

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **031883**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2019.03.29

(21) Номер заявки
201591783

(22) Дата подачи заявки
2014.03.15

(51) Int. Cl. *A61K 38/00* (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

(54) СПОСОБ ИНГИБИРОВАНИЯ И/ИЛИ СНИЖЕНИЯ ОБРАЗОВАНИЯ РУБЦОВОЙ ТКАНИ

(31) **61/793,462**

(32) **2013.03.15**

(33) **US**

(43) **2016.01.29**

(86) **PCT/US2014/029960**

(87) **WO 2014/145236 2014.09.18**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ДЖУВЕНТАС ТЕРАПЬЮТИКС,
ИНК.; ДЗЕ КЛИВЛЕНД КЛИНИК
ФАУНДЕЙШН (US)**

(72) Изобретатель:
**Пенн Марк С., Кидровски Мэттью,
Арас Рахул, Пастор Джозеф (US)**

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

(56) **US-A1-20130034523**

GenBank: AF425299.1. Expression vector pGA3, complete sequence. 15 November 2001 [Retrieved from the Internet 24 September 2014: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/16930604?report=genbank&log\\$=nuclalign&blast_rank=39&RID=268SKA0H01R](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/16930604?report=genbank&log$=nuclalign&blast_rank=39&RID=268SKA0H01R)>]; in entirety

(57) Изобретение относится к способу ингибирования и/или снижения образования рубцовой ткани в ране кожи, включающему повышение концентрации SDF-1 в ране или вблизи раны, путем введения в указанную рану и/или область, примыкающую к ране, терапевтически эффективного количества вектора, экспрессирующего SDF-1.

B1**031883****031883****B1**

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Данная заявка истребует приоритет на основании заявки на патент США № 61/793462, поданной 15 марта 2013 г., которая включена в данное описание посредством ссылки во всей своей полноте.

Область техники

Настоящее изобретение относится к композиции и способам стимулирования заживления ран пациента.

Предшествующий уровень техники

Раны (например, резаные или открытые) в ткани млекопитающих приводят к разрушению ткани и коагуляции микрососудов на поверхности раны. Восстановление такой ткани представляет собой упорядоченный, контролируемый клеточный ответ на повреждение. Все раны мягких тканей независимо от размера заживают одинаково. Рост и восстановление ткани являются биологическими системами, в которых клеточная пролиферация и ангиогенез происходят в присутствии кислородного градиента. Последовательные морфологические и структурные изменения, которые происходят во время восстановления ткани, подробно охарактеризованы, и в некоторых случаях был проведен количественный анализ (Hunt, T.K. с соавторами "Coagulation and macrophage stimulation of angiogenesis and wound healing", The Surgical Wound, с. 1-18, под ред. F. Dineen & G. Hildrick-Smith (Lea & Febiger, Филадельфия, 1981)).

Клеточная морфология состоит из трех четко выраженных отдельных зон. Центральное бессосудистое раневое пространство характеризуется дефицитом кислорода, ацидозом и гиперкапнией и имеет высокие уровни лактата. Рядом с раневым пространством находится градиентная зона местной анемии (ишемии), которая заполняется путем деления фибробластов. За ведущей зоной находится область активного синтеза коллагена, которая характеризуется зрелыми фибробластами и многочисленными новообразованными капиллярами (т.е. область неоваскуляризации). Хотя такой рост новых кровеносных сосудов (ангиогенез) является необходимым для заживления раневой ткани, как правило, ангиогенные средства не в состоянии выполнить давно испытываемую потребность обеспечения дополнительных биосинтетических эффектов восстановления тканей. Несмотря на необходимость более быстрого заживления ран (например, при тяжелых ожогах, хирургических разрезах, разрывах и других травмах), на сегодняшний день наблюдается лишь ограниченный успех в ускорении заживления ран с помощью фармакологических средств.

Краткое содержание изобретения

Настоящее изобретение относится к способам и препаратам для лечения и/или стимулирования заживления ран у пациента. В способе SDF-1 вводят непосредственно в рану или клетки вблизи раны в количестве, эффективном для ускорения заживления ран. Рана может включать в себя любое повреждение какой-либо части тела пациента. Примеры ран, которые можно лечить с помощью данного способа, включают обострения или раны, такие как термические ожоги, химические ожоги, радиационные ожоги, ожоги, вызванные избыточным воздействием ультрафиолетового излучения (например, солнечные ожоги); повреждение тканей организма, такие как повреждение промежности в результате потуг и родов; травмы во время медицинских процедур, такие как эпизиотомия, травмы в результате повреждений, включая порезы, разрезы, экскорииации; травмы при несчастных случаях; послеоперационные раны, а также хронические заболевания; такие как пролежни, надины, состояния, связанные с диабетом и плохой циркуляцией, и все виды акне. Кроме того, примеры ран могут включать дерматит, такой как импетиго, опрелости, фолликулит и экземы, раны, полученные в результате стоматологической хирургии; пародонтоз; раны после травмы и раны, связанные с опухолями.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу ингибирования и/или снижения образования рубцовой ткани в ране кожи, включающему повышение концентрации SDF-1 в ране или вблизи раны путем введения в указанную рану и/или область, примыкающую к ране, терапевтически эффективного количества вектора, экспрессирующего SDF-1, где вектор является плазмидой, имеющей последовательность SEQ ID NO:6. В частности, указанная рана кожи является острой раной, выбранной из следующих: термический ожог, химический ожог, радиационный ожог, ожог, вызванный избыточным воздействием ультрафиолетового излучения, повреждение, полученное во время медицинской процедуры, разрез, повреждение, вызванное травмой, порез или разрыв. В другом варианте осуществления рана кожи является хронической раной, выбранной из следующих: язвы от сдавливания, пролежни, раны, связанных с диабетом или плохим кровообращением, или раны, возникшие в результате дерматита или акне. В следующем варианте осуществления вектор, экспрессирующий SDF-1, вводят в форме фармацевтической композиции, содержащей вектор экспрессии SDF-1 и фармацевтически приемлемый носитель, в частности фармацевтическая композиция может являться инъекционным составом, предпочтительно указанный инъекционный состав вводят инъекцией непосредственно в рану или в область, прилегающую к ране. В еще одном варианте осуществления вектор, экспрессирующий SDF-1, наносят в виде состава для наружного применения, предпочтительно вектор, экспрессирующий SDF-1, наносят на подложке, твердом носителе или раневой повязке, еще более предпочтительно указанная подложка является биорассасывающимся имплантатом, или указанный вектор, экспрессирующий SDF-1, наносят на или в раневой повязке. В следующем варианте осуществления указанный вектор, экспрессирующий SDF-1, наносят на поверхность раны. Кроме того, указанный вектор, экспрессирующий SDF-1, может вводиться как

часть хирургической процедуры. Указанный вектор, экспрессирующий SDF-1, можно вводить в течение 24 ч после возникновения раны или через более чем 24 ч после возникновения раны. В еще одном варианте осуществления изобретения рану закрывают при проведении медицинской процедуры.

В другом аспекте настоящего изобретения SDF-1 могут быть введены путем экспрессии SDF-1 в клетках вблизи раны и/или нанесения на рану лекарственного препарата, включающего SDF-1. SDF-1 может экспрессироваться из клеток вблизи раны вследствие генетической модификации клеток вектором, кодирующим SDF-1. SDF-1 может экспрессироваться из клеток вблизи раны вследствие генетической модификации клеток плазмидом, кодирующим SDF-1. В некоторых вариантах осуществления плазмидная ДНК, имеющая последовательность SEQ ID NO:6, может быть использована для экспрессии SDF-1 в клетке вблизи раны.

Настоящее изобретение также относится к способам и препаратам ингибирования образования рубцов во время заживления ран у пациента. В способе SDF-1 вводят непосредственно в рану или клетки вблизи раны в количестве, эффективном для снижения образования рубцов в и/или вокруг раны. Рана может включать в себя любое повреждение какой-либо части тела пациента. Примеры ран, которые можно лечить с помощью данного способа, включают обострения или раны; такие как термические ожоги, химические ожоги, радиационные ожоги, ожоги, вызванные избыточным воздействием ультрафиолетового излучения (например, солнечные ожоги); повреждение тканей организма, такие как повреждение промежности в результате потуг и родов; травмы во время медицинских процедур, такие как эпизиотомия, травмы в результате повреждений, включая порезы, разрезы, экскорации; травмы при несчастных случаях; послеоперационные раны, а также хронические заболевания, такие как пролежни, намины, состояния, связанные с диабетом и плохой циркуляцией, и все виды акне. Кроме того, примеры ран могут включать дерматит, такой как импетиго, опрелости, фолликулит и экземы, раны, полученные в результате стоматологической хирургии; пародонтоз; раны после травмы и раны, связанные с опухолями.

В одном аспекте настоящего изобретения количество SDF-1, которое вводят в рану или клетки вблизи раны, может быть количеством, эффективным для содействия или ускорения закрытия раны и заживления раны, уменьшения рубцового фиброза ткани на и/или вокруг раны, ингибирования апоптоза клеток вокруг или вблизи раны и/или содействия реваскуляризации поврежденной ткани. SDF-1 может быть введен в клетки вблизи раны, включающие SDF-1 рецепторы, активированные в результате повреждения тканей и/или травмы. В одном аспекте настоящего изобретения рецептор SDF-1 может включать CXCR4 и/или CXCR7, и SDF-1 может быть введен в количестве, эффективном для увеличения Активации фосфорилирования клеток.

В другом аспекте настоящего изобретения SDF-1 могут быть введены путем экспрессии SDF-1 в клетках вблизи раны и/или нанесения на рану лекарственного препарата, включающего SDF-1. SDF-1 может экспрессироваться из клеток вблизи раны вследствие генетической модификации клеток для экспрессии SDF-1 по меньшей мере одним из следующих способов: вектор, плазмидная ДНК, электропорация и наночастицы. В некоторых вариантах осуществления плазмидная ДНК, имеющая последовательность SEQ ID NO:6, может быть использована для экспрессии SDF-1 в клетке вблизи раны.

Настоящее изобретение дополнительно относится к способам и препаратам для стимулирования или ускорения закрытия раны у пациента. В способе SDF-1 вводят непосредственно в рану или клетки вблизи раны в количестве, эффективном для ускорения закрытия раны. Рана может включать в себя любое повреждение какой-либо части тела пациента. Примеры ран, которые можно лечить с помощью данного способа, включают обострения или раны, такие как термические ожоги, химические ожоги, радиационные ожоги, ожоги, вызванные избыточным воздействием ультрафиолетового излучения (например, солнечные ожоги); повреждение тканей организма, такие как повреждение промежности в результате потуг и родов; травмы во время медицинских процедур, такие как эпизиотомия, травмы в результате повреждений, включая порезы, разрезы, экскорации; травмы при несчастных случаях; послеоперационные раны, а также хронические заболевания, такие как пролежни, намины, состояния, связанные с диабетом и плохой циркуляцией, и все виды акне. Кроме того, примеры ран могут включать дерматит, такой как импетиго, опрелости, фолликулит и экземы, раны, полученные в результате стоматологической хирургии; пародонтоз; раны после травмы и раны, связанные с опухолями.

В одном аспекте настоящего изобретения количество SDF-1, которое вводят в рану или клетки вблизи раны, может быть количеством, эффективным для содействия или ускорения закрытия раны и заживления раны, уменьшения образования шрамов на и/или вокруг раны, ингибирования апоптоза клеток вокруг или вблизи раны и/или содействия реваскуляризации поврежденной ткани. SDF-1 может быть введен в клетки вблизи раны, включающие SDF-1 рецепторы, активированные в результате повреждения тканей и/или травмы. В одном аспекте настоящего изобретения рецептор SDF-1 может включать CXCR4 и/или CXCR7, и SDF-1 может быть введен в количестве, эффективном для увеличения Активации фосфорилирования клеток.

В другом аспекте настоящего изобретения SDF-1 могут быть введены путем экспрессии SDF-1 в клетках вблизи раны и/или нанесения на рану лекарственного препарата, включающего SDF-1. SDF-1 может экспрессироваться из клеток вблизи раны вследствие генетической модификации клеток для экспрессии SDF-1 по меньшей мере одним из следующих способов: вектор, плазмидная ДНК, электропора-

ция и наночастицы. В некоторых вариантах осуществления плазмидная ДНК, имеющая последовательность SEQ ID NO:6, может быть использована для экспрессии SDF-1 в клетке вблизи раны.

Настоящее изобретение также относится к лекарственной форме для топического и/или местного применения для стимулирования заживления ран у пациента. Состав может включать в себя некоторое количество SDF-1, эффективное для ускорения заживления раны и ингибирования рубцевания раны при введении формы в рану.

Рана может включать в себя любое повреждение какой-либо части тела пациента. Примеры ран, которые можно лечить с помощью данного способа, включают обострения или раны, такие как термические ожоги, химические ожоги, радиационные ожоги, ожоги, вызванные избыточным воздействием ультрафиолетового излучения (например, солнечные ожоги); повреждение тканей организма, такие как повреждение промежности в результате потуг и родов; травмы во время медицинских процедур, такие как эпизиотомия, травмы в результате повреждений, включая порезы, разрезы, экскориаии; травмы при несчастных случаях; послеоперационные раны, а также хронические заболевания, такие как пролежни, намины, состояния, связанные с диабетом и плохой циркуляцией, и все виды акне. Кроме того, примеры ран могут включать дерматит, такой как импетиго, опрелости, фолликулит и экземы, раны, полученные в результате стоматологической хирургии; пародонтоз; раны после травмы и раны, связанные с опухолями.

Количество SDF-1 в ране также может быть количеством, эффективным для содействия или ускорения закрытия раны и заживления раны, уменьшения образования шрамов на и/или вокруг раны, ингибирования апоптоза клеток вокруг или вблизи раны и/или содействия реваскуляризации поврежденной ткани. В одном аспекте настоящего изобретения SDF-1 может находиться в виде белка или плазмиды, которые при введении в клетку вблизи раны способствуют клеточной экспрессии SDF-1.

Краткое описание фигур

Вышеуказанные и другие признаки настоящего изобретения станут очевидными для специалистов в данной области техники, к которой относится настоящее изобретение, при чтении последующих описаний со ссылкой на прилагаемые изображения.

Фиг. 1 иллюстрирует фотографии, показывающие, что каркасы, выделяющие SDF-1, ускоряют заживление ран.

Фиг. 2 иллюстрирует участки, показывающие % заживления в течение дня ран свиней, получивших лечение с помощью белкового каркаса с SDF-1, плазмового каркаса с SDF-1, солевого каркаса и без каркаса.

Фиг. 3 показывает графическое представление данных для общего объема рубца (A), максимальной высоты рубца (B) и области поверхности рубца (C) у пациентов, получавших JVS-100 через 28 дней после возникновения ранения.

Фиг. 4 обеспечивает графическое представление данных для цвета рубца (A), текстуры рубца (B) и оценки рубца согласно Манчестерской шкале рубцов (C) у пациентов, получавших JVS-100 через 28 дней после возникновения раны (раны с более чем 70% расхождением краев были исключены из этих оценок).

Фиг. 5 показывает результаты оценки согласно Манчестерской шкале рубцов (A), оценку текстуры рубца (B) и оценку контура рубца (C) у ран, обработанных JVS-100 через 28 дней после возникновения ран, расхождение краев которых составляет более 60%.

Фиг. 6 дает графическое представление данных для текстуры рубца (A), контура рубца (B), цвета рубца (C), деформации рубца (D) и общую оценку согласно Манчестерской шкале рубцов (E) у пациентов, получавших JVS-100 через 90 дней после возникновения ранения.

