кроличьих антител к мыши IgG, конъюгированных пероксидазой стрептавидина (Zymed Hististain-Spkit). После окрашивания пероксидазой срезы контрастно окрашивают гематоксилином.

Бактериальный β-гал также определяют путем анализа с применением субстрата, используя промышленно выпускаемые наборы (например, Promega) в соответствии с инструкциями производителя.

7.2. ТРАНСГЕН ЛЮЦИФЕРАЗЫ

Люциферазу определяют путем анализа с применением субстрата, используя промышленно выпускаемые наборы (например, Promega) в соответствии с инструкциями производителя.

7.3. ТРАНСФЕРАЗЫ ПАРАТИРЕОИДНОГО ГОРМОНА

Рекомбинантный паратиреоидный гормон (PTH), такой как пептид hPTH1-34, определяют в гомогенатах ткани остеотомического зазора, например, используя два промышленно выпускаемых набора для радиоиммуноанализа в соответствии с протоколами производителя (Nichols Institute Diagnostics, San Juan Capistrano, CA).

Один набор является набором для интактного паратиреоидного гормона PTH 100T. Этот радиоиммуноанализ использует антитело к С-концу интактного гормона, что, в свою очередь, используется для измерения эндогенного уровня гормона в ткани остеотомического зазора. Этот анализ может быть использован для установления базовой линии величины экспрессии паратиреоидного гормона на модели остеотомии крысы.

Второй набор представляет собой двухсайтный иммунорadiометрический набор для определения паратиреоидного гормона крыс. Этот набор использует аффинноочищенные антитела, специфичные по отношению к N-концу интактного гормона крыс (PTH1-34), и таким образом измеряет выработку эндогенных паратиреоидных гормонов, а также рекомбинантного белка. Предыдущие исследования показывают, что эти антитела вступают в перекрестную реакцию с человеческим паратиреоидным гормоном и способны распознавать рекомбинантные молекулы in vivo.

Величины, полученные при использовании набора N 1 (антитело к С-концу), вычитают из величин, полученных при использовании набора N 2 (антитело к N-концу), для получения точных и высокочувствительных измерений. Таким образом, уровень

рекомбинантного пептида коррелируется со степенью нового костного образования.

7.4. ТРАНСГЕН КОСТНОГО МОРФОГЕНЕТИЧЕСКОГО БЕЛКА

Костные морфогенетические белки (BMP), такие как мышинный пептидный продукт трансгена BMP-4, определяют иммуногистохимическим способом, используя специфическое антитело, распознающее эпитоп HA (Majmudar et al., 1991, J. Bone and Min. Res. 6:869-881), такое как моноклональное тело, производимое Boehringer-Mannheim. Могут быть также использованы антитела к самим костным морфологическим белкам. Такие антитела, наряду с различными методами иммуноанализа, описаны в патенте США 4875456, приводимом в данном описании в качестве ссылки.

Остеотомические образцы ткани фиксируют в деминерализованном фиксаторе Bouins, а затем разделяют пополам вдоль продольной плоскости. Одну половину каждого образца заливают парафином для последующей иммуногистохимической идентификации рекомбинантной мышинной молекулы BMP-4.

8. ПРИМЕР: ПЕРЕНОС ОСТЕОТРОПНОГО ГЕНА СТИМУЛИРУЕТ РЕГЕНЕРАЦИЮ/РЕПАРАЦИЮ КОСТЕЙ IN VIVO

Следующий эксперимент предназначен для выяснения, может ли перенос генов быть использован для выработки трансфицированных клеток, постоянно экспрессирующих рекомбинантный hPTH1-34 in vivo, и может ли этот трансген стимулировать образование костей. Скорость образования новых костей анализируют следующим образом. При аутопсии остеотомическую область осторожно иссекают для гистоморфометрического анализа. Используя штангенциркуль, измеряют размеры A-P и M-L мозольной ткани. Затем образцы фиксируют погружением в фиксатор Bouins, промывают в этаноле и деминерализуют в забуференной муравьиной кислоте. Используют пластиковую заливку декальцинированного материала из-за высокой способности сохранять размеры метакрилата во время приготовления и иссечения образца.

Блоки тканей обезвоживают в спирте с увеличивающейся концентрацией и заливают. Используя микротом Reichert Polycot, в коронарной плоскости делают срезы толщиной 5 мм. Срезы берут в средней части ширины полости костного мозга во избежание ошибок с образцами. Срезы для световой микроскопии окрашивают, используя модифицированный трехцветный краситель Голднера, для дифференциации костной, остеонной, хрящевой и фиброзной ткани. Срезы заклеивают покровными стеклами, используя заливочную среду Eukitt (Calibrated Instruments, Ardsley, NY). Гистоморфометрические анализы проводят при ярком освещении, используя микроскоп для исследований Nikon Optiphot. Используют стандартный стереологический метод подсчета точек, применяя 10 x 10 мм окулярную ретикулярную решетку.

Всю мозольную площадь измеряют при 125x увеличении как показатель общей интенсивности заживляющей реакции.

Фракции площадей костной, хрящевой и фиброзной ткани измеряют при 250х увеличении для определения относительного вклада каждой ткани в образование мозоли. Поскольку размеры остеотомического зазора отражают основную линию (время 0), для обозначения скорости костного наполнения используют измерение костного участка при последующих временных интервалах. Используя дисперсный анализ, оценивают статистическую значимость при сравнении post-hoc между группами, применяя для определения диапазоновый тест Tukey.

В результате исследования 5-мм модели остеотомии на крысах было установлено, что трансгенная экспрессия паратиреоидного гормона может стимулировать регенерацию/репарацию костей у живых животных. Это открытие является особенно важным, поскольку известно, что hPTH1-34 является более сильным анаболическим веществом при интермиттирующем приеме, чем при постоянном, при этом способы переноса генов, используемые в данном изобретении, обеспечивают его постоянное выделение.

9. ПРИМЕР: ПРЯМОЙ ПЕРЕНОС ГЕНОВ В РЕГЕНЕРИРУЮЩУЮ КОСТЬ IN VIVO

Активированные генами матрицы, содержащие экспрессионную плазмидную ДНК млекопитающих, имплантируют в большие сегментные зазоры, сделанные в бедренной кости взрослых самцов. Имплантация активированных генами матриц, содержащих плазмиды бета-галактозидазы или люциферазы, приводит к поглощению ДНК и функциональной ферментной экспрессии, осуществляемой репарационными клетками, растущими в зазоре. Кроме того, осуществляют имплантацию активированной генами матрицы, содержащей либо костную морфогенетическую плазмиду белка-4, либо плазмиду, кодирующую для фрагмента паратиреоидного гормона (аминокислоты 1-34), что приводит к биологической реакции нового костного наполнения зазора. Наконец имплантация двухплазмидной, активированной генами матрицы, кодирующей костный морфогенетический белок-4 и фрагмент паратиреоидного гормона, которые, как показано, оказывают синергетическое действие in vitro, способствует более быстрому образованию новой кости, чем при использовании любого из этих факторов по отдельности. Эти исследования показывают, что впервые репарационными клетками в кости можно генетически манипулировать in vivo. Представляя собой полезный инструмент для исследования биологии репарационных фибробластов и реакции заживления раны, активированная генами матрица по данному изобретению имеет также широкое терапевтическое применение.

