

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ М.В.  
ЛОМОНОСОВА  
ФАКУЛЬТЕТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ

На правах рукописи

**СЛОБОДКИНА ЕКАТЕРИНА АЛЕКСАНДРОВНА**

**СОЗДАНИЕ И ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ БИЦИСТРОННОЙ  
ПЛАЗМИДНОЙ ГЕНОТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ КОНСТРУКЦИИ ДЛЯ  
СТИМУЛЯЦИИ АНГИОГЕНЕЗА**

3.3.6 – Фармакология, клиническая фармакология

1.5.4 – Биохимия

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научные руководители:  
доктор фармацевтических наук, доцент  
Балабаньян Вадим Юрьевич  
кандидат медицинских наук  
Макаревич Павел Игоревич

Москва 2021

## Оглавление

<b>ВВЕДЕНИЕ .....</b>	<b>5</b>
Актуальность темы .....	5
Степень разработанности.....	7
Цель исследования.....	8
Задачи исследования: .....	8
Научная новизна .....	8
Теоретическая и практическая значимость работы .....	9
Методология и методы исследования .....	9
Основные положения, выносимые на защиту .....	10
Публикации .....	10
Апробация диссертации .....	10
Личный вклад автора.....	11
Объем и структура диссертации.....	11
<b>Глава 1. Обзор литературы.....</b>	<b>12</b>
<b>1.1 Генная терапия .....</b>	<b>12</b>
1.1.1 Введение.....	12
1.1.2 Методология и принципы генной терапии .....	13
<b>1.2 Векторы для генной терапии .....</b>	<b>14</b>
1.2.1 Векторы на основе вирусов.....	16
1.2.2 Невирусные системы доставки генетической информации .....	17
1.2.3 Проблемы невирусной ГТ с использованием пДНК.....	18
1.2.4 Способы введения векторов и методы трансфекции <i>in vivo</i> .....	21
<b>1.3 Подходы к фармакологическому изучению плазмидных генотерапевтических препаратов.....</b>	<b>22</b>
1.3.1 Особенности доклинических исследований препаратов для ГТ.....	22
1.3.2 Фармакокинетика/фармакодинамика (ПК/ПД).....	23
1.3.3 Биораспределение и выделение .....	26
<b>1.4 Генотерапевтические препараты .....</b>	<b>27</b>
1.4.1 История и современное состояние.....	27
1.4.2 Развитие направления: комбинированная генная терапия.....	31
<b>1.5 Терапевтический ангиогенез.....</b>	<b>32</b>
1.5.1 Механизмы роста сосудов .....	32
1.5.2 Терапевтический ангиогенез: история и развитие направления .....	34
1.5.3 Комбинированная ГТ для стимуляции ангиогенеза .....	38
1.5.4 Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) и механизм его действия .....	39
1.5.5 Фактор роста гепатоцитов (HGF) и механизм его действия .....	39
1.5.6 Комбинирование VEGF165 и HGF для стимуляции ангиогенеза.....	40
<b>1.6 Бицистронные плазмидные векторы .....</b>	<b>43</b>
<b>1.7 Релевантные фармакологические модели для оценки ангиогенеза.....</b>	<b>46</b>
1.7.1 Модель ишемии задней конечности .....	46
1.7.2 Модель инфаркта миокарда .....	48
1.7.3 Модель заживления кожной раны .....	50

1.7.4 Модель кислород-индуцированной ретинопатии .....	51
<b>1.8 Заключение .....</b>	<b>51</b>
<b>Глава 2. Материалы и методы .....</b>	<b>54</b>
<b>2.1 Молекулярные и биохимические методы .....</b>	<b>54</b>
2.1.1 Конструирование бицистронных плазмид, кодирующих гены АФР человека.....	54
2.1.2 Рестрикция плазмид с помощью специфических эндонуклеаз.....	54
2.1.3 Электрофорез ДНК .....	54
2.1.4 Трансформация <i>E. coli</i> и бактериальная культура .....	55
2.1.5 Выделение пДНК из бактериальных культур.....	55
<b>2.2 Методы оценки биологической активности бицистронных плазмидных конструкций <i>in vitro</i> .....</b>	<b>56</b>
2.2.1 Культивирование НЕК293Т и клеток эндотелия человека.....	56
2.2.2 Трансфекция НЕК293Т кальций-фосфатным методом .....	56
2.2.3 Модель ангиогенеза <i>in vitro</i> .....	57
2.2.4 Модель ангиогенеза <i>in vitro</i> с оценкой выживаемости клеток .....	57
2.2.5 Модель ангиогенеза <i>in vitro</i> с оценкой апоптоза.....	58
<b>2.3 Экспериментальные модели .....</b>	<b>59</b>
2.3.1 Экспериментальные животные.....	59
2.3.2 Инъекция пДНК в скелетные мышцы .....	59
2.3.3 Модель эксплантной культуры скелетной мышцы.....	60
2.3.4 Модель ишемии задней конечности мыши .....	60
2.3.5 Лазерная доплерография .....	61
<b>2.4 Гистологические методы .....</b>	<b>61</b>
2.4.1 Иммунофлуоресцентная визуализация и подсчет сосудов .....	61
2.4.2 Окраска гематоксилином и эозином и морфометрический анализ площади некроза .....	62
<b>2.5 Статистическая обработка данных .....</b>	<b>63</b>
<b>Глава 3. Результаты.....</b>	<b>64</b>
<b>3.1 Создание и оценка экспрессионной активности бицистронных плазмидных векторов, содержащих IRES, разделяющую гены HGF и VEGF165.....</b>	<b>64</b>
3.1.1 Создание бицистронного вектора, содержащего IRES для одновременной экспрессии АФР .....	64
3.1.2 Сравнительная оценка продукции HGF и VEGF165 трансфицированными клетками НЕК293Т .....	66
3.1.3 Оценка на культуре клеток HUVEC ангиогенной активности HGF и VEGF165, секретируемых после трансфекции клеток НЕК293Т плазмидами «EMCV» и «Vip».....	68
3.1.4 Продукция человеческих HGF и VEGF165 в эксплантной культуре скелетной мышцы мыши после введения IRES-содержащих плазмид с генами АФР.....	70
<b>3.2 Создание бицистронных векторов с двунаправленным промотором и независимыми промоторами для одновременной экспрессии HGF и VEGF165 и оценка продукции АФР трансфицированными клетками НЕК293Т .....</b>	<b>70</b>
3.2.1 Создание бицистронных векторов с двунаправленным промотором или независимыми промоторами для одновременной экспрессии HGF и VEGF165 .....	70
3.2.2 <i>In vitro</i> оценка эффективности плазмидных векторов с двунаправленным промотором CMV или с двумя независимыми промоторами CMV и CAG с генами HGF и VEGF165 .....	72
3.2.3 Оценка на культуре HUVEC ангиогенной активности HGF и VEGF165, секретируемых после трансфекции клеток НЕК293Т плазмидами «rHGF/VEGF» и «bi-HGF/VEGF».....	73
3.2.4 Исследование продукции целевых белков HGF и VEGF165 в эксплантной культуре скелетных мышц мыши .....	75
3.2.5 Оценка продолжительности продукции факторов роста после однократного введения плазмиды rHGF/VEGF в скелетную мускулатуру мыши .....	76
<b>3.3 Сравнительная оценка продукции HGF и VEGF165 различными вариантами плазмид.....</b>	<b>77</b>
<b>3.4 Оценка ангиогенной эффективности бицистронной плазмиды rHGF/VEGF с генами VEGF165 и HGF на мышинной модели ишемии задней конечности.....</b>	<b>78</b>
3.4.1 Обоснование выбора модели для изучения фармакологической активности .....	78

3.4.2 Восстановление кровотока в ишемизированной конечности мыши после однократной инъекции rHGF/VEGF.....	80
3.4.3 Гистологический анализ распространённости некроза ишемизированных скелетных мышц .....	82
3.4.4 Оценка васкуляризации ишемизированных скелетных мышц после введения rHGF/VEGF .....	84
<b>3.5 Оценка активности каспаз-3 и 7 и выживаемости эндотелиальных клеток.....</b>	<b>85</b>
<b>Глава 4. Обсуждение .....</b>	<b>88</b>
<b>Заключение .....</b>	<b>106</b>
<b>Выводы.....</b>	<b>109</b>
<b>Список сокращений и обозначений.....</b>	<b>111</b>
<b>Список литературы.....</b>	<b>114</b>
<b>Приложения .....</b>	<b>133</b>

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы

Одним из перспективных направлений развития современной фармакологии является создание лекарственных препаратов для генной терапии (ГТ). Методы ГТ позволяют лечить как моногенные наследственные заболевания (гемофилию, недостаточность аденозиндезаминазы (ADA) [191], мышечную дистрофию [46], муковисцидоз [64], синдром тяжелого комбинированного иммунодефицита (SCID) [146] и др.), так и болезни с мультифакторным патогенезом (сердечно-сосудистые [51], нейродегенеративные [187]), а также используется для стимуляции регенерации (заживления ран [41]).

Согласно Федеральному закону РФ №61-ФЗ “Об обращении лекарственных средств” генотерапевтические лекарственные препараты – это лекарственные препараты, фармацевтическая субстанция которых является рекомбинантной нуклеиновой кислотой или включает в себя рекомбинантную нуклеиновую кислоту, позволяющую осуществлять регулирование, репарацию, замену, добавление или удаление генетической последовательности. К настоящему времени в мире зарегистрировано порядка десяти генотерапевтических лекарственных средств, активно проводятся доклинические и клинические исследования новых лекарственных препаратов, ведется поиск новых подходов к повышению эффективности ГТ.

Несмотря на наличие различных медикаментозных и хирургических методов лечения заболеваний, вызванных нарушением кровообращения (например, хронической и острой ишемии нижних конечностей, диабетической нейропатии и ишемической болезни сердца) остается нерешенной медицинской проблемой. В настоящее время отсутствуют эффективные способы стимуляции роста сосудов (ангиогенеза) в тканях. Вместе с тем эта проблема может быть решена с применением методов ГТ, позволяющих создавать терапевтически значимые концентрации ангиогенных факторов роста (АФР) локально в очаге ишемии, что

является принципиально новым подходом к фармакологической коррекции патологий, вызванных недостаточностью кровоснабжения. С середины 90-х годов активное развитие получил *терапевтический ангиогенез* - область медицины, основанная на лечении ишемических заболеваний путем стимуляции роста кровеносных сосудов с целью восстановления кровоснабжения ткани или органа) с применением плазмидной ДНК (пДНК), кодирующей гены АФР (Gupta et al. 2009). В клинических исследованиях у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями (ССЗ) большинство лекарственных средств для ГТ, кодирующих фактор роста эндотелия сосудов (VEGF165), фактор роста гепатоцитов (HGF) или основной фактор роста фибробластов (bFGF), продемонстрировали хорошие профили безопасности при ограниченной эффективности [91] [168] [144] [69].

В определенной степени это обусловлено тем, что ангиогенез регулируется различными цитокинами, протеазами и факторами роста, в виду чего доставка одиночного фактора в виде рекомбинантного белка или гена не вызывает длительных терапевтически значимых эффектов. Учитывая вышеизложенное, для повышения эффективности терапевтического ангиогенеза целесообразно использовать физиологически обоснованные и потенциально аддитивные комбинации АФР. Примером такой комбинации может служить сочетание VEGF165 и HGF [74]. Показано, что введение смеси плазмид с генами VEGF165 и HGF более эффективно стимулирует ангиогенез по сравнению с использованием плазмид с каждым из данных генов по отдельности [122] [123].

Существенными недостатками введения смеси векторов является стохастическая вероятность ко-трансфекции клеток двумя плазмидами, невозможность предсказания эффективности трансфекции и конечных концентраций целевых белков. Кроме того, сложная стехиометрия и различия в экспрессии могут привести к потере аддитивности эффектов, ожидаемой при комбинированном применении терапевтических генов. Для осуществления одновременной доставки нескольких генов в составе одной генетической конструкции предложены би- и мультицистронные векторы различного строения. Под понятием «бицистронный вектор» подразумевается генетическая

конструкция, включающая два цистрона, т.е. участка ДНК, ответственных за синтез целевого белка. В мире активно проводятся доклинические и клинические исследования таких генотерапевтических препаратов для коррекции различных патологических состояний [9], [80]), однако на данный момент зарегистрированных лекарственных препаратов на основе бицистронных векторов для терапии ишемических заболеваний на фармацевтическом рынке нет.

### **Степень разработанности**

Из зарегистрированных генотерапевтических препаратов для стимуляции ангиогенеза можно отметить разрешенный к применению в России в 2011 году «Неоваскулген» (ПАО «Институт стволовых клеток человека», Россия), представляющий собой плазмиду, кодирующую VEGF165, и «Collatogene» (AnGes, Ink., Япония) – плазмиду с геном HGF, которая получила условное разрешение в Японии. Проводятся клинические исследования препарата «Корвиан» - оригинальной разработки НМИЦ Кардиологии (Россия), представляющей собой пДНК, кодирующую VEGF165, а также препарата «Юпикор» (НМИЦ Кардиологии, Россия) – препарата с геном урокиназного активатора плазминогена (uPa).

Среди генотерапевтических препаратов, кодирующих два белка в составе одной конструкции, следует отметить VM202 (Engensis, ViroMed, Южная Корея, США) – пДНК, несущую гены двух изоформ HGF – HGF728 и HGF723. Препарат прошёл КИ третьей фазы у пациентов с диабетической периферической нейропатией [102]. Также завершены пилотные исследования генотерапевтического препарата, представляющего собой пДНК с генами VEGF165 и HGF, разделенными сайтом внутренней посадки рибосом (IRES) - pIRES/VEGF165/HGF (Вроцлавский медицинский университет, Польша), показавшие безопасность и эффективность у пациентов с ишемией нижних конечностей, как осложненной [11], так и не осложненной сахарным диабетом второго типа [10].

## **Цель исследования**

Разработка и изучение фармакологической активности бицистронной плазмидной генотерапевтической конструкции, экспрессирующей факторы роста HGF и VEGF165 для стимуляции ангиогенеза.

## **Задачи исследования:**

- 1) Разработать бицистронные плазмидные конструкции с генами фактора роста гепатоцитов (HGF) и фактора роста эндотелия сосудов (VEGF165) человека для стимуляции ангиогенеза.
- 2) Определить экспрессионную активность созданных бицистронных плазмидных конструкций *in vitro*.
- 3) На модели ангиогенеза *in vitro* исследовать биологическую активность экспрессированных факторов роста HGF и VEGF165.
- 4) В эксперименте *ex vivo* оценить продукцию целевых белков HGF и VEGF165.
- 5) Исследовать фармакологическую активность бицистронной плазмидной генотерапевтической конструкции рHGF/VEGF на модели ишемии задней конечности у мышей.
- 6) Оценить вклад плеiotропных эффектов HGF и VEGF165 в стимуляцию ангиогенеза.

## **Научная новизна**

Созданы оригинальные бицистронные плазмидные конструкции, кодирующие одновременно гены HGF и VEGF165.

Показана способность бицистронной плазмидной конструкции с генами HGF и VEGF165 (рHGF/VEGF) стимулировать ангиогенез в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. На модели ишемии задней конечности у мышей продемонстрирована способность бицистронной плазмидной конструкции восстанавливать перфузию, уменьшать площадь некроза и стимулировать васкуляризацию ишемизированной ткани. Предложены механизмы стимуляции ангиогенеза при введении рHGF/VEGF в ишемизированную ткань.

Новизна проведенных исследований подтверждена получением патента на изобретение Патент РФ №2737481 С1, 01.12.2020, Бюл. №34; дата подачи заявки: 06.11.2019.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Показана принципиальная возможность создания нового класса генотерапевтических препаратов для стимуляции ангиогенеза на основе бицистронных плазмидных векторов, механизм действия которых обусловлен локальной экспрессией АФР (HGF и VEGF165).

Показано, что именно бицистронная конструкция с двумя разными промоторами способствует значимой экспрессии генов HGF и VEGF165.

Установлено, что экспрессируемые факторы обладают ангиогенной активностью *in vitro* и *in vivo*.

Полученные результаты служат основой для дальнейшего углубленного доклинического исследования созданной генотерапевтической конструкции для стимуляции ангиогенеза. Полученные в диссертации результаты используются в работе научно-исследовательской компании «Генная и клеточная терапия».

### **Методология и методы исследования**

Методология основывается на теоретическом и экспериментальном обосновании гипотезы о способности созданной бицистронной плазмидной конструкции стимулировать ангиогенез в эксперименте. Выбор лекарственного «кандидата» был основан на скрининговом сравнительном исследовании экспрессионной активности созданных генотерапевтических конструкций с генами HGF и VEGF165 в релевантных моделях *in vitro* и *in vivo*.

В работе использовались молекулярно-биологические (виртуальный дизайн пДНК, их синтез, выделение и очистка), биохимические (выделение РНК, ПЦР, ИФА), цитологические (выделение и культивирование клеток, клеточные модели оценки специфической активности плазмидных векторов), иммуногистохимические, а также фармакологические (оценка биологической активности пДНК на модели ишемии задней конечности у мышей) и статистические методы.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

- 1) Бицистронные плазмидные конструкции различного строения с генами фактора роста гепатоцитов (HGF) и фактора роста эндотелия сосудов (VEGF165) для стимуляции ангиогенеза.
- 2) Биологическая активность и различия в эффективности экспрессии целевых белков HGF и VEGF165 определяется строением бицистронной плазмидной конструкции.
- 3) Бицистронная плазмидная конструкция рHGF/VEGF с двумя различными промоторами для генов HGF и VEGF165 способна восстанавливать перфузию, уменьшать площадь некроза и стимулировать васкуляризацию в ишемизированной ткани на модели ишемии задней конечности у мышей.

### **Публикации**

По материалам диссертации опубликовано 8 печатных работ, в том числе, 3 статьи в журналах, индексируемых международной библиографической и реферативной базой данных Scopus и/или Web of Science. По результатам исследования получен патент Российской Федерации на изобретение Патент РФ №2737481 С1, 01.12.2020, Бюл. №34 (дата подачи заявки: 06.11.2019), подана заявка PCT/RU2021/050002 (дата подачи заявки: 05.01.2021).

### **Апробация диссертации**

Основные результаты работы были представлены на Ежегодном конгрессе Европейского общества генной и клеточной терапии (ESGCT 2019), Барселона, Испания, 2019 г., Объединенном международном симпозиуме по прикладной сердечно-сосудистой биологии и сосудистой тканевой инженерии, Цюрих, Швейцария, 2019 г., III Национальном конгрессе по регенеративной медицине, Москва, 2017 г., а также на состоявшемся 26 февраля 2021 года совместном заседании кафедры биохимии и молекулярной медицины и научно-исследовательской лаборатории генных и клеточных технологий.