Подробное описание иллюстративных вариантов осуществления

Если не указано иное, все технические термины, используемые здесь, имеют значение, обычно понимаемое специалистом с обычной квалификацией в области, к которой принадлежит данное изобретение. Обычно понимаемое определение терминов молекулярной биологии может быть найдено, например, в словаре Rieger с соавторами, *Glossary of Genetics: Classical and Molecular*, 5-е изд., Springer-Verlag: Нью-Йорк, 1991 и Lewin, *Genes V*, Oxford University Press: Нью-Йорк, 1994.

Здесь описаны способы, включающие обычные способы, применяемые в молекулярной биологии. Такие методы, как правило, известны в данной области и описаны подробно в методических трудах, таких как *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2-е изд., т. 1-3, под ред. Sambrook с соавторами, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989 и *Current Protocols in Molecular Biology*, под ред. Ausubel с соавторами, Greene Publishing and Wiley-Interscience, Нью-Йорк, 1992 (с периодическими обновлениями). Способы химического синтеза нуклеиновых кислот описаны, например, в Beaucage and Carruthers, *Tetra. Letts.* 22:1859-1862, 1981 и Matteucci с соавторами, *J. Am. Chem. Soc.* 103:3185, 1981. Химический синтез нуклеиновых кислот может быть выполнен, например, на коммерческих автоматических синтезаторах олигонуклеотидов. Иммунологические методы (например, подготовка антиген-специфических антител, иммунопреципитация и иммуноблоттинг) описаны, например, в *Current Protocols in Immunology*, под ред. Coligan с соавторами, John Wiley & Sons, Нью-Йорк, 1991 и *Methods of Immunological Analysis*, под ред. Masseyeff с соавторами, John Wiley & Sons, Нью-Йорк, 1992. Обычные

способы переноса генов и генной терапии также могут быть адаптированы для использования в настоящем изобретении (см., например, *Gene Therapy: Principles and Applications*, под ред. Т. Blackenstein, Springer Verlag, 1999; *Gene Therapy Protocols (Methods in Molecular Medicine)*, под ред. P.D. Robbins, Humana Press, 1997 и *Retro-vectors for Human Gene Therapy*, под ред. C.P. Hodgson, Springer Verlag, 1996).

Настоящее изобретение относится к лечению ран и/или ускорению заживления ран или закрытия ран у млекопитающего путем введения в рану и/или клетки вблизи раны количества SDF-1, обеспечивающего ускорение заживления ран, снижение апоптоза клеток и/или уменьшение или ингибирование образования рубцов в ране. Настоящее изобретение также относится к способу ингибирования образования рубцов и/или фиброза раны или ткани, находящихся вблизи раны, путем введения в рану и/или клетки или ткани вблизи раны количества SDF-1, эффективного для ускорения заживления ран, уменьшения апоптоза клеток и/или уменьшения или ингибирования образования рубцов в ране. Настоящее изобретение также относится к лекарственной форме для топического и/или местного применения для лечения ран, содержащей SDF-1 или средство, которое активирует экспрессию SDF-1 в клетках раны.

Раны, которые обрабатывают по способу и/или композиции по настоящему изобретению, могут включать в себя любые повреждения какой-либо части тела пациента (например, внутренние или внешние раны), в том числе обострения или раны; такие как термические ожоги, химические ожоги, радиационные ожоги, ожоги, вызванные избыточным воздействием ультрафиолетового излучения (например, солнечные ожоги); повреждение тканей организма, такие как повреждение промежности в результате потуг и родов; травмы во время медицинских процедур, такие как эпизиотомия, травмы в результате повреждений, такие как порезы, разрезы, эксориации; травмы, образовавшиеся в результате несчастных случаев; язвы, такие как язвы от сдавливания, диабетические язвы, язвы, вызванные гипсовой повязкой, или язвы при пролежнях, послеоперационные раны. Рана может также включать в себя хронические заболевания или ранения, такие как пролежни, намины, состояния, связанные с диабетом и плохой циркуляцией, и все типы акне. Кроме того, примеры ран могут включать дерматит, такой как импетиго, опрелости, фолликулит и экземы, раны, полученные в результате стоматологической хирургии; пародонтоз; раны, связанные с опухолями.

Следует иметь в виду, что настоящая заявка не ограничена указанными ранами или повреждениями, и что другие раны или повреждения тканей, острые и/или хронические, можно лечить с помощью композиций и способов по настоящему изобретению.

Используемый здесь термин "стимулирование заживления ран" или "ускорение заживления раны" означает увеличение, улучшение, повышение или индуцирование закрытия, заживления или восстановление раны.

Используемые здесь термины "лечение" и "обработка" относятся к снижению тяжести и/или частоты проявления симптомов, устранению симптомов и/или основной причины их появления, предотвращению возникновения симптомов и/или их основной причины их появления и улучшение или восстановление повреждения. Так, например, "лечение" раны включает в себя увеличение заживления на месте раны, стимулирование закрытия раны и уменьшения рубцевания раны.

Пациенты-млекопитающие, которые будут подвергнуты лечению по способам и препаратам по настоящему изобретению, могут включать в себя любое млекопитающее, например человека, крысу, мышь, кошку, собаку, козу, овцу, лошадь, обезьяну, человекообразную обезьяну, кролика, крупный рогатый скот и т.д. Пациент-млекопитающее может быть на любой стадии развития, включая взрослое животное, молодое животное и новорожденное животное. Пациенты-млекопитающие могут также включать в себя животных на эмбриональной стадии развития.

В соответствии с одним из аспектов настоящего изобретения SDF-1 может быть введен в клетки вблизи раны для уменьшения апоптоза клеток и способствованию заживления ран, ускорения заживления раны и/или уменьшения образования рубцов на и/или вокруг раны. Клетки включают клетки, которые экспрессируют SDF-1 рецепторы, которые активируются в результате травмы и/или повреждения ткани. Активированные рецепторы SDF-1 могут включать в себя, например, CXCR4 и/или CXCR7. Было установлено, что устойчивое локализованное введение SDF-1 в клетки с активированным рецептором SDF-1 в результате повреждения тканей повышает фосфорилирование Akt в клетках, что, в свою очередь, может смягчить апоптоз клеток. Кроме того, длительное локализованное введение SDF-1 в ткани способствует рекрутингу стволовых клеток и/или клеток-предшественников, таких как клетки-предшественники эндотелия, экспрессирующие CXCR4 и/или CXCR7 к месту раны, подвергаемой лечению, которые могут способствовать реваскуляризации тканей вокруг и/или вблизи раны.

В одном примере период времени введения SDF-1 в клетки раны и/или вблизи раны может составлять от приблизительно времени появления раны и/или повреждения ткани до приблизительно нескольких дней, недель или месяцев после появления травмы ткани. В некоторых вариантах осуществления плазмиды, кодирующие SDF-1, могут быть введены в рану до закрытия раны (например, с помощью шва, клея или других физических средств). Было установлено, что топическая и/или местная доставка белка или плазмиды SDF-1 в рану достаточна для увеличения скорости заживления и закрытия раны. Кроме того, раны, обработанные SDF-1, показывают меньшее проявление фиброза, чем раны, не обработанные SDF-1, что свидетельствует о том, что SDF-1 может смягчить рубцевание обработанных им ран. Было

также обнаружено, что сразу после появления повреждения тканей клетки в раневой ткани или около периферии или на границе раны активируют экспрессию SDF-1. Через приблизительно 24 ч экспрессия SDF-1 в клетках уменьшается. SDF-1 может быть введен после снижения экспрессии SDF-1 для снижения апоптоза клеток.

SDF-1 в соответствии с настоящим изобретением может иметь аминокислотную последовательность, которая, по существу, схожа с нативной аминокислотной последовательностью SDF-1 млекопитающих. Известны аминокислотные последовательности белка SDF-1 множества различных млекопитающих, в том числе человека, мыши и крысы. Аминокислотные последовательности SDF-1 человека и крысы идентичны на приблизительно 92%. SDF-1 может содержать две изоформы, SDF-1 альфа и SDF-1 бета, обе упоминаются здесь как SDF-1, если не указано иное.

SDF-1 может иметь аминокислотную последовательность, по существу, идентичную последовательности SEQ ID NO:1. SDF-1, который сверхэкспрессируется, также может иметь аминокислотную последовательность, по существу, аналогичную таковой у одного из предыдущих SDF-1 белков млекопитающих. Например, SDF-1, который сверхэкспрессируется, также может иметь аминокислотную последовательность, по существу, аналогичную SEQ ID NO:2. SEQ ID NO:2, который, по существу, содержит SEQ ID NO:1, представляет собой аминокислотную последовательность человеческого SDF-1 и идентифицирована как GenBank, № NP 954637. SDF-1, который сверхэкспрессируется, также может иметь аминокислотную последовательность, по существу, идентичную SEQ ID NO:3. SEQ ID NO:3 включает в себя аминокислотные последовательности для крысиного SDF и идентифицирована как GenBank, № AAF01066.

SDF-1 в соответствии с настоящим изобретением также может быть вариантом SDF-1 млекопитающих, таким как фрагмент, аналог и производная SDF-1 млекопитающих. Такие варианты включают, например, полипептид, кодируемый встречающимся в природе аллельным вариантом нативного гена SDF-1 (т.е. встречающейся в природе нуклеиновой кислотой, которая кодирует природный полипептид SDF-1 млекопитающих), полипептид, кодируемый формой нативного гена SDF-1, полученного с помощью альтернативного сплайсинга, полипептид, кодируемый гомологом или ортологом нативного гена SDF-1, и полипептид, кодируемый неприродным вариантом нативного гена SDF-1.

Варианты SDF-1 имеют пептидную последовательность, которая отличается от нативного SDF-1 полипептида на одну или несколько аминокислот. В таких вариантах пептидные последовательности могут характеризоваться делециями, добавлением или замещением одной или нескольких аминокислот в варианте SDF-1. Предпочтительны аминокислотные вставки от приблизительно 1 до 4 смежных аминокислот и делеции от приблизительно 1 до 10 последовательных аминокислот. Варианты полипептидов SDF-1, по существу, поддерживают нативную функциональную активность SDF-1. Примеры вариантов полипептидов SDF-1 могут быть изготовлены путем экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты в рамках объема изобретения, которые отличаются молчащими или консервативными заменами. Один пример варианта SDF-1 приведен в патенте США № 7405195, который включен здесь в качестве ссылки в полном объеме.

Полипептидные фрагменты SDF-1, соответствующие одному или нескольким конкретным мотивам и/или доменам, или фрагменты произвольных размеров находятся в пределах объема настоящего изобретения. Изолированные пептидные части SDF-1 могут быть получены путем скрининга пептидов, полученных методом рекомбинации соответствующего фрагмента нуклеиновой кислоты, кодирующей такие пептиды. Например, полипептиды SDF-1 по настоящему изобретению могут быть произвольно разделены на фрагменты нужной длины без каких-либо перекрытий фрагментов или предпочтительно разделены на перекрывающиеся фрагменты нужной длины. Фрагменты могут быть получены методом рекомбинации и протестированы для определения пептидных фрагментов, которые могут функционировать в качестве агонистов к нативным полипептидам CXCR-4.

Варианты полипептидов SDF-1 могут также включать рекомбинантные формы полипептидов SDF-1.

Предпочтительными рекомбинантными полипептидами согласно настоящему изобретению в дополнение к полипептидам SDF-1 являются полипептиды, которые кодируются с нуклеиновой кислотой, которая может иметь по меньшей мере 70% идентичности последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты гена, кодирующего SDF-1 млекопитающего.

Варианты SDF-1 могут включать в себя формы-агонисты белка, который постоянно экспрессирует функциональную активность нативного SDF-1. Другие SDF-1 варианты могут включать в себя те, которые устойчивы к протеолитическим расщеплениям, как, например, из-за мутаций, которые изменяют протеазы последовательности-мишени. Приведет ли изменение в аминокислотной последовательности пептидных результатов к появлению варианта, имеющего одну или более функциональных активностей нативного SDF-1, можно легко определить путем тестирования варианта на нативную функциональную активность SDF-1.

Нуклеиновая кислота SDF-1, которая кодирует белок SDF-1, может быть нативной или не нативной нуклеиновой кислотой и может быть в форме РНК или в форме ДНК (например, кДНК, геномная ДНК и синтетическая ДНК). ДНК может быть двухцепочечной или одноцепочечной, и в случае одноцепочечной

может быть кодирующей (нетранскрибируемой) нитью или не кодирующей (антисмысловой) нитью. Последовательность кодирующей нуклеиновой кислоты, которая кодирует SDF-1, может быть, по существу, подобна нуклеотидной последовательности гена SDF-1, например нуклеотидной последовательности, показанной в SEQ ID NO:4 и SEQ ID NO:5. SEQ ID NO:4 и SEQ ID NO:5 содержат соответственно последовательности нуклеиновых кислот для человеческого SDF-1 и крысы SDF-1 и, по существу, аналогичны нуклеиновым последовательностям GenBank, № NM199168 и GenBank, № AF189724. Нуклеиновая кислота, кодирующая последовательность SDF-1, также может быть другой кодирующей последовательностью, которая в результате избыточности или вырожденности генетического кода кодирует тот же полипептид, что и SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO:3.

Другие молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют SDF-1 в рамках объема изобретения, являются вариантами нативного SDF-1, например, такими, которые кодируют фрагменты, аналоги и производные нативного SDF-1. Такие варианты могут быть, например, встречающимися в природе аллельными вариантами нативного гена SDF-1, гомологами или ортологами нативного гена SDF-1 или не встречающимися в природе вариантами нативного гена SDF-1. Эти варианты имеют нуклеотидную последовательность, отличающуюся от нативного гена SDF-1 одним или более основаниями. Например, нуклеотидная последовательность по таким вариантам может характеризоваться делециями, добавлением или замещением одной или нескольких нуклеотидов нативного гена SDF-1.

Предпочтительны вставки нуклеиновых кислот приблизительно от 1 до 10 последовательных нуклеотидов и делеции от приблизительно 1 до 10 последовательных нуклеотидов.

В других приложениях вариант SDF-1, показывающий существенные изменения в структуре, может быть получен путем нуклеотидных замен, которые вызывают меньше консервативных изменений в кодируемом полипептиде. Примерами таких нуклеотидных замен являются те, которые вызывают изменения в (а) структуре полипептидного остова; (б) заряде или гидрофобности полипептида или (с) объема боковой цепи аминокислоты. Нуклеотидные замены, которые, как правило, предположительно производят наибольшие изменения в свойствах белка - это замены, которые вызывают неконсервативные изменения кодонов. Примерами изменений кодонов, которые могут вызвать значительные изменения в структуре белка, являются такие, которые вызывают замену (а) гидрофильного остатка (например, серина или треонина) на (или им) гидрофобный остаток (например, лейцин, изолейцин, фенилаланин, валин или аланин); (б) цистеина или пролина на (или им) любой другой остаток; (с) остаток, имеющий электроположительную боковую цепь (например, лизин, аргинин, гистидин или), на (или им) электроотрицательный остаток (например, глутамин или аспарагин); или (г) остаток, имеющий объемную боковую цепь (например, фенилаланин), на (или им) остаток, не имеющий боковой цепи (например, глицин).