9.1. МАТЕРИАЛЫ И СПОСОБЫ

9.1.1. МОДЕЛЬ МЛЕКОПИТАЮЩЕГО-ХОЗЯИНА

Для осуществления 5-мм остеотомии 4 штифта диаметром 1,2 мм ввинчивают в диафиз бедренной кости нормальных взрослых крыс породы Sprague-Dawley под общей анестезией и постоянном промывании. Хирургический шаблон направляет параллельное расположение штифтов, что подтверждается флюорографией (штифты помещают на расстоянии 3,5 мм от края места

фиксации и 2,5 мм между собой). Затем на штифтах закрепляют наружный фиксатор (30x10x5 мм). Пластинки для наружной фиксации изготавливают с алюминиевым сплавом на заводе CNC для обеспечения высокой прочности. Зажимы со стопорами и нарезные штифты изготавливают отдельно из нержавеющей стали. Перед операцией все части фиксатора стерилизуют газообразной окисью этилена. С помощью осциллирующей пилы Hall Micro 100 (Zimmer Inc., Warsaw, IN) на середине стержня наносят 5-мм сегментные надрезы. В остеотомический зазор помещают коллагеновые губки и удерживают до тех пор, пока они не будут окружены сгустками крови; предварительные исследования показывают, что этот прием фиксирует губку в области остеотомии. Разрезы на коже закрывают скобами. Фиксатор обеспечивает необходимую прочность, так что способность к передвижению хозяина-млекопитающего не ограничена в течение нескольких недель.

9.1.2. ИММУНОГИСТОХИМИЯ

Ткани готовят для световой микроскопии, а иммуногистохимический анализ проводят, как описано в Wong et al., 1992, J. Biol. Chem. 267:5592-5598. Гистологические срезы инкубируют промышленно изготавливаемым анти-β-гал антителом (разбавление 1:200, 5 прим ---> 3 прим) и промышленно изготавливаемым анти-НА.11 поликлональным антителом (разбавление 1:500, Bab CO).

9.1.3. ЛЮЦИФЕРАЗНЫЙ И β-ГАЛ-ФЕРМЕНТНЫЙ ТЕСТЫ

Активность люциферазы и β-гал определяют, используя люциферазную тестовую систему (Promega) и β-галактозидазную ферментную тест-систему (Promega) в соответствии с протоколами изготовителя.

9.1.4. ПЛАЗМИДА ЭКСПРЕССИИ pGAM1

Для сборки pGAM1, используя реагенты и протоколы набора (система изолирования I мПНК Poly AT Tract, Promega), готовят мПНК из однодневных мышинных эмбрионов CD-1 13,5 р. с. Применяя промышленные реагенты (Reverse Transcriptase System, Promega), используют аликвоту мПНК для выработки кДНК. Полимеразной цепной реакцией (PCR) образуют полноразмерную кодирующую последовательность кДНК BMP-4 мыши, используя следующие условия: 94 °C, 4 минуты, 1 цикл; 94°C, 1 мин. , 65°C, 1 мин, 72 °C, 1 мин, 30 циклов; 72°C, 8 мин, 1 цикл. Последовательность праймеров полимеразной цепной реакции основывается на известной последовательности BMP-4 (GenBank) мыши: в обратном направлении праймер-5' CCATGATTCCTGGTAACCGAATGCTG 3'; в прямом направлении праймер-5' CTCAGCGCATCCGCACCCCTC 3'. Единичный продукт полимеразной цепной реакции (1,3 т. п.н.) очищают электрофорезом на агарозном геле и клонируют в клонирующий вектор TA (Invitrogen). Конец 5' вставки BMP-4 далее модифицируют (PCR), добавляя 27-нуклеотидную последовательность, кодирующую эпигенот НА, а вставку BMP-4 клонируют в вектор экспрессии ркДНК3 (Invitrogen). Плазмидную ДНК получают и секвенируют (обе цепочки) для обеспечения ориентации и целостности вставки BMP-4.

Плазмиду рGAM1 экспрессируют, используя набор для транскрипции и трансляции *in vitro* (TNT T7 Coupled Reticulocyte Lysate System, Promega) в соответствии с протоколами изготовителя. Осуществляют введение радиоактивной метки в белок, иммунопреципитацию, получение образца и анализ методом электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия, ауторадиографию, быструю трансфекцию и вестерн-анализ, как описано Yin et al., 1995, J. Biol. Chem. 270:10147-10160.

9.1.5. ПЛАЗМИДА ЭКСПРЕССИИ рGAM2

Фрагменты кДНК человеческого паратиреоидного гормона, кодирующие аминокислоты препро1-34, получают путем полимеразной цепной реакции. Последовательность праймеров PCR основывается на известной последовательности РТН человека (GenBank): в обратном направлении праймер-5' GCGGATCCGCGATGATACCTGCAAAAGACAT G 3'; в прямом направлении праймер-5' GCGGATCCGCGTCAAAAATTGTGCACATCC 3'. Эта пара праймеров создает сайты BamHI на обоих концах фрагмента полимеразной цепной реакции. Фрагмент гидролизует BamHI и лигируется в клонирующий сайт BamHI в векторе ретро-вируса PLJ (Wilson et al., 1992, Endocrinol. 130:2947-2954). Клон со вставкой в кодирующей ориентации (рGAM2) в конце концов изолируют и характеризуют путем анализа последовательности ДНК.

Для получения запаса ретровирусов линии упаковочных клеток Ф CRIP (Wilson, J. M., et al., 1992, Endocrinology 130:2947-2954) трансфицируют 10 мкг рекомбинантной векторной ДНК, используя кальциево-фосфатный способ. После инкубирования в течение ночи культуральную среду (модифицированная по способу Дюльбекко среда Игла, дополненная 10% фетальной бычьей сыворотки, пенициллином (100 ед./мл) и стрептомицином (100 мг/мл) (от Gibco-BRL Life Technologies, Inc.), содержащую частицы ретровируса, собирают и наносят на культуральные клетки Rat-1. Независимые клоны успешно трансдуцированных клеток Rat-1 получают с помощью стандартных процедур инфицирования и отбора. Вкратце, культуральные клетки Rat-1 выращивают для слияния, расщепления 1:10 и отбора в G418 (1 мг/мл. Gibco-BRL Life Technologies, Inc.). В некоторых случаях колонии, резистентные к антибиотику, соединяют в виде единой культуры. В других случаях сохраняют отдельные колонии резистентных клеток. Подобные методы используют для получения клонов клеток Rat-1, трансдуцированных ретровирусом BAGT, кодирующим бактериальный фермент б-гал.

Концентрацию hPTH1-34 в среде культуральных клеток оценивают, используя промышленно выпускаемый набор для радиоиммуноанализа (INS-PTH, Nichols), и в соответствии с протоколом изготовителя. Биологическую активность пептида, кодируемого рGAM2, оценивают как описано McCauley, et al., 1994, Mol. Cell. Endocrinol. 101:331-336.

9.1.6. ПОЛУЧЕНИЕ АКТИВИРОВАННЫХ ГЕНАМИ КОЛЛАГЕНОВЫХ ГУБОК

Для каждого остеотомического зазора

лиофилизированный бычий трахеальный коллаген (10 мг, Sigma) тщательно вымачивают в стерильном растворе 0,5-1,0 мг плазмидной ДНК и перед имплантацией дают возможность инкубироваться в течение 1-16 часов при 4°C.

9.1.7. РАДИОГРАФИЯ

Используя переносную рентгеновскую установку (GE, модель 100), еженедельно получают простые рентгенограммы (задне-передний вид) во время бодрствования хозяев-млекопитающих. Выдержка составляет 1/10 сек при 57 кВ и 15 ма.