### **Личный вклад автора**

Автору диссертационного исследования принадлежит ключевая роль в постановке целей и формулировке задач, планировании и проведении экспериментов, статистической обработке данных, подготовке тезисов и публикаций по теме исследования.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, главы результатов собственных исследований, обсуждения, заключения, выводов, списка литературы. Работа изложена на 134 страницах компьютерного текста, содержит 3 таблицы и 13 рисунков. Список литературы включает 222 источника, из них 11 отечественных и 211 зарубежных.

## Глава 1. Обзор литературы

### 1.1 Генная терапия

#### 1.1.1 Введение

Под генной терапией (ГТ) понимают группу методов, направленных на модификацию последовательности генов или управление их экспрессией, а также на изменение биологических свойств клеток для их терапевтического или профилактического использования. Такое определение приводится Администрацией по продуктам питания и лекарствам (Food and Drug Administration – FDA) США [57], его можно считать консенсусным и соответствующим уровню развития ГТ в медицине и в научном плане. Согласно ФЗ-61 «Об обращении лекарственных средств»: генотерапевтические лекарственные препараты - лекарственные препараты, фармацевтическая субстанция которых является рекомбинантной нуклеиновой кислотой или включает в себя рекомбинантную нуклеиновую кислоту, позволяющую осуществлять регулирование, репарацию, замену, добавление или удаление генетической последовательности (Федеральный закон ‘Об обращении лекарственных средств’ от 12.04.2010 N 61-ФЗ в ред. от 03.07.2016 N 350-ФЗ, 2016).

Разработанные методы ГТ позволяют проводить следующие манипуляции в медицинских целях:

- вносить в клетки копии генов (как в геном, так и эписомально);
- инактивировать вызывающие заболевание гены;
- редактировать гены (методы CRISPR/Cas9, TALEN и ZFN);
- «перепрограммировать» клетки (клетки одного типа приобретают свойства клеток другого типа, чьи функции нарушены);
- элиминировать клетки путем введения «суицидальных» генов.

Генная терапия применяется для лечения различных групп заболеваний: как наследственных, так и приобретенных. При моногенных наследственных заболеваниях таких, как гемофилия, недостаточность аденозиндезаминазы (ADA) [191], мышечная дистрофия [46], муковисцидоз [64], синдром тяжелого комбинированного иммунодефицита (SCID) [146] и др. ГТ направлена на замену или коррекцию поврежденных генов в конкретных клетках. При лечении болезней с мультифакторным патогенезом (сердечно-сосудистых [51], нейродегенеративных [187]) или для стимуляции регенерации (заживления ран [41]) ГТ используется для создания локальной экспрессии терапевтических белков. В случае онкологических заболеваний используются технологии CAR-T или гены, непосредственно запускающие процессы гибели клеток (суицидные гены) или индуцирующие иммуноопосредованное разрушение клеток (гены иммуногенных антигенов или цитокинов) [189]. При аутоиммунных заболеваниях ГТ используется для подавления провоспалительного действия CD4<sup>+</sup> Т клеток иммунной системы в пораженных тканях [163].

### 1.1.2 Методология и принципы генной терапии

Методы ГТ можно разделить на две большие принципиально различающиеся группы: первая группа методов включает модификацию клеток *ex vivo*, а вторая – *in vivo*, т.е. непосредственно в организме пациента.

Генная терапия *ex vivo* предполагает получение клеток от пациента и их генетическую модификацию, за которой следует отбор и культивирование успешно модифицированных клеток, после чего они вводятся обратно пациенту (аутологичная терапия). Данный метод применяется, например, для лечения наследственных заболеваний (ADA-зависимый и ADA-независимый тяжелый комбинированный иммунодефицит, серповидноклеточная анемия, бета-талассемия): выделенные у пациента гемопоэтические клетки костного мозга подвергаются генетической модификации и трансплантируются обратно. ГТ *ex vivo* перекликается с клеточной терапией, и четкое их разделение невозможно (например, как в случае CAR-T терапии).

С правовой точки зрения в РФ относительно *ex vivo* ГТ и клеточной терапии существует некоторая двойственность: согласно Федеральному закону N180-ФЗ “О биомедицинских клеточных продуктах”, продукты, содержащие культивированные клетки, относятся к уникальному классу лекарственных препаратов - биомедицинским клеточным продуктам (БМКП), и их обращение регулируется данным ФЗ. В отношении возможности получения модифицированных БМКП в п.1 ст. 4 Федерального закона N180-ФЗ указано, что приготовление клеточной линии для производства БМКП может включать “культивирование и модификацию вне организма человека”, что не исключает генетических модификаций с помощью методов редактирования генома. При этом разъяснений о разрешенных физических, химических или иных методах модификации клеток в принятых нормативных правовых актах не имеется. Правила производства препаратов для ГТ установлены приказом Минпромторга №916 от 14.06.2013 “Об утверждении правил надлежащей производственной практики”. В Приложении №2 к данному приказу (“Специальное руководство по отдельным типам продукции”) перечислены требования для производства “Лекарственных препаратов генной терапии (Класс В9)”, в помимо препаратов для прямой ГТ на основе плазмид или вирусов среди прочих названы “лекарственные препараты генной терапии, содержащие генетически модифицированные клетки”.

Методы ГТ *in vivo* заключаются в доставке «терапевтических» генов непосредственно в клетки тканей пациента для создания локальной продукции целевых белков. Потенциально данная технология позволяет лечить большее количество патологий по сравнению с *ex vivo* ГТ, однако пока этот метод отработан в меньшей степени. Методы ГТ *in vivo* успешно применяются при лечении заболеваний органов зрения, нервно-мышечных расстройств, гемофилии и служат инструментом для терапевтического ангиогенеза.

## **1.2 Векторы для генной терапии**

Критическим для всех методов ГТ является этап доставки необходимой генетической информации в клетки, которая осуществляется с помощью

специальных генетических конструкций – векторов. Выбора вектора для ГТ во многом определяет её исход и является важнейшим этапом в разработке генотерапевтического препарата.

Ключевыми характеристиками вектора являются: эффективность доставки генетической информации в клетки и ткани, обычно определяемая как % клеток, подвергшихся успешной модификации в культуре или в объеме ткани-мишени, а также адресная доставка и высокая эффективность трансфекции/трансдукции клеток-мишеней, высокая пакующая способность, позволяющая переносить большие гены (вставки от 1000 до 1 млн. п.о.), обеспечение длительной и/или регулируемой экспрессии трансгена, адресная доставка, а также показатели безопасности - отсутствие токсичности, онкогенности или иных нежелательных эффектов (в т.ч. иммунотоксичности).

С помощью генотерапевтического вектора в клетки доставляется экспрессионная кассета, которая, как правило, включает следующие элементы: промотор, кодирующую часть вводимого трансгена (терапевтическую последовательность ДНК) и сигнал полиаденилирования. Такая конструкция доставляет генетическую информацию в ткани-мишени, а для ее считывания используется экспрессионный аппарат клеток самого пациента.

Существуют две основные категории векторов для доставки генетической информации: вирусные и невирусные, обобщенная характеристика которых представлена в Таблице 1.

Таблица 1. Типы векторов для доставки генов и их краткая характеристика

Тип вектора	Семейство, род	Пример	Характеристика вектора						
			Ограничение размера упаковки генома	Хромосомная интеграция	Экспрессия трансгена	Локализация вектора	Тип трансфицируемых клеток	Эффективность трансфекции	Экспрессия вирусных белков
Вирусный	Retroviridae	Вирус лейкемии мышей Молони	8 kb	да	постоянная	ядро	Только делящиеся	Высокая	нет
		ВИЧ	8 kb	да	постоянная	ядро	Делящиеся и покоящиеся	Высокая	нет
	Adenoviridae	Аденовирус	4,3–34 kb	нет, эписомный	Постоянная или временная	ядро	Делящиеся и покоящиеся	Высокая	есть, если вирусные гены не удалены
	Parvoviridae	Аденоассоциированный вирус (AAV)	4–5 kb	Интегрируемый или эписомный	постоянная	ядро	Делящиеся и покоящиеся	Высокая	нет
	Herpes viridae	Вирус простого герпеса	40–150 kb	Интегрируемый или эписомный	Постоянная или временная	ядро	Делящиеся и покоящиеся	Высокая	есть
	Togaviridae	Вирус лихорадки	5 kb	нет	временная	цитоплазма	Делящиеся и покоящиеся	Высокая	есть
	Poxviridae	Поксвирус	25–50 kb	нет	временная	цитоплазма	Делящиеся и покоящиеся	Высокая	есть
Невирусный		Плазмиды	12 kb	Да, но с низкой частотой	Постоянная или временная	ядро	Делящиеся и покоящиеся	Низкая	нет

### 1.2.1 Векторы на основе вирусов

Вирусные векторы для ГТ представляют собой модифицированные вирионы, лишенные патогенности, но сохранившие способность инфицировать клетки. Как правило, они состоят из капсида, несущего измененный геном вируса, с минимальным количеством генетического материала от вируса дикого типа. Главным преимуществом большинства вирусных систем доставки является высокая эффективность трансдукции клеток-мишеней и длительная экспрессия белка. Длительность экспрессии трансгена, и, следовательно, эффективность и безопасность вектора определяются природой и составом вирусного генома, в то время как определенный тканевой тропизм и минимизация иммуногенности могут достигаться путём направленного мутагенеза генов, кодирующих белки капсида.

Среди вирусных векторов чаще всего используются системы на основе ретровирусов (в частности, лентивируса), аденовирусов и аденоассоциированных вирусов, а также вируса простого герпеса. Около 75% клинических исследований (КИ) в области генной терапии проводится с использованием ретровирусных векторов, в основном, благодаря тому, что молекулярная биология этих вирусов

хорошо изучена, а их использование позволяет достигать высокой эффективности трансфекции и длительной экспрессии генов. Первым примером успешного использования ретровирусной системы доставки, стало сообщение французских ученых об излечении тяжелого комбинированного иммунодефицита у детей [29]. Основными недостатками ретровирусных векторов является то, что они инфицируют только активно делящиеся клетки, а внедряемая ДНК встраивается в геном трансдуцированных клеток случайным образом. Это приводит к развитию серьезных нежелательных эффектов, например, у значительного числа участников данного и последующих КИ наблюдалось развитие неконтролируемой лимфопрлиферации - состояния, сходного с лейкемией [83] [81]. Другим часто используемым вариантом вирусного вектора является аденовирусная система. Аденовирусы стабильны, их сравнительно легко использовать на производстве, они способны доставлять генетический материал не только в делящиеся, но и в неделящиеся клетки и обеспечивают высокую экспрессию генов. Однако аденовирусные векторы оказались высоко иммуногенными для человека, они недостаточно специфичны по отношению к клеткам различных тканей, а экспрессия генов, доставленных такими векторами, весьма непостоянна.

Несмотря на высокую эффективность, вирусные системы доставки имеют ряд существенных недостатков, ограничивающих их применение: высокую иммуногенность [18], потенциальную канцерогенность [12], тропизм к широкому спектру клеток [190], ограниченный размер упаковки ДНК [182], а также сложность и дороговизну производства [23].

### *1.2.2 Невирусные системы доставки генетической информации*

Недостатки вирусных систем доставки служат стимулом для поиска альтернативных невирусных векторов. Данная группа векторов довольно разнородна и включает: плазмиды (небольшие, обычно кольцевые суперскрученные молекулы ДНК), ДНК-вакцины, синтетические олигонуклеотиды (smallDNA), векторы на основе РНК (рибозимы, siRNA, мРНК) и CRISPR/Cas9 – системы. Перечисленные векторы используются как в незащищенном виде («голая» ДНК), так и в составе липосом, различных полимерных и пептидных

конструкций (CPPs), неорганических наночастиц (золотые и кремниевые наночастицы, углеродные нанотрубки и квантовые точки). Число КИ невирусных систем доставки заметно увеличилось в последнее десятилетие, в то время как вирусные векторы используют все реже и реже [155]. Одним из наиболее широко используемых вариантов, являются плазмиды. Плазмидная ДНК (пДНК) не вызывает характерных для вирусных векторов побочных эффектов и практически не обладает иммуногенностью [158] [135], что позволяет использовать её с многократным введением. Кроме того, пДНК не встраивается в хромосомы «клеток-хозяев» и, таким образом, не нарушает работу основных генов и не стимулирует активацию онкогенов. Невирусные векторы могут переносить более длинные последовательности (от 5 до 150 kb) и, обычно их проще синтезировать и получать в промышленном масштабе [130] [148].

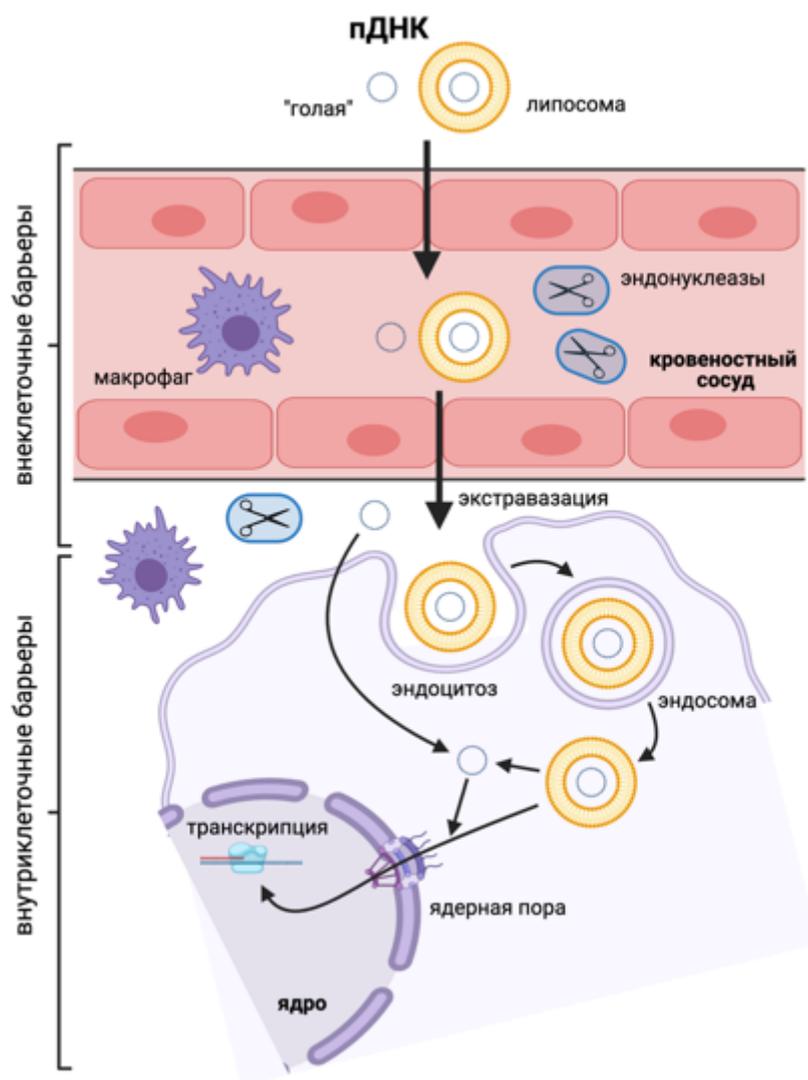
Однако эффективность доставки с помощью невирусных векторов значительно уступает большинству вирусных систем. Совершенствование и разработка новых невирусных конструкций направлены на повышение эффективности трансфекции с сохранением профиля безопасности.

### *1.2.3 Проблемы невирусной ГТ с использованием пДНК*

Использование незащищенной пДНК является самым простым и дешевым способом для генной терапии и впервые было применено в 1990 году. Плазида, кодирующая  $\beta$ -галактозидазу, вводилась мышам путем внутримышечной (в/м) инъекции, после чего кодируемый фермент обнаруживался в волокнах скелетных мышц животных. И, хотя эффективность трансфекции была невысокой (пДНК обнаруживалась в 1-2% мышечных волокон), авторами было показано, что незащищенная ДНК может спонтанно проникать в клетки мышечной ткани после введения путем инъекции [196]. Для оказания терапевтического действия (синтеза необходимого белка) на пути от места введения до места действия (клеточного ядра) вводимая ДНК должна преодолеть несколько барьеров.

Первым препятствием при системном введении является деградация пДНК в физиологических жидкостях и межклеточном пространстве под действием эндонуклеаз, а также ее захват клетками печени и элиминация за счет фагоцитоза

[2] [100] [130] (см. Рисунок 1). По данным Kawabata и др. период полувыведения незащищенной пДНК из плазмы крови у мышей после внутривенного введения составляет около 10 мин [100]. Кроме того, за счет наличия полярных групп сахарофосфатного остова молекулы ДНК, которые направлены полярными группами наружу, при физиологических значениях рН плазмида обладает отрицательным зарядом и гидрофильными свойствами, что препятствует ее сближению с клетками и проникновению через клеточные мембраны, которые также заряжены отрицательно.



**Рисунок 1. Препятствия на пути невирусных векторов при *in vivo***

Для увеличения стабильности плазмид в организме и для специфической доставки нуклеотидных последовательностей пДНК включают в состав

высокомолекулярных комплексов. Чаще всего используются следующие комплексы: 1) липоплексы - комплексы ДНК с липидами); 2) полиплексы - комплексы ДНК с катионными полимерами и 3) комплексы на основе наночастиц оксида кремния.

Среди липосом наиболее часто используемыми являются катионные амфилилы и нейтральные фосфолипиды [60]. Конденсированная пДНК упаковывается внутрь липосом благодаря взаимодействию с их полярными концевыми группами. Гидрофобный хвост липидов способствует образованию мицелл, которые сливаются с мембраной клеток-мишеней в ходе трансфекции, что приводит к эндоцитозу содержащейся в них ДНК [70]. Улучшенной модификацией липосом являются системы доставки ДНК, конъюгированные с лигандами мембранных рецепторов клетки-мишени. Такие комплексы узнаются поверхностными рецепторами клеток и захватываются путем эндоцитоза, что обеспечивает более эффективную и адресную доставку пДНК [103]. Основой липосом обычно являются 2,3-диолеилокси-N-[2(спермин-карбоксамидо)этил]-N,N-диметил-1-пропанамина трифторацетат (DOSPA) или диолеилфосфатидилэтаноламин (DOPE) [50].