Природные аллельные варианты нативного гена SDF-1 в рамках объема изобретения являются выделенными из тканей млекопитающих нуклеиновыми кислотами, которые имеют по меньшей мере 70%-ную идентичность последовательности нативному гену SDF-1, и кодируют полипептиды, имеющие структурное сходство с нативным полипептидом SDF-1. Гомологи нативного гена SDF-1 в рамках объема изобретения являются нуклеиновыми кислотами, выделенными из других видов, которые имеют по меньшей мере 70% идентичности последовательности с нативным геном и кодируют полипептиды, имеющие структурное сходство с нативным полипептидом SDF-1. В публичных и/или закрытых базах данных нуклеиновых кислот могут быть найдены и идентифицированы другие молекулы нуклеиновых кислот, имеющие высокий процент (например, 70% или более) идентичности последовательности нативному гену SDF-1.

Не встречающиеся в природе варианты гена SDF-1 представляют собой нуклеиновые кислоты, которые не встречаются в природе (например, созданные человеком) и имеющие по меньшей мере 70%-ную идентичность последовательности нативному гену SDF-1, и кодируют полипептиды, имеющие структурное сходство с нативным полипептидом SDF-1. Примерами не встречающихся в природе вариантов гена SDF-1 являются те, которые кодируют фрагмент нативного белка SDF-1, те, которые гибридизуются с носителем гена SDF-1 или комплементом нативного гена SDF-1 в жестких условиях, и те, которые имеют по меньшей мере 65%-ную идентичность последовательности нативному гену SDF-1 или комплемента нативного гена SDF-1.

Нуклеиновые кислоты, кодирующие фрагменты нативного гена SDF-1 в рамках объема изобретения, являются такими, которые кодируют аминокислотные остатки нативного SDF-1. Более короткие олигонуклеотиды, которые кодируют или гибридизуются с нуклеиновыми кислотами, которые кодируют фрагменты нативного SDF-1, могут быть использованы в качестве зондов, праймеров или антисмысловых молекул. Более длинные полинуклеотиды, которые кодируют или гибридизуются с нуклеиновыми кислотами, которые кодируют фрагменты нативного SDF-1, также могут быть использованы в различных аспектах настоящего изобретения. Нуклеиновые кислоты, кодирующие фрагменты нативного SDF-1, могут быть получены путем ферментативного расщепления (например, с помощью фермента рестрикции) или химической дегградации первичного нативного гена SDF-1 или его вариантов.

Нуклеиновые кислоты, которые гибридизуются в жестких условиях с одной из вышеуказанных нуклеиновых кислот, также могут быть использованы в настоящем изобретении. Например, такие нуклеиновые кислоты, которые могут гибридизоваться с одной из вышеупомянутых нуклеиновых кислот в

условиях пониженной жесткости, условиях средней жесткости или условиях высокой жесткости, находясь в рамках объема изобретения.

Молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие слитый белок SDF-1, также могут быть использованы в настоящем изобретении. Такие нуклеиновые кислоты могут быть получены путем подготовки конструкции (например, вектора экспрессии), который экспрессирует гибридный белок SDF-1 при введении в подходящие клетки-мишени. Например, такая конструкция может быть создана путем лигирования первого полинуклеотида, кодирующего белок SDF-1, слитый на рамке с вторым полинуклеотидом, кодирующим другой белок, так, что экспрессия конструкции в подходящей системе экспрессии дает гибридный белок.

Нуклеиновые кислоты, кодирующие SDF-1, могут быть изменены в компоненте основы, сахарном компоненте или фосфатном компоненте, например, для повышения стабильности молекулы, гибридизации и т.д. Нуклеиновые кислоты в рамках объема изобретения могут дополнительно включать другие прилагаемые группы, такие как пептиды (например, для нацеливания на рецепторы клеток-мишеней *in vivo*), или средства, облегчающие транспорт через клеточную мембрану, активированное гибридизацией расщепление. С этой целью нуклеиновые кислоты могут быть конъюгированы с другой молекулой (например, пептидом), активированным гибридизацией сшивающим агентом, агентом транспортировки, активированным гибридизацией агентом расщепления и т.д.

SDF-1 может быть введен непосредственно в рану, на периферии раны или в ближайшие к ране клетки для уменьшения апоптоза клеток вблизи раны и облегчения ангиогенеза в раневой области, а также ускорения закрытия раны и ингибирования рубцевания раны. SDF-1 может быть доставлен в рану или клетки вблизи раны путем введения белка SDF-1 в рану или клетки или путем введения средства в клетки-мишени, которые вызывают, увеличивают и/или активируют экспрессию SDF-1 (т.е. средство SDF-1). Белок SDF-1, экспрессируемый в клетках-мишенях, может быть продуктом экспрессии генетически модифицированной клетки. Клетки-мишени могут включать клетки внутри или на периферии раны или клетки *ex vivo*, которые являются биосовместимыми с обрабатываемой тканью. Биосовместимые клетки могут также включать в себя аутологичные клетки, извлеченные у пациента, получающего лечение, и/или биосовместимые аллогенные или сингенные клетки, такие как аутологичные, аллогенные или сингенные стволовые клетки (например, мезенхимальные стволовые клетки), клетки-предшественники (например, мультипотентные клетки-предшественники взрослых) и/или другие клетки, которые дополнительно дифференцированы и биосовместимы с обрабатываемой тканью. Клетки могут включать клетки, предоставленные в кожных трансплантатах, костных трансплантатах, трансплантатах, подвергнутых тканевой инженерии и других терапиях замены ткани, которые используются для лечения ран.

Агент может содержать натуральные или синтетические нуклеиновые кислоты в соответствии с настоящим изобретением, описанным выше, которые включены в рекомбинантные конструкции нуклеиновых кислот, обычно ДНК-конструкции, способные к интродукции и репликации в клетке. Такая конструкция может включать в себя систему репликации и последовательности, способные к транскрипции и трансляции кодирующей полипептид последовательности в данной клетке-мишени.

Другие агенты также могут быть введены в клетки для содействия экспрессии SDF-1 из клеток. Например, агенты, повышающие транскрипцию гена, кодирующего SDF-1, увеличивающие трансляцию мРНК, кодирующую SDF-1, и/или уменьшающие деградацию мРНК, кодирующей SDF-1, могут быть использованы для повышения уровней белка SDF-1. Увеличение скорости транскрипции из гена в клетке может быть достигнуто путем введения экзогенного промотора против хода транскрипции от гена, кодирующего SDF-1. Также могут быть использованы энхансеры, которые облегчают экспрессию гетерологичного гена.

Другие агенты могут дополнительно включать другие белки, хемокины и цитокины, которые при введении в клетки-мишени могут повышать экспрессию SDF-1 клетки-мишени. Такие агенты могут включать, например, инсулиноподобный фактор роста (IGF)-1, который, как было обнаружено, способен повышать экспрессию SDF-1 при введении в мезенхимальные стволовые клетки (MSCs) (Circ. Res. 2008, Nov. 21; 103 (11): 1300-98); сигнальный белок "sonic hedgehog" (Shh), который, как было обнаружено, активирует экспрессию SDF-1 при введении в фибробласты взрослых (Nature Medicine, т. 11, № 11, 23 ноября); трансформирующий фактор роста - бета. (TGF-beta.), который, как было обнаружено, повышает экспрессию SDF-1 при введении в перитонеальные мезотелиальные клетки человека (HPMC); IL-1.бета, PDGF-BF, VEGF, FНО-альфа, и PTTG, которые, как было обнаружено, повышают экспрессию SDF-1 при введении в первичные остеобласты человека (HOBS), смешанные стромальные клетки костного мозга (BMSCs) и линии остеобластоподобных клеток человека (Bone, 2006, April; 38(4): 497-508); тимозин.бета.4, который, как было обнаружено, повышает экспрессию при введении в клетки костного мозга (BMCs) (Curr. Pharm. Des. 2007; 13 (31):3245-51; и индуцированный гипоксией фактор 1.альфа. (HIF-1), который, как было обнаружено, повышает экспрессию SDF-1 при введении в полученные из костного мозга клетки-предшественники (Cardiovasc. Res. 2008, E. Pub.). Эти агенты могут быть использованы для лечения конкретных ран или травм, где подобные клетки способны повысить экспрессию SDF-1 по отношению к конкретному присутствующему или введенному цитокину.

Один способ введения агента в клетку-мишень включает в себя использование генотерапии. Гено-

терапия в соответствии с настоящим изобретением может быть использована для экспрессии белка SDF-1 в клетке-мишени *in vivo* или *in vitro*. В одном аспекте изобретения генотерапия может использовать вектор, включающий в себя нуклеотид, кодирующий белок SDF-1. Термин "вектор" (иногда его называют "проводником" доставки генов или переноса генов) относится к макромолекуле или комплексу молекул, включающих полинуклеотид, который должен быть доставлен в клетку-мишень, *in vitro* или *in vivo*. Полинуклеотид, который должен быть доставлен, может содержать исследуемую кодирующую последовательность в генотерапии. Векторы включают, например, вирусные векторы (например, аденовирусы ("Ad"), аденоассоциированные вирусы (AAV) и ретровирусы), липосомы и другие липидосодержащие комплексы и другие макромолекулярные комплексы, способные опосредовать доставку какого-либо полинуклеотида в клетки-мишени.

Векторы могут также включать другие компоненты или функции, которые дополнительно влияют на доставку генов и/или экспрессию гена или иным образом обеспечивают выгодные свойства клеткам-мишеням. Такие другие компоненты включают, например, компоненты, которые влияют на связывание или направленное взаимодействие клеток (в том числе компонентов, которые опосредуют зависящее от типа клеток или тканеспецифичное связывание); компоненты, которые влияют на захват клеткой вектора нуклеиновой кислоты; компоненты, которые влияют на локализацию полинуклеотида внутри клетки после захвата (например, агенты, опосредующие ядерную локализацию); и компоненты, которые влияют на экспрессию полинуклеотида. Такие компоненты могут также включать в себя маркеры, такие как обнаруживаемые и/или селективные маркеры, которые могут быть использованы для обнаружения или отбора клеток, которые были захвачены и экспрессируют нуклеиновую кислоту, доставленную вектором. Такие компоненты могут быть предоставлены в качестве естественного элемента вектора (например, использование определенных вирусных векторов, которые имеют компоненты или функции, опосредующие связывание и поглощение), либо векторы могут быть изменены для обеспечения таких функциональных возможностей.

Селективные маркеры могут быть положительными, отрицательными или бифункциональными. Положительные селективные маркеры позволяют выбрать клетки, несущие маркер, тогда как негативные селективные маркеры позволяют отсеять клетки, несущие маркер. Были описаны разнообразные маркерные гены, в том числе бифункциональные (т.е. положительные/отрицательные) маркеры (см., например, Lupton S., WO 92/08796, опубликовано 29 мая 1992 и Lupton S., WO 94/28143, опубликовано 8 декабря 1994). Такие гены-маркеры могут обеспечить дополнительную меру контроля, что может быть выгодным в контексте генотерапии. В данной области известно и общедоступно большое разнообразие таких векторов.

Векторы для использования в настоящем изобретении включают вирусные векторы, векторы на основе липидов и другие невирусные векторы, которые способны доставлять нуклеотид в соответствии с настоящим изобретением в клетки-мишени. Вектор может быть направленным вектором, особенно направленным вектором, который преимущественно связывается с клетками вблизи раны. Вирусные векторы, используемые в рамках объема изобретения, могут включать те, которые обладают низкой токсичностью в клетке-мишени и вызывают выработку терапевтически применимых количеств белка SDF-1 тканеспецифичным образом.

Примерами вирусных векторов являются векторы, полученные из аденовируса (Ad) или аденоассоциированного вируса (AAV). Могут быть использованы человеческие и нечеловеческие вирусные векторы, и рекомбинантный вирусный вектор может быть дефектным по репликации в организме человека. Если вектор представляет собой аденовирус, вектор может содержать полинуклеотид, имеющий промотор, функционально связанный с геном, кодирующим белок SDF-1, и дефектный по репликации в организме человека.

Другие вирусные векторы, которые можно использовать в соответствии с настоящим изобретением, включают векторы на основе вируса простого герпеса (ВПГ). Векторы ВПГ, удаленные из одного или более преддранних генов (IE), являются предпочтительными, потому что они обычно не являются цитотоксическими, находятся в клетке-мишени в состоянии, сходном с латентностью, и позволяют эффективную трансдукцию клеток-мишеней. Рекомбинантные векторы ВПГ могут включать приблизительно 30 кб гетерологичных нуклеиновых кислот.

Ретровирусы, такие как ретровирусы типа С и лентивирусы, также могут быть использованы в настоящем изобретении. Например, ретровирусные векторы могут быть основаны на вирусе мышинного лейкоза (БМЛ) (см., например, Hu and Pathak, *Pharmacol. Rev.* 52:493-511, 2000 и Fong с соавторами, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 17:1-60, 2000). Векторы на основе БМЛ могут содержать до 8 кб гетерологичных (терапевтических) ДНК вместо вирусных генов. Гетерологичная ДНК может включать тканеспецифичный промотор и нуклеиновую кислоту SDF-1. В способах доставки к клеткам вблизи раны он также может кодировать лиганд к тканеспецифичному рецептору.

Дополнительными ретровирусными векторами, которые могут быть использованы, являются дефектные по репликации векторы на основе лентивирусов, в том числе векторы на основе вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) (см., например, Vigna and Naldini, *J. Gene Med.* 5:308-316, 2000 и Miyoshi с соавторами, *J. Virol.* 72:8150-8157, 1998). Лентивирусные векторы выгодны тем, что они способны инфи-

цировать активно делящиеся и не делящиеся клетки. Они также очень эффективны при трансдукции эпителиальных клеток человека.

Лентивирусные векторы для использования в настоящем изобретении могут быть получены из человеческих и нечеловеческих (в том числе SIV) лентивирусов. Примеры лентивирусных векторов включают последовательности нуклеиновых кислот, необходимые для распространения вектора, а также тканеспецифичный промотор, функционально связанный с геном SDF-1. Они могут включать в себя вирусные LTR, сайт связывания праймера, полипуриновый путь, сайты присоединения и инкапсулирования.

Лентивирусный вектор может быть помещен в любой подходящий лентивирусный капсид. Замещение одной белковой частицы на другую, принадлежащую другому вирусу, называется "псевдотипирование". Капсид вектора может содержать вирусные белки оболочки других вирусов, включая вирус мышинного лейкоза (BML) или вирус везикулярного стоматита (VSV). Использование G-белка VSV дает высокий титр вектора и в результате большую стабильность вирусных частиц вектора.

Векторы на основе альфавирусов, например на основе вируса леса Семлики (SFV) и вируса Синдбис (SIN), также могут быть использованы в настоящем изобретении. Использование альфавирусов описано в Lundstrom, K., *Intervirology* 43: 247-257, 2000 и Perri с соавторами, *Journal of Virology* 74:9802-9807, 2000.

Рекомбинантные дефектные по репликации векторы на основе альфавирусов выгодны, потому что они способны на высокоуровневую экспрессию гетерологичных (терапевтических) генов и могут инфицировать широкий спектр клеток-мишеней. Репликоны альфавирусов могут быть направлены на определенные типы клеток путем представления на поверхности вириона функционального гетерологичного лиганда или связывающего домена, который позволил бы избирательное связывание с клетками-мишенями, экспрессирующими когнатный партнер по связыванию. Репликоны альфавирусов могут находиться в латентном состоянии, таким образом обеспечивая долгосрочную экспрессию гетерологичной нуклеиновой кислоты в клетке-мишени. Репликоны могут также проявлять кратковременную экспрессию гетерологичной нуклеиновой кислоты в клетке-мишени.