9.2. РЕЗУЛЬТАТЫ

9.2.1. ОСТЕОТОМИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ

Наша модельная система использует 5-мм остеотомию на середине стержня бедренной кости взрослых крыс. Остеотомический зазор стабилизируют наружным фиксатором с четырьмя штифтами. В то время как остеотомическую репарацию у крыс завершают 9-недельной пост-хирургической операцией, способ репарации зависит от размера зазора: 2-мм зазор заживает костным сращиванием, однако 5-мм зазор заживает фиброзным несращиванием (Rouleau, J.P., et al., Trans. Ortho. Res. Soc. 20:). Контролируемые млекопитающие-хозяева, доводимые до 13-недельной пост-хирургической операции, подтверждают наблюдения, что 5-мм зазоры обычно заживают фиброзным несращиванием. Еженедельные простые радиограммы и гистология (фиг. 1A-D) показывают, что у млекопитающих-хозяев, подвергшихся либо только 5-мм остеотомии (n=3), 5-мм остеотомии плюс коллагеновая губка (n=10) или 5-мм остеотомии плюс коллагеновая губка, содержащая "голую" плазмидную ДНК гена-маркера (n=23), кости не формируются. Все 36 контрольных зазора заживают путем отложения фиброзной ткани. Контрольные бедренные кости обнаруживают фокальные периостные новые костные образования (осложнения после размещения штифтов). После хирургической операции в тканях зазора также наблюдается фокальная преходящая воспалительная реакция (лимфоциты и макрофаги).

9.2.2. ИССЛЕДОВАНИЯ ГЕНА-МАРКЕРА

В предварительных испытаниях на осуществимость плазмидную ДНК экспрессии lacZ и β-гал успешно переносят *in vivo*. Целью является стандартизация протокола получения активированной генами матрицы и определение послеоперационного периода. Активированную генами матрицу, кодирующую люциферазу, помещают в остеотомический зазор одной из крыс, а активированную генами матрицу, кодирующую β-гал, помещают в зазор второго животного. Через три недели, после тщательного иссечения окружающей ткани, хряща и скелетных мышц, получают гомогенаты зазора (состоящие из грануляционной ткани). Аликвоты каждого гомогената оценивают на экспрессию ферментов с помощью анализа с использованием субстрата. В каждом образце гомогената обнаруживают ожидаемую ферментную активность. Положительные результаты получают в других экспериментах с измененными условиями (например, доза ДНК, период исследования экспрессии белков).

9.2.3. ПЕРЕНОС ГЕНА ВМО-4

Продemonстрировав, что клетки зазора экспрессируют функциональные ферменты после поглощения плазмидной ДНК с матрицы, мы спрашиваем, может ли перенос генов быть использован для модулирования регенерации костей. Мы выбираем сверхсинтез BMP-4, остеоиндуктивного фактора, обычно экспрессируемого клетками-предшественниками во время репарации переломов. Полимеразной цепной реакцией получают мышиную кДНК BMP-4 полной длины и субклонируют в ркДНК3 эукариотический вектор экспрессии (Invitrogen) (фиг. 2). Для специфического выявления рекомбинантных белков конец 3' кодирующей последовательности BMP-4 модифицируют путем добавления эпитопа гемагглютинина (HA). Используя транскрипцию *in vitro* и протокол трансляции, из этой конструкции (pGAM1) экспрессируют рекомбинантный BMP-4. Исследования по иммуноосаждению определяют способность эпитопа гемагглютинина быть распознаваемым поликлональным антителом анти-HA. Биосинтез рекомбинантного BMP-4 оценивают после переходящей трансфекции культуральных клеток 293T плазмидой ДНК pGAM1. Как показывает иммуноосаждение, молекулы BMP-4 собираются в гомодимеры, секретируются и процессируются в ожидаемом порядке. Все вместе эти результаты показывают, что эпитоп гемагглютинина распознается поликлональным антителом анти-HA.

Коллагеновые губки, содержащие ДНК pGAM1, помещают в зазоры 9 взрослых крыс на 4-24 недели. У одного млекопитающего-хозяина, умерщвленного через 4 недели после операции, иммуногистохимические исследования с использованием анти-HA антитела показывают экспрессию pGAM1 репарационными фибробластами внутри зазора. Это является несущественным притом, что мы не наблюдаем ложного положительного окрашивания при обследовании ткани зазоров 13 контрольных млекопитающих-хозяев. Микроскопические очаги новой кости, начинающиеся от обоих хирургических краев, также наблюдаются в четырехнедельных образцах. В соответствии с классическим описанием образования кости путем аутоиндукции (Urist, 1965, Science 150:893-899), эти очаги состоят из костных пластинок, покрытых большими кубовидными остеобластами и поддерживаемых клеточной соединительной тканью, состоящей из плеоморфных веретеновидных фибробластов и капиллярных сосудов. У 7 млекопитающих-хозяев, умерщвленных через 5-12 недель после операции, количество новой рентгенографической кости постоянно увеличивается (фиг. 3А), даже несмотря на то, что BMP-4, кодируемый трансгеном, не обнаруживается иммуногистохимическим методом. Образование мостиков, определяемое как новая кость, проходящая от хирургических краев через остеоотомический зазор, обычно наблюдается через 9 недель. Девятое млекопитающее-хозяин прожило без осложнений 24 недели после хирургической операции. Достаточно прочная новая кость формируется к 18-й неделе, что позволяет снять наружный фиксатор, и в течение еще 6 недель млекопитающее-хозяин хорошо

передвигается (фиг. 3А). После умерщвления зазор оказывается наполненным новой костью, подвергающейся активному ремоделированию, за исключением тонкой полоски рентгенопрозрачной ткани вблизи дистальных краев зазора. При условии, что млекопитающее-хозяин успешно двигалось без фиксации, предположительно, что эта полоска частично минерализована. Этой гипотезе соответствует биомеханическое испытание (Frankenburg et al., 1994, Trans. Ortho. Res. Soc. 19:513), показывающее, что заживший зазор имеет по существу такую же механическую прочность, как и неоперированная бедренная кость того же млекопитающего-хозяина (разница 6,3%, испытание на максимальное кручение). Рентгенографический вид контралатеральных (неоперированных) бедренных костей остается неизменным во всех девяти случаях, учитывая, что действие переноса генов и сверхэкспрессия BMP-4 в остеоотомическом зазоре являются ограниченными.

9.2.4. ПЕРЕНОС И ЭКСПРЕССИЯ ПЛАЗМИДНОЙ СМЕСИ (BMP-4 + PTH1-34)

Регенерация костей обычно зависит от многочисленных факторов, действующих в регулируемой последовательности, поэтому мы предположили, что экспрессия нескольких анаболических факторов будет стимулировать образование костей сильнее, чем один отдельный фактор. Для проверки этой гипотезы мы выбрали доставку двухплазмидной активированной генами матрицы, кодирующей BMP-4, плюс пептидный фрагмент паратиреоидного гормона (PTH). PTH представляет собой гормон аминокислоты 84, увеличивающий концентрацию Ca^{+2} плазмы и внеклеточной жидкости. В скелетных тканях интермиттирующее введение фрагмента паратиреоидного гормона, удовлетворяющего структурным требованиям биологической активности (aa 1-34), оказывает настоящее анаболическое действие: многочисленные исследования *in vivo* и *in vitro* убедительно доказывают, что введение PTH1-34 млекопитающему-хозяину (включая крыс) приводит к разобщенному высококачественному образованию костей, благодаря общему ингибирующему действию на остеокласты и стимулирующему действию на остеогенные клетки (Dempster et al., 1993, Endocrin Rev. 14:690-709). Известно, что пептид PTH1-34 взаимодействует синергетически с BMP-4, регулирующим экспрессию функциональных рецепторов PTH поверхности клеток при дифференциации остеобластов (Ahrens et al., 1993, J. Bone Min. Res. 12:871-880).