Применяемые в ГТ полимеры обычно разделяют на две категории: высоко- и низкомолекулярные. Размер полимера определяется соотношением аминогрупп к фосфатным остаткам (N/P). Высокомолекулярные полимеры более стабильны, однако низкомолекулярные полимеры обладают большей эффективностью трансфекции. Основой для полимерных векторов служат поли(амидоамино)дендримеры (РАМАМ), поли(этиленамин) (PEI), поли(аминоэфир), поли(2-диэтиламиноэтилметакрилат) (PDEAEMA), полифосфоэфир и  $\beta$ -циклодекстрин [50].

В цитоплазме клетки ДНК также подвергается действию нуклеаз [106], впрочем, заключение плазмиды в липидные или белковые комплексы защищает их от этого воздействия. Диффузия свободной ДНК в цитоплазме ограничена, что, скорее всего, связано с элементами цитоскелета, которые создают своеобразные молекулярные «ситы» и препятствуют движению кольцевой ДНК [49] [114], а также

с феноменом макромолекулярного краудинга (от англ. «crowd» - толпа, давка, множество), оказывающим большое влияние на внутриклеточные взаимодействия белков, ДНК и других макромолекул [138]. Как уже было описано, в составе комплексов пДНК проникает в клетку путем эндоцитоза, и после этого очередным ограничением становится выход ДНК из эндосом до их слияния с лизосомами и разрушения содержимого [131]. Одним из решений является добавление в трансфицирующую смесь хлорохина, который, накапливаясь в лизосомах, снижает их кислотность и препятствует деградации нуклеиновой кислоты [56].

Наконец, для осуществления транскрипции необходимо проникновение плазмиды в ядро, однако, этот процесс до конца не изучен. Известно, что молекулы с диаметром не более 9-11 нм могут проходить через ядерные поры пассивно [21]. Кроме того известно, что существует АТФ-зависимый процесс переноса через ядерную мембрану белков размером  $\geq 20$  кДа, и, возможно, пДНК попадает в ядро по схожему механизму [59] [49] [116]. Для упрощения проникновения плазмид в ядро предложено использование специфичных промоторов (SV40 промотор, SMGA промотор гладкомышечного гамма актина, flk-1 промотор) или включение в комплексы доставки ДНК специальных сигнальных последовательностей ядерной локализации (NLS) [44] [161] Также отмечено, что трансфекция активно делящихся клеток, у которых происходит разрушение ядерной мембраны, происходит в разы эффективнее, чем трансфекция покоящихся или редко делящихся клеток [128] [194] [24].

#### *1.2.4 Способы введения векторов и методы трансфекции in vivo*

Подбор оптимального способа введения гена определяет биораспределение вектора и, таким образом, непосредственно влияет на эффективность терапии. Для системной доставки используются внутрисосудистые инъекции. Внутримышечное введение применяется при заболеваниях мышечной ткани (например, мышечная дистрофия) или в тех случаях, когда мышца является тканью, в которой продуцируется секретируемый белок, попадающий в системный кровоток (например,  $\alpha$ -антитрипсин при ГТ эмфиземы и заболеваний печени, связанных с недостаточностью данного белка) [33]. Активно ведется разработка методов

прямых инъекций для доставки в другие органы, например, интравитреальные инъекции, т.е. введение в стекловидное тело глаза. В случае с *ex vivo* генной терапией клетки, взятые у пациента, подвергаются модификации (как правило, вирусными векторами) в культуре, а затем снова вводятся в организм этого пациента. Существуют и другие способы, например, введение генетического материала непосредственно в пораженный орган с последующей электропорацией, бомбардировкой частицами, магнетофекцией. Также было предложено использовать струйное введение под давлением и некоторые другие способы, однако большинство из перечисленных методов пока не нашли своего применения в широкой клинической практике [2].

### **1.3 Подходы к фармакологическому изучению плазмидных генотерапевтических препаратов**

#### *1.3.1 Особенности доклинических исследований препаратов для ГТ*

Генотерапевтические препараты обладают рядом особенностей, которые необходимо учитывать при планировании дизайна доклинических (ДКИ) и клинических исследований (КИ):

- неприменимость к генотерапевтическим препаратам «классических» фармакокинетических анализов абсорбции, распределения, метаболизма и экскреции (ADME: absorption, distribution, metabolism and excretion,)
- сложность оценки фармакодинамики и зависимости доза-эффект; например, векторы, несущие терапевтические гены, попадая в клетку, реплицируются, причем количество «новых» генов может варьировать от клетки к клетке, кроме того разные клетки трансфицируются в разной степени;
- недостаточно хорошо изученные долгосрочные последствия использования генотерапевтических препаратов, что имеет особенно важное значение при планировании конечных точек исследования, общего времени наблюдения за пациентами и регистрации отсроченных эффектов (как положительных, так и нежелательных). Помимо оценки общей безопасности для невирусных

конструкций необходима оценка потенциальной иммунной реакции в ответ на введение ДНК;

- низкая предсказательная ценность животных моделей и затруднения при токсикологических исследованиях.

### 1.3.2 Фармакокинетика/фармакодинамика (PK/PD)

Для оценки эффективности и безопасности лекарственного средства, а также подбора доз, способа и частоты введения требуется оценка фармакокинетических и фармакодинамических параметров лекарственного вещества. Считается, что концентрация вещества в плазме крови пропорциональна концентрации в месте действия, а эффекты препарата определяются его концентрацией в плазме. Стандартные исследования абсорбции/распределения/метаболизма и выведения неприменимы для генотерапевтических препаратов. Для того, чтобы охарактеризовать фармакокинетику плазмид, необходимо понимание и оценка всего пути препарата в организме от места введения до места действия (ядра). Основные его этапы уже были описаны выше, перечислим их ещё раз, это:

- 1) распределение вводимого вектора и процессы, происходящие с ним в плазме крови
- 2) захват плазмиды клетками
- 3) движение ДНК в цитоплазме и деградация вектора в клетке
- 4) проникновение ДНК в ядро
- 5) транскрипция мРНК с ДНК
- 7) трансляция первичной последовательности белка с мРНК
- 8) секреция терапевтического белка
- 9) распределение и время «жизни» терапевтического белка в организме [95].

Исходя из этого некоторые авторы вводят понятие внутренней и видимой кинетики [151] [97]. К внутренней кинетике относятся перечисленные выше этапы 1-8, а к видимой – фармакокинетика синтезированного целевого белка (этап 9).

Для описания фармакокинетики генотерапевтических препаратов разрабатываются полумеханистические или компьютерные модели. Houk с соавторами изучали кинетику незащищенной пДНК в плазме крови крыс *ex vivo* и

*in vivo* после внутривенного введения (в/в) суперскрученной ДНК, и на основании полученных результатов предложили модель описания фармакокинетики пДНК. Модель предполагает последовательный переход пДНК от суперскрученной формы в кольцевую и линейную, этот процесс описывается обыкновенными дифференциальными уравнениями. В случае экспериментов *ex vivo* кинетика системы моделировалась с использованием процессов первого порядка, периоды полужизни каждой из топоизоформ пДНК составили 1,2, 21 и 11 минут соответственно, что соответствует активности нуклеаз, содержащихся в плазме [89]. В случае *in vivo* экспериментов в модель была включена дополнительная необратимая потеря суперскрученной формы из центрального компартмента (распределение пДНК в тканях), а также процесс Михаэлиса-Ментена для учета образования линейной формы из кольцевой. Также показано, что параметры фармакокинетики (терминальная элиминация) при использовании разных плазмидных векторов практически не различаются [88].

Заключение ДНК в комплексы с липидами и/или полимерами защищает её от деградации в системном кровотоке, но добавляет ещё один этап на пути ГТ препарата в организме от места введения до ядра, т.к. для экспрессии генов ДНК необходимо высвободиться из комплекса. Экспрессия генов плазмид, доставленных в липоплексах, идет в несколько раз эффективнее, чем при доставке в полиплексах, по-видимому, за счет неполной диссоциации последних в ядре [36]. Что касается липоплексов, предполагается, что слияние катионных липидов с клеточной мембраной одновременно способствует доставке генетической информации в клетку, минуя эндосомы, и высвобождению ДНК [192].

На основании экспериментальных и литературных данных различными авторами были представлены математические модели внутриклеточной фармакокинетики невирусных векторов. Большинство из них являются мультикомпаратментными, а основными скорость-лимитирующими факторами являются: стабильность ДНК, РНК и белкового продукта, проникновение плазмиды в ядро, а также её высвобождение из эндосом [188] [6]. Ledley с соавторами первыми предложили трехкомпаратментную модель (внеклеточная

среда, эндосома и цитоплазма) для описания кинетики пДНК. Их модель показала, что определенные процессы, такие как деградация ДНК в эндосомах и цитоплазме или деградация мРНК, могут быть описаны с помощью традиционной кинетики первого порядка [107]. Более сложная модель была разработана Varga и коллегами, в ней в качестве отдельного компартмента рассматривается клеточное ядро. Также данная модель позволяет предсказывать уровень экспрессии трансгена, доставляемого с помощью полиплексного вектора, в зависимости от длины полимера, входящего в состав генетической конструкции [188]. Были предложены и другие модели для описания внутриклеточной кинетики пДНК, большинство из которых сходятся к предположению, что основным скоростью-лимитирующим этапом является прохождение генетического материала через ядерную мембрану [151].

Несмотря на свои преимущества, кинетическое моделирование не дает информации о количестве и распределении пДНК в отдельных клеточных компартментах. Для этого хорошо подходит метод конфокальной лазерной сканирующей микроскопии, с помощью которого можно оценить проникновение ДНК в ядро, а также её распределение в эндосомах, липосомах и цитоплазме [164] [96]. Для количественной оценки содержания ДНК в различных органеллах применимы методы субклеточного фракционирования с последующим проведением ПЦР и/или Саузерн блоттинга, однако и они имеют свои ограничения из-за сложности выделения эндосом/лизосом и утечки из них части ДНК при выделении.

Такая характеристика лекарственного средства, как зависимость доза-эффект описывается фармакокинетическими/фармакодинамическими (PK/PD) моделями. Механизм действия генотерапевтического препарата, т.е. его фармакодинамика, определяется функциями трансгенного белка, синтезируемого с вводимой нуклеиновой кислоты, и зависит от эффективности доставки. Простейшая PK/PD модель экспрессии трансгена в ядре предполагает линейную зависимость между количеством ДНК и транскрибируемой с неё мРНК.

Однако ряд исследований показал, что транскрипция мРНК с вводимых ДНК происходит с разной эффективностью. Экспрессия отдельно взятого гена регулируется множеством факторов [40] [90], поэтому была предложена новая РК/PD модель, предполагающая наличие в ядре активной (с которой идет транскрипция) и неактивной форм ДНК. Данная модель может быть усложнена, поскольку при делении клеток часть экзогенной ДНК вновь попадает в цитоплазму, где разрушается под действием нуклеаз, что также необходимо учитывать при описании РК/PD параметров плазмиды [115]. К сожалению, количественное измерение содержания ДНК в активной и неактивной формах затруднено и требует разработки новых методик.

### *1.3.3 Биораспределение и выделение*

Общей целью исследований биораспределения является определение органов и тканей-мишеней (органов, которые могут подвергнуться токсическому действию), а также области распространения вектора. Характеристики персистенции, устойчивости и клиренса вектора используются при выборе режима дозирования изучаемого ГТ препарата, временных точек для оценки параметров активности/безопасности и продолжительности ДКИ.

После в/м введения незащищенной плазмиды мышам и кроликам в начальные моменты пДНК обнаруживается во всех сильно васкуляризованных органах, а затем только в инъецированной мышце (до 8 недель). После в/в пДНК распределяется практически по всем тканям кроме гонад и головного мозга [150].

При в/в введении меченых липидных комплексов пДНК мышам в первые часы после инъекции (через 5 ч) они обнаруживаются в основном в печени и селезенке и в меньшем количестве в почках, сердце и мозге. Через 24 часа происходит перераспределение пДНК между тканями: её количество в печени и селезенке уменьшается, и меченые комплексы начинают детектироваться в лёгких. ПЦР анализ, проведенный через 2-3 недели после введения генетических конструкций показал, что пДНК в основном накапливается в лёгких и сердце и не детектируется в печени, почках и мозге [173]. Комплексы пДНК с катионными

липидами после в/в введения обычно обнаруживаются в лёгких, почках, селезенке и печени, пДНК может детектироваться в перечисленных органах вплоть до 1 месяца после инъекции [183].

пДНК в комплексе с полиэтиленом, вводимая внутривенно, имеет широкое распределение в ранние моменты времени (15 мин, 24 ч) и затем сохраняется в печени, лёгких и почках, причем более длительное время по сравнению с незащищенной пДНК (более 10 дней по сравнению с 2–3 днями) [147].

Под экскрецией пДНК понимается диссеминация через секреты и (или) экскреты организма. Исследования данного параметра выделения обычно проводят совместно с изучением биораспределения.

## 1.4 Генотерапевтические препараты

### 1.4.1 История и современное состояние

Термин *трансдукция* - был введен в 1952 году Zinder и Lederberg для описания процесса переноса генетического материала между бактериальными клетками с помощью фагов [208]. За открытием фагов последовало изучение работы онковирусов эукариотических клеток, что привело к открытию обратных транскриптаз (1960-61). Появление методов выделения отдельных последовательностей способствовало разработке и внедрению в практику вирусных векторов, и после успешных экспериментов по переносу генов у животных, в 1989 году состоялся первый опыт на человеке. Rosenberg с коллегами использовали ретровирус для *ex vivo* доставки бактериального гена устойчивости к неомицину в TIL-клетки (tumor-infiltrating lymphocytes), которые затем были возвращены пациентам [156]. В 1990 доктор W. French Anderson впервые использовал генную терапию для лечения 4-х летней пациентки, страдающей острым комбинированным иммунодефицитом, связанным с дефицитом аденозиндезаминазы (ADA SCID). Хотя полного излечения добиться не удалось, состояние пациентки значительно улучшилось [4].

На данный момент в мире зарегистрировано и разрешено к применению порядка 10 генотерапевтических препаратов, активно проводятся доклинические и

клинические исследования. Первым из них был «Гендицин» (Gendicine; Shenzhen Sibiono GeneTech Co. Ltd, Китай), появившийся на китайском фармацевтическом рынке в 2003 году. Препарат представляет собой рекомбинантный аденовирус человека, несущий ген белка p53, с мутацией которого связывают развитие многих онкологических заболеваний. Аденовирусный вектор доставляет терапевтический белок в раковые клетки, синтез p53 в которых приводит к их гибели. «Гендицин» эффективен при лечении злокачественных опухолей головы и шеи, назначают его дополнительно к хирургическому лечению, лучевой- и химиотерапии. Нарботка рекомбинантного аденовируса ведется в биореакторах с использованием специально разработанных продуцентов на основе клеток линии HEK293, после чего препарат подвергается хроматографической очистке. [111].

Другой генотерапевтический препарат – «Онкорин» (Oncorine, H101; Shanghai Sunway Biotech, Китай) также был разработан в Китае и разрешен к применению с 2006 года. Как и Гендицин, препарат представляет собой рекомбинантный аденовирус, предназначен для лечения злокачественных новообразований головы и шеи, вводится инъекционно и применяется в дополнение к химиотерапии. Интересно, что действующим веществом здесь является сам аденовирус, из которого удалены E1B-55KD и E3 участки. Удаление этих последовательностей из аденовируса во-первых позволяет проникать только в опухолевые клетки, а во-вторых препятствует деградации белка p53 при попадании вируса в клетку и обеспечивает его онколитические свойства [118].

Первым препаратом для генной терапии, появившемся на европейском рынке стала «Глайбера» (Glybera, алипоген типарвовек, alipogene tiparvovec; UniQure, Нидерланды) Лекарственное средство получило разрешение на применение в Европейском Союзе в 2012 году и использовалось для лечения очень редкого наследственного заболевания - врожденного дефицита липопротеинлипазы. Механизм действия препарата заключается в восстановлении необходимого уровня липопротеинлипазы путем доставки кодирующего её гена в мышечные клетки. Вектором для переноса терапевтической ДНК в данном случае стал аденоассоциированный вирус [52]. Препарат «Глайбера» стал самым дорогим

лекарством в мире, а стоимость курса лечения составляла около 1 млн. долларов. В 2017 г. компания-разработчик отказалась от продления разрешения на продажу препарата ввиду отсутствия спроса и рентабельности - на коммерческой основе курс лечения препаратом «Глайбера» прошел один пациент.

Ещё одним генотерапевтическим препаратом на основе аденоассоциированного вируса является «Люкстурна» (Luxturna, voretigene neparvovec-rzyl; Spark Therapeutics, США). Препарат предназначен для лечения наследственной дистрофии сетчатки у взрослых и детей, вызванной мутациями гена RPE65. Механизм действия препарата заключается в доставке копии гена RPE65 для восстановления зрения непосредственно в клетки сетчатки, которые после этого производят нормальный белок, преобразующий свет в электрический сигнал [171]. Препарат был одобрен в США по процедуре приоритетного рассмотрения в декабре 2017 году, а в 2018 году использование «Люкстурна» было одобрено Европейским агентством лекарственных средств (EMA). В ЕС компания Novartis осуществляет производство препарата, права на который за пределами США она приобрела у американской компании Spark Therapeutics.

«Имлигик» (Imlygic, талимоген лагерпарепвек, talimogene laherparepvec; BioVec, Amgen, США) был одобрен FDA и EMA в 2015 г. для местного лечения неоперабельной рецидивирующей меланомы с поражениями кожи, подкожной клетчатки и лимфатических узлов у пациентов после первичного хирургического вмешательства. Препарат представляет собой генетически модифицированный онколитический вирус простого герпеса I типа, который способен реплицироваться только в опухолевых клетках, вызывая их гибель [53].

Также в 2019 г. FDA одобрило препарат «Золгенсма» (Zolgensma, онасемноген адепарвовек, onasemnogene aberparvovec-xioi) компании AveXis, Inc (США, группа Новартис), предназначенный для терапии спинальной мышечной атрофии (СМА) у детей младше 2 лет. Принцип действия препарат заключается в доставке с помощью аденоассоциированного вируса 9 функциональной копии гена SMN1 в моторные нейроны. Однократное внутривенное введение приводит к

экспрессии белка SMN в двигательных нейронах ребенка, что улучшает функционирование мышц и обеспечивает его выживание. Безопасность и эффективность Золгенсма была показана в КИ с участием 36 пациентов с СМА в возрасте от 2 недель до 8 месяцев на момент начала исследования [58].