Во многих вирусных векторах, совместимых с методами изобретения, в вектор может быть включен более чем один промотор, для экспрессии вектором более чем одного гетерологичного гена. Кроме того, вектор может содержать последовательность, которая кодирует сигнальный пептид или другой фрагмент, который облегчает секрецию генного продукта SDF-1 из клетки-мишени.

Чтобы объединить благоприятные свойства двух систем вирусных векторов, для доставки нуклеиновой кислоты SDF-1 к ткани-мишени могут быть использованы гибридные вирусные векторы. Стандартные методы для создания гибридных векторов хорошо известны специалистам в данной области. Такие методы могут быть найдены, например, в Sambrook с соавторами, *In Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, Нью-Йорк, или любом другом из большого количества лабораторных руководств, которые поднимают вопрос технологии рекомбинантной ДНК. Двухцепочечные AAV геномы в аденовирусных капсидах, содержащих комбинацию AAV и аденовирусных ITRs, могут использоваться для трансфектации клеток. В другом варианте AAV вектор может быть помещен в "выпотрошенный", "зависящий от вируса-помощника" или "высокоемкий" аденовирусный вектор. Аденовирусные/AAV гибридные векторы описаны в Lieber с соавторами, *J. Virol.* 73:9314-9324, 1999. Ретровирусные/аденовирусные гибридные векторы описаны в Zheng с соавторами, *Nature Biotechnol.* 18:176-186, 2000. Ретровирусные геномы, содержащиеся в аденовирусе, могут интегрировать в геном клетки-мишени и осуществить стабильную экспрессию гена SDF-1.

Далее рассматриваются другие элементы нуклеотидной последовательности, которые облегчают экспрессию гена SDF-1 и клонирование вектора. Например, наличие энхансеров против хода транскрипции от промотора или терминаторов по ходу транскрипции от кодирующей области, например, может способствовать экспрессии.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения тканеспецифический промотор может быть слит с геном SDF-1. Благодаря слиянию такого тканеспецифического промотора в аденовирусной конструкции экспрессия трансгена ограничивается конкретной тканью. Эффективность экспрессии генов и степень специфичности, представленная тканеспецифическим промотором, могут быть определены с использованием рекомбинантной аденовирусной системы по настоящему изобретению.

В дополнение к вирусным методам на основе векторов для введения нуклеиновой кислоты SDF-1 в клетку-мишень могут быть также использованы невирусные методы. Обзор невирусных методов доставки генов содержится в Nishikawa and Huang, *Human Gene Ther.* 12:861-870, 2001. Пример невирусного метода доставки генов в соответствии с изобретением использует плазмидную ДНК для введения в клетку нуклеиновой кислоты SDF-1. Методы доставки генов на основе плазмидов, как правило, известны в данной области.

Синтетические молекулы переноса генов могут быть предназначены для формирования мультимолекулярных агрегатов с плазмидной ДНК. Эти агрегаты могут быть предназначены для связывания с клеткой-мишенью. Катионные амфифилы, в том числе и липополиамины и катионные липиды, могут быть использованы для обеспечения рецепторнезависимой передачи нуклеиновой кислоты SDF-1 в клетку-мишени (например, кардиомиоциты). Кроме того, предварительно сформированные катионные липо-

сомы или катионные липиды могут быть смешаны с плазмидной ДНК для генерирования клеточно-трансфицирующих комплексов. Методы, включающие катионные составы липидов, рассмотрены в Feigner с соавторами, *Ann N.Y. Acad. Sci.* 772:126-139, 1995 и Lasic and Templeton, *Adv. Drug Delivery Rev.* 20:221-266, 1996. Для доставки генов ДНК может быть также соединена с амфипатическим катионным пептидом (Fomina с соавторами, *J. Gene Med.* 2:455-464, 2000).

Методы, которые включают в себя компоненты на вирусной и невирусной основе, могут быть использованы в соответствии с изобретением. Например, плазмид на основе вируса Эпштейна-Барр (ВЭБ) для терапевтической доставки генов описан в Cui с соавторами, *Gene Therapy* 8:1508-1513, 2001. Кроме того, способ, включающий ДНК/лиганд/поликатионный адъювант, соединенный с аденовирусом, описан в Curiel D.T., *Nat. Immun.* 13:141-164, 1994.

Кроме того, нуклеиновая кислота SDF-1 может быть введена в клетку-мишень путем трансфекции клетки-мишени с использованием методов электропорации. Методы электропорации хорошо известны и могут быть использованы для облегчения трансфекции клеток с использованием плазмидной ДНК.

Векторы, кодирующие экспрессию SDF-1, могут быть доставлены в клетки-мишени в форме инъекционного препарата, содержащего фармацевтически приемлемый носитель, такой как физиологический раствор, по мере необходимости. Другие фармацевтические носители, составы и дозировки могут быть также использованы в соответствии с настоящим изобретением. В некоторых вариантах осуществления плазмидная ДНК, кодирующая SDF-1, имеющая последовательность SEQ ID NO:6, может быть доставлена в клетки-мишени.

Если клетка-мишень содержит клетки вблизи раны, подвергаемой лечению, вектор может быть доставлен непосредственно инъекцией в количестве, достаточном для такого уровня экспрессии белка SDF-1, которая позволяет проводить высокоскоростную терапию. При введении вектора непосредственно в рану или на периферии раны появляется возможность эффективного нацеливания вектора трансфекции и сведения к минимуму потери рекомбинантных векторов. Этот тип инъекции дает возможность локальной трансфекции желаемого числа клеток, в частности, в ране, тем самым увеличивая до максимума терапевтическую эффективность переноса генов и сводя к минимуму возможность воспалительной реакции на вирусные белки. В некоторых вариантах осуществления введение может быть выполнено с помощью иглы. В некоторых вариантах осуществления введение может быть выполнено в виде подкожной безыгольной инъекции.

Если клетка-мишень является культивируемой клеткой, которая впоследствии пересаживается в рану (например, клеткой трансплантата ткани), векторы могут быть доставлены путем прямой инъекции в культуральную среду. Нуклеиновая кислота SDF-1, трансфицированная в клетки, может быть функционально связана с регуляторной последовательностью.

Трансфицированные клетки-мишени могут быть пересажены в рану хорошо известными способами трансплантации, такими как трансплантация трансплантата. При первоначальной трансфекции клеток-мишеней *in vitro*, а затем пересадке трансфицированных клеток-мишеней в рану, возможность воспалительной реакции в ткани вблизи раны минимизирована по сравнению с непосредственной инъекцией вектора в клетки вблизи раны.

SDF-1 может экспрессироваться в клетки-мишени в течение любого подходящего срока, возможна временная экспрессия и стабильная, долгосрочная экспрессия. В одном аспекте изобретения нуклеиновой кислоты SDF-1 будет экспрессироваться в терапевтических количествах в течение определенного периода времени, эффективного для снижения апоптоза в клетках вблизи раны и/или для способствования хомингу к ране стволовых клеток или клеток-предшественников. Данный срок может быть сроком, эффективным для ускорения заживления раны, ускорения закрытия раны и/или ингибирования образования рубцов.

Терапевтическое количество представляет собой количество, которое способно приводить к медицински желаемому результату у подвергшегося лечению животного или человека. Как известно в медицине, дозировки для любого животного или человека зависят от многих факторов, в том числе от размера пациента, площади поверхности тела, возраста, конкретного вводимого препарата, пола, времени и способа введения, общего состояния здоровья и других одновременно вводимых препаратов. Конкретные дозы белков и нуклеиновых кислот могут быть легко определены специалистом в данной области с использованием экспериментальных методов, описанных ниже.

Белок или агент SDF-1, который вызывает, увеличивает и/или активирует экспрессию SDF-1 клеток-мишеней, может быть введен в клетки раны, клетки вблизи раны или клетки, введенные в рану (например, МСК трансфицирование для экспрессии SDF-1) в чистом виде или в виде лекарственного препарата. Лекарственный препарат может обеспечить локализованное высвобождение SDF-1 или агента в клетки вблизи раны, клетки, подвергаемые лечению, или клетки, введенные в рану. Лекарственные препараты в соответствии с изобретением, как правило, включают в себя некоторое количество SDF-1 или агента, смешанного с приемлемым фармацевтическим разбавителем или наполнителем, таким как стерильный водный раствор, для получения диапазона конечных концентраций, зависящих от предполагаемого использования. Методы подготовки обычно хорошо известны в данной области на примере Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Ed. Mack Publishing Company, 1980, включенного здесь путем ссылки.

Кроме того, для введения человеку препараты должны отвечать стандартам стерильности, пирогенности, общей безопасности и чистоты, как того требует Управления биологических стандартов FDA.

Лекарственный препарат может быть представлен в единичной дозированной форме для инъекций (например, в виде раствора, суспензии и/или эмульсии). Примеры лекарственных препаратов, которые могут быть использованы для инъекций, включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для приготовления стерильных инъеклируемых растворов или дисперсий. Носитель может быть растворителем или диспергирующей средой, содержащей, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль и т.п.), их подходящие смеси и растительные масла.

Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, путем использования покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и использования поверхностно-активных веществ. Неводные носители, такие как хлопковое масло, кунжутное масло, оливковое масло, соевое масло, кукурузное масло, подсолнечное масло, арахисовое масло, или сложные эфиры, такие как изопропилмиристат, также могут быть использованы в качестве систем растворителя для лекарственных соединений.

Кроме того, могут быть добавлены различные добавки, которые повышают стабильность, стерильность и изотоничность составов, в том числе антимикробные консерванты, антиоксиданты, хелатирующие агенты и буферы. Предотвращение действия микроорганизмов может быть обеспечено различными антибактериальными и противогрибковыми средствами, например парабенами, хлорбутанолом, фенолом, сорбиновой кислотой и тому подобными. Во многих случаях будет желательно включить изотонические агенты, например сахара, хлористый натрий и им подобные. Пролонгированное всасывание инъекционной фармацевтической формы может быть достигнуто с использованием агентов, задерживающих абсорбцию, например моностеарата алюминия и желатина. В соответствии с настоящим изобретением, однако, любой используемый наполнитель, разбавитель или добавка должны быть совместимы с соединениями.

Стерильные инъекционные растворы могут быть получены путем включения соединений, используемых в практике настоящего изобретения, в необходимое количество соответствующего растворителя с различными количествами других ингредиентов по необходимости.

Фармацевтические капсулы с "медленным высвобождением" или композиции или препараты с "замедленным высвобождением" могут быть использованы и, как правило, применяются. Составы с замедленным высвобождением, как правило, разработаны для подачи постоянного уровня лекарства в течение длительного периода и могут быть использованы для доставки SDF-1 или агента. Составы с замедленным высвобождением, как правило, имплантированы в непосредственной близости от места раны, например на сайте клетки, экспрессирующей CXCR4 и/или CXCR7 в ране или около раны.

Примеры препаратов с замедленным высвобождением включают полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, содержащих SDF-1 или агент, где матрицы находятся в виде формованных изделий, например пленок или микрокапсул. Примеры матриц с замедленным высвобождением включают сложные полиэфиры; гидрогели, например поли(2-гидроксиэтил метакрилат) или поли(виниловый спирт); полилактиды, например, указанные в патенте США № 3773919; сополимеры L-глутаминовой кислоты и гамма этил-L-глутамата; недеградируемый этиленвинилацетат; разлагаемые сополимеры молочной кислоты-гликолевой кислоты, такие как LUPRON DEPOT (инъеклируемые микросферы, состоящие из сополимера молочной кислоты, гликолевой кислоты и сополимера ацетата лейпролида); и поли-D-(-)-3-гидроксимасляную кислоту.

В то время как полимеры, такие как этиленвинилацетат и полимер молочной кислоты-гликолевой кислоты, способны высвобождать молекулы в течение более 100 дней, некоторые гидрогели высвобождают белки в течение более коротких периодов времени. Инкапсулированные SDF-1 или агент могут оставаться в организме в течение длительного времени и могут денатурировать или агрегировать в результате воздействия влаги при 37°C, тем самым уменьшая биологическую активность и/или изменения иммуногенности. Рациональные стратегии доступны для стабилизации в зависимости от вовлеченного механизма. Например, если механизм агрегации включает формирование межмолекулярных S-S связей посредством тиодисульфидного обмена, то стабилизация достигается путем модификации сульфгидрильных остатков, лиофилизацией из кислых растворов, контролем содержания влаги, использованием соответствующих добавок, разработкой конкретных композиций полимерных матриц и тому подобными методами.

В некоторых вариантах осуществления липосомы и/или наночастицы также могут быть использованы с SDF-1 или агентом. Формирование и использование липосом известно специалистам в данной области техники, как представлено ниже.

Липосомы образуются из фосфолипидов, которые диспергированы в водной среде и спонтанно образуют концентрические двухслойные многослойные везикулы (также называемые многослойными везикулами (MLVs)). MLV, как правило, имеют диаметры от 25 нм до 4 мкм. Обработка MLV ультразвуком приводит к образованию небольших однослойных пузырьков (SUV) с диаметром в диапазоне от 200 до 500 ангстрем, содержащих водный раствор.

Кроме липосом, фосфолипиды могут образовывать иные разнообразные структуры при диспергировании в воде в зависимости от молярного соотношения липида к воде. При низких соотношениях предпочтительной структурой является липосома. Физические характеристики липосом зависят от pH, ионной силы и присутствия двухвалентных катионов. Липосомы могут показывать низкую проницаемость для ионных и полярных веществ, но при повышенных температурах подвергаются фазовому переходу, который заметно изменяет их проницаемость. Фазовый переход связан с изменением от плотно упакованной упорядоченной структуры, известной как гелеобразное состояние, к более свободной менее упорядоченной структуре, известной как жидкое состояние. Это происходит при характерной температуре фазового перехода и приводит к увеличению проницаемости для ионов, сахаров и лекарственных средств.

Липосомы взаимодействуют с клетками с помощью четырех различных механизмов: Эндоцитоз фагоцитами ретикулоэндотелиальной системы, такими как макрофаги и нейтрофилы; адсорбция на поверхности клетки, либо с помощью неспецифических слабых гидрофобных или электростатических сил, либо специфических взаимодействий с компонентами клеточной поверхности; слияние с плазматической мембраной клетки путем введения липидного бислоя липосомы в плазматическую мембрану с одновременным выпуском липосомального содержимого в цитоплазму и переносом липосомальных липидов в клеточные или субклеточные мембраны или наоборот, без какой-либо ассоциации содержимого липосом. Изменение липосомной композиции может изменить механизм работы, хотя более одного механизма может работать одновременно.

Нанокapsулы могут в общем содержать соединения стабильным и воспроизводимым образом. Чтобы избежать побочных эффектов из-за внутриклеточной полимерной перегрузки, такие ультрадисперсные частицы (размером около 0,1 мкм) должны быть разработаны с использованием полимеров, способных разлагаться *in vivo*. Биоразлагаемые полиалкилцианоакрилатные наночастицы, которые удовлетворяют этим требованиям, рассматриваются для использования в настоящем изобретении, и такие частицы могут быть легко изготовлены.

Для получения лекарственных препаратов из соединений по настоящему изобретению фармацевтически приемлемые носители могут находиться в любой подходящей форме (например, в форме твердых тел, жидкостей, гелей и т.п.). Твердый носитель может быть одним или несколькими веществами, которые могут также действовать как разбавители, корригенты, связующие вещества, консерванты и/или инкапсулирующий материал.