Фрагмент кДНК, кодирующий человеческий PTH1-34, синтезируют с помощью полимеразной цепной реакции. Для определения биологической активности фрагмента его субклонируют в ретровирусный вектор PLJ (Wilson et al., 1992, Endocrin. 130:2947-2954), синтезирующий плазмиду экспрессии pGAM2 (фиг. 4А). Готовят запас репликационно-дефективного рекомбинантного ретровируса, наносимого на клетки Rat-1 в культуре. Получают независимые клоны трансдуцированных клеток Rat-1, а устойчивую интеграцию и экспрессию ретровирусной ДНК демонстрируют путем саузерн- и

нозерн-анализов. Для определения концентрации человеческого PTH1-34 в кондиционной среде индивидуальных клонов используют радиоиммуноанализ. Клетки ROS 17/2,8 обладают рецепторами поверхности клеток паратиреоидного гормона, принадлежащего к суперсемейству связанных белком рецепторов G (Dempster et al., 1993, Endocrin. Rev. 14:690-709). Инкубирование клеток ROS 17/2,8 в аликвотах кондиционной среды из стабильно трансдуцированной клеточной линии (секретирующей > 2 пг/мл, как установлено с помощью радиоиммуноанализа) приводит к 2,7-кратному увеличению реакции CAMP против контроля, результат, показывающий, что секретируемый пептид PTH1-34 является биологически активным.

Активированные генами матрицы, содержащие одну лишь плазмидную ДНК pGAM2, стимулируют костные активированные генами матрицы, содержащие плазмидные ДНК экспрессии BMP-4 и PTH1-34, а затем вместе имплантируют в остеотомический зазор еще трех хозяев-млекопитающих. К четвертой неделе во всех трех хозяевах-млекопитающих наблюдается образование мостиков (к этому времени одного хозяина-млекопитающего умерщвляют для гистологии), и к 12-й неделе после операции у оставшихся хозяев-млекопитающих образуется достаточно прочная новая кость, позволяющая удалить наружный фиксатор (фиг. 5). Оба млекопитающих-хозяина хорошо передвигаются ко времени публикации, через 15 и 26 недель после имплантации, соответственно. Исходя из рентгенограмм, действие переноса генов и сверхсинтез в остеотомическом зазоре вновь ограничены.

После исследований с использованием коллагеновой губки также показано, что плазмидная ДНК может быть доставлена к клеткам непрерывным образом после инкапсулирования во время получения блок-сополимеров полимолочных-полигликолевых частиц. Результаты показывают, что культуральные клетки могут быть трансфицированы плазмидной ДНК, освобожденной из полимолочных-полигликолевых частиц. Результаты также показывают, что репарационные фибробласты (модель остеотомии у крыс) in vivo поглощают и экспрессируют плазмидную ДНК, освобождаемую из блок-сополимеров полимолочных-полигликолевых частиц. Фиг. 7 показывает, что репарационные фибробласты (модель остеотомии у крыс) in vivo поглощают и экспрессируют плазмидную ДНК pGAM2 после освобождения из полимолочных-полигликолевых частиц. Как показано на фиг. 7, экспрессия PTH1-34, кодированной плазмидой, связана со значительным новым костным образованием в остеотомическом зазоре.

В целом эти исследования показывают, что успех технологии активированных генами матриц не зависит от коллагенозной матрицы. Поэтому эта технология достаточно широка, чтобы ее можно было объединить как с биологическими, так и синтетическими матрицами.

10. ПРИМЕР: ПЕРЕНОС ГЕНОВ К РЕГЕНЕРИРУЮЩЕМУ СУХОЖИЛИЮ И ДЛЯ

РЕГЕНЕРАЦИИ КРЕСТООБРАЗНОЙ СВЯЗКИ IN VIVO

Существует клиническая потребность в стимулировании образования шрамов во время репарации пяточного сухожилия и связок (плечевых и коленных) с целью усиления механической прочности поврежденной ткани. Разработана система модели, в соответствии с которой пяточному сухожилию наносят сегментные дефекты, и новый биоматериал, т.е. подслизистую основу тонких кишок или SIS, используют как имплантат для сухожилия/молекулярный агент для доставки. Данный пример демонстрирует способность доставлять и экспрессировать конструкции гена-маркера в регенерирующую ткань сухожилия, используя трансплантат SIS.

10.1. МАТЕРИАЛЫ И СПОСОБЫ

Наносят сегментные дефекты на пяточное сухожилие, и препарат, содержащий подслизистую основу тонких кишок, наносят в качестве системы имплантат для сухожилия/молекулярная доставка. В соответствии со стандартными протоколами (Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press) готовят маточные растворы плазмиды (pSVogal, Promega). Материал для трансплантата, содержащий подслизистую основу тонких кишок, готовят из сегмента тощей кишки взрослых свиней (Badylak et al., 1989, J. Surg. Res. 47:74-80). При сборе мезентериальные ткани удаляют, сегмент инвертируют, а слизистую оболочку и поверхностный слой подслизистой основы удаляют методом механической абразии. После придания сегменту его первоначальной ориентации серозный и мышечный слои промывают, стерилизуют путем обработки разбавленной перуксусной кислотой и хранят при 4°C до использования.

Собак смешанных пород (все испытания) анестезируют, интубируют, укладывают на правый бок на подогреваемой прокладке и подвергают ингаляционному наркозу. Делают боковой разрез от мускульно-сухожильного соединения до подошвенной фасции с целью обнажения пяточного сухожилия. Лист SIS двойной толщины оборачивают вокруг центральной части сухожилия, оба конца зашивают, 1,5 см сегмент сухожилия удаляют через боковое отверстие в материале трансплантата, а трансплантат и хирургическое поле закрывают. Ногу иммобилизуют на 6 недель, а затем свободно используют в течение 6 недель. Трансплантированные ткани собирают через указанные ниже отрезки времени, фиксируют в растворе Bouins и заливают парафином. Делают срезы тканей (8 мкм) для иммунохимического анализа.

10.2. РЕЗУЛЬТАТЫ

При первоначальных исследованиях, после нанесения сегментных дефектов беспородным собакам через 6 месяцев после хирургической операции, материал, содержащий одну лишь подслизистую основу тонких кишок, имплантируют, обеспечивая регенерацию пяточного сухожилия. Процесс ремоделирования включает быстрое образование грануляционной ткани и постепенную деградацию трансплантата. Рубцовая ткань не образуется, и признаков иммунного отторжения не наблюдается.

Во втором исследовании SIS замачивают в

растворе плазмидной ДНК (SIS + плазмидный трансплантат), а затем имплантируют в качестве имплантата пяточного сухожилия (n=2 собаки) или трансплантата крестообразной связки (n=2 собаки) обычным беспородным собакам. Плазмиду pSV β -гал, включающую регуляторные последовательности обезьяньего вируса 40 для поддержания активности β -галактозидазы (β -гал), определяют путем иммуногистохимического анализа, используя специфические антитела в хозяевах-млекопитающих 4/4. В качестве отрицательного контроля активность β -гал неоперированного пяточного сухожилия и крестообразной связки этих хозяев-млекопитающих не определяют. Поэтому, оказывается, SIS облегчает поглощение и последующую экспрессию плазмидной ДНК новыми клетками сухожилия как в сухожилии, так и связке.