Среди невирусных препаратов первым в мире (2011 г.) было зарегистрировано лекарственное средство, разработанное российскими учеными – «Неоваскулген». Действующее вещество представляет собой пДНК, кодирующую ген фактора роста эндотелия сосудов (VEGF165). Препарат выпускается в виде лиофилизата для приготовления раствора для в/м введения. «Неоваскулген» стимулирует ангиогенез и применяется для лечения ишемии нижних конечностей атеросклеротического генеза [219].

В 2019 году условное разрешение на использование в Японии получил препарат «Коллатаджен» (Collatagene, AnGes, Япония). Препарат содержит плазмиду, кодирующую фактор роста гепатоцитов (HGF), стимулирующий рост сосудов, и предназначен для лечения критической ишемии конечностей. Компания AnGes подала заявку на получение регистрационного удостоверения в Министерство здравоохранения, труда и социального обеспечения Японии (MHLW) в январе 2018 года, основываясь на положительных результатах рандомизированного плацебо-контролируемого исследования третьей фазы. В соответствии с условиями одобрения, AnGes в течение пяти лет должны провести подтверждающее исследование для всех пациентов, которые получают лечение данной плазмидой, после чего смогут подать заявку на получение регистрационного удостоверения. [17].

По данным журнала Gene Medicine, в мире были проведены, идут или одобрены более 3 тыс. КИ генной терапии (на начало 2021 года эта цифра составила 3180 исследований) [221]. Основные показания для проводимых КИ: онкологические и моногенные наследственные болезни, инфекционные и сердечно-сосудистые заболевания. При этом более половины (56,8%) составляют исследования I фазы, то есть ранние КИ с привлечением ограниченных групп пациентов.

Среди КИ средств для генной терапии, проводимых в России, стоит отметить исследования препаратов «Корвиан» (пДНК, кодирующая VEGF165) и «Юпикор» (препарат с геном урокиназы), разработанные НМИЦ Кардиологии и прошедшие КИ у больных с критической ишемии нижних конечностей [218]. Также в 2015 году МГУ имени М.В. Ломоносова было инициировано КИ плазмидного препарата «Иннервин» с геном мозгового фактора роста нервов (BDNF), предназначенного для стимуляции посттравматического восстановления периферических нервов пальцев кисти.

#### *1.4.2 Развитие направления: комбинированная генная терапия*

Несмотря на успешное применение ГТ для лечения наследственных моногенных заболеваний, эффективность терапии путем введения одного гена заметно ограничена [91] [168] [144] [69], поэтому с начала 2000-х годов появляется тенденция к разработке комбинированных подходов в ГТ с созданием новых препаратов, способных доставлять два и более терапевтических гена [174] [10] [222].

Использование комбинированной ГТ хорошо показало себя в регенеративной медицине и при лечении дегенеративных заболеваний. Например, такое заболевание, как остеоартрит имеет сложный патогенез, включающий деградацию хрящевой ткани, её ремоделирование и хроническое воспаление. Исходя из этого, можно предположить, что комбинированные подходы к лечению будут эффективнее, чем использование одного терапевтического метода, и это было подтверждено в работе А. Stone и соавт. Введение мышам с посттравматическим остеоартритом смеси двух генетических векторов, один из которых кодировал протеогликан 4 (лубрицин, PRG4) и обладал хондропротекторными свойствами, а другой нес антагонист рецептора к IL-1 (IL-1Ra) и оказывал противовоспалительное действие, обеспечивало сохранность хряща, причем комбинация двух векторов оказалась эффективнее, чем применение каждой из этих конструкций по отдельности [174].

Такие процессы как ангио- или нейрогенез являются многоэтапными и регулируются широким спектром цитокинов, факторов роста, протеаз и их

ингибиторов, поэтому применение одного фактора роста или цитокина (в виде рекомбинантного белка или генетической конструкции) не позволяет добиться стойкого, клинически значимого эффекта [122]. Одним из вариантов решения данной проблемы является поиск физиологически обоснованных комбинаций факторов и создание на их основе комбинированных препаратов, в расчете на аддитивность эффектов при совместной экспрессии двух терапевтических факторов после введения комбинированного препарата для ГТ.

## 1.5 Терапевтический ангиогенез

### 1.5.1 Механизмы роста сосудов

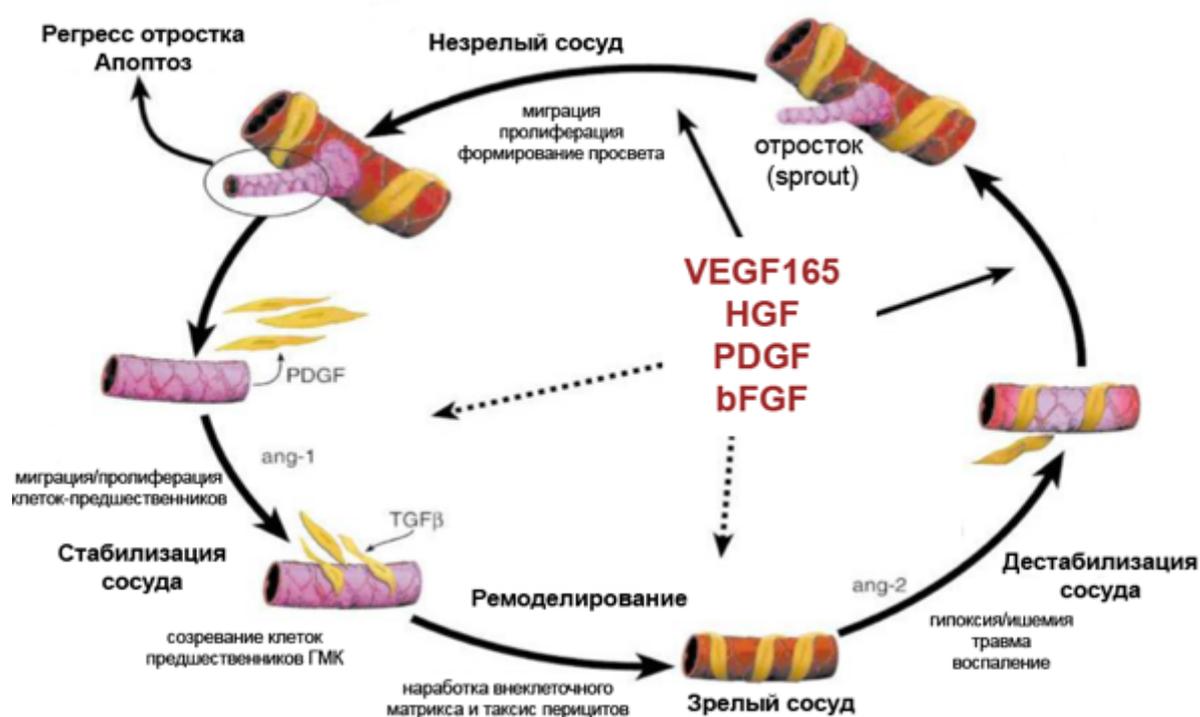
Среди клинических направлений разрабатываемых генотерапевтических препаратов значительное место занимают средства для лечения сердечно-сосудистых заболеваний (5,8 % от всех КИ генотерапевтических средств).

Основным физиологическим ответом на гипоксию и ишемию является активация роста кровеносных сосудов – ангиогенеза, однако при длительном или тяжелом нарушении кровоснабжения ткани, ангиогенный ответ оказывается недостаточным или возникает дефицит эндогенных факторов, способствующих росту сосудов. Оправданным терапевтическим решением в такой ситуации является экзогенная стимуляция роста сосудов, получившая название *терапевтический ангиогенез*. Эта область медицины основана на лечении ишемических заболеваний путем стимуляции роста кровеносных сосудов с целью восстановления кровоснабжения ткани или органа. В отличие от медикаментозных и хирургических методов лечения в данном подходе используются регуляторные факторы, участвующие в ответе на гипоксию.

Кратко рассмотрим основные этапы ангиогенеза. Ангиогенез — это процесс образования кровеносных сосудов *de novo*, включающий такие стадии как миграция, пролиферация и прорастание существующих эндотелиальных клеток (ЭК) с формированием капилляров. Последние представляют собой небольшие (8–15 мкм) сосуды без гладкомышечной оболочки, отвечающие за кровоснабжение тканей и обмен  $O_2/CO_2$  [3].

Уменьшение парциального давления  $O_2$  в ткани служит основным стимулом ангиогенеза. В нормальных условиях капилляры состоят из неделящихся клеток эндотелия, стабилизация которых поддерживается действием аутокринных и паракринных стимулов. Среди них есть как проангиогенные: факторы роста эндотелия сосудов (VEGFs), факторы роста фибробластов (FGFs), фактор роста гепатоцитов (HGF), тромбоцитарный фактор роста (PDGF), так и факторы, подавляющие рост сосудов: Notch-1, ангиопоэтин-1, тромбоспондин-1, ангиостатин, трансформирующий фактор роста (TGF- $\beta$ 1) (см. Рисунок 2). При гипоксии стабилизация эндотелия уменьшается и баланс смещается в сторону ангиогенеза. Этот процесс опосредуется активацией семейства транскрипционных факторов, индуцируемых гипоксией (HIF) в клетках эндотелия, гладкомышечных клетках (ГМК), перицитах и фибробластах [67]. Изоформа HIF- $\alpha$  представлена тремя субъединицами, каждая из которых может гетеродимеризоваться с субъединицей HIF- $\beta$  (ARNT) с образованием активного транскрипционного комплекса, который инициирует экспрессию сотен генов, включая гены, регулирующие выживание клеток, метаболизм и ангиогенез [162]. Это приводит к синтезу и секреции растворимых факторов роста, связанных с пролиферацией и дифференцировкой ЭК (кислотного FGF (aFGF), основного FGF (bFGF), HGF, VEGF) [63] [199]. Эти изменения приводят к появлению ведущих клеток (англ. tip cell) – клеток эндотелия, теряющих контакт с соседними клетками и обладающих повышенной миграционной и протеолитической активностью. Ведущие клетки направляют рост новых сосудов по градиенту АФР, за счёт удлинения филоподий, отвечающих за хемотаксис. Молекулярные механизмы обеспечивающие приобретение ЭК фенотипа ведущих клеток, до конца не изучены, однако, имеются данные, показывающие важную роль в этом процессе VEGF-VEGFR-Dll4-Notch сигнального пути [32]. Ведущие клетки продуцируют большое количество матриксных металлопротеиназ (ММП-1 и -2), которые за счет протеолитической активности обеспечивают прорастание формирующегося сосуда через внеклеточный матрикс (ВКМ). За ведущими клетками следуют ведомые клетки (англ. stalk cells), они отличаются по морфологии и поведению от ведущих клеток:

имеют более короткие филоподии и обладают меньшим протеолитическим и большим пролиферативным потенциалом. Данные клетки составляют основу будущего сосуда и принимают участие в формировании его просвета [73]. После образования просвета и нормализации кровоснабжения, действие гипоксических стимулов прекращается, ведущие клетки теряют свой фенотип и протеолитический потенциал, переходя в покоящиеся фаланговые клетки (англ. phalanx cells). Основная функция этих клеток - стабилизации сосуда: образование межклеточных контактов, синтез компонентов базальной мембраны и взаимодействие с перicyтами, ГМК и белками матрикса [65] [170].



**Рисунок 2.** Схема ангиогенеза и его регуляции (адаптировано из Yin-Shan и др. [203])

### 1.5.2 Терапевтический ангиогенез: история и развитие направления

Как уже было упомянуто, ангиогенез регулируется различными сигнальными молекулами, важнейшую роль играют АФР, которые оказывают на клетки эндотелия митогенное действие и являются хемоаттрактантами. Для стимуляции и поддержания роста сосудов целесообразно использование именно АФР, причем

особое внимание уделяется факторам из семейств VEGF, HGF, FGF, ангиопоэтинам и белкам из группы PDGF. Для них характерна плеiotропия функций, т.е. влияние на разные этапы образования сосуда и на разные клетки, участвующие в ангиогенезе), что делает их своего рода универсальными регуляторами васкуляризации тканей [26] [63] [136].

Первыми препаратами, которые разрабатывались с целью восстановления кровоснабжения были рекомбинантные АФР. Несмотря на эффективность в опытах на животных, их применение в клинической практике оказалось практически невозможным. Это связано с тем, что для поддержания терапевтически значимой концентрации рекомбинантного АФР в зоне ишемии необходимы огромные количества белка, имеющего короткое время жизни в ткани. Затруднения вызвали также способы доставки таких количеств белка и высокая стоимость терапии [47].

На смену методов ТА с применением рекомбинантных АФР появились методы ГТ. Первые эксперименты, показывающие возможность *in vivo* доставки гена VEGF165 с помощью простой инъекции пДНК для стимуляции реваскуляризации ишемизированной конечности, стали основой для сотен исследований, проведенных за последние десятилетия [179].

Первое клиническое применение ГТ, а именно, плазмиды с геном VEGF165 для стимуляции ангиогенеза у больной с критической ишемией нижней конечности (КИНК) предпринял доктор Джеффри Иснер в 1996 году. В исследовании пациентке вводили 2000 мкг плазмиды rhVEGF165, которая была нанесена на гидрогелевое полимерное покрытие ангиопластического баллона. Терапия способствовала улучшению кровообращения в пораженной конечности и стимулировала образование новых сосудов [91]. В данной работе впервые была показана принципиальная возможность использования ГТ для терапевтического ангиогенеза.

Эффективность ГТ с использованием VEGF165 при внутримышечном введении впервые показал доктор Баумгартнер и соавт., которые наблюдали

повышенное образование коллатералей сосудов, а также пролиферацию ЭК в ампутационном материале после инъекции пДНК пациентам с КИНК [13].

Последующие исследования ГТ с доставкой VEGF165 показали их безопасность и хорошую переносимость за исключением нескольких случаев развития отеков конечности, что связывают со способностью VEGF165 повышать сосудистую проницаемость [186] [14].

Помимо VEGF165 с целью использования для ТА изучалась и другая изоформа данного АФР - VEGF121. Считается, что этот цитокин имеет лучшую растворимость, чем изоформа VEGF165, поскольку в нем отсутствует гепарин-связывающий домен. Однако в КИ ГТ с использованием VEGF121 оказалась не эффективной: в двойном слепом плацебо-контролируемом КИ RAVE не было выявлено значительных различий между контрольной и экспериментальной (введение аденовирусного вектора Ad-VEGF121) группами, кроме того наблюдалось дозозависимое усиление побочного эффекта – развитие отеков [154]. Однако, в другом пилотном исследовании показана эффективность ГТ VEGF121 при тяжелой ишемической болезни сердца: прямая инъекция аденовирусного вектора Ad(GV)VEGF121.10 приводила к облегчению степени стенокардии у пациентов, улучшению переносимости физической нагрузки и не вызывала серьезных побочных эффектов [157].

Другой АФР – FGF одним из первых был использован в виде рекомбинантного белка для ТА, позже появились КИ генотерапевтических векторов с геном данного АФР. В пилотном КИ терапевтического ангиогенеза при ишемии нижних конечностей для лечения артериопатии и незаживающих язв (TALISMAN-201) было показано уменьшение частоты ампутаций в течение 1 года после в/м введения пациентам плазмиды pDNA-FGF-1, так же отмечалось снижение общей смертности [143]. Однако в плацебо-контролируемом КИ III фазы «TAMARIS» (n = 525) были получены неутешительные результаты: основные изучаемые показатели, включая число ампутаций, не улучшились после введения пациентам пДНК с геном FGF-1 [66] [15]. Сходные результаты об отсутствии эффективности ГТ FGF так же были получены в исследованиях OPTIMIST и

EuroOPTIMIST. Тем не менее накоплены важные данные о безопасности применения пДНК с FGF, поэтому исследования данного АФР продолжаются [142].

Первые КИ с использованием гена HGF были проведены группой доктора Моришиты с целью лечения заболеваний периферических артерий (ЗПА), основой для них послужили обнадеживающие результаты, полученные на животных моделях с в/м инъекцией пДНК HGF [134]. В КИ, сравнивающем однократное и повторное введение пДНК HGF, положительная динамика (измерялось парциальное напряжение кислорода) наблюдалась только при многократном введении [136]. Результаты последующего плацебо-контролируемого исследования I/IIa фазы показали, что многократное введение 8 мг пДНК HGF приводит к уменьшению размеров язв и боли [137]. Аналогичные результаты были получены в и плацебо-контролируемом исследовании пациентов с ЗПА, где к концу 12 недели наблюдалось уменьшение размера язвы на 70% [167].

Активное развитие данного направления привело к появлению первых генотерапевтических препаратов с генами АФР VEGF165 и HGF. Развиваются комбинированные генно-клеточные подходы: например, предложено использование генетически модифицированных предшественников эндотелиальных клеток (ЕРС). Введение мышам с ишемией задней конечности гетерологичных ЕРС, трансдуцированных аденовирусом, кодирующим VEGF, приводило к неоваскуляризации, восстановлению кровотока и уменьшению области некроза по сравнению с контрольными животными. Кроме того необходимая для улучшения кровообращения ишемизированной конечности доза ЕРС в случае их модификации в 30 раз меньше, чем в случае трансплантации неизмененных клеток [92]. Аналогично, введение мезенхимальных стромальных клеток (МСК), трансдуцированных вирусными векторами с генами VEGF или ANG-1, приводило к значительному усилению ангиогенеза и улучшению сердечной функции по сравнению с введением нетрансдуцированных клеток как бфло показано на модели инфаркта миокарда у крыс по сравнению с введением нетрансдуцированных клеток [126] [176].

### *1.5.3 Комбинированная ГТ для стимуляции ангиогенеза*

Несмотря на показанную в ДКИ и КИ безопасность, эффективность такой терапии относительно невысокая. Это связано с тем, что ангиогенез – это многостадийный процесс, регулируемый различными факторами роста, поэтому введение лишь одного из них может не вызывать длительного физиологически значимого эффекта.

Усиления ангиогенеза можно ожидать при применении нескольких факторов, каждый из которых реализует свое действие через специфический рецептор, вызывая полимодальную активацию роста сосудов. Под последней следует понимать пролиферацию эндотелиальных и гладкомышечных клеток, привлечение прогениторных клеток, ремоделирование ВКМ, влияние на процессы воспаления и т.д.