В другом аспекте настоящего изобретения агент SDF-1 или SDF-1 может быть изготовлен для местного введения для лечения поверхностных ран. Композиции для местного применения включают композиции для доставки через рот (буккально) и наочно таким образом, что по меньшей мере один слой кожи (т.е. эпидермиса, дермы и/или подкожного слоя) будет подвергнут взаимодействию с SDF-1 или агентом. Актуальные системы доставки могут быть использованы для введения для местного применения по настоящему изобретению.

Композиции для местного применения на коже могут включать в себя мази, кремы, гели, пасты, содержащие SDF-1 или агент SDF-1, которые могут быть введены в фармацевтически приемлемом носителе. Композиции для местного применения могут быть получены с использованием маслянистых или водорастворимых мазевых основ, как это хорошо известно специалистам в данной области техники. Например, эти композиции могут включать растительные масла, животные жиры, а более предпочтительно полутвердые углеводороды, полученные из нефти. Конкретные используемые компоненты могут включать белые мази, желтые мази, воск цетиловых эфиров, олеиновую кислоту, оливковое масло, парафин, вазелин, белый вазелин, спермацет, глицериновый экстракт крахмала, белый воск, желтый воск, ланолин, безводный ланолин и глицерилмоностеарат. Различные водорастворимые мазевые основы также могут быть использованы, в том числе, например, простые гликолевые эфиры и их производные, полиэтиленгликоли, полиоксилстеарат 40 и полисорбаты.

В другом аспекте настоящего изобретения SDF-1 или агент могут быть размещены в и/или на подложке, твердой подложке и/или раневой повязке для доставки SDF-1 или агента к ране. Используемый здесь термин "подложка" или "твердый носитель" и "раневая повязка" широко относятся к любой подложке, подготовленной и примененной к ране для защиты, впитывания, дренажа и т.д. Настоящее изобретение может включать любые из многочисленных типов подложек и/или подкладок, которые являются коммерчески доступными, включая пленки (например, полиуретановые пленки), гидроколлоиды (гидрофильные коллоидные частицы, связанные с пенополиуретаном), гидрогели (поперечно-сшитые полимеры, содержащие по меньшей мере 60% воды), пены (гидрофильные или гидрофобные), альгинаты кальция (нетканые композиционные материалы из волокон альгината кальция) и целлофан (целлюлоза с пластификатором). Форма и размер раны могут быть определены и раневая повязка изготовлена для точного размещения на основании измерений раны. Поскольку места ранений могут различаться по механической прочности, толщине, чувствительности и т.д., подложка может быть сформирована на основании точного рассмотрения механических и/или других особенностей места размещения. Например, толщина подложки может быть сведена к минимуму для размещения на высокоиннервированных местах, например на кончиках пальцев. Другие места расположения раны, например пальцы, лодыжки, колени, локти и

т.п., могут быть подвержены более высокой механической нагрузке и требуют нескольких слоев подложки.

В одном примере основа может представлять собой биологически рассасывающийся имплантат, который включает в себя полимерную матрицу и SDF-1, или агент, диспергированный в матрице. Полимерная матрица может быть в форме мембраны, губки, геля или любой другой желательной конфигурации. Полимерная матрица может быть образована из биоразлагаемого полимера. Следует иметь в виду, однако, что полимерная матрица может дополнительно включать неорганический или органический композит. Полимерная матрица может содержать любой один или сочетание известных материалов, включая, например, хитозан, поли(этиленоксид), поли(молочную кислоту), поли(акриловую кислоту), поли(виниловый спирт), поли(уретан), поли(N-изопропил акриламида), поли(винилпирролидон) (PVP), поли(метакриловую кислоту), поли(п-стирол карбоновой кислоты), поли(п-стиролсульфокислоту), поли(винилсульфоновой кислоты), поли(этиленмин), поли(виниламин), поли(ангидрид), поли(L-лизин), поли(L-глутаминовую кислоту), поли(гамма-глутаминовую кислоту), поли(капролактон), полилактид, поли(этилен), поли(пропилен), поли(гликолид), поли(лактид-со-гликолид), поли(амид), поли(гидроксильную кислоту), поли(сульфон), поли(амин), поли(сахарид), поли(HEMA), поли(ангидрид), коллаген, желатин, гликозаминогликаны (ГАГ), поли(гиалуроновую кислоту), поли(альгинат натрия), альгинат, гиалуроновую кислоту, агароз, полигидроксibuтират (PHB) и тому подобное.

Следует иметь в виду, что специалист в данной области техники может создать полимерные матрицы любой желаемой конфигурации, структуры или плотности. Варьируя концентрации полимера, концентрации растворителя, температуру нагрева, время реакции и другие параметры, например, рядовой специалист в данной области может создать полимерную матрицу с любой желаемой физической характеристикой(ами). Например, полимерная матрица может быть сформирована в губчатые структуры различной плотности. Полимерная матрица может быть сформирована в виде мембраны или листа, который затем может быть обернут вокруг или иным образом изогнут для прилегания к ране. Полимерная матрица может быть также выполнена в виде геля, сетки, пластины, винта, вилки или стержня. Любые возможные конфигурации или формы полимерной матрицы находятся в пределах объема настоящего изобретения. В качестве примера осуществления настоящего изобретения полимерная матрица может содержать альгинатную матрицу.

В другом аспекте настоящего изобретения по меньшей мере одна клетка-предшественник может быть предоставлена на полимерной матрице. Примеры клеток-предшественников могут быть выбраны, не ограничиваясь, из тотипотентных стволовых клеток, плюрипотентных стволовых клеток, мультипотентных стволовых клеток, мезенхимальных стволовых клеток, нервных стволовых клеток, гемопоэтических стволовых клеток, панкреатических стволовых клеток, сердечных стволовых клеток, эмбриональных стволовых клеток, эмбриональных зародышевых клеток, стволовых клеток нейрального гребня, стволовых клеток почек, стволовых клеток печени, стволовых клеток легких, гемангиобластных клеток и эндотелиальных клеток-предшественников. Дополнительные примеры клеток-предшественников могут быть выбраны, не ограничиваясь, из дедифференцированных хондрогенных клеток, миогенных клеток, остеогенных клеток, клеток-предшественников клеток связок, клеток-предшественников клеток сухожилий, адипогенных клеток и клеток-предшественников клеток кожи.

Полимерная матрица по настоящему изобретению может быть засеяна по меньшей мере одной клеткой-предшественником и SDF-1 или агентом. SDF-1 или агент могут быть диспергированы в матрице и/или экспрессироваться из засеянной клетки-предшественника. Клетки-предшественники могут включать в себя аутологичные клетки; однако следует иметь в виду, что также могут быть использованы ксеногенные, аллогенные или сингенные клетки. При засеивании не аутологичных клеток может быть желательным введение иммунодепрессантов, чтобы минимизировать иммунное отторжение. Используемые клетки-предшественники могут быть первичными клетками элементов, эксплантатами или клеточными линиями и могут представлять собой делящиеся или не делящиеся клетки. Клетки-предшественники могут быть выращены *ex vivo* до введения в полимерную матрицу. Аутологичные клетки предпочтительно должны быть выращены таким образом в случае, если собрать достаточное количество жизнеспособных клеток у носителя не представляется возможным.

SDF-1 или агент SDF-1 также могут быть представлены в или на поверхности медицинского устройства, используемого для лечения внутренней и/или внешней раны. Медицинское устройство может содержать любой инструмент, прибор, аппарат, приспособление, имплантат или другой подобный или схожий предмет, включая компонент или часть, или аксессуар, который, например, признан в официальном Национальном формуляре США или Фармакопее США или любом их дополнении; предназначенный для использования в диагностике болезней или прочих состояний или в лечении, облегчении, терапии или профилактике заболеваний в организме человека или в других животных или предназначенный для воздействия на структуру или любую функцию тела человека или других животных, и с помощью которых не представляется возможным достичь выполнения любой из первичных намеченных целей путем химического действия в пределах или на теле человека или других животных и которые не зависят от процесса метаболизации для достижения какой-либо из первично намеченных целей.

Медицинское устройство может включать в себя, например, эндоваскулярные медицинские устрой-

ства, такие как внутрикоронарные медицинские устройства. Примеры внутрикоронарных медицинских устройств могут включать в себя стенты, катетеры для доставки лекарств, имплантаты и баллоны для доставки лекарств, используемые в сосудистой системе пациента. Если медицинское устройство содержит стент, стент может включать периферические стенты, периферические коронарные стенты, разлагаемые коронарные стенты, неразлагающиеся коронарные стенты, саморасширяющиеся стенты, баллонорасширяемые стенты и стенты пищевода. Медицинское устройство может также включать в себя артериовенозные трансплантаты, обходные трансплантаты, имплантаты в пенисе, сосудистые имплантаты и трансплантаты, внутривенные катетеры, трансплантаты малого диаметра, искусственные катетеры легких, электрофизиологические катетеры, штифты в костях, шовные якоря, стент-графты и катетеры для поддержания артериального давления, грудные имплантаты, имплантаты при доброкачественной гиперплазии предстательной железы и раке предстательной железы, устройства для восстановления/наращивания костной ткани, имплантаты груди, ортопедические имплантаты суставов, зубные имплантаты, имплантированные трубки для подачи лекарственных препаратов, онкологические имплантаты, имплантаты для купирования боли, неврологические катетеры, центральные венозные катетеры доступа, катетеры-манжеты, катетеры для сосудистого доступа, урологические катетеры/имплантаты, катетеры при атерэктомии, катетеры для выведения сгустков, ЧТА-катетеры, ЧТКА-катетеры, тонкие зонды (сосудистые и несосудистые), катетеры для подачи лекарственных препаратов, ангиографические катетеры, катетеры системы гемодиализа, нейроваскулярные баллонорасширяемые катетеры, катетеры для всасывающего дренажа грудной полости, электрофизиологические катетеры, катетеры для терапии инсульта, дренажные катетеры абсцессов, приспособления для выведения продуктов отделения желчи, катетеры для диализа, катетеры для центрального венозного доступа и родительские катетеры для кормления.

Медицинское устройство может дополнительно включать в себя имплантируемые кардиостимуляторы или дефибрилляторы, сосудистые трансплантаты, устройства для сфинктера, устройства для уретры, устройства для мочевого пузыря, устройства для почек, гастроэнтеральные устройства и устройства для анастомоза, позвоночные диски, кровоостанавливающие барьеры, зажимы, хирургические скобы/швы/штифты/пластины/провода/зажимы, датчики глюкозы, трубки оксигенатора крови, мембраны оксигенатора крови, пакеты для крови, устройства для контроля рождаемости/ВМС и связанные с ними устройства контроля беременности, устройства для восстановления хряща, ортопедические устройства для восстановления трещин, тканевые каркасы, спинно-мозговые шунты, стоматологические устройства для восстановления после перелома, интравитреальные устройства для введения лекарственных препаратов, каналы для регенерации нервов, выводы для электростимуляции, устройства для восстановления позвоночника/ортопедические устройства для восстановления, перевязочные материалы, эмболические защитные фильтры, трансплантаты и устройства при аневризме брюшной аорты, спирали для нейролечения аневризмы, устройства для гемодиализа, тампоны при маточных кровотечениях, устройства для закрытия анастомозов, устройства для исключения аневризмы, пластыри Neuro-Patch®, фильтры полой вены, расширители мочевыводящих путей, эндоскопические хирургические и раневые дренажи, хирургические экстракторы ткани, транзитные интродьюсеры и расширители, коронарные и периферические проводники, системы поддержки кровообращения, тимпаностомические вентиляционные трубки, шунты для спинно-мозговой жидкости, выходы для дефибриллятора, устройства чрескожного закрытия, дренажные трубки, бронхиальные трубки, сосудистые спирали, устройства защиты сосудов, устройства для сосудистых вмешательств, включая сосудистые фильтры и дистальные опорные устройства и фильтры при эмболии/устройства для помощи при защемлении, трансплантаты артериовенозного доступа, хирургических тампоны, сердечные клапаны и конструкции тканевой инженерии, такие как костные трансплантаты и трансплантаты кожи.

Следующие примеры приведены только с целью иллюстрации и не предназначены для ограничения объема приложенной формулы изобретения.

Пример 1. Высвобождение стромального клеточного фактора-1 на альгинатном каркасе. Характеристика и способность ускорять заживление ран.

Мы предположили, что доставка белка SDF-1 или плазмиды с медленным высвобождением повышает их эффективность при заживлении ран. Таким образом, мы использовали клинически соответствующую систему доставки, альгинатный каркас, чтобы доставлять SDF-1 в течение долгого времени, для чего была использована модель острой хирургической раны, нанесенной на свинью. Мы охарактеризовали доставку SDF-1 с использованием альгинатного каркаса *in vitro* и продемонстрировали потенциал для терапевтической пользы *in vivo* использования каркасов для доставки белка SDF-1 и плазмидов к острым хирургическим ранам.

Подготовка каркасов для применения *in vivo*.

Для применения *in vivo* альгинатные каркасы 1×6 см были изготовлены способом, описанным выше. На каркасы затем были нанесены плазмиды SDF-1 (N=6), белок SDF-1 (N=10) или фосфатный буферный раствор (ФБР) (N=4) по способу, описанному ниже.

Для каркасов плазмидов SDF-1 плазмиды были созданы путем введения гена, кодирующего челове-

ческий SDF-1, в pcDNA3.1 позвоночного столба (Invitrogen Corporation, Carlsbad, Calif.). Раствор для нанесения готовили путем смешивания 3,5 мг плазмидов SDF-1 в 2,33 мл ФБР для получения раствора с концентрацией 1,5 мг/мл. На каждый каркас раствор был нанесен пипеткой в стерильных условиях в количестве шести капель по 60 мкл на каркас (всего 360 мкл) и равномерно распределен так, что каждая капля заняла площадь каркаса 1×1 см.

Для белковых каркасов SDF-1 раствор для нанесения готовили путем смешивания 10 мкг белка SDF-1 без носителя (R & D Systems, Миннеаполис, штат Миннесота.) с 5 мл ФБР и 3 мл 1000 МЕ/мл инъекционного гепарина (Baxter Healthcare Corporation, Дирфилд, штат Иллинойс) для получения раствора с концентрацией 1,5 мкг/мл. На каждый каркас раствор был нанесен пипеткой в стерильных условиях в количестве шести равноотстоящих друг от друга капель по 60 мкл на каркас.

Каркас ФБР служил в качестве негативного контроля. Раствор для нанесения готовили путем смешивания 1,35 мл ФБР и 0,45 мл 1000 МЕ/мл инъекционного гепарина. Раствор для нанесения был нанесен пипеткой в стерильных условиях в количестве шести равноотстоящих друг от друга капель по 60 мкл на каркас.

Все каркасы с нанесенными растворами хранили при 4°C в течение 12 ч до применения на раны.

Модель заживления хирургической раны, нанесенной на свинью, и последующее наблюдение до усыпления.

Две домашние свиньи йоркширской породы были подвергнуты общему наркозу. Была прикреплена эндотрахеальная трубка, и общий наркоз поддерживался с помощью поставляемого с кислородом изофлурана через систему возвратного дыхания с помощью вентилятора. Была использована стандартная модель острых хирургических ран. Каждое животное получило 12 разрезов длиной 5 см по всей толщине ткани (шесть с каждой стороны позвоночника), разрезы разнесены приблизительно на 7,5 см друг от друга. Каждый разрез шел перпендикулярно позвоночнику, начиная от расстояния 7,5 см от позвоночника, и проводился в направлении брюшной полости. До остановки кровотечения разрезы были закрыты марлей. Марля была удалена и разрезы были защищены.