Третье исследование предназначено для определения периода времени экспрессии трансгена β -гал. SIS + плазмидные трансплантаты имплантируют на 3, 6, 9 и 12 недель (n= 2 собаки на определенный момент времени), и экспрессию трансгенов определяют иммуногистохимическим методом. Делают поперечные срезы (8 мкм) зафиксированной в фиксаторе Bouins и залитой парафином ткани и переносят их на предметные стекла Probeon Plus (Fisher). Иммуногистохимический анализ осуществляют в соответствии с протоколом, прилагаемым к набору Histostain-SP (Zymed). Вкратце, микроскопические препараты инкубируют с ярко выраженным антителом анти- β -галактозидазы (разбавление 12:00, 5 прим ----> 3 прим), промывают в забуференном фосфатом физиологическом растворе (PBS), инкубируют со вторым биотинилированным антителом, промывают, окрашивают ферментным конъюгатом плюс субстратно-хромогенная смесь, а затем контрастно окрашивают гематоксилином и эозином.

Бактериальную активность β -гал определяют в сухожилиях с трансплантатом, содержащим SIS + плазмиды (хозяева-млекопитающие 8/8). Хотя и не строго количественно, экспрессия трансгенов достигает пика на 9-12-й неделе. Бактериальную экспрессию гена β -гал не обнаруживают в 35 млекопитающих-хозяевах с трансплантатами, содержащими только SIS.

11. ПРИМЕР: ПЕРЕНОС АДЕНОВИРУСНОГО ГЕНА В РЕГЕНЕРИРУЮЩУЮ КОСТЬ IN VIVO

Альтернативный способ переноса гена в регенерирующую ткань in vivo включает перенос с использованием аденовируса. Осуществляют успешный перенос аденовирусного гена конструкции гена-маркера в репарационные клетки кости на остеотомической модели крыс.

11.1. МАТЕРИАЛЫ И СПОСОБЫ

Аденовирусный вектор pAd. CMVlacZ представляет собой пример репликационно-дефективного аденовирусного вектора, который может быть реплицирован в пермиссивных клетках (Stratford-Perricaudet et al., 1992, J. Clin. Invest. 90: 626-630). В этом конкретном векторе ранний энхансер/промотор цитомегаловируса (CMV)

используют для удаления транскрипции lacZ с последовательностью полиаденилирования SV40, клонированную в прямом направлении от гена-репортера (Davidson et al., 1993, Nature Genetics 3:219-223).

pAd. RSV4 имеет по существу такой же скелет, как и pAd.CMVlacZ, однако промотор CMV и единственный клонирующий сайт BglII заменяют на кассету с фрагментом B III, состоящим из промотора RSV множественного клонирующего сайта и сайта поли (A⁺). Большая пластичность данного вектора предназначена для субклонирования остеотропных генов, таких как фрагмент кДНК hPTH1-34, используемых в дальнейших исследованиях.

Имплантат Ultra FiberTM замачивают на 6 минут в растворе вируса AdCMV lacZ (10¹⁰-10¹¹ бляшкообразующих единиц или PFU/мл), а затем имплантируют в сайт остеотомии. Дефектам дают возможность заживать в течение 3 недель, на протяжении которых ход реакции заживления раны наблюдают с помощью еженедельных рентгенограмм. Через 3 недели определяют, что 40% дефекта заполнено мозольной тканью. Хозяина-млекопитающее умерщвляют, ткани фиксируют в фиксаторе Bouins, а затем деминерализуют в течение 7 дней, используя стандартные растворы муравьиной кислоты.

11.2. РЕЗУЛЬТАТЫ

Полученные результаты окончательно демонстрируют экспрессию продукта гена-маркера в хондроцитоподобных клетках остеотомического зазора (фиг. 6). В предшественниках остеобластов также наблюдается ядерно-направленный сигнал.

12. ПРИМЕР: ПЕРЕНОС ГЕНОВ В СКЕЛЕТНЫЕ МЫШЦЫ

Существует клиническая потребность в стимулировании образования рубцов во время репарации мягких тканей, за исключением пяточного сухожилия и связок (плечо и колено), с целью усиления механической компетентности поврежденной ткани. Разработана модельная система, в соответствии с которой делают разрезы в скелетной мышце взрослых крыс, и шовный материал, покрытый препаратом, содержащим непрерывно выделяющиеся частицы PLGA и плазмидную ДНК, используют в качестве приспособления скелетная мышца/доставка генов. Для демонстрации осуществимости составов для покрытия и способов по данному изобретению шовный хирургический материал покрывают ДНК-маркером (кодирующим человеческую плацентарную щелочную фосфатазу) и используют для зашивания мышечной ткани крыс. Эксперимент показывает успешный перенос и экспрессию ДНК в ткани, репарированной покрытым шовным материалом.

12.1. МАТЕРИАЛЫ И СПОСОБЫ

12.1.1. ПОЛУЧЕНИЕ КОМПОЗИЦИЙ ДЛЯ ПОКРЫТИЯ ДНК-PLGA

К 1,5 мл раствора сополимера гликолевой и молочной кислоты (PLGA) и хлороформа (3% (вес. /об.) 50/50 сополимер полимолочной и полигликолевой кислоты PLGA, средняя молекулярная масса 90000, характеристическая вязкость 1,07) добавляют 0,2 мл раствора, содержащего ДНК-маркер, кодирующий человеческую плацентарную щелочную фосфатазу (1 мг ДНК, 0,5 mM

трис-ЭДТА, 0,5 мМ ЭДТА, pH 7,3). Раствор эмульгируют интенсивным перемешиванием в течение 2 минут с последующим воздействием ультразвуком в течение 30 сек приблизительно при 0°C, используя ультразвуковой прибор с микронаконечником, зондом и выходом 55 ватт. В результате этого процесса получают эмульсию, очень похожую на молоко.

12.1.2. ПОКРЫТИЕ ХИРУРГИЧЕСКИХ ШОВНЫХ МАТЕРИАЛОВ

Используя иглу N 22, в фольге, покрытой тефлоном (Norton Performance Plastic Corp., Akron, OH), прокалывают отверстие. На отверстие наносят каплю (приблизительно 60 мкл) эмульсии ДНК + сополимер гликолевой и молочной кислоты (PLGA). Хромированную нить 3-0 (Ethicon) длиной 70 см протягивают через отверстие для нанесения на нее покрытия. По мере прохождения через отверстие на нить наносится тонкий (толщиной приблизительно 30 мкм) равномерный слой композиции для покрытия. Нити дают возможность высохнуть на воздухе в течение приблизительно 3 минут, и процесс покрытия повторяют 15 раз, давая возможность каждому слою высохнуть на воздухе. Покрытый шовный материал исследуют под электронным микроскопом (150X) и определяют, что он покрыт равномерным слоем эмульсии ДНК + сополимер гликолевой и молочной кислоты. Более того, покрытие остается интактным даже после многократного протягивания шовного материала через ткань.

12.1.3. РЕПАРАЦИЯ СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЫ С ПОМОЩЬЮ ШОВНОГО МАТЕРИАЛА С ПОКРЫТИЕМ

Полученный выше шовный материал вшивают в ткань скелетной мышцы двух нормальных взрослых крыс с удовлетворительными хирургическими результатами. Связывающий материал показывает хорошие скрепляющие свойства. Через неделю мышцу и шовный материал иссекают, моментально замораживают в жидком азоте и перемалывают в порошок. Порошок инкубируют в 200 мкл лизинного буфера, подвергают трем циклам замораживание-оттаивание и очищают. Очищенную жидкость анализируют на активность щелочной фосфатазы, используя стандартные методы после инкубирования при 65°C.