Данное предположение было подтверждено в экспериментальных работах, в которых использовались комбинации VEGF165 с другими ангиогенными факторами, механизм действия которых отличается от действия VEGF или может уменьшать его негативные эффекты – отечность и воспалительные реакции. При этом, чаще всего, использовались белки, обладающие доказанными ангиогенными свойствами. Введение VEGF, как правило приводит к образованию не зрелых (нестабильных) капилляров. Стабилизации формирующихся кровеносных сосудов может способствовать PDGF-B за счёт привлечения предшественников мезенхимальных клеток. Как было показано, совместная доставка VEGF и PDGF-B приводит к раннему образованию зрелых сосудов [75]. Ангиогенным и артериогенным свойствами обладает bFGF, рецепторы к FGF экспрессируются как на эндотелиальных клетках, так и на клетках гладких мышц, что может способствовать формированию зрелой сети кровеносных сосудов [28] [108]. Также было показано увеличение эффективности генной терапии при использовании VEGF165 совместно с uPA [184] ангиопоэтином-1 [31] [113] и SDF-1a [204].

Среди других комбинаций следует выделить сочетание фактора роста эндотелия сосудов VEGF165 и фактора роста гепатоцитов HGF. Рассмотрим действие каждого из этих АФР подробнее.

#### *1.5.4 Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) и механизм его действия*

Одними из основных регуляторов васкуло- и ангиогенеза являются белки семейства VEGF: VEGF-A (более известный как VEGF, или VEGF-1), VEGF-B, VEGF-C (VEGF-2), VEGF-D и плацентарный фактор роста (PlGF). VEGF-A имеет несколько изоформ (VEGF121, VEGF145, VEGF165, VEGF189, VEGF206) наиболее значимым ангиогенным и противоапоптотическим эффектом из которых обладает VEGF165. Он представляет собой гомодимер, массой около 46 кДа [62] [87]. Обнаружено три типа рецепторов к VEGF, причем основная масса биологических эффектов наблюдается при связывании VEGF165 с рецептором VEGFR2 (KDR/Flk-1). Данный рецептор находится на поверхности клеток эндотелия сосудов и обладает тирозинкиназной активностью. Связывание с лигандом приводит к фосфорилированию тирозиновых остатков внутриклеточных доменов рецептора, активации фосфолипазы C, протеинкиназы C и последующему фосфорилированию молекул RAF, RAS и MEK с активацией MAP-киназ ERK1/2, p38 и Akt1. Описанный сигнальный каскад приводит к активации ряда транскрипционных факторов (c-Fos, FOXO3a) [127], что вызывает увеличение подвижности, пролиферации и выживаемости эндотелиальной клетки. Все это обеспечивает реализацию ангиогенного действия VEGF, но также является причиной повышения проницаемости сосудов, и развитию связанных с этим нежелательных эффектов [62].

#### *1.5.5 Фактор роста гепатоцитов (HGF) и механизм его действия*

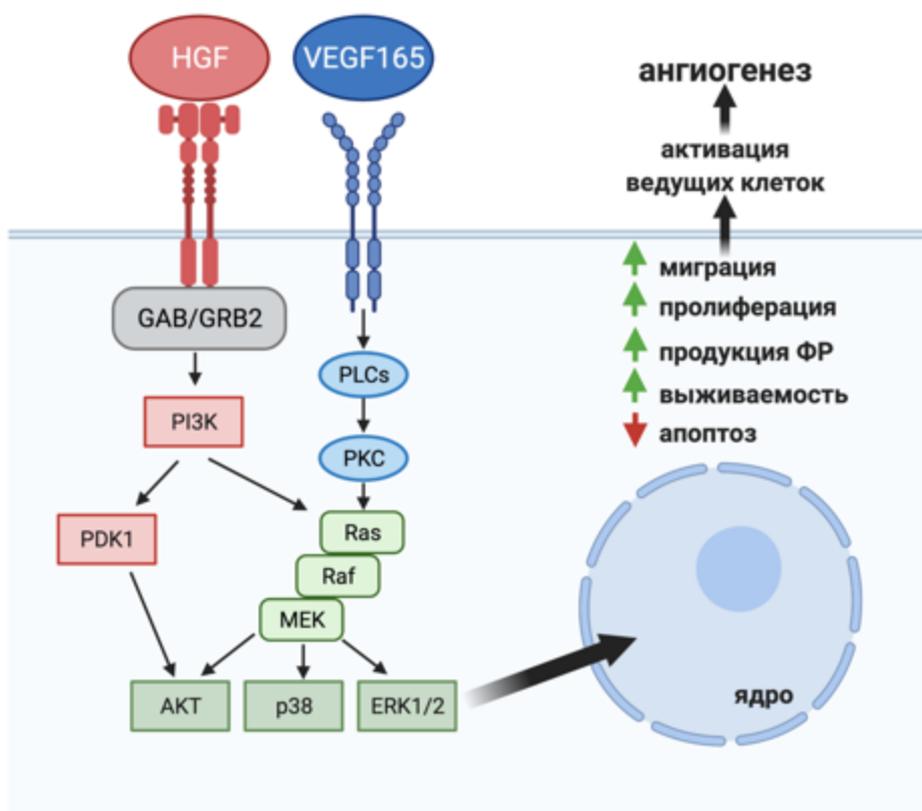
HGF синтезируется в виде одноцепочечного предшественника, который затем подвергается протеолизу с образованием активной формы, состоящей из  $\alpha$  и  $\beta$  субъединиц с молекулярными массами в 59 и 34 кДа соответственно [140]. Единственным известным рецептором HGF является c-met, который представляет собой трансмембранный белок, обладающий тирозинкиназной активностью. Рецептор к HGF представлен на клетках эндотелия и эпителия, гепатоцитах, гладкомышечных клетках, клетках миокарда и лейкоцитах. Активация c-met приводит к фосфорилированию его тирозинкиназного домена и последующему фосфорилированию сигнальных белков класса src (фосфолипазы C- $\gamma$ ), гидролизу

фосфатидилинозитолтрифосфата с формированием диацилглицерола и инозитол-1,4,5-трифосфата, что приводит к активации протеинкиназы С и мобилизации внутриклеточных запасов ионов  $Ca^{2+}$ . Кроме того, при активации с-met происходит фосфорилирование MAP-киназ ERK1/2 и  $\alpha$ -серин/треонин-протеинкиназы (Akt). В результате наблюдается увеличение миграционной и пролиферативной активности клеток, а также проявляется антиапоптотическое действие HGF [136] [121] [201].

#### *1.5.6 Комбинирование VEGF165 и HGF для стимуляции ангиогенеза*

Исследования факторов роста, стимулирующих тирозинкиназные рецепторы ЭК, показали, что они имеют ряд плеiotропных эффектов, усиливающихся при комбинированном действии нескольких белков. Сочетание HGF и VEGF165 приводит к гораздо более сильному пролиферативному и хемотаксическому ответу ЭК по сравнению с использованием каждого из факторов по отдельности [74].

Механизмом усиления ангиогенного эффекта при их совместном действии считается амплификация сигналинга, активируемого при связывании лигандов со своими рецепторами (VEGF165 с VEGFR2 и HGF с с-met). Показано усиление фосфорилирования MAP-киназ ERK1/2 и p38 при стимуляции эндотелиальных клеток HUVEC комбинацией VEGF165 и HGF (см. Рисунок 3). Кроме того, отмечено увеличение экспрессии рецептора VEGFR2 и повышение продукции FAK – молекулы, регулирующей состояние цитоскелета и фокальные адгезионные контакты между клетками. Все эти изменения увеличивают миграционную и пролиферативную активность клеток эндотелия и повышают их ангиогенный потенциал [175].



**Рисунок 3. Механизм усиления ангиогенного эффекта, опосредованный активацией MAP-киназных каскадов при совместном действии HGF и VEGF165 на клетки эндотелия**

Важной особенностью взаимодействия VEGF165 и HGF является разнонаправленное влияние этих факторов на воспаление. Хорошо известно провоспалительное действие VEGF165: для него характерно повышение сосудистой проницаемости [117], продукции эндотелиальными клетками воспалительных цитокинов и увеличение экспрессии молекул адгезии. VEGF165 может влиять на инвазию моноцитов путем активации NF-κB пути в ЭК. Показана роль VEGF165 в развитии хронических воспалительных заболеваний – ревматоидного артрита [177] и ХОБЛ [169]. HGF может уменьшать упомянутые выше провоспалительные эффекты VEGF165, подавляя экспрессию молекул ICAM-1 и VCAM-1, и тем самым снижая адгезию лейкоцитов [129].

В предыдущих работах нашей научной группы была продемонстрирована эффективная стимуляция ангиогенеза после в/м инъекции мышам с ишемией

задней конечности смеси двух плазмид, кодирующих VEGF165 и HGF. Введение смеси пДНК приводило к усилению ангио- и артериогенеза и снижению площади некроза скелетных мышц по сравнению с введением плазмид с каждым из АФР по отдельности [122]. Ангиогенный эффект введения смеси плазмид с генами VEGF165 или HGF также был показан на модели инфаркта миокарда у крыс. Введение комбинации плазмид с VEGF165 и HGF более эффективно стимулировало капиллярогенез в периинфарктной зоне миокарда по сравнению с использованием плазмиды с одним АФР, однако не превосходило одиночные плазмиды по выраженности стимуляции артериогенеза и по показателям уменьшения размера постинфарктного рубца [123]. Известно, что, артериогенез чувствителен к истощению моноцитов и зависит от макрофагов во многих тканях, включая миокард [94] [17]. Среди огромного разнообразия клеток, инфильтрирующих миокард после инфаркта, моноциты играют особую роль, поскольку они являются предшественниками макрофагов, которые удаляют некротизированную ткань и стимулируют образование сосудов. При использовании пДНК с VEGF165 в зоне инфаркта наблюдалось значительное увеличение числа моноцитов, что соотносится с провоспалительными эффектами, описанными для VEGF. При этом экспрессия HGF в миокарде приводила к снижению количества моноцитов в периинфарктной области, что наблюдалось при использовании плазмиды с данным АФР как отдельно, так и в смеси с VEGF165. Одновременно с меньшим количеством моноцитов в зоне инфаркта при использовании пДНК HGF отмечалось отсутствие артериогенеза. Эксперименты *in vitro* показали, что HGF снижает активность NF-κB и продукцию MCP-1 ЭК и за счет этого может подавлять эффекты VEGF165 на инвазию моноцитов и артериогенез [123]. Таким образом, можно предположить, что плеiotропные эффекты VEGF165 и HGF на рекрутирование моноцитов могут определять артериогенный ответ, индуцируемый этими факторами роста.

Накопленные экспериментальные данные подтверждают эффективность комбинированного использования VEGF165 и HGF и потенциальную возможность разработки лекарственного средства для ГТ, кодирующего данные АФР. При этом,

однако, необходимо учитывать роль плейотропии, показанной для многих факторов роста и цитокинов, которая может оказывать на терапевтический ангиогенез как положительный так и отрицательный эффект

### 1.6 Бицистронные плазмидные векторы

Введение смеси векторов имеет ряд существенных недостатков, таких как: стохастический характер одновременной трансфекции клеток двумя плазмидами, невозможность точного предсказания эффективности трансфекции и конечных концентраций экспрессируемых целевых белков, а, следовательно, трудность описания фармакокинетики. Кроме того, сложная стехиометрия и различия в экспрессии целевых мРНК могут привести к потере аддитивных эффектов, ожидаемых от комбинированного применения терапевтических генов [10]. Все это затрудняет фармацевтическую разработку лекарственных средств на основе комбинаций двух и более пДНК.

Для осуществления одновременной доставки нескольких генов в составе одной генетической конструкции разработаны би- и мультицистронные векторы различного строения. Бицистронный вектор содержит два цистрона, т.е. участка ДНК, ответственных за синтез определенного белка. Существует несколько наиболее распространенных подходов к созданию бицистронного плазмидного вектора, которые могут быть использованы для разработки потенциальных препаратов для ГТ (см. Рисунок 4):

1) Разделение генов внутренним сайтом посадки рибосом – IRES (internal ribosomal entry site). Данная последовательность обеспечивает связывание субъединиц рибосом с мРНК и начало синтеза белка без вовлечения 5'-конца мРНК. В таких конструкциях оба гена находятся под контролем одного промотора и транскрибируются в виде единой молекулы мРНК, оставаясь разделенными последовательностью IRES. Трансляция гена, расположенного перед последовательностью IRES происходит по «классическому» кэп-зависимому механизму, а трансляция идущего следом гена инициируется последовательностью IRES кэп-независимым, т.н. «внутренним» способом. Последовательности IRES

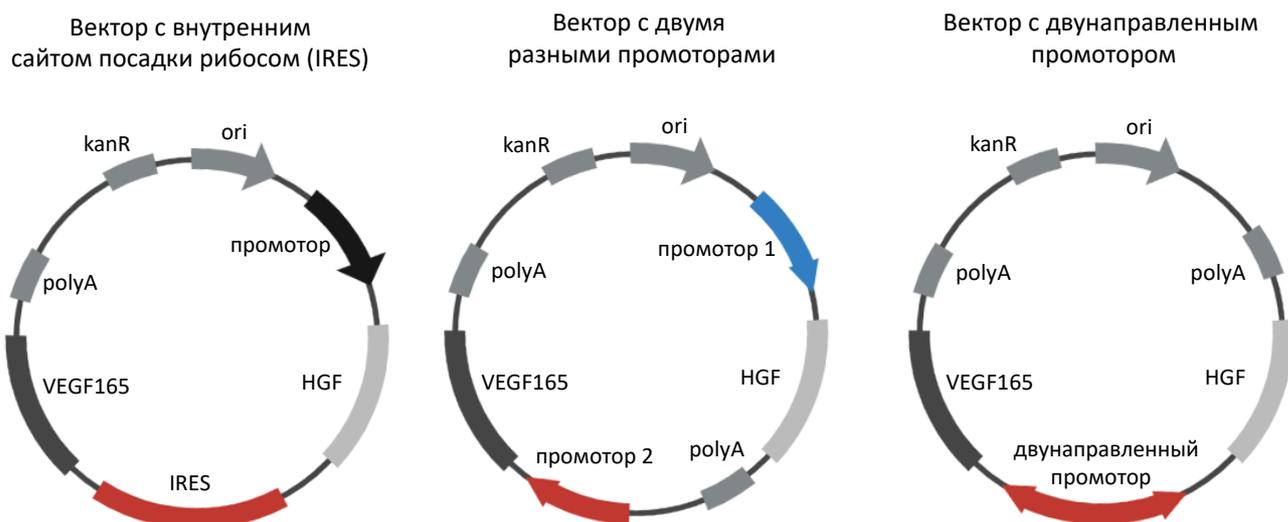
обнаружены в геномах многих организмов, начиная от вирусов и заканчивая млекопитающими. Наиболее часто используется IRES вируса энцефаломиокардита (EMCV). Основной минус конструкций, включающих последовательность IRES, заключается в том, что уровень экспрессии гена, стоящего следом за IRES в разы меньше, чем гена, стоящего первым на пути движения рибосомы [206] [132] [198]. Эффективность IRES-зависимой трансляции может зависеть от расположения генов относительно данной последовательности [85], вида используемого IRES, а также от типа вектора (вирусный/невирусный) и его структуры, а также от трансфицируемых клеток [48] [198] [141]. Кроме того, размер самой последовательности IRES составляет до несколько сотен пар нуклеотидов, поэтому её использование может быть ограничено ёмкостью вектора.

2) Использование 2А-пептидов и аналогичных им последовательностей. 2А-пептиды состоят из 18-22 аминокислот (20 аминокислот у наиболее часто используемого 2А-пептида вируса ящура) и обладают способностью к «самовырезанию» (англ. *self-cleavage*) из транслируемой последовательности белка. Кодированные 2А-пептиды нуклеотидные последовательности клонируют непосредственно между генами белков, которые необходимо нарабатывать в ткани. Во время трансляции, когда рибосома встречает 2А в открытой рамке считывания (ORF), происходит её проскок в месте последней пептидной связи на С-конце 2А (связь пролин-глицин) и переход к синтезу второго белка. В результате формируется два продукта: один белок, слитый своим С-концом с 19 аминокислотами 2А последовательности и второй белок, несущий на N-конце 20-ую аминокислоту 2А пептида - пролин. Сейчас активно используются 2А-пептиды четырёх видов: P2А, E2А, F2А и T2А, полученные из разных вирусов. Наличие дополнительной последовательности, как правило, оказывает минимальное влияние на активность большинства белков и не влияет на их стабильность [61]. Использование вектора данного дизайна позволяет добиваться одновременного синтеза целевых белков в эквимольной стехиометрии, однако, влияние наличия остатка 2А-пептида на С-конце одного из белков на его биологическую активность,

а также возможная иммуногенность до конца не изучены, поэтому использование подобных конструкций в клинической практике пока ограничено.

3) Использование в одном векторе двух и более экспрессионных кассет (векторы с двумя независимыми промоторами). Каждый из кодируемых генов в таких конструкциях имеет собственный энхансер, промотор и полиА сигнал. Таким образом, транскрипция каждого из генов происходит независимо [16]. Также одним из плюсов является возможность выбора подходящего промотора в зависимости от типа трансфицируемых клеток или условий (промоторы, включающие отвечающие на гипоксию элементы HRE, активируемый в условиях нехватки глюкозы промотор *grp78*, активируемый радиацией промотор) [71]. Тем не менее, существуют данные о том, что в подобных векторах возможно ослабление или выключение одного из промоторов из-за перекрестного влияния продуктов транскрипции (эпигенетическая супрессия) [54] [55].

4) Использование двунаправленных промоторов. Подобные промоторы найдены в геноме человека и других организмов и обеспечивают транскрипцию двух генов в противоположных направлениях, однако для успешного использования вектора данного дизайна необходим тщательный выбор промотора. Двунаправленный промотор должен быть достаточно сильным и обеспечивать высокую транскрипционную активность в разных типах клеток, а также должен быть устойчив к выключению (англ. *silencing*) под влиянием эпигенетических факторов [1] [205]. При конструировании векторов такого типа чаще всего используют промоторы цитомегаловируса человека (CMV), фосфоглицераткиназы (P<sub>gk1</sub>), гена β-актина цыпленка (CAG), а также искусственные слитые промоторы на основе промотора фактора элонгации трансляции 1α человека (EEF1A1) и минимального CMV промотора, а также слитых P<sub>gk1</sub> и CMV промоторов [76].



**Рисунок 4. Наиболее распространенные подходы к конструированию бицистронных плазмидных векторов**

### 1.7 Релевантные фармакологические модели для оценки ангиогенеза

Ангиогенез является одним из ключевых процессов, вовлеченных в восстановление, рост и ремоделирование тканей как в физиологических процессах (заживление ран, овуляция, развитие эмбриона), так и при различных патологических состояниях, включая канцерогенез, атеросклероз и хроническое воспаление [79] [27]. Многие из этих состояний имеют общие характеристики, например, гипоксии или воспаление ткани, рекрутирование воспалительных клеток, активная продукция АФР и деградация базальной мембраны с миграцией эндотелиальных клеток. Однако в зависимости от исследуемой ткани или заболевания механизмы и сигнальные молекулы, участвующие в регуляции этих процессов, могут значительно варьировать. Исходя из этого, были разработаны различные модели исследования ангиогенеза, некоторые из них описаны ниже.