После закрытия ран рядом с раной был помещен и сфотографирован каркас (фиг. 1). Порядок размещения каркасов на каждой свинье был рандомизирован со следующим распределением:

- белковый каркас с SDF-1 (n=5);
- плазмидный каркас с SDF-1 (n=3);
- каркас с ФБР (контроль, n=2);
- каркас отсутствует (пустышка, n=2).

Каркас был помещен на рану (за исключением группы пустышки), и каждая рана была закрыта пластырем Tegaderm™.

Для определения влияния SDF-1 на скорость заживления ран длина ран измерялась одним и тем же ветеринаром в день 0 (перед размещением каркасов) и до усыпления. Длина раны был преобразована в проценты заживления с помощью следующего соотношения:

(Начальная длина раны - итоговая длина раны)/начальная длина раны·100%.

Для мониторинга острых и хронических эффектов SDF-1 на заживление ран острые эффекты были оценены на первой свинье, которая была усыплена на 4 день, и хронических эффекты - на второй свинье, усыпленной через 9 дней.

Последующие наблюдения после усыпления.

После усыпления одна секция из середины каждой раны была вырезана для гистопатологического и иммуногистохимического анализов. Стандартная окраска гематоксилином и эозином (H&E) была использована для оценки степени фиброплазии, воспаления и некроза на 4-й день и некроза, фиброза и гранулематозного воспаления на 9-й день. Каждый параметр оценивали по шкале качественного анализа патогистологом, заслепленным в отношении рандомизации, оценка выражалась следующим образом: нет проявлений (отсутствует), минимальные, легкие, средние или тяжелые проявления. Иммуногистохимическое окрашивание проводили на том же срезе ткани. Эффект SDF-1 на инфильтрацию фибробластов в ране определялся с помощью окрашивания виментином. Влияние на формирование кровеносных сосудов определяли по CD31 и наличию гладкой мускулатуры, наличие гладкой мускулатуры определяли с помощью окрашивания актином. Количество каждого пятна на образце оценивалась тем же патологом с использованием описанной выше шкалы (минимальные проявления ... тяжелые проявления).

Воздействие каркаса, высвобождающего SDF-1, на заживление ран также показано на фиг. 1 и 2. На фиг. 1 показаны репрезентативные примеры ран, обработанных каркасом с контролем (ФБР), белковым каркасом с SDF-1 и плазмидным каркасом с SDF-1 в день 0 (верхняя панель) и на 9-й день (нижняя панель). Все нанесенные раны (в середине) имеют длину 5,0±0,1 см.

На 9-й день обработанные контрольным каркасом раны все еще очевидны и имеют процент заживления 0%. В противоположность этому раны, обработанные SDF-1 на белковом каркасе и SDF-1 на плазмидном каркасе, уже не видны на 9-й день и имеют процент заживления 100%.

Фиг. 2 показывает данные по процентам заживления всех обработанных ран. Данные дня 4 получены от первой свиньи, данные дня 9 получены от второй свиньи. В день 9 раны, которые обрабатывали

SDF-1 на плазмидном или белковом каркасе (сплошные маркеры и линии), зажили в большей степени, чем раны контрольной группы и группы пустышки (открытые маркеры и пунктирные линии). Примечательно, 1 из 3 ран, обработанных SDF-1 на плазмидном каркасе, и 2 из 5 ран, обработанных SDF-1 на белковом каркасе, показали 100% заживление за 9 дней; тогда как раны контрольной группы и группы пустышки показали заживление не более чем 20% за 9 дней.

Мы исследовали влияние SDF-1 на инфильтрацию фибробластов, образование новых кровеносных сосудов и гладких мышц с помощью иммуногистохимического окрашивания виментином, CD31 и актином для гладкой мускулатуры соответственно. Не было обнаружено существенных различий в количестве любых пятен между группами. Анализ H&E показал незначительное уменьшение фиброза в ранах, обработанных SDF-1 на белковом и плазмидном каркасе, по сравнению с контролем или пустышкой, все прочие параметры также схожи. Результаты показаны ниже в следующих таблицах.

Результаты показаны в приведенной ниже таблице.

Заживление ран по данным H/E - день 9

Группа, подвергшаяся обработке	Количество ран	Фиброз				% < Минимальный
		Нет	Минимальные проявления	Легкие проявления	Средние проявления	
Пустышка (без повязки)	2	0	1	1	0	50%
Контроль (повязка с физраствором)	2	0	1	0	1	50%
SDF-1 на белковом каркасе	5	0	4	1	0	80%
SDF1 на плазмидном каркасе	3	0	3	0	0	100%

Заживление ран по данным H/E - день 9

Группа, подвергшаяся обработке	Количество ран	Воспаление, гранулематоз			% < Минимальные проявления
		Нет	Минимальные проявления	Тяжелые проявления	
Пустышка	2	0	0	0	100%
Контроль	2	0	0	1	50%
SDF1 на белковом каркасе	5	0	1	0	50%
SDF-1 на плазмидном каркасе	3	0	0	0	100%

Заживление ран по данным H/E - день 9

Группа, подвергшаяся обработке	Всего	Некроз		% < Минимальные проявления
		Минимальные проявления	Легкие проявления	
Пустышка (без повязки)	2	1	0	50%
Контроль (повязка с физраствором)	2	0	0	100%
SDF-1 на белковом каркасе	5	1	1	80%
SDF-1 на плазмидном каркасе	3	1	0	100%

Заживление ран по данным Н/Е - день 9

Группа, подверг- шаяся обработке	Всего	Воспаление, подострое/хроническое				% <
		Нет	Минимальные проявления	Легкие проявления	Средние проявления	Минимальные проявления
Пустышка (без повязки)	2	0	1	1	0	50%
Контроль (повязка с физраст- вором)	2	0	0	0	0	100%
SDF-1 на белковом каркасе	5	3	0	1	1	60%
SDF-1 на плазмидном каркасе	3	1	1	0	1	67%

Пример 2. Оценка заживления ран и уменьшения рубцов у свиней породы дюрок.

Исследования проводились с целью оценки способности SDF-1 оказания содействия заживлению ран и коррекции рубцов у свиней породы дюрок, признанной модели гипертрофических рубцов. Каждое животное получило от 5 до 6 эксцизионных ран на полную толщину ткани на каждой стороне от средней линии спины. Затем раны были закрыты зажимами, и плазмид, кодирующий SDF-1 (JVS-100), или контрольный носитель были введены подкожно в место нанесения раны. Как показано на фиг. 3, общий объем рубца (А), максимальная высота рубца (В) и площадь поверхности рубца (С) были снижены у пациентов, получавших JVS-100, через 28 дней после возникновения раны. Кроме того, цвет, текстура и средний балл по Манчестерской шкале рубцов (MSS) показали явное улучшение (фиг. 4 и 5). Соответствующие результаты оценки ран через 90 дней после появления показали приблизительное улучшение у ран, обработанных SDF-1, на 40% (фиг. 6 (АЕ)).

Пример 3. Сверхэкспрессия SDF-1 непосредственно после хирургического закрытия минимизирует образование рубцов у пациента-человека.

Было проведено слепое рандомизированное исследование с повышением дозы для определения того, способен ли плазмид, кодирующий SDF-1, нанесенный по краям раны грудины, появившейся вследствие операции на открытом сердце, улучшить заживление ран и уменьшить образование рубцов у пациентов. 26 пациентов были рандомизированы для получения JVS-100 или плацебо вдоль раны на груди. В каждой группе 2 пациента получали плацебо и 6 пациентов - JVS-100 методом безыгольных подкожных инъекций. Безопасность оценивалась через 1 месяц, а эффективность в отношении закрытия ран и косметический эффект - через 6 месяцев с помощью 3D-изображений и анкетирования пациента и врача. На сегодняшний день все исследователи по-прежнему слепо. Промежуточный анализ наименьших квадратов, который подходит для анализа полного набора данных пациентов, которые достигли 6 месяцев наблюдения (первая группа и половина второй группы), показывает дозозависимое снижение ширины рубца (плацебо: 35,9 мм против 18,5 мм у группы 1, $P < 0,0001$) и объема рубцового образования (P : 13,9 мл против 1,4 мл, $p < 0,0001$) через 6 месяцев после операции. Составная визуальная аналоговая шкала оценки рубцов пациентом показала значительное улучшение внешнего вида разреза ($p < 0,0001$) в группе 1 по сравнению с плацебо; однако оценки врача и пациента по Манчестерской шкале рубцов не выявили значительного улучшения внешнего вида рубцов. Эти результаты позволяют предположить, что JVS-100 может значительно улучшить заживление хирургического разреза и свести к минимуму образование рубцов у людей.

Из приведенного выше описания изобретения специалистам в данной области техники будут понятны возможные усовершенствования, изменения и модификации. Такие улучшения, изменения и модификации в пределах данной области техники считаются охваченными прилагаемой формулой изобретения. Все патенты, патентные заявки и публикации, цитируемые здесь, включены в качестве ссылок во всей их полноте.

Последовательности, представляющие интерес:

SEQ ID NO: 1

KPVSLLYRCPCRFFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQVCIDPKLKI
QEYLEKALNK

SEQ ID NO: 2

MNAKVVVVLVLVLTALCLSDGKPVSLSYRCPCRFFESHVARANVKHLKILNTPNCALQ
IVARLKNNNRQVCIDPKLKIQEYLEKALNK

SEQ ID NO: 3

MDAKVVAVLALVLAALCISDGKPVSLSYRCPCRFFESHVARANVKHLKILNTPNCALQ
IVARLKNNNRQVCIDPKLKIQEYLDKALNK

SEQ ID NO: 4

gccgcactttcactctccgtcagccgattgccgctcggcgtccggcccccgacccg
cgctcgccgccccgccccgccccgccccgcatgaacccaaggctcgtggtcgtggtg
cctcgtgctgaccgcgctctgctcagcgacgggaagcccgctcagcctgagctacagatgcc
atgccgattcttcgaaagccatggtgccagagccaacgtcaagcatctcaaatctcaacac
tccaaactgtgcccttcagattgtagccggctgaagaacaacaacagacaagtgatgcatga
cccgaagctaaagtggattcaggagtagctggagaaagctttaacaagtaagcacaacagcc
aaaaaggactttccgctagaccactcgaggaaaactaaaaccttgtagagatgaaagggca
aagacgtgggggaggggaccttaaccatgaggaccaggtgtgtgtgtgggtgggcacattga
tctgggagcgggctgaggtttgccagcatttagaccctgcatttatagcatacggatgata
ttgcagcttatattcatccatgccctgtacctgtgcacgttggaacttttactggtgtt
ttctaagaaagaaatgtattatcaacagcattttcaagcagtttagttccttcgatcatca
caatcatcatcattctcattctcatttttaaatcaacgagtacttcaagatctgaattggc
ttgtttggagcatctcctctgctccctcgggagctctgggcacagtcaggtggtggttaaca
gggagctggaaaaagtgctcttcttcagacactgaggctcccgagcagcgccctcccaag
aggaaggcctctgtggcactcagataccgactggggtgggcgcccactgccttcacctcc
tctttcaacctcagtgattggctctgtgggtccatgtagaagccactattactgggactgtg
ctcagagacccctctccagctattctactctctcccgactccgagagcatgcttaactct
gcttctgcttctcatttctgtagcctgatcagcgccgaccagccgggaagaggtgattgct
ggggtcgtgccctgcattccctctcctccagggctcgtcccccagctcgggcccctctgtgag
atccgtctttggcctcctccagaatggagctggccctctcctgggagtgtagtaatgggtcccc
tgcttaccgcaaaaagacaagtccttacagaatcaaatgcaattttaaatctgagagctcgct
ttgagtgcagtggttttgtagtgcctctgaagcctatgtagccatggaggcactaacaac
tctgaggtttccgaatcagaagcgaaaaaatcagtgataaaccatcatcttgccactacc
cctcctgaagccacagcaggggtttcaggttccaatcagaactgttggaaggtgacatttcca
tgcataaatgcgatccacagaaggtcctgggtgattttgtaacttttgcaaggcatttttt
atataatttttgtgcacattttttttacgtttctttagaaaacaaatgtatttcaaatat
atattatagtcgaacaattcatatatttgaagtggagccatgaaatgacagtagttatactt
ctctattatctcaactactggcaatttgaagaaatataatgatataataatgtgattgc
agcttttcaatgttagccacagtgattttttcacttgactaaaattgatcaaatgtgaca
ttatatgactagcaataaaatgctaattgtttcatgggtataaacgtcctactgtatgtggga
atattttacctgaataaaatcattagttgttagtgatggagcttaaaaaaa

SEQ ID NO: 5

catggacgccaaggctcgtcgtgctggtggccctggtgctggccgctctgcatcagt
gacggtgaagccagtcagcctgagctacagatgccctgccgattctttgagagccatgctgcc
agagccaacgtcaaacatctgaaaatcctcaactccaaactgtgcccttcagattgttgca
aggctgaaaagcaacaacagacaagtgatgacccgaaattaaagtggaatccaagagtag
ctggacaaagccttaacaagtaagcacaacagcccaaggactt

SEQ ID NO: 6

AGATCTCCTAGGGAGTCCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGC
CCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGA
CTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAG

TGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCGCGCTGGCATT
 ATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCG
 CTATTACCATGGTGATGCGGTTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCAC
 GGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACC AAAATCAAC
 GGGACTTTCCAAAATGTCGTAACTCCGCCCCATTGACGCAATGGGCGGTAGCGGTGTAC
 GGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATC
 CACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCGCGCGGAACGGT
 GCATTGGAACGCGGATTCCCCGTGCCAAGAGTGACGTAAGTACCGCCTATAGAGTCTATAGGC
 CCACCCCCCTTGGCTTCTTATGCATGCTATACTGTTTTTGGCTTGGGGTCTATACACCCCCGCT
 TCCTCATGTTATAGGTGATGGTATAGCTTAGCCTATAGGTGTGGGTTATTGACCATTATTGAC
 CACTCCCCCTATTGGTGACGATACTTTCCATTACTAATCCATAACATGGCTCTTTGCCACAAC
 CTCTTTATTGGCTATATGCCAATACACTGTCCTTCAGAGACTGACACGGACTCTGTATTTTAA
 CAGGATGGGGTCTCATTTATTATTTACAAATTCACATATACAACACCACCGTCCCCAGTGCCC
 GCAGTTTTTTATTAACATAACGTGGGATCTCCACGCGAATCTCGGGTACGTGTTCCGGACATG
 GGCTCTTCTCCGGTAGCGGCGGAGCTTCTACATCCGAGCCCTGCTCCCATGCCTCCAGCGACT
 CATGGTCGCTCGGCAGCTCCTTGCTCCTAACAGTGGAGGCCAGACTTAGGCACAGCACGATGC
 CCACCACCACAGTGTGCCGCACAAGGCCGTGGCGGTAGGGTATGTGTCTGAAAAATGAGCTCG
 GGGAGCGGGCTTGACCCGCTGACGCATTTGGAAGACTTAAGGCAGCGGCAGAAGAAGATGCAG
 GCAGCTGAGTTGTTGTTCTGATAAGAGTCAGAGGTAACCTCCGTTGCGGTGCTGTTAACGG
 TGGAGGGCAGTGTAGTCTGAGCAGTACTCGTTGCTGCGCGCGCGCCACCAGACATAATAGCT
 GACAGACTAACAGACTGTTCCCTTTCCATGGGTCTTTTCTGCAGTCACCGTCCTTGCCATCGGT
 GACCACTAGTGGCTCGCATCTCTCCTTCACGCGCCCGCGCCCTACCTGAGGCGCCATCCAC
 GCCGGTTGAGTCGCGTTCTGCGCGCTCCCGCTGTGGTGCCCTCCTGAATGCGTCGCGCGTCT
 AGGTAAGTTTAAAGCTCAGGTCGAGACCGGGCCTTTGTCCGCGCTCCCTTGGAGCCTACCTA
 GACTCAGCCGCTCTCCACGCTTTGCCTGACCCTGCTTGCTCAACTCTACGTCTTTGTTTCGT
 TTTCTGTTCTGCGCGTTACAGATCGGTACCAAGCTTGCCACCACCATGAACGCCAAGGTCGT
 GGTGCTGCTGGTCTCGTGCTGACCGGCTCTGCCTCAGCGACGGGAAGCCCGTCAGCCTGAG
 CTACAGATGCCATGCCGATTCTTCGAAAGCCATGTTGCCAGAGCCAACGTCAAGCATCTCAA
 AATTCTCAACACCCCAAACCTGTGCCCTTCAGATTGTAGCCCGGTGAAGAACAACAACAGACA
 AGTGTGCATTGACCCGAAGCTAAAGTGGATTACAGAGTACCTGGAGAAAGCCTTAAACAAGTA
 ATCTAGAGGGCCCTATTCTATAGTGTACCTAAATGTAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTG
 TGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCGTGCCCTCCTTGACCCTGGAAG
 GTGCCACTCCCACTGTCTTTCCATAAAATGAGGAAATGCATCGCATTTGCTGAGTAGGT
 GTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATA
 GCAGGCATGTGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACAGGGCCGCGG
 TGGCCATCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAG
 AAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAACAA
 AAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTCGGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGA
 AGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAACTACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAG
 GCCACCACCTTCAAGAACTCTGTAGCAGCGCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCCAG
 TGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCCGG
 ATAAGGCGCGCGGTGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAAGCTTGAGACGGAACGA
 CCTAGACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGA
 GAAAGGCGGACAGGTATCCGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTC
 CAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTC
 GATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTT
 TACGGTTCTTGGCCTTTTGTGCTGACATGAATTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGG
 CGATAGAAGGCGATGCGCTGCGAATCGGGAGCGCGATACCGTAAAGCACGAGGAAGCGGTCA
 GCCCATTCGCCGCCAAGCTCTTCAGCAATATCACGGGTAGCCAACGCTATGTCCTGATAGCGG
 TCCGCCACACCCAGCCGCCACAGTCGATGAATCCAGAAAAGCGGCCATTTTCCACCATGATA
 TTCGGCAAGCAGGCATCGCCATGGGTACGACGAGATCCTCGCGCTCGGGCATGCTCGCCTTG
 AGCCTGGCGAACAGTTTCGGCTGGCGGAGCCCTGATGCTCTTCGTCCAGATCATCCTGATCG
 ACAAGACCGGCTTCCATCCGAGTACGTGCTCGCTCGATGCGATGTTTCGCTTGGTGGTCAAT
 GGGCAGGTAGCCGGATCAAGCGTATGCAGCCGCCGCTATGCATCAGCCATGATGGATACTTTC
 TCGGCAGGAGCAAGGTGAGATGACAGGAGATCCTGCCCCGGCACTTCGCCCAATAGCAGCCAG
 TCCCTTCCCGCTTCAGTGACAACGTGAGCACAGTGCAGCAAGGAACGCCCGTCTGTGGCCAGC
 CACGATAGCCGCTGCTCGTTCGAGTTTATTCAGGGCACCGGACAGGTGCGTCTTGACA
 AAAAGAACCAGGCGCCCCGTGCGCTGACAGCCGGAACACGGCGGCATCAGAGCAGCCGATTGTC
 TGTGTGCCAGTCATAGCCGAATAGCCTCTCCACCAAGCGGCGGAGAACCTGCGTGCAAT
 CCATCTTGTTCATCATGCGAAACGATCCTCATCTGTCTCTTGATC

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> JUVENTAS THERAPEUTICS, INC.
 PENN, MARC S.
 KIEDROWSKI, MATTHEW

<120> ИСПОЛЬЗОВАНИЕ SDF-1 ДЛЯ УМЕНЬШЕНИЯ ОБРАЗОВАНИЯ РУБЦОВ

<130> 101431.000020

<140>

<141>

<150> 61/793,462

<151> 2013-03-15

<160> 6

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 68

<212> PRT

<213> Искусственные последовательности

<220>

<223> Описание искусственных последовательностей: Синтетические полипептиды

<400> 1

Lys	Pro	Val	Ser	Leu	Leu	Tyr	Arg	Cys	Pro	Cys	Arg	Phe	Phe	Glu	Ser
1				5				10						15	

His	Val	Ala	Arg	Ala	Asn	Val	Lys	His	Leu	Lys	Ile	Leu	Asn	Thr	Pro
			20					25					30		

Asn	Cys	Ala	Leu	Gln	Ile	Val	Ala	Arg	Leu	Lys	Asn	Asn	Asn	Arg	Gln
		35					40				45				

Val	Cys	Ile	Asp	Pro	Lys	Leu	Lys	Trp	Ile	Gln	Glu	Tyr	Leu	Glu	Lys
	50					55				60					

Ala	Leu	Asn	Lys
65			

<210> 2

<211> 89

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met	Asn	Ala	Lys	Val	Val	Val	Val	Leu	Val	Leu	Val	Leu	Thr	Ala	Leu
1				5				10					15		

Cys	Leu	Ser	Asp	Gly	Lys	Pro	Val	Ser	Leu	Ser	Tyr	Arg	Cys	Pro	Cys
			20					25					30		

Arg Phe Phe Glu Ser His Val Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys
 35 40 45

Ile Leu Asn Thr Pro Asn Cys Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys
 50 55 60

Asn Asn Asn Arg Gln Val Cys Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln
 65 70 75 80

Glu Tyr Leu Glu Lys Ala Leu Asn Lys
 85

<210> 3

<211> 89

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 3

Met Asp Ala Lys Val Val Ala Val Leu Ala Leu Val Leu Ala Ala Leu
 1 5 10 15

Cys Ile Ser Asp Gly Lys Pro Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys
 20 25 30

Arg Phe Phe Glu Ser His Val Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys
 35 40 45

Ile Leu Asn Thr Pro Asn Cys Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys
 50 55 60

Ser Asn Asn Arg Gln Val Cys Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln
 65 70 75 80

Glu Tyr Leu Asp Lys Ala Leu Asn Lys
 85

<210> 4

<211> 1940

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 4

gccgcacttt cactctccgt cagccgcatt gcccgctcgg cgtccggccc cgcacccgcg	60
ctcgtccgcc cgcccccccg cccgcccgcg ccatgaacgc caaggctcgtg gtcgtgctgg	120
tcctcgtgct gaccgcgctc tgccctcagcg acgggaagcc cgtcagcctg agctacagat	180
gcccattgccg attcttcgaa agccatgttg ccagagccaa cgtcaagcat ctcaaaattc	240
tcaacactcc aaactgtgcc cttcagattg tagcccggt gaagaacaac aacagacaag	300

tgtgcattga cccgaagcta aagtggattc aggagtacct ggagaaagct ttaaacaagt 360
 aagcacaaca gccaaaaagg actttccgct agaccactc gaggaaaact aaaaccttgt 420
 gagagatgaa agggcaaaga cgtgggggag ggggccttaa ccatgaggac caggtgtgtg 480
 tgtgggggtg gcacattgat ctgggatcgg gcctgagggt tgcacagcatt tagaccctgc 540
 atttatagca tacggtatga tattgcagct tatattcatc catgccctgt acctgtgcac 600
 gttggaactt ttattactgg ggtttttcta agaaagaaat tgtattatca acagcatttt 660
 caagcagtta gttccttcat gatcatcaca atcatcatca ttctcattct catttttttaa 720
 atcaacgagt acttcaagat ctgaatttgg ctgttttggg gcacatcctc tgcctccctg 780
 gggagtcctg gcacagtcag gtggtggcct aacagggagc tggaaaaagt gtcctttcct 840
 cagacactga ggctcccgca gcagcgcctc tccaagagg aaggcctctg tggcactcag 900
 ataccgactg gggctgggcg ccgccactgc ctacacctc tctttcaacc tcagtgattg 960
 gctctgtggg ctccatgtag aagccactat tactgggact gtgctcagag acccctctcc 1020
 cagctattcc tactctctcc ccgactccga gagcatgctt aatcttgctt ctgcttctca 1080
 tttctgtagc ctgatcagcg ccgcaccagc cgggaagagg gtgattgctg gggctcgtgc 1140
 cctgcacccc tctcctccca gggcctgccc cacagctcgg gccctctgtg agatccgtct 1200
 ttggcctcct ccagaatgga gctggccctc tctgggggat gtgtaatggg cccctgctt 1260
 acccgcaaaa gacaagtctt tacagaatca aatgcaattt taaatctgag agctcgtctt 1320
 gagtgactgg gttttgtgat tgcctctgaa gcctatgtat gccatggagg cactaacaaa 1380
 ctctgagggt tccgaaatca gaagcgaaaa aatcagtga taaaccatca tcttgccact 1440
 acccctcct gaagccacag cagggtttca ggttccaatc agaactgttg gcaagggtgac 1500
 atttccatgc ataatgcca tccacagaag gtctgggtgg tatttgtaac tttttgcaag 1560
 gcattttttt atatataatt ttgtgcacat ttttttttac gtttcttttag aaaacaaatg 1620
 tatttcaaaa tatatttata gtcgaacaat tcataatatt gaagtggagc catatgaatg 1680
 tcagtagttt atacttctct attatctcaa actactggca atttgtaaag aaatatatat 1740
 gatataataa tgtgattgca gcttttcaat gttagccaca gtgtattttt tcaattgtac 1800
 taaaattgta tcaaatgtga cattatatgc actagcaata aatgctaata tgtttcatgg 1860
 tataaacgtc ctactgtatg tgggaattta tttacctgaa ataaaattca ttagttgtta 1920
 gtgatggagc ttaaaaaaaaaa 1940

<210> 5

<211> 293

<212> ДНК

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 5

ccatggacgc caaggtcgtc gctgtgctgg ccttggtgct ggcgcgctc tgcacagtgc	60
acggtaagcc agtcagcctg agctacagat gcccctgcgc attctttgag agccatgtgc	120
ccagagccaa cgtcaaacat ctgaaaatcc tcaacactcc aaactgtgcc cttcagattg	180
ttgcaaggct gaaaagcaac aacagacaag tgtgcattga cccgaaatta aagtggatcc	240
aagagtacct ggacaaagcc ttaaacaagt aagcacaaca gcccaaagga ctt	293

<210> 6

<211> 3948

<212> ДНК

<213> Искусственные последовательности

<220>

<223> Описание искусственных последовательностей: Синтетические полинуклеотиды

<400> 6

agatctccta gggagtcctg tacataactt acggtaaattg gcccgcctgg ctgaccgccc	60
aacgaccccc gccattgac gtcaataatg acgtatgttc ccatagtaac gccaataggg	120
actttccatt gacgtcaatg ggtggagtat ttacggtaaa ctgccactt ggcagtacat	180
caagtgtatc atatgccaa g tacgccccct attgacgtca atgacggtaa atggccccgc	240
tggcattatg cccagtacat gaccttatgg gactttccta cttggcagta catctacgta	300
ttagtcatcg ctattaccat ggtgatggcg ttttggcagt acatcaatgg gcgtggatag	360
cggtttgact cacggggatt tccaagtctc caccocattg acgtcaatgg gagtttgttt	420
tggcaccaaa atcaacggga ctttccaaaa tgcgtaaca actccgcccc attgacgcaa	480
atgggcggtg ggcgtgtacg gtgggaggtc tatataagca gagctcgttt agtgaaccgt	540
cagatcgctt ggagacgcca tccacgctgt tttgacctcc atagaagaca ccgggaccga	600
tccagcctcc gcggccggga acggtgcatt ggaacgcgga ttccccgtgc caagagtgc	660
gtaagtaccg cctatagagt ctataggccc acccccttgg cttcttatgc atgctatact	720
gtttttggct tggggtctat acacccccgc ttctcatgt tataggatgat ggtatagctt	780
agcctatagg tgtgggttat tgaccattat tgaccactcc cctattgggtg acgatacttt	840
ccattactaa tccataacat ggctctttgc cacaactctc tttattggct atatgccaat	900
acactgtcct tcagagactg acacggactc tgtattttta caggatgggg tctcatttat	960
tatttcaaaa ttcacatata caacaccacc gtccccagt cccgcagttt ttattaaaca	1020
taacgtggga tctccacgcg aatctcgggt acgtgttccg gacatgggct cttctccggt	1080
agcggcggag cttctacatc cgagccctgc tcccatgcct ccagcgactc atggctcgctc	1140
ggcagctcct tgctcctaac agtggaggcc agacttaggc acagcacgat gccaccacc	1200
accagtgtgc cgcacaaggc cgtggcggta gggatatgtgt ctgaaaatga gctcggggag	1260

cgggccttgca	ccgctgacgc	atttgggaaga	cttaaggcag	cggcagaaga	agatgcaggc	1320
agctgagttg	ttgtgttctg	ataagagtca	gaggtaactc	ccgttgccgg	gctgttaacg	1380
gtggagggca	gtgtagtctg	agcagtactc	gttgcgtccg	cgcgcgccac	cagacataat	1440
agctgacaga	ctaacagact	gttcctttcc	atgggtcttt	tctgcagtca	ccgtccttgc	1500
catcggtgac	cactagtggc	tcgcatctct	ccttcacgcg	cccgccgccc	tacctgaggc	1560
cgccatccac	gccggttgag	tcgcgttctg	ccgcctcccg	cctgtggtgc	ctcctgaact	1620
gcgtccgccg	tctaggtaag	tttaaagctc	aggtegagac	cgggcctttg	tccggcgctc	1680
ccttgaggcc	tacctagact	cagccggctc	tccacgcttt	gcctgaccct	gcttgetcaa	1740
ctctacgtct	ttgtttcggt	ttctgttctg	cgcggttaca	gatcgggtacc	aagcttgcca	1800
ccaccatgaa	cgccaaggct	gtggtcgtgc	tggtcctcgt	gctgaccgcg	ctctgcctca	1860
gcgacgggaa	gcccgtcagc	ctgagctaca	gatgcccatg	ccgattcttc	gaaagccatg	1920
ttgccagagc	caacgtcaag	catctcaaaa	ttctcaacac	cccaaactgt	gcccttcaga	1980
ttgtagcccg	gctgaagaac	aacaacagac	aagtgtgcat	tgacccgaag	ctaaagtgga	2040
ttcaggagta	cctggagaaa	gccttaaaca	agtaatctag	agggccctat	tctatagtgt	2100
cacctaaatg	ctagagctcg	ctgatcagcc	tcgactgtgc	cttctagtgt	ccagccatct	2160
gttgttttgc	cctcccccg	gccttccttg	accctggaag	gtgccactcc	cactgtcctt	2220
tcctaataaa	atgaggaaat	tgcctcgcat	tgtctgagta	ggtgtcattc	tattctgggg	2280
ggtgggggtg	ggcaggacag	caagggggag	gattgggaag	acaatagcag	gcatgctggg	2340
gatgcgggtg	gctctatggc	ttctgaggcg	gaaagaacca	gggccgcggg	ggccatcatg	2400
acaaaaatcc	cttaacgtga	gttttcgttc	cactgagcgt	cagaccccg	agaaaagatc	2460
aaaggatctt	cttgagatcc	ttttttctct	cgcgtaatct	gctgcttgca	aacaaaaaaaa	2520
ccaccgctac	cagcgggtgg	ttgtttgccg	gatcaagagc	taccaactct	ttttccgaag	2580
gtaactggct	tcagcagagc	gcagatacca	aatactgttc	ttctagtgtg	gccgtagtta	2640
ggccaccact	tcaagaactc	tgtagcaccg	cctacatacc	tcgctctgct	aatcctgtta	2700
ccagtggctg	ctgccagtgg	cgataagtcg	tgtcttaccg	ggttggactc	aagacgatag	2760
ttaccggata	aggcgcagcg	gtcgggctga	acgggggggt	cgtgcacaca	gccagcttg	2820
gagcgaacga	cctacaccga	actgagatac	ctacagcgtg	agctatgaga	aagcgccacg	2880
cttcccgaag	ggagaaaggc	ggacagggtat	ccggtaaagc	gcagggtcgg	aacaggagag	2940
cgcacgaggg	agcttccagg	gggaaacgcc	tggtatcttt	atagtccctgt	cgggtttcgc	3000
cacctctgac	ttgagcgtcg	atTTTTgtga	tgtctgtcag	gggggcggag	cctatggaaa	3060
aacgccagca	acgcggcctt	tttacgggtc	ctggcctttt	gctggccttt	tgtcacatg	3120
aattcagaag	aactcgtcaa	gaaggcgata	gaaggcgatg	cgtctcggaat	cgggagcggc	3180