12.2. РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты показывают, что скелетная мышца крыс, зашитая шовным материалом с покрытием, удаленным через неделю, проявляет щелочно-фосфатазную активность, означающую, что ген-маркер щелочной фосфатазы экспрессирован в мышечную ткань. Контрольные восстановления не показывают значительной активности щелочной фосфатазы. Эти данные показывают, что эмульсии могут быть использованы для эффективного покрытия шовных материалов и доставки генов в пролиферирующие репарационные клетки *in vivo*.

13. ПРИМЕР: ПЕРЕНОС ГЕНОВ В КРОВЕНОСНЫЕ СОСУДЫ

Существует клиническая потребность в предотвращении избыточного фиброза (рестеноз), который, например, может возникнуть во время репарации кровеносных

сосудов после ангиопластики. Это может быть осуществлено, например, путем доставки генов, кодирующих ингибиторы лизиловой оксидазы, или путем переноса генов, кодирующих определенные TGF-β. Кроме того, существует клиническая потребность в регулировании ангиогенеза, как, например, при нарушениях, связанных с сосудистой недостаточностью, целью которого является стимулирование формирования новых сосудов для предотвращения гипоксии тканей и гибели клеток. Разработана модельная система, в которой репарационные клетки в больших кровеносных сосудах у кроликов трансфицируют препаратом, содержащим непрерывно выделяемые частицы сополимера гликолевой и молочной кислоты и плазмидной ДНК. Репарационные клетки присутствуют, потому что эти кровеносные сосуды кроликов являются пристанищем для поражающих ксантомных (пенистых) клеток, имитирующих клинический атеросклероз у людей. Данный пример демонстрирует способность доставлять и экспрессировать конструкции гена-маркера в репарационные клетки больших кровеносных сосудов.

13.1. МАТЕРИАЛЫ И СПОСОБЫ

Для этого исследования используют белых новозеландских кроликов обоих полов весом от 3,1 до 3,5 кг. Кроликов анестезируют внутримышечным введением кетамина (35 мг/кг) и ксилазина (5 мг/кг), поддерживая анестезию внутривенным введением кетамина (8 мг/кг) в крайнюю вену. Приблизительно 2-см сегменты обеих подвздошных артерий между бифуркацией нисходящей аорты и паховой связки связывают проксимально, и все небольшие ответвления этих артериальных сегментов лигируют. Локальный тромб предотвращают путем введения гепарина (100 мг) в крайнюю ушную вену. После подвздошной артериотомии в подвздошные артериальные сегменты вводят баллонный катетер для ангиопластики (2,0 мм баллон) и расширяют баллон в течение 1 минуты при давлении 8 атм.

После расширения баллона катетер для ангиопластики удаляют и внутриартериально вводят 20 мг гепарина для предотвращения дистального тромбоза. Оба конца подвздошной артерии стягивают шелком 10,0 и в каждую подвздошную артерию в течение 3 минут при 0,5 атм вливают 0,5 мг/мл суспензии, содержащей наночастицы ДНК. Рану зашивают. Кроликов умерщвляют через 2 недели после баллонной ангиопластики и доставки наночастиц. Через вертикальный разрез в нижней части брюшной полости изолируют обе подвздошные артерии, 2-см сегмент подвздошной артерии иссекают с обеих сторон. В качестве контрольного образца используют сонные артерии кролика. Ткань сохраняют в жидком азоте для анализа на щелочную фосфатазу.

13.2. РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты анализов на экспрессию фосфатазы показывают, что состав, содержащий наночастицы плюс ДНК, способен доставлять нуклеиновые кислоты в репарационные клетки подвздошных артерий взрослых кроликов, поврежденных баллонным катетером. Как правая, так и левая подвздошные артерии показывают положительную активность фосфатазы после контакта с составами, содержащими

наночастицы плюс ДНК. Контрольная аорта не обнаруживает активности фосфатазы. Эти положительные результаты показывают, что после воздействия активированной генами матрицы репарационные клетки в больших кровеносных сосудах могут поглощать и экспрессировать молекулы нуклеиновых кислот.

Объем данного изобретения не ограничивается проиллюстрированными вариантами его осуществления, предназначенными для иллюстрации отдельных аспектов настоящего изобретения, и любые функционально эквивалентные клоны, ДНК или последовательности аминокислот входят в объем данного изобретения, также включающего различные модификации, известные специалистам, и вытекающие из вышеприведенного описания и прилагаемых фигур. Эти модификации также входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

Следует также отметить, что все основные размеры пар, приведенные для нуклеотидов, являются приблизительными и используются с описательной целью.

Формула изобретения:

1. Способ переноса молекулы ДНК, направляющий экспрессию генного продукта, в репаративную клетку млекопитающего, включающий внедрение биосовместимой матрицы, содержащей молекулу ДНК, в рану млекопитающего таким образом, чтобы репаративные клетки в области раны приобрели эту молекулу ДНК и экспрессировали генный продукт *in vivo*.

2. Способ по п. 1, в котором биосовместимая матрица включает коллагенозный, металлический, гидроксиапатитовый, биокерамический, биостеклянный, алюминатный материал, очищенные белки или внеклеточные матричные композиции.

3. Способ по п.2, в котором биосовместимая матрица представляет собой коллаген.

4. Способ по п.3, в котором коллаген представляет собой коллаген тип II.

5. Способ по п.1, в котором молекула ДНК кодирует заживляющий белок.

6. Способ по п.5, в котором заживляющий белок представляет собой гормон.

7. Способ по п.6, в котором гормон представляет собой гормон роста (GH).

8. Способ по п.6, в котором гормон представляет собой человеческий паратиреоидный гормон (PTH).

9. Способ по п.1, в котором молекула ДНК кодирует фактор роста.

10. Способ по п.9, в котором фактор роста представляет собой трансформирующий фактор роста - β (TGF- β), фибробластный фактор роста (FGF), тромбоцитарный фактор роста (PDGF), инсулиноподобный фактор роста (IGF) или костный морфогенный фактор (BMP).

11. Способ по п.1, в котором молекула кодирует антисмысловую или рибозимную молекулу.

12. Способ по п.1, в котором молекула ДНК является более чем одной молекулой ДНК.

13. Способ по п.1, в котором указанная область раны представляет собой область перелома кости.

14. Способ по п.1, в котором указанная область раны представляет собой область повреждения соединительной ткани.

15. Способ по п.1, в котором указанная область раны представляет собой область повреждения органа.

16. Активированная генами матрица, содержащая биосовместимую матрицу, составленную как поддерживающая структура, которая способствует присоединению или росту клеток, и молекулу ДНК, направляющую экспрессию генного продукта, где указанная молекула ДНК способна поглощаться репаративными клетками *in vivo*.

17. Активированная генами матрица по п.16, в которой генный продукт представляет собой белок.

18. Активированная генами матрица по п.16, в которой генный продукт представляет собой антисмысловую или рибозимную молекулу.

19. Активированная генами матрица по п.16, в которой генный продукт представляет собой фактор роста.

20. Активированная генами матрица по п.19, в которой фактор роста представляет собой TGF- β , FGF, PDGF, IGF или BMP.

21. Активированная генами матрица по п.16, в которой матрица содержит более чем одну молекулу ДНК.

22. Активированная генами матрица по п.16, в которой матрица представляет собой коллагенозный, металлический, гидроксиапатитовый, биокерамический, биостеклянный, алюминатный материал, очищенные белки или внеклеточные матричные композиции.