#### 1.7.1 Модель ишемии задней конечности

Модель ишемии задней конечности у мышей, крыс, а также кроликов широко используется для изучения образования сосудов в ответ на тканевую ишемию/гипоксию [25]. В этом исследовании артерии, снабжающие кровью одну из задних конечностей мыши, перевязывают так, чтобы нарушить кровообращение во всей конечности. Хирургические процедуры варьируют от перевязки бедренной

или общей подвздошной артерии 1-2 лигатурами [172] до полного иссечения бедренной артерии [38], также иногда иссекаются вены и нервы [193] для получения модели с необходимой выраженностью ишемии. Перевязка или иссечение артерий приводит к ишемии тканей и инициации ангиогенеза из коллатеральных артерий. Исследуемое проангиогенное соединение вводится в ишемизированные мышцы. Для моделирования ишемии тяжелой степени (третьей-четвертой стадии по классификации Покровского-Фонтейна) дополнительно к перевязке бедренной артерии проводят перевязку *a. saphena*, что препятствует образованию анастомозов по “*vasa vasorum*” [217].

Стоит учитывать, что степень поражения конечности и скорость восстановления кровотока зависит от используемых модельных животных, так например мыши линии C57BL/6 отличающихся быстрым восстановлением перфузии, в отличие от мышей линии BALB/c, обладающих низкой способностью к регенерации; для них характерно развитие обширного некроза ишемизированной конечности [160] [68]. Для оценки кровообращения в задних конечностях используется доплеровская ангиография, для изучения динамики восстановления кровотока процедуру повторяют несколько раз на одном и том же животном, при этом неоперированная конечность служит контролем. Помимо лазер-доплеровской ангиографии возможно использование рентгенографии и МРТ с контрастированием. Также оценивается наличие/отсутствие некроза и его степень.

Для оценки неоваскуляризации после выведения животных из эксперимента проводят иммуногистохимический анализ образцов ишемизированных тканей. Ангиогенный ответ, обычно, изучают в дистальной части ишемизированной конечности: передней большеберцовой или икроножной мышце путем окрашивания ЭК (CD31). Для оценки ангиогенеза (т.е. образование новых коллатеральных артерий) образцы ткани окрашивают мечеными антителами к  $\alpha$ -актину гладких мышц [165] [145].

Данная модель для изучения терапевтического ангиогенеза была разработана одной из первых и широко используется в фундаментальных исследованиях, однако, её потенциальным недостатком является довольно сложная операция на

задней конечности, требующая высококвалифицированных специалистов и опытных хирургов [25]. Кроме того, одним из основных ограничений модели ишемии задней конечности является острый характер ишемии, тогда как у пациентов с заболеванием периферических артерий ишемия/гипоксия развивается постепенно. Ещё одним недостатком является то, что способность к регенерации сосудов и неоваскуляризации сильно различается между обычно используемыми линиями мышей [30]. Также не рационально использование линий иммунодефицитных мышей (например, линии Balb/c Nude), поскольку клетки иммунной системы играют важную роль в регуляции ангио- и артериогенеза [145]. Значимым ограничением для большинства исследований ишемии задней конечности на мышах является и то, что они проводятся на молодых здоровых животных, тогда как пациенты с заболеванием периферических артерий обычно принадлежат к группе старшего возраста и страдают атеросклерозом, диабетом 2 типа или другими сопутствующими заболеваниями.

### *1.7.2 Модель инфаркта миокарда*

При доклинической разработке препаратов для ТА для оценки эффективности используются животные модели инфаркта миокарда (ИМ). Стойкая ишемия характеризуется некрозом миокарда с массивной гибелью кардиомиоцитов с последующим выраженным воспалительным ответом. На более поздних этапах происходит образование грануляционной ткани, которая характеризуется наличием множества кровеносных сосудов [35].

Большинство моделей инфаркта миокарда у грызунов основано на хирургической окклюзии или перевязке коронарной артерии. Хирургическая окклюзия коронарной артерии с последующей реперфузией была разработана на мышах для имитации событий, наблюдаемых в клинике, а также для изучения ангиогенеза в контексте воспалительных процессов, связанных с ишемией-реперфузией [86]. Для моделирования постинфарктной хронической сердечной недостаточности используются крысы, которым проводится операция по наложению лигатуры на левую коронарную артерию (ЛКА) [209]. Размер ИМ сильно зависит от уровня перевязки: при выполнении высокой перевязки ЛКА образуется

ишемизированной участок большой площади, отличающийся низкой вариабельностью от животного к животному, однако при этом типе наложения лигатуры наблюдается высокая смертность. При выполнении более низкой перевязки выживаемость животных после операции значительно увеличивается, однако, размер ишемии уменьшается, а её вариабельность возрастает [211].

Для изучения заживления повреждения сердца и ангиогенного ответа доступны неинвазивные и инвазивные методы оценки функциональных показателей левого желудочка. К неинвазивным методам относится эхокардиография и электрокардиография, которые позволяют отслеживать изменения объема и систолической функции у одного и того же животного в разные временные точки после инфаркта [202]. Стандартом для оценки сердечной функции у грызунов является катетеризация левого желудочка с использованием высокоточных датчиков давления [7]. Для оценки сердечной функции, метаболизма, перфузии, степени фиброза и состояния сосудов также применяется сцинтиграфия и МРТ с использованием различных радиофармпрепаратов [34] [215]. Эти методы дают косвенное представление об ангиогенном процессе и качестве заживления послеоперационной раны. После прижизненной оценки морфофункциональных показателей проводят эвтаназию животных, сердца выделяют и используют для приготовления гистологических препаратов. Обычно препараты окрашивают гематоксилин-эозином и специфическими маркерами клеток сосудов, после чего оценивают площадь постинфарктного фиброза (размеры рубца) и количество сосудов [39] [112] [123].

Несмотря на удобство использования для моделирования инфаркта грызунов, предпочтение отдается моделям с использованием крупных животных. Основное их преимущество по сравнению с более мелкими организмами заключается в том, что сердце крупных животных ближе к человеческому сердцу по размеру, анатомии и функциональным параметрам. Кроме того, для визуализации и проведения лечения (включая выбор дозировки вводимого вещества) можно использовать одно и такое же оборудование и методы, что и для

человека, поэтому в настоящее время в исследованиях ангиогенеза миокарда наиболее широко используются овцы и свиньи [145].

### *1.7.3 Модель заживления кожной раны*

Анализ заживления кожной раны позволяет изучать и оценивать как ангиогенез, так и созревание/ремоделирование сосудов в поврежденных тканях [200]. Анализ обычно проводят на коже мышей, т.к. другие доступные ткани (например, хвост и уши) плохо заживают. В коже спины наркотизированных мышей C57/Bl6 дикого типа проделывают два круглых отверстия (диаметром около 5-8 мм): одно – для введения исследуемого вещества, в то время как другое служит контролем. В этой области кожи нет крупных кровеносных сосудов, поэтому образованные раны мало кровоточат и не требуют использования каких либо повязок. Закрытие раны начинается в течение двух недель, а полное заживление происходит в течение месяца [200]. Исследуемые вещества (про- или антиангиогенные соединения) в данной модели можно вводить либо системно путем инъекции, либо местно.

Для изучения длительно незаживающей раны разработана модель ишемизированного кожного лоскута. В данной модели мышам наносятся полнослойные параллельные разрезы кожи, симметричные позвоночнику (длиной 30 мм, на расстоянии 10 мм друг от друга), при этом для создания ишемии ткани проводят отсечение от полученного лоскута всех крупных сосудов [214].

Процесс раневого заживления оценивается по площади раны, её эпителизации и образованию рубца к 14-м суткам после операции. Анализ ангиогенеза проводится на окрашенных гистологических препаратах срезов кожи [39].

Потенциальный недостаток данной модели заключается в том, что ангиогенез и процессы регенерации в коже сильно отличаются от регенерации других васкуляризованных тканей, таких как, например, сердце и нервная система. Таким образом, информация о механизмах ангиогенеза, полученная на данной модели не позволяет экстраполировать их на другие ткани и органы [165].

#### *1.7.4 Модель кислород-индуцированной ретинопатии*

Интересной моделью для изучения роста сосудов, роли кислорода и факторов роста в ангиогенезе сетчатки является модель ретинопатии, индуцированной кислородом, которая имитирует ретинопатию недоношенных - главную причину детской слепоты. Для данной модели использую новорожденных крысят или мышей, поскольку в отличие от людей, у грызунов при рождении васкуляризация сетчатки ещё не завершена и сохраняются обширные аваскулярные зоны. Моделирование ретинопатии основано на последовательном чередовании условий гипероксии и гипоксии в среде, окружающей крысят (или мышат) сразу после рождения [212] [39]. Сосуды сетчатки визуализируют с использованием методов иммуноокрашивания, *in situ* гибридизации в сочетании с трехмерной визуализацией высокого разрешения с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии [39]. При использовании данной модели стоит учитывать, что восприимчивость к развитию кислород-индуцированной ретинопатии зависит от используемой линии крыс/мышей.

### **1.8 Заключение**

Несмотря на активное развитие медицины, лечение заболеваний, вызванных ишемическими повреждениями остается актуальной проблемой. Существуют лекарственные средства, влияющие на местный кровоток (например, вазодилататоры), однако, практически отсутствуют эффективные и доступные препараты, стимулирующие рост новых сосудов.

Последние тенденции в области ГТ и, в частности, терапевтического ангиогенеза указывают на смещение акцента в сторону разработки комбинированных подходов. Среди многочисленных факторов, регулирующих ангиогенез, особый практический интерес представляет использование АФР. Их многообразие продиктовано многоэтапностью процесса роста и стабилизации кровеносного сосуда и участия в нем большого количества клеток разных типов, взаимодействующих между собой как контактным путем, так и паракринно.

Перспективной для ТА комбинацией АФР является сочетание HGF и VEGF165. Молекулярные взаимодействия между этими факторами и их рецепторными системами достаточно подробно изучены и указывают на то, что при совместном введении возможно потенцирование эффектов, которое целесообразно использовать для повышения эффективности ГТ. Кроме того, HGF обладает противовоспалительными свойствами и может снижать проявления нежелательных явлений, связанных с применением VEGF165. Ещё одним плюсом использования комбинации именно VEGF165 и HGF является наличие на рынке препаратов с каждым из данных АФР по отдельности с доказанной эффективностью и безопасностью («Неоваскулген» - с пДНК VEGF165 и «Collatogene» - с пДНК с HGF).

Для доставки генетического материала в ткани используются как векторы на основе вирусов, так и плазмиды. Последние получают все большее распространение в силу своей безопасности и благодаря совершенствованию механизмов, обеспечивающих эффективную трансфекцию клеток-мишеней. Актуальной является разработка бицистронных конструкций, позволяющих осуществлять одновременную доставку двух и более АФР в составе одного вектора.

Зарегистрированных лекарственных препаратов, основанных на этом принципе, пока не существует, однако активно проводятся КИ. Одним из примеров является препарат VM202 (ViroMed, Южная Корея, США), находящийся на III фазе КИ. Препарат содержит плазмиду, несущую две изоформы гена HGF: HGF728 и HGF723, и предназначен для лечения сердечно-сосудистых заболеваний и болевого синдрома при диабетической нейропатии. Согласно недавним сообщениям, КИ III фазы было остановлено, а затем прекращено из-за отсутствия эффективности в промежуточных конечных точках и возможного смешения групп в испытаниях [104]. Другой пример – препарат, разработанный польскими учеными pIRES/VEGF165/HGF (Вроцлавский медицинский университет, Польша) – пДНК с генами VEGF165 и HGF, разделенными сайтом внутренней посадки рибосом (IRES). Проведенное рандомизированное, но не плацебо-контролируемое и не

«слепое» КИ плазмиды pIRES/VEGF165/HGF на пациентах с критической ишемией ног с сопутствующим сахарным диабетом показало значительное уменьшение боли в состоянии покоя после внутримышечного введения плазмиды по сравнению с контрольной группой. Через 90 дней после введения уровень VEGF165 в сыворотке значительно увеличился, а уровень HGF исследователями не измерялся [11].

Лечение заболеваний, вызванных нарушением кровообращения в настоящее время остается нерешенной медицинской проблемой, одним из способов преодоления которой является использование ТА. Его дальнейшее развитие может идти в нескольких направлениях, однако направление по созданию комбинированных генотерапевтических препаратов с АФР в последние годы становится одним из наиболее актуальных, идет быстрое накопление доклинических и клинических данных, что позволяет рассчитывать на создание в будущем целой линейки препаратов нового поколения, несущих несколько АФР. Таким образом, значительный интерес представляет создание и изучение бицистронной плазмидной конструкции для стимуляции ангиогенеза с генами HGF и VEGF165 человека.

## Глава 2. Материалы и методы

### 2.1 Молекулярные и биохимические методы

#### 2.1.1 Конструирование бицистронных плазмид, кодирующих гены АФР человека

Все используемые плазмиды были созданы на основе модифицированной системы pVAX2, преимуществом которой является факт разрешения ее к использованию FDA США, т.е. данные о безопасности входящих в ее состав компонентов. В качестве генов, кодирующих HGF и VEGF165 использовали нативные последовательности, полученные методом ПЦР.

#### 2.1.2 Рестрикция плазмид с помощью специфических эндонуклеаз

Для анализа пДНК методом электрофореза предварительно проводили рестрикцию плазмид. Реакционная смесь состояла из: 1 мкг ДНК, эндонуклеаз рестрикции и соответствующего данной рестриктазе коммерческого буфера “W+BSA” или “CutSmart”. В работе использовали следующие эндонуклеазы рестрикции (Fermentas, Латвия): CciI, AsuNI, PmeI, XbaI, Bsp13I, PciSI (5 единиц активности для рестрикции/мкг ДНК). Рестрикцию проводили в 20 мкл реакционной смеси, которую инкубировали в течение 12-14 часов при 37°C на шейкере, после чего разделяли полученные фрагменты в агарозном геле.

#### 2.1.3 Электрофорез ДНК

Разделение продуктов рестрикции и полученных пДНК проводили стандартным способом методом электрофореза в агарозном геле. Для этого готовили 1% агарозный гель на трис-ацетатном буфере (ТАЕ), с добавлением 0,1% бромистого этидия, куда вносились образцы, смешанные с 6-кратным буфером для нанесения (Fermentas, Латвия). Для электрофореза использовали буфер ТАЕ (1мМ Na-ЭДТА, pH=8,0, 0,04 М трис-ацетат), напряжение 20 В/см<sup>2</sup>, время - 30-60 мин. Ход электрофореза определяли по лидирующему красителю (бромфеноловый

синий). Оценка результатов проводилась с помощью УФ-трансиллюминатора с использованием маркеров молекулярного веса (Fermentas, Латвия).

#### 2.1.4 Трансформация *E. coli* и бактериальная культура

Для трансформации компетентных клеток *E. coli* штамма DH5 $\alpha$  к размороженным на льду бактериям (объем культуры 150-200 мкл) добавляли 1-2 нг пДНК, инкубировали на льду в течение 30 мин, после чего подвергали обработке так называемым «тепловым шоком». Для этого пробирка с бактериями помещалась в предварительно нагретый до 42°C термостат на 45 сек, после чего переносилась в лёд на 5 мин. После этого 100 мкл полученной культуры переносили в стерильную среду LB (500 мкл) и инкубировали на термошейкере в течение 60 мин (500 об/мин, 37°C). Затем в ламинарном бактериологическом боксе 50 мкл полученной суспензии переносили на заранее подготовленные чашки Петри диаметром 100 мм залитые LB-агаром, содержащим селективирующий агент – канамицин (100 мкг/мл). Суспензию распределяли по поверхности LB-агара с помощью прожжённого стеклянного шпателя Дригальского, после чего чашки с полученной культурой инкубировали при 37°C в течение 15-17 ч. Для контроля трансформации использовали пробу без внесения пДНК (в ней не должен был наблюдаться рост бактерий в LB-агара с канамицином). По окончании инкубации с помощью стерильного шпателя одну из трансформированных бактериальных колоний переносили в жидкую среду LB, содержащую 100 мкг/мл канамицина (15-20 мл, соотношение объема жидкости и воздуха не менее 1:4-1:5). После этого колбу с инокулированной средой помещали в термошейкер на 18 часов (250 об/мин, 37°C). По истечении этого времени полученную культуру переносили в жидкую среду LB со 100 мкг/мл канамицина большого объема (соотношение 1:500) и инкубировали в аналогичных условиях ещё 15-18 ч для получения большого объема бактериальных клеток, содержащих пДНК.

#### 2.1.5 Выделение пДНК из бактериальных культур

Полученную культуру бактерий в среде LB осаждали центрифугированием (6000g, 15 мин), после чего жидкую фазу удаляли, а осадок использовали для выделения пДНК. Лизис, очистку от эндотоксинов и выделение плазмиды

проводили с использованием наборов компании Qiagen (Mega или Giga EndoFree kit) согласно протоколу производителя (Qiagen, США).

## **2.2 Методы оценки биологической активности бицистронных плазмидных конструкций *in vitro***

### *2.2.1 Культивирование HEK293T и клеток эндотелия человека*

В исследовании использовались линейные клетки эмбрионального почечного эпителия человека (HEK293T), а также клетки эндотелия пупочной вены человека (HUVES). Клетки культивировали в стандартном инкубаторе (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) при постоянной влажности. При достижении 70-90% конфлюэнтного монослоя клетки пассировали. Для снятия клеток с культурального пластика использовали 0,05% раствор трипсина/ЭДТА (HyClone, США) и обработку раствором Версена. Клетки линии HEK293T культивировали на среде DMEM с 4,5 г/л D-глюкозы (Life Technologies, США) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС) (Gibco, США) и 100 ед/мл пенициллина и стрептомицина. Клетки эндотелия HUVES культивировали на пластиковых чашках, покрытых желатином в среде EGM-2 (Lonza, Швейцария), также с добавлением антибиотика/антимикотика.