gataccgtaa agcacgagga agcgggtcagc ccattcgccg ccaagctctt cagcaatata	3240
acgggtagcc aacgctatgt cctgatagcg gtccgccaca cccagccggc cacagtcgat	3300
gaatccagaa aagcggccat tttccaccat gatattcggc aagcaggcat cgccatgggt	3360
cacgacgaga tctctgccgt cgggcatgct cgccttgagc ctggcgaaca gttcggctgg	3420
cgcgagcccc tgatgctctt cgtccagatc atcctgatcg acaagaccgg cttccatccg	3480
agtacgtgct cgctcgatgc gatgtttcgc ttgggtggctg aatgggcagg tagccggatc	3540
aagcgtatgc agccgccgca ttgcatcagc catgatggat actttctcgg caggagcaag	3600
gtgagatgac aggagatcct gccccggcac ttgcgccaat agcagccagt cccttcccg	3660
ttcagtgaca acgtcgagca cagctgcgca aggaacgccc gtcgtggcca gccacgatag	3720
ccgcgctgcc tcgtcttgca gttcattcag ggcaccggac aggtcgggtc tgacaaaaag	3780
aaccggggcg ccctgcgctg acagccggaa cacggcggca tcagagcagc cgattgtctg	3840
ttgtgcccag tcatagccga atagcctctc caccgaagcg gccggagaac ctgcgtgcaa	3900
tccatcttgt tcaatcatgc gaaacgatcc tcatcctgtc tcttgatc	3948

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ ингибирования и/или снижения образования рубцовой ткани в ране кожи, включающий повышение концентрации SDF-1 в ране или вблизи раны путем введения в указанную рану и/или область, примыкающую к ране, терапевтически эффективного количества вектора, экспрессирующего SDF-1, где вектор является плазмидой, имеющей последовательность SEQ ID NO:6.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что данная рана кожи является острой раной, выбранной из следующих: термический ожог, химический ожог, радиационный ожог, ожог, вызванный избыточным воздействием ультрафиолетового излучения, повреждение, полученное во время медицинской процедуры, разрез, повреждение, вызванное травмой, порез или разрыв.

3. Способ по п.1, в котором рана кожи является хронической раной, выбранной из следующих: язвы от сдавливания, пролежни, раны, связанные с диабетом или плохим кровообращением, или раны, возникшие в результате дерматита или акне.

4. Способ по любому из предыдущих пунктов формулы изобретения, в котором указанный вектор, экспрессирующий SDF-1, вводят в форме фармацевтической композиции, содержащей вектор экспрессии SDF-1 и фармацевтически приемлемый носитель.

5. Способ по п.4, в котором указанная фармацевтическая композиция является инъекционным составом.

6. Способ по п.5, в котором указанный инъекционный состав вводят инъекцией непосредственно в рану или в область, прилегающую к ране.

7. Способ по любому из пп.1-4, в котором указанный вектор, экспрессирующий SDF-1, наносят в виде состава для наружного применения.

8. Способ по любому из пп.1-4, в котором указанный вектор, экспрессирующий SDF-1, наносят на подложке, твердом носителе или раневой повязке.

9. Способ по п.8, в котором подложка является биорассасывающимся имплантатом.

10. Способ по п.8, в котором указанный вектор, экспрессирующий SDF-1, наносят на или в раневой повязке.

11. Способ по любому из пп.1-4, в котором указанный вектор, экспрессирующий SDF-1, наносят на поверхность раны.

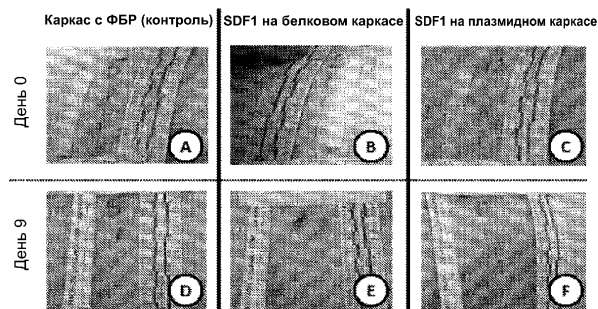
12. Способ по любому из пп.1-4, в котором указанный вектор, экспрессирующий SDF-1, вводят как часть хирургической процедуры.

13. Способ по любому из пп.1-4, в котором указанный вектор, экспрессирующий SDF-1, вводят в течение 24 ч после возникновения раны.

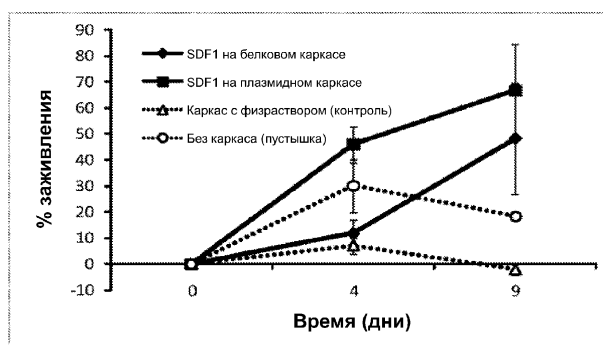
14. Способ по любому из пп.1-4, в котором указанный вектор, экспрессирующий SDF-1, вводят че-

рез более чем 24 ч после возникновения раны.

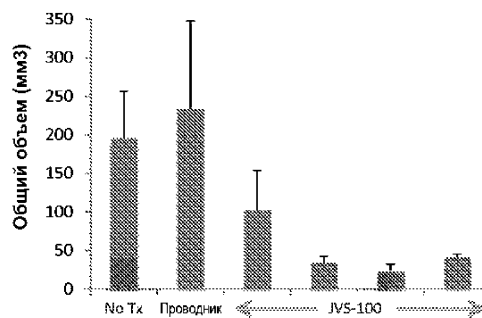
15. Способ по любому из предыдущих пунктов формулы изобретения, в котором рану закрывают при проведении медицинской процедуры.



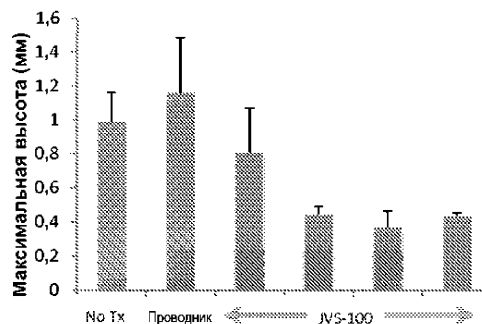
Фиг. 1



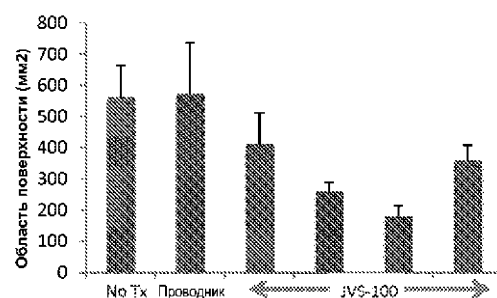
Фиг. 2



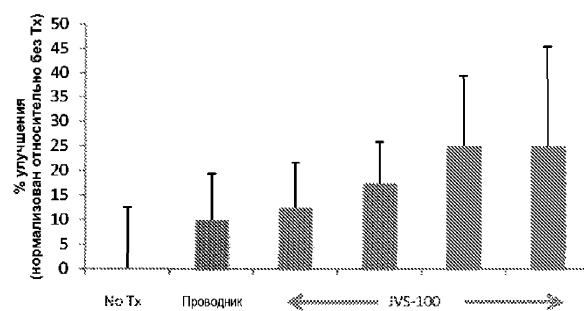
Фиг. 3А



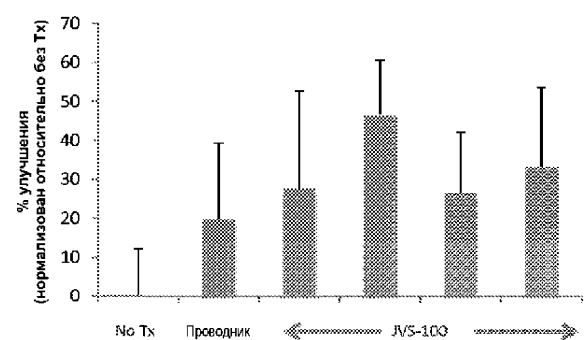
Фиг. 3В



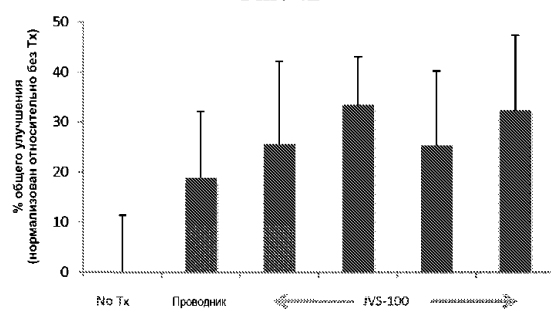
Фиг. 3С



Фиг. 4А

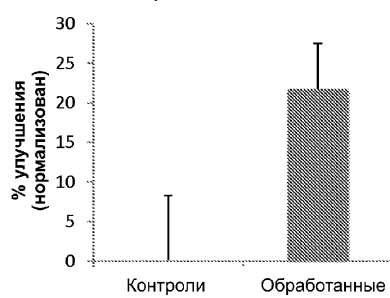


Фиг. 4В



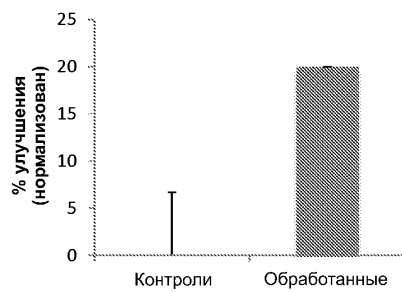
Фиг. 4С

Оценка по MSS



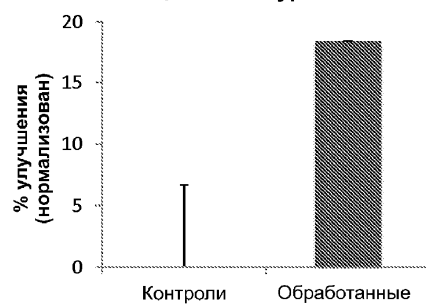
Фиг. 5А

Оценка текстуры

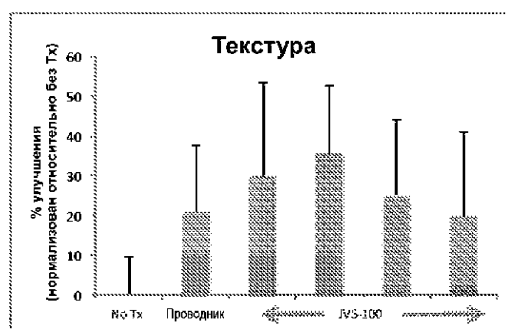


Фиг. 5В

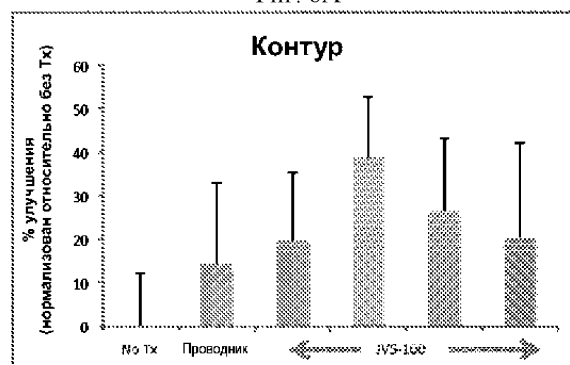
Оценка контура



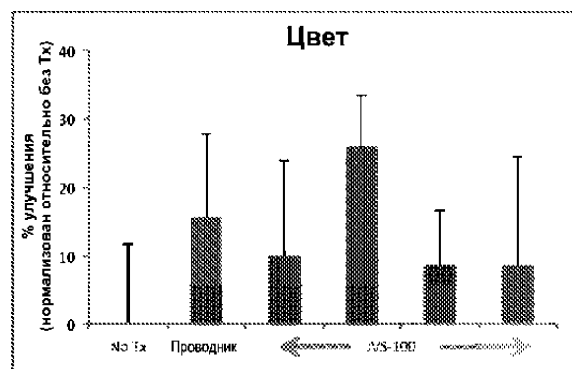
Фиг. 5С



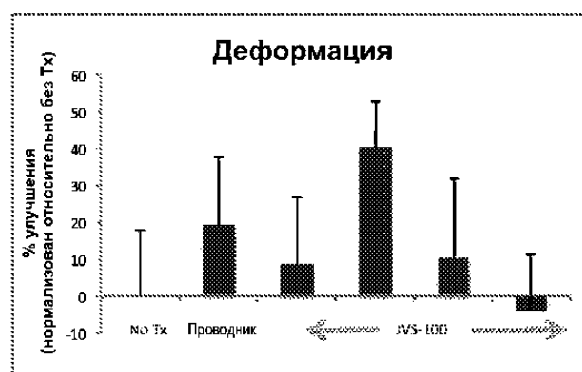
Фиг. 6А



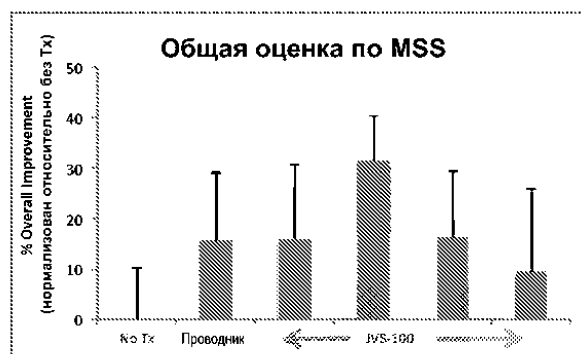
Фиг. 6В



Фиг. 6C



Фиг. 6D



Фиг. 6E



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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