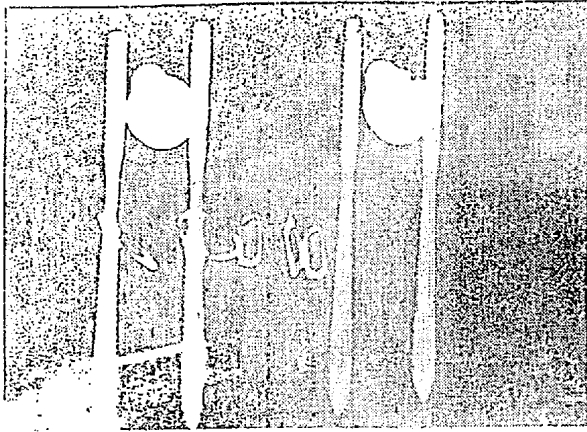
23. Активированная генами матрица по п.22, в которой биосовместимая матрица представляет собой коллаген.

24. Активированная генами матрица, в которой коллаген представляет собой коллаген, тип II.

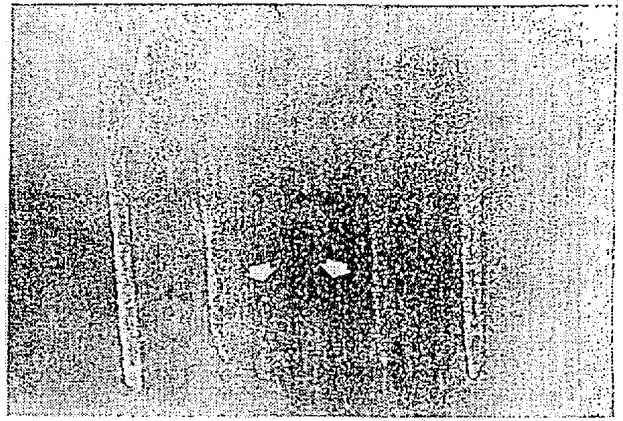
25. Набор, содержащий в подходящей емкости препарат активированной генами матрицы.

26. Набор, содержащий в подходящей емкости препарат биосовместимой матрицы и препарат ДНК, кодирующей заживляющий белок.

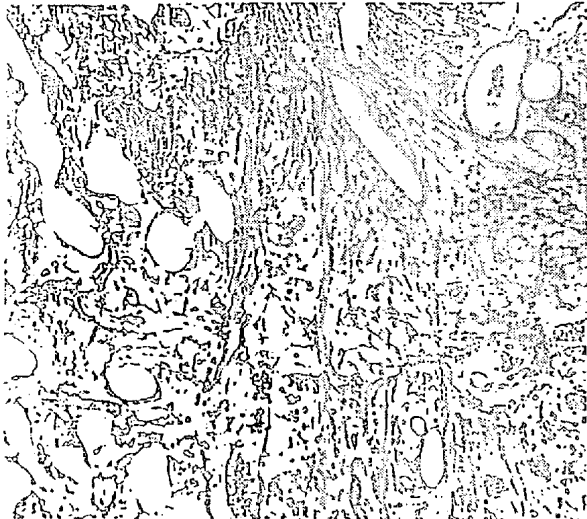
27. Способ получения композиции ДНК-матрицы, включающий контактирование молекулы ДНК с биосовместимой матрицей, составленной как поддерживающая структура, способствующая присоединению или росту клеток, так, чтобы ДНК связывалась с матрицей нековалентно и была способна поглощаться репаративными клетками *in vivo*.



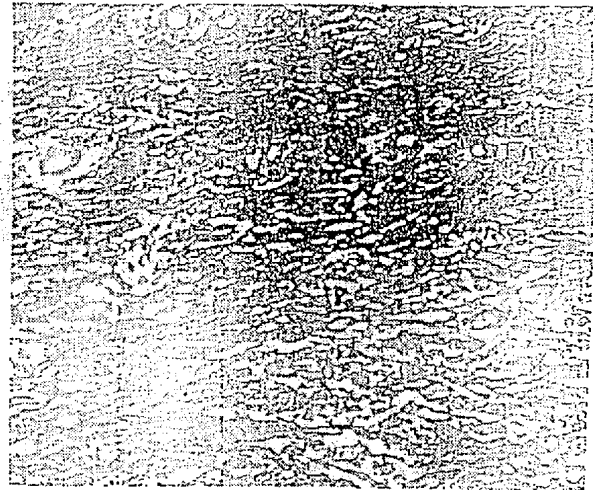
ФИГ. 1А



ФИГ. 1В

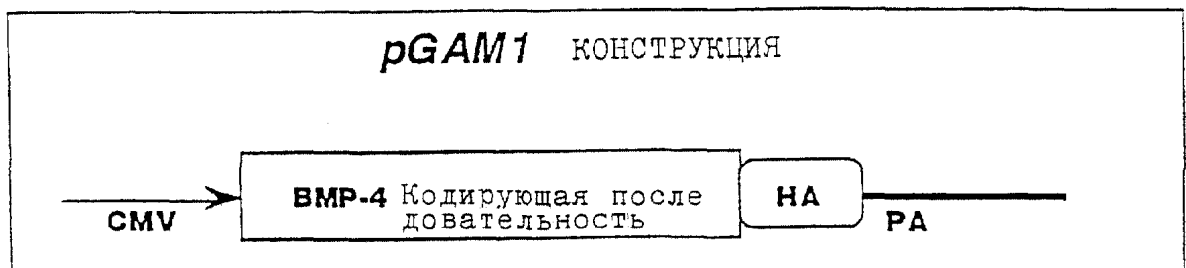


ФИГ. 1С

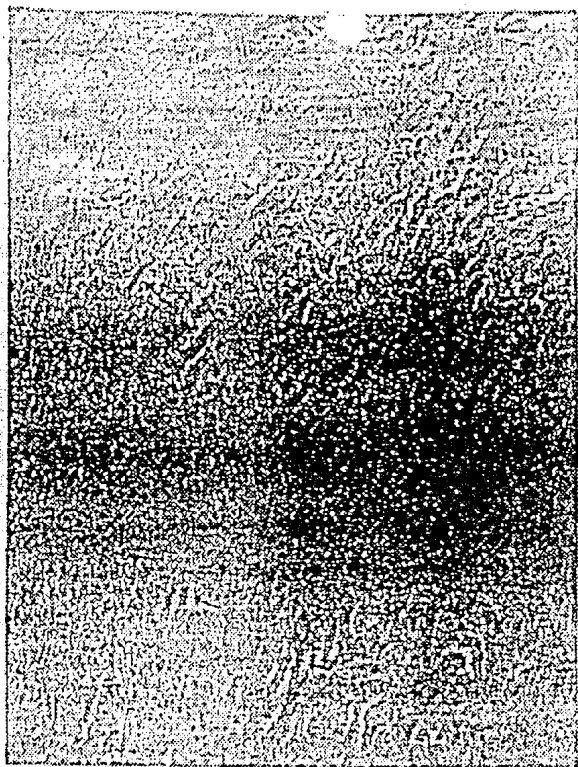
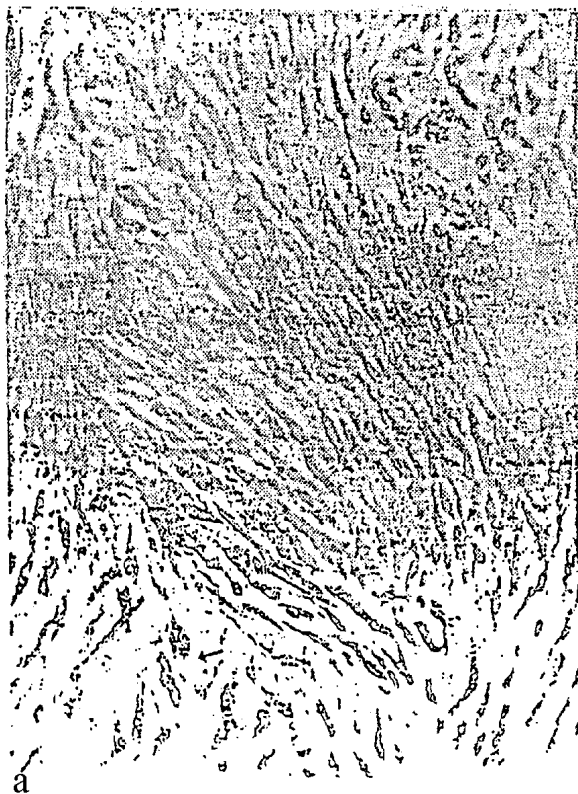