### *2.2.2 Трансфекция HEK293T кальций-фосфатным методом*

Трансфекцию клеток HEK293T проводили кальций-фосфатным способом на 6-луночном планшете по достижении ими 80–90% конфлюэнтного монослоя. Для приготовления трансфекционной смеси использовали буферный раствор 2xHBS (pH=7,10), состоящий из 280 мМ NaCl; 50 мМ HEPES; 1,5 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, к которому по каплям добавляли раствор 0,3 М CaCl<sub>2</sub> с 2 мкг пДНК. Полученную смесь инкубировали 1 мин и по каплям добавляли к среде культивирования HEK293T (DMEM + 10% ФБС, 400 мкл смеси к 2 мл/лунке). Через 15-16 часов среду в клетках заменяли на среду DMEM + 1% ФБС. Через 48 ч среду собирали, откручивали от возможного клеточного дебриса (2000g, 5 мин) и использовали для оценки продукции HGF и VEGF165. Для контроля эффективности трансфекции использовалась репортерная плаزمиды с геном GFP.

### 2.2.3 Модель ангиогенеза *in vitro*

Матригель (356231, Corning, США) размораживали в соответствии с инструкциями производителя. Лунки 48-луночного планшета заполняли 200 мкл матригеля и инкубировали 1 ч при +4°C; после этого избыток Матригеля был удален из лунок. Затем планшет помещали на 15 мин в инкубатор при 37°C для полимеризации матригеля. Эндотелиальные клетки пупочной вены человека (HUVEC) 3-его пассажа культивировали в EGM-2 (Lonza, Швейцария) до 80% конфлюентности. Затем клетки отделяли от пластика с помощью 0,05% раствора трипсин-ЭДТА (Gibco, США), центрифугировали при  $300 \times g$  в течение 5 мин и ресуспендировали в 200 мкл EBM-2. После подсчета клеток суспензию дополнительно разбавляли до концентрации 5 миллионов клеток/мл и добавляли  $50 \times 10^3$  клеток (10 мкл суспензии) в тестируемую и контрольную среду, подготовленные для анализа (200 мкл на каждую лунку планшета). В качестве отрицательного контроля использовали кондиционированную среду, собранную с HEK293T, подвергшихся ложной трансфекции (с 0,5% ФБС), среду DMEM (Life Technologies, США) без ФБС и DMEM с 0,5% ФБС (Hyclone, США) использовали в качестве отрицательного контроля. EGM-2 использовали в качестве положительного контроля. Затем полученные суспензии добавляли в лунки с Матригелем.

Для экспериментов с плазидами на основе IRES использовали систему анализа живых клеток IncuCyte® (Essen BioScience, США). Микрофотографии снимались в режиме фазового контраста с увеличением  $100\times$  каждые 2 ч. Длину трубочек и количество точек ветвления анализировали с помощью программного обеспечения ImageJ (NIH, USA) и плагина Angiogenesis Analyzer (анализатор ангиогенеза) в 5 случайно выбранных полях зрения (ПЗ), взятых в каждой лунке планшета.

### 2.2.4 Модель ангиогенеза *in vitro* с оценкой выживаемости клеток

Приготовление Матригеля и клеток HUVEC проводили, как описано ранее. Суспензии клеток в контрольной или тестируемой среде добавляли в 48-луночный планшет, покрытый матригелем. Планшет переносили в инкубатор системы

анализа живых клеток BioSpra (BioTek, USA). Каждые 4 ч с использованием 4-кратного объектива и одного и того же протокола система выполняла панорамную съемку в светлом поле (12 полей зрения на каждую лунку с их последующим сшиванием). Через 24 ч после начала эксперимента 7 мкл смеси, состоящей из 5 мкл 0,5 мМ Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific, США) и 2 мкл 1 мМ гомодимера этидия (Sigma-Aldrich, США) добавляли непосредственно в лунки для визуализации живых и мертвых клеток (Hoechst 33342 метит ядра всех клеток; а гомодимер этидия - только мертвых клеток). Планшет инкубировали в течение 5 минут, а затем проводили визуализацию в тех же полях зрения, что и раньше, с добавлением каналов 4', 6-диамидино-2-фенилиндола (DAPI) и канале красного флуоресцентного белка (RFP) для обнаружения флуоресцентного сигнала от Hoechst 33342 и гомодимера этидия соответственно. После завершения съемки, которая длилась около 1 часа, лунки планшета промывали один раз средой DMEM (Gibco, США) с 0,5% ФБС (Hyclone, США) для удаления большей части мертвых клеток, и визуализацию проводили снова в тех же полях зрения с теми же настройками. Изображения капиллярно-подобных структур, полученные в светлом поле, анализировали в ImageJ. Расчет общей площади (суммарной площади) объектов, помеченных Hoechst 33342 и / или гомодимером этидия, проводили с использованием программного обеспечения Gen5 (BioTek, США). Индекс выживаемости клеток определяли по формуле:  $\Sigma_{\text{площадь Hoechst}} - \Sigma_{\text{площадь гомодимера этидия}}$ .

### 2.2.5 Модель ангиогенеза *in vitro* с оценкой апоптоза

Для модели ангиогенеза *in vitro* с оценкой апоптоза использовали 96-луночный планшет. Манипуляции с Матригелем проводили, как описано выше; использовали  $20 \times 10^3$  HUVEC и 100 мкл среды на лунку. Для оценки апоптоза использовали зеленый краситель Incucyte® Caspase-3/7 (eBioScience, USA) в конечной концентрации 5 мкМ, который добавляли к суспензиям клеток перед нанесением на планшет. Каждые 4 ч с использованием 4-кратного объектива и одного и того же протокола система анализа живых клеток BioSpra (BioTek, США)

выполняла панорамную съемку в светлом поле и канале GFP (зелёная флуоресценция) (4 поля зрения для каждой лунки с их последующим сшиванием).

Суммарную площадь, занимаемую клетками, рассчитывали по изображениям, полученным в светлом поле, а суммарную площадь активированного зеленого красителя Incucyte® Caspase-3/7 – по изображениям, полученным в канале GFP. Относительную активность каспазы-3/7 определяли по следующей формуле: сумма площади красителя каспазы-3/7 / общую площадь клеток.

## 2.3 Экспериментальные модели

### 2.3.1 Экспериментальные животные

Для анализа эффективности трансфекции *in vivo* использовались мыши линии C57/B6 в возрасте 8–10 недель. Все манипуляции с животными, разработанные в соответствии с национальными и европейскими директивами, были одобрены комиссией по этике и уходу за животными (ФГБУ "НМИЦ кардиологии" Минздрава России, разрешение № 385.06.2009).

### 2.3.2 Инъекция пДНК в скелетные мышцы

Для проведения *ex vivo* экспериментов с последующим выделением мышечных эксплантов стерильные растворы пДНК разводили в 0,9% NaCl и вводили в *m. tibialis anterior* однократно в объеме 100 мкл. Чрескожно игла инсулинового шприца вводилась параллельно продольной оси мышцы, после чего раствор медленно вводился в толщу мышцы во избежание разрыва перимизия. Доза вводимых экспериментальных плазмид составляла 100 мкг на животное, в качестве контроля вводили такой же объём физиологического раствора.

Для повышения эффективности трансфекции при тестировании плазмид, содержащих последовательность IRES, использовался метод низковольтной электропорации, описанный Schertzer и Lynch [159], с минимальной модификацией: было опущено введение гиалуронидазы, описанное в оригинальном методе. Для проведения электропорации использовался генератор импульсных токов постоянной формы марки ВТХ-Harvard apparatus ECM 830 (Harvard apparatus, США). Для этого непосредственно после инъекции плазмид на

кожу, прилегающую к *m. tibialis anterior*, накладывались пластинчатые электроды, смазанные проводящим гелем, и проводилась электропорация тремя импульсами с напряжением 80 В/см частотой 1 гЦ и продолжительностью 20 мсек. После чего полярность электродов менялась и подавалось еще 3 импульса с аналогичными характеристиками. Поле проведения электропорации поверхность кожи очищалась 70% этиловым спиртом.

Введение плазмид bi-HGF/VEGF и рHGF/VEGF проводилось без электропорации.

### 2.3.3 Модель эксплантной культуры скелетной мышцы

На 2 день после внутримышечного введения пДНК образцы *m. tibialis anterior* мышцы выделяли и готовили эксплантную культуру по методу Jang [93]. Для этого выделенные образцы скелетной мышцы промывали раствором антибиотика, разрезали в продольном направлении и высаживали на матригель. Экспланты культивировали в полной среде DMEM с 4,5 г/л D-глюкозы (Life Technologies, США) и 2% ФБС (Gibco, США) при стандартных условиях. На 3 и 7 сутки культивирования эксплантов отбирали образцы культуральной среды для оценки содержания HGF или VEGF165 человека методом ИФА. Для изучения кинетики экспрессии HGF и VEGF165 после введения плазмидного вектора *m. tibialis anterior* мышцей выделяли на 3, 7 и 14 день после введения пДНК.

### 2.3.4 Модель ишемии задней конечности мышцы

Для моделирования ишемии задней конечности использовали самцов мыши линии C57/B6 в возрасте 8–10 недель. Перед операцией мышцей вводили в наркоз с помощью интраперитонеальной инъекции 300 мкл 2,5% раствора авертина. Использовалась модель ишемии задней конечности мышцы, разработанная в более ранних работах нашего коллектива [122] [210]. Кожу надрезали по средней линии бедра левой задней конечности, *a. femoralis* и ее крупные ветви лигировали дистальнее паховой связки и проксимальнее ее подколенной бифуркации. Сосуд иссекали между верхней и нижней лигатурами. После остановки кровотечения кожа ушивалась атравматической иглой (шелк 5–0) непрерывным швом. Все хирургические манипуляции проводились в асептических условиях с

использованием бинокулярного микроскопа. После завершения операции для компенсации кровопотери всем животным подкожно болюсно вводили 1,5 мл тёплого стерильного физиологического раствора и помещали в отдельную клетку до полного выхода из наркоза. Перед введением плазмиды разводили стерильным физиологическим раствором. Растворы вводили тремя равными инъекциями (по 50 мкл каждая) в *anterior tibia muscle*, *femoral biceps muscle* и *femoral quadriceps muscle*.

### 2.3.5 Лазерная доплерография

Оценка восстановления подкожного кровотока задних лап мышей проводилась с использованием лазер-доплеровского сканера (Moor Instruments Ltd, Великобритания). Сканирования проводили сразу после операции и затем на 7-й и 14-й дни. Перед измерением животных наркотизировали при помощи интраперитонеальной инъекции авертина, как было описано выше. Оценка перфузии проводилась на подошвенной поверхности ног животного, для каждой конечности делалось 3-4 измерения, вариабельность данных анализировалась с помощью программного обеспечения Moor Image Review. Показания снимали до получения трёх последовательных измерений с минимальным отклонением (<10%). Для исключения влияния внешних факторов полученные данные нормировали на значения кровотока в противоположной интактной конечности и представляли в виде относительной перфузии (%).

## 2.4 Гистологические методы

### 2.4.1 Иммунофлуоресцентная визуализация и подсчет сосудов

На 14-й день после введения плазмид животных умерщвляли путем летальной ингаляции изофлурана. Ишемизированные *m. tibialis anterior* выделяли и замораживали в среде TissueTek medium (Sakura Finetek, Нидерланды). Срезы толщиной 7 мкм готовили с помощью криотома Microm HM 505E (MICROM International GmbH, Германия) и хранили при  $-70^{\circ}\text{C}$ . Для иммунофлуоресцентного анализа срезы *m. tibialis anterior* фиксировали на предметных стеклах ацетоном, охлажденным до  $-20^{\circ}\text{C}$  в течение 20 минут, высушивали и промывали раствором PBS 5 мин. Предметные стекла блокировали 10% нормальной ослиной сывороткой (30 мин), промывали и инкубировали в течение ночи с первичными антителами

(крысиные антитела против CD31 мыши, #553370 BD Biosciences Pharmingen, США; кроличьи антитела против  $\alpha$ -гладкомышечного актина ( $\alpha$ -SMA), (#56945, Abcam, США), разбавленными блокирующим раствором (1% BSA в PBS). После этого срезы окрашивали вторичным антителом, конъюгированным с Alexa Fluor® 488 (#A21206, Thermo Scientific®, США) или вторичными антителами, конъюгированным с Alexa Fluor® 594 (#A21209, Thermo Scientific®, США) (1:800) в течение 1 ч; все стекла контрастировали с помощью красителя DAPI (40,6-диамидино-2-фенилиндол) (Sigma-Aldrich, США). После этого препараты промывали раствором ФСБ и заключали в среду Aqua polymount (Polysciences inc, США) под покровными стеклами. Микрофотографии срезов получали при 200-кратном увеличении в 5 случайных полях зрения с использованием Zeiss Axio Observer A1 (Zeiss, Германия). Полученные изображения анализировали с помощью программного обеспечения ImageJ (NIH, США). Количество CD31-положительных и  $\alpha$ -SMA-положительных структур (>30 мкм в диаметре) подсчитывалось в 2-3 полях зрения с 5-6 срезов для каждого образца, после чего рассчитывалось среднее количество структур на поле зрения для каждого животного и для каждой исследуемой группы.

#### *2.4.2 Окраска гематоксилином и эозином и морфометрический анализ площади некроза*

Срезы фиксировали 4% формальдегидом, промывали в ФБС, ополаскивали дистиллятом и инкубировали в гематоксилине 1 мин. Для дифференцировки срезы промывали водопроводной водой, затем погружали в эозин В на 3 мин. Далее срезы проводили по спиртам и заключали под покровными стеклами. Окрашенные срезы использовали для анализа некротической ткани. Мышцы фотографировали, как описано выше, и рассчитывали соотношение некротизированной/жизнеспособной ткани с использованием программы ImageJ. Некроз мышц заключался в разрушения волокон, кариолизисе, фиброзе и инфильтрации тканей клетками воспаления.

## 2.5 Статистическая обработка данных

Данные представлены в формате среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение или стандартная ошибка среднего. Статистическую обработку результатов выполняли при помощи программного пакета Statsoft Statistica 13.0. Характер распределения значений в группах оценивался с использованием критерия Колмогорова-Смирнова. Для определения значимости различий между группами использовали t-критерий Стьюдента (для выборок с нормальным распределением) или U-критерий Манна-Уитни (для выборок с непараметрическим распределением величин). При сравнении нескольких групп или подгрупп использовали дисперсионный анализ (ANOVA) или его вариант для непараметрических показателей – метод Крускала-Уоллиса. Значимыми считали отличия с  $p < 0,05$ , при необходимости вводили поправку Бонферрони.

## Глава 3. Результаты

### 3.1 Создание и оценка экспрессионной активности бицистронных плазмидных векторов, содержащих IRES, разделяющую гены HGF и VEGF165

#### 3.1.1 Создание бицистронного вектора, содержащего IRES для одновременной экспрессии АФР

Бицистронный вектор – генетическая конструкция, одновременно несущая два гена целевых белков. Изучаемые плазмидные конструкции с генами АФР были созданы на основе вектора pVax2 – модифицированного коммерческого вектора pVax1 (Thermo Fisher Scientific, США). Модификация заключалась во вставке SV40 энхансера между CMV промотором и CMV энхансером pVax1 и замене гена устойчивости к канамицину KanR. Преимуществом данной генетической конструкции является факт разрешения ее к использованию FDA США, т.е. данные о безопасности входящих в ее состав компонентов. Полученный вектор содержал следующие функциональные элементы, обеспечивающие высокий уровень экспрессии трансгена: промотор pCMV ранних генов цитомегаловируса человека, энхансер промотора pCMV, последовательность инициации трансляции, ген устойчивости к канамицину (для селекции трансформированных бактерий) и сигнал полиаденилирования мРНК гена гормона роста быка (bGF poly(A)). Далее в него были клонированы последовательности кДНК HGF и VEGF165 человека.

Для проведения сравнительных исследований была получена панель плазмидных конструкций, кодирующих гены HGF и VEGF165 человека и отличающихся по последовательности IRES, используемой для обеспечения одновременной экспрессии АФР. Для наработки плазмидной ДНК были использованы компетентные бактерии *E. coli* штамма DH5 $\alpha$ . Выделение пДНК проводилось с использованием наборов Qiagen Endofree согласно протоколу

производителя, полученные пДНК растворяли в 0,9% NaCl. Все полученные векторы и последовательности кДНК были проанализированы рестрикционным методом и ДНК-секвенированием.

Известно, что эффективность трансляции белка, идущего после последовательности IRES ниже таковой для белка, закодированного перед данной последовательностью, однако соотношения количеств белков мало предсказуемо и может различаться в десятки раз в зависимости от используемой последовательности IRES. Для пилотных экспериментов мы использовали IRES вируса энцефаломиокардита (EMCV) в качестве референсного, часто используемого для экспрессии в клетках млекопитающих. Нами были созданы плазмидные конструкции VEGF-EMCV\_IRES-HGF и HGF-EMCV\_IRES-VEGF (см. Рисунок 5А), отличающиеся расположением генов HGF и VEGF165 относительно последовательности IRES.

Для анализа продукции АФР данными плазидами трансфицировали клетки линии HEK293Т, после чего количество HGF и VEGF165 в среде культивирования клеток оценивали методом ИФА. Предварительное тестирование на культуре HEK293Т показало, что трансфекция вектором VEGF-EMCV\_IRES-HGF приводила к очень низкой продукции VEGF165 - 1,1 нг/мл - в отличие от обычно наблюдаемого  $\approx 100$  нг/мл [122] [123], а содержание HGF был ниже предела обнаружения, что исключало дальнейшее применение конструкции VEGF-EMCV\_IRES-HGF. Использование плазмидной конструкции HGF-EMCV\_IRES-VEGF обеспечивало продукцию обоих целевых белков, и на основе данной плазмиды было создано несколько вариантов генетических конструкций, различавшихся IRES, клонированной между генами.

Нами были использованы следующие варианты последовательностей IRES (последовательности IRES приведены в приложении):

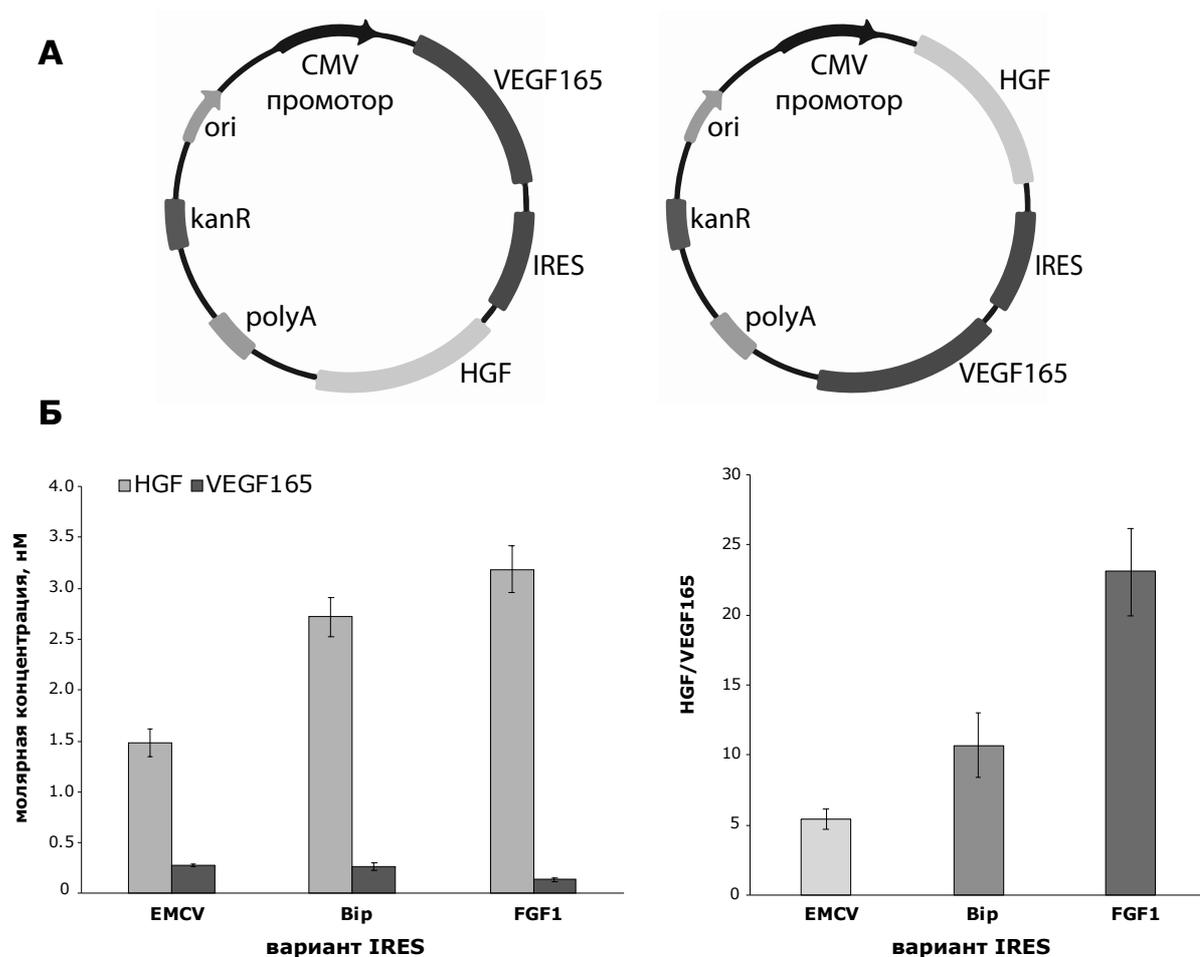
- 1) IRES вируса энцефаломиокардита (EMCV)
- 2) IRES гена белка-шаперона тяжелой цепи иммуноглобулинов (Bir, binding immunoglobulin protein)
- 3) IRES гена кислотного фактор роста фибробластов (FGF1)

- 4) IRES гена эукариотического фактора инициации трансляции (EIF4G, eukaryotic translation initiation factor 4 G)

### *3.1.2 Сравнительная оценка продукции HGF и VEGF165 трансфицированными клетками HEK293T*

Клетки HEK293T трансфицировали описанными выше плазмидами с помощью кальций-фосфатного метода. Эффективность трансфекции оценивалась по количеству GFP-позитивных клеток после трансфекции «контрольной» плазмидой pAAV-CMV-GFP и составила около 75%. Через 48 часов после трансфекции, среда культивирования собиралась для последующей оценки содержания факторов роста с помощью ИФА.

Концентрации HGF и VEGF165 в среде культивирования трансфицированных клеток, а также их соотношение представлены на рисунке 1В. При использовании всех вариантов плазмид наблюдалась продукция обоих АФР, однако, синтезировались относительно небольшие количества VEGF165, а соотношения концентраций HGF/VEGF165 составляли 5,3:1 («EMCV»), 10,7:1 («Vip») и 23:1 («FGF1») в образцах, в которых были детектированы оба АФР (см. Рисунок 5Б). При использовании конструкции, несущей IRES eIF4G, концентрации обоих АФР были близки к нижнему пределу обнаружения (данные не показаны), поэтому в дальнейшей работе данный вектор не использовался. Предыдущие исследования с введением смеси плазмид с генами HGF и VEGF165 показали, что оптимальным для стимуляции ангиогенных процессов являются соотношения, близкие к эквимолярным [122] [123], поэтому конструкция с IRES гена FGF1 не имела перспектив для дальнейшего фармакологического изучения.



**Рисунок 5. Схемы плазмид, содержащих IRES, и результаты анализа их экспрессионной активности в культуре HEK293T.**

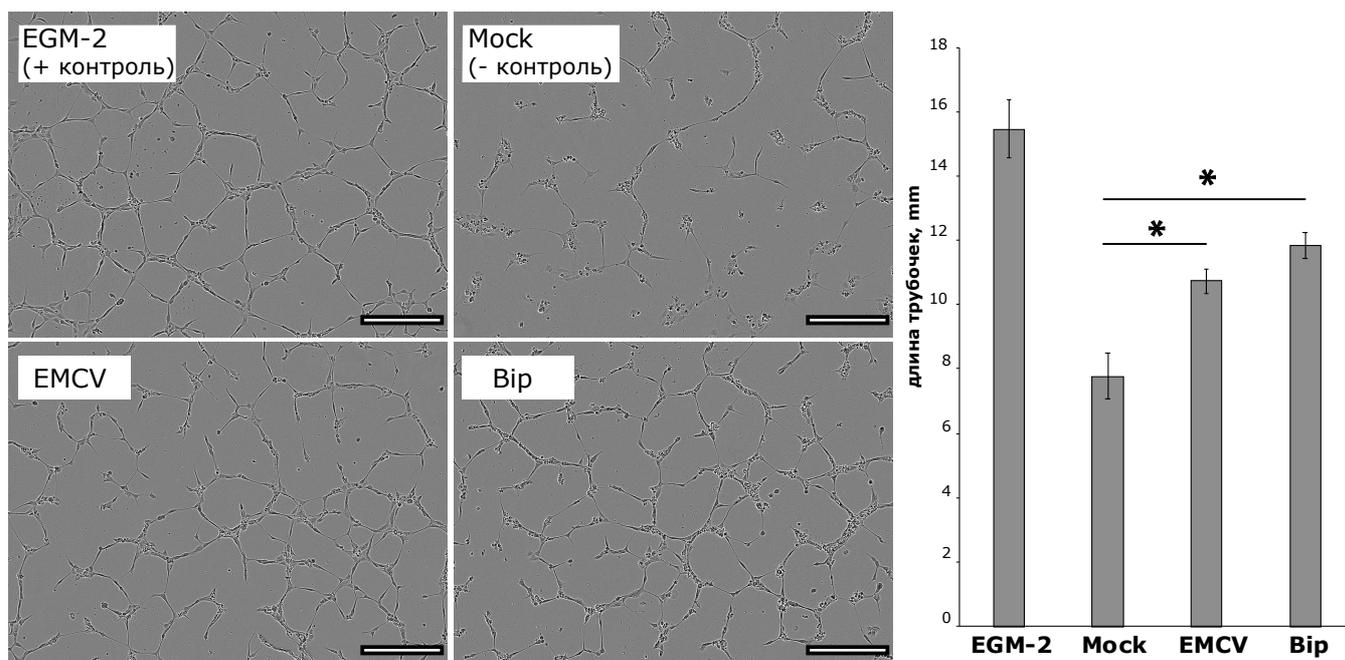
А. Плазмидные векторы на основе IRES для экспрессии HGF и VEGF165 человека с альтернативными конструкциями: (слева) ген VEGF165 перед EMCV\_IRES или (справа) ген HGF перед EMCV\_IRES.

Б. Молярные концентрации HGF и VEGF165 (слева) и их отношения (справа) в культуральной среде, собранной с трансфицированных клеток HEK293T. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Результаты представлены только для образцов, в которых детектировались оба АФР.

### 3.1.3 Оценка на культуре клеток HUVEC ангиогенной активности HGF и VEGF165, секретируемых после трансфекции клеток HEK293T плазмидами «EMCV» и «Vip»

Для оценки специфической фармакологической активности секретируемых клетками HEK293T HGF и VEGF165 была использована модель ангиогенеза *in vitro* (“tube assay”). Для этого клетки эндотелия сосудов – HUVEC высаживались на Матригель, после чего к ним добавлялась кондиционированная среда, содержащая HGF и VEGF165, наработанные HEK293T после трансфекции плазмидами «EMCV» и «Vip» (см. Материалы и методы). После 10-16 часов инкубации в культуре HUVEC отмечалось формирование тубулоподобных структур. В качестве положительного контроля использовалась полная среда культивирования HUVEC – EGM-2, содержащая VEGF165, а отрицательным контролем служила среда, собранная с клеток HEK293T, подвергшихся «ложной» трансфекции (клетки, обработанные трансфицирующими агентами без добавления плазмидной ДНК, или «тосок»). Длина и количество точек ветвления образованных сосудоподобных структур оценивалась по фотографиям с помощью программы ImageJ.

Инкубация HUVEC со средами, собранными с трансфицированных исследуемыми плазмидами HEK293T, стимулировала образование капиллярноподобных структур, при этом максимальный эффект наблюдался через 10 ч от начала стимуляции (см. Рисунок 6). Длина образовавшихся «трубочек» и число точек ветвления были значимо выше при инкубации со средами, собранными с HEK293T после трансфекции плазмидами, по сравнению с контрольными средами.



**Рисунок 6. Результаты формирования капилляроподобных структур клетками HUVEC после инкубации с культуральными средами, собранными с HEK293T, трансфицированных плазмидными векторами на основе IRES.**

В образцах «Vip» и «EMCV» длина трубочек была достоверно выше по сравнению с «mock» контролем (среда с ложно трансфицированных HEK293T на основе DMEM с 0,5% ФБС); количество точек ветвления было достоверно больше в образцах «Vip» и «EMCV». В качестве положительного контроля использовали среду для роста эндотелия (EGM-2), а в качестве отрицательного контроля среду с HEK293T, которые были обработаны смесью для трансфекции без добавления пДНК (ложная трансфекция, или «mock»). Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего. (\*)  $p < 0,05$ . Масштабный отрезок соответствует 300 мкм.

Таким образом, трансфекция клеток человека тестируемыми плазмидными конструкциями «Vip» и «EMCV» с генами HGF и VEGF165 приводила к экспрессии целевых белков, для которых была показана биологическая активность, заключающаяся в стимуляции образования капилляроподобных структур эндотелиоцитами HUVEC на Матригеле.

### *3.1.4 Продукция человеческих HGF и VEGF165 в эксплантной культуре скелетной мышцы мыши после введения IRES-содержащих плазмид с генами АФР*

Основным параметром пригодности вектора для фармацевтической разработки является его способность обеспечивать экспрессию целевых белков в ткани. Для оценки продукции HGF и VEGF165 была использована модель эксплантной культуры скелетных мышц, культивируемых *ex vivo* (см. Методы).

Целевые АФР не обнаруживались в среде культивирования мышечных эксплантов после инъекции плазмиды с IRES EMCV. В образцах среды культивирования мышц, в которые вводилась плазида с IRES *Bip*, детектировали HGF ( $718,67 \pm 10,59$  и  $477,00 \pm 8,32$  пг/мл на 3-й и 7-й дни соответственно), а количество VEGF165 было ниже пределов обнаружения. Таким образом, протестированные бицистронные плазмиды с последовательностями IRES оказались неэффективными для одновременной доставки HGF и VEGF165 в скелетные мышцы мыши.

По сумме проведенных экспериментов ни одна из генотерапевтических конструкций, включающих последовательность IRES, не показала свойств, необходимых для дальнейшей разработки.

## **3.2 Создание бицистронных векторов с двунаправленным промотором и независимыми промоторами для одновременной экспрессии HGF и VEGF165 и оценка продукции АФР трансфицированными клетками HEK293T**

### *3.2.1 Создание бицистронных векторов с двунаправленным промотором или независимыми промоторами для одновременной экспрессии HGF и VEGF165*

В качестве альтернативных векторов для одновременной продукции двух АФР на основе вектора pVAX2 были сконструированы две конструкции (см. Рисунок 7А):

- Вектор «pHGF/VEGF», в котором гены HGF и VEGF165 имеют собственные промоторы.

Основные элементы конструкции:

- Эnhансер 1 – CMV enhancer

- Промотор 1 - pCMV (промотор цитомегаловируса)
- Последовательность гена HGF
- Терминатор 1 – bGH poly A (участок полиаденилирования гена бычьего гормона роста)
- Энхансер 2 – CMV enhancer
- Промотор 2 - pCAG (промотор гена  $\beta$ -актина цыпленка)

Последовательность гена VEGF165

- Терминатор 2 – SV40 poly A (участок полиаденилирования вируса SV40)

Регуляторные элементы экспрессии и трансляции конструкции в бактерии *E. coli*:

- Точка начала репликации (ori)
- маркер для отбора трансформированных бактерий – ген устойчивости к канамицину
- Вектор «bi-HGF/VEGF», включающий общий для генов HGF и VEGF165 двунаправленный промотор цитомегаловируса (CMV).

Основные элементы конструкции:

- Энхансер 1 – CMV enhancer
- двунаправленный промотор - pCMV
- Последовательность гена HGF
- Терминатор 1 – bGH poly A
- Последовательность гена VEGF165
- Гибридный (химерный) интрон
- Терминатор 2 – SV40 poly A

Регуляторные элементы экспрессии и трансляции конструкции в бактерии *E. coli*:

- Точка начала репликации (ori)
- Селективный маркер для отбора трансформированных бактерий – ген устойчивости к канамицину

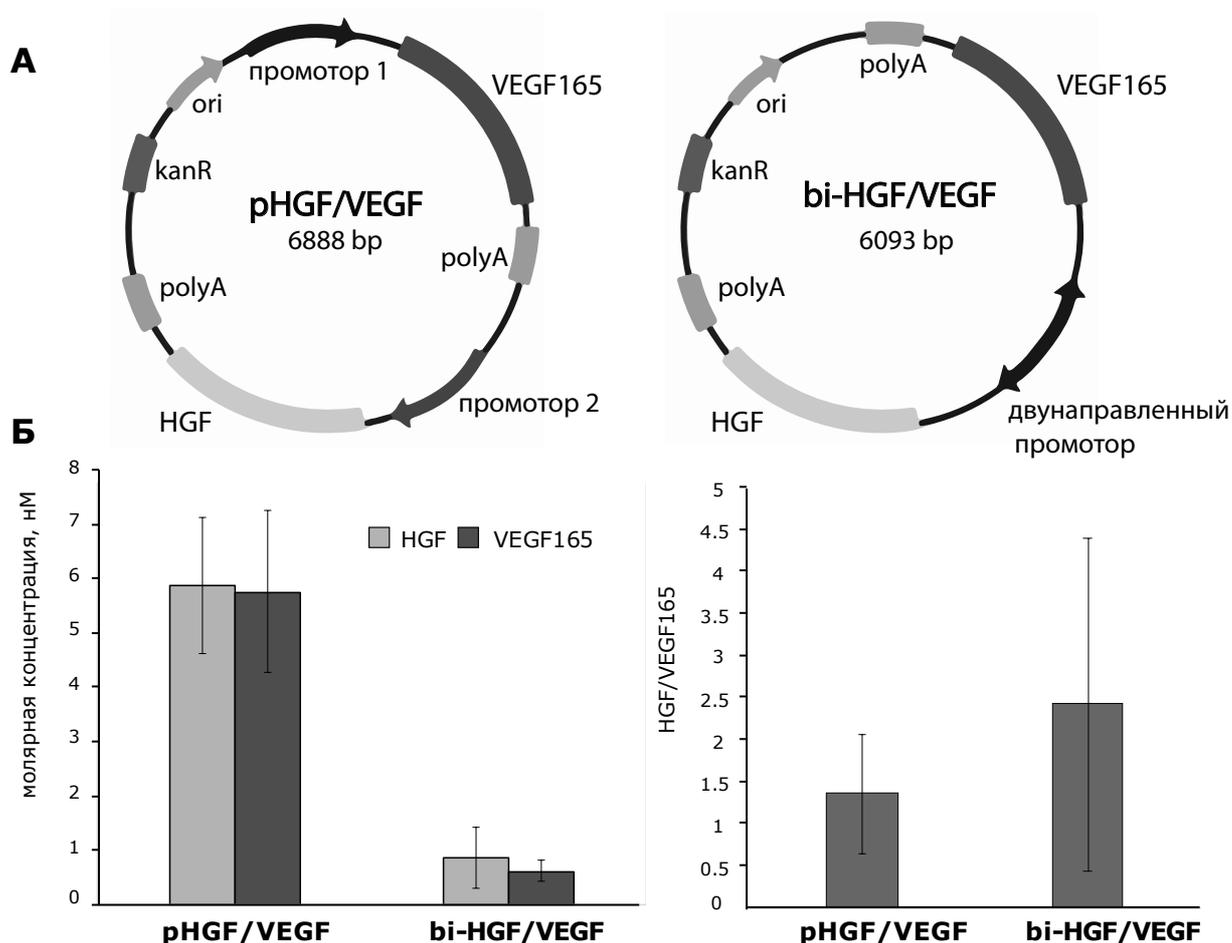
Векторы были наработаны в компетентной культуре *E. coli* штамма DH5 $\alpha$ .

Выделению и очистку пДНК проводили с использованием набора Qiagen Plasmid

EndoFree Giga Kit. Качество выделенных векторов было подтверждено рестрикционным анализом с последующим электрофорезом в агарозном геле.

### 3.2.2 *In vitro* оценка эффективности плазмидных векторов с двунаправленным промотором CMV или с двумя независимыми промоторами CMV и CAG с генами HGF и VEGF165

Полученные пДНК использовали для трансфекции клеток HEK293T и последующей оценки содержания синтезированных АФР в среде культивирования методом ИФА, результаты которого представлены на Рисунке 7Б.



**Рисунок 7.** Схемы бицистронных плазмид и результаты анализа их экспрессионной активности в культуре HEK293T.

А. Схемы созданных бицистронных плазмидных векторов: рHGF/VEGF с двумя независимыми промоторами для каждого гена и bi-HGF/VEGF с двунаправленным CMV промотором.

Б. Молярные концентрации HGF и VEGF165 (слева) и их отношения (справа) в культуральной среде, собранной с трансфицированных клеток HEK293T. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего.