ФИГ. 1D

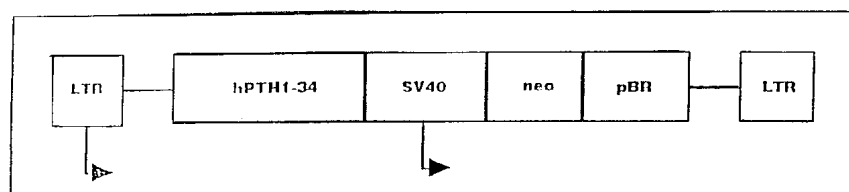
a



ФИГ. 2



ФИГ. 3А

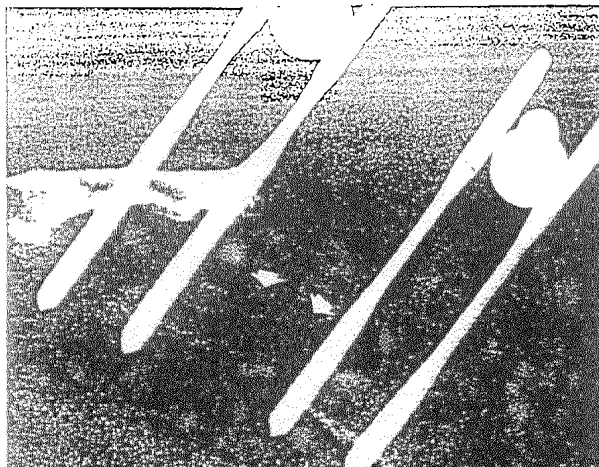


ФИГ. 4А

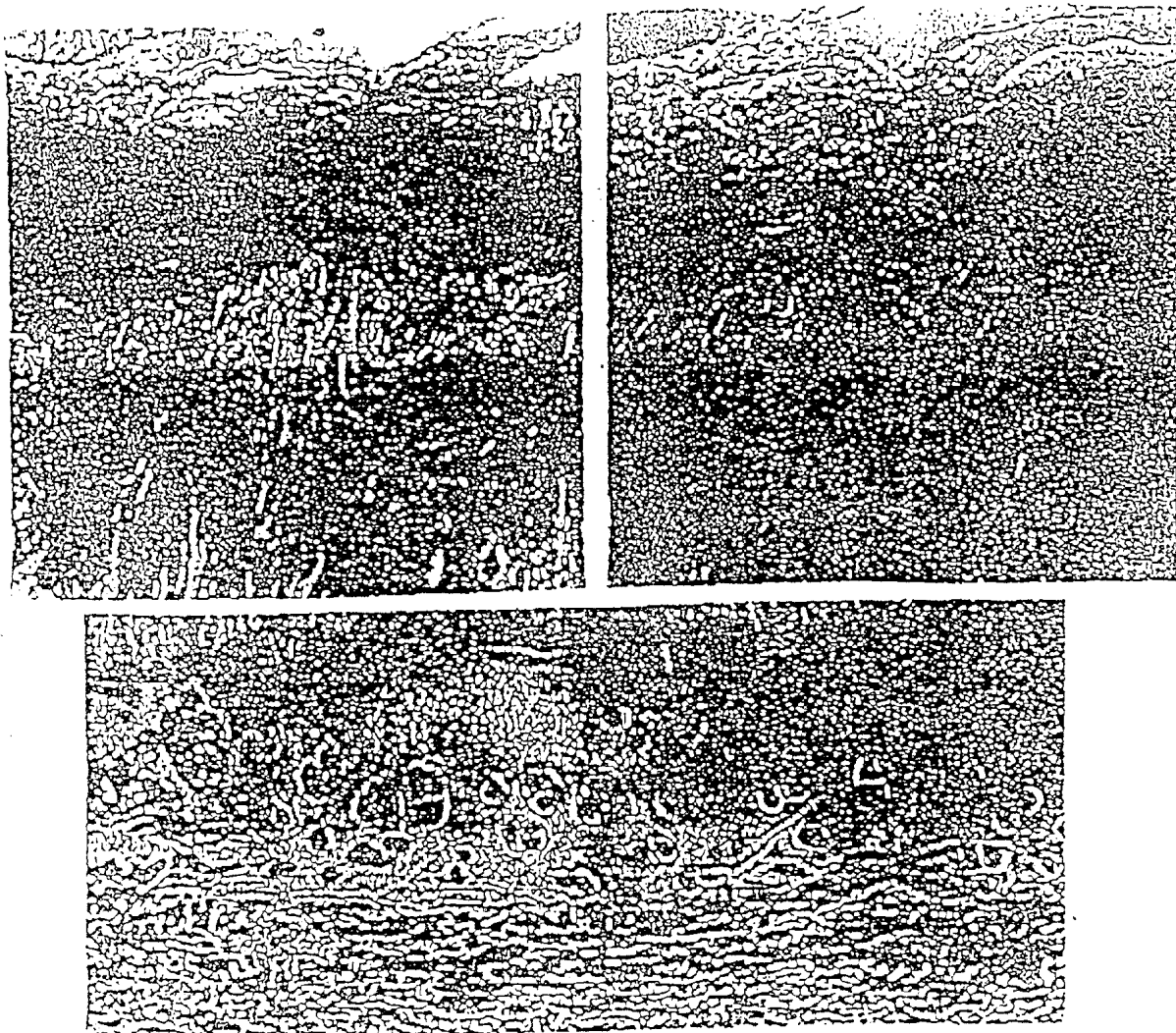


Фиг. 4В

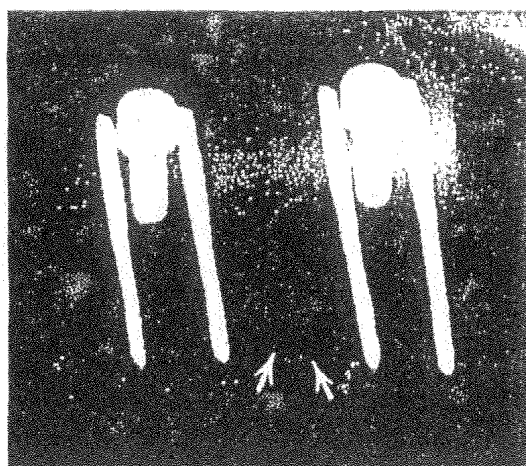
RU 2170104 C2



RU 2170104 C2



ФИГ. 6



6 НЕДЕЛЬ

ФИГ. 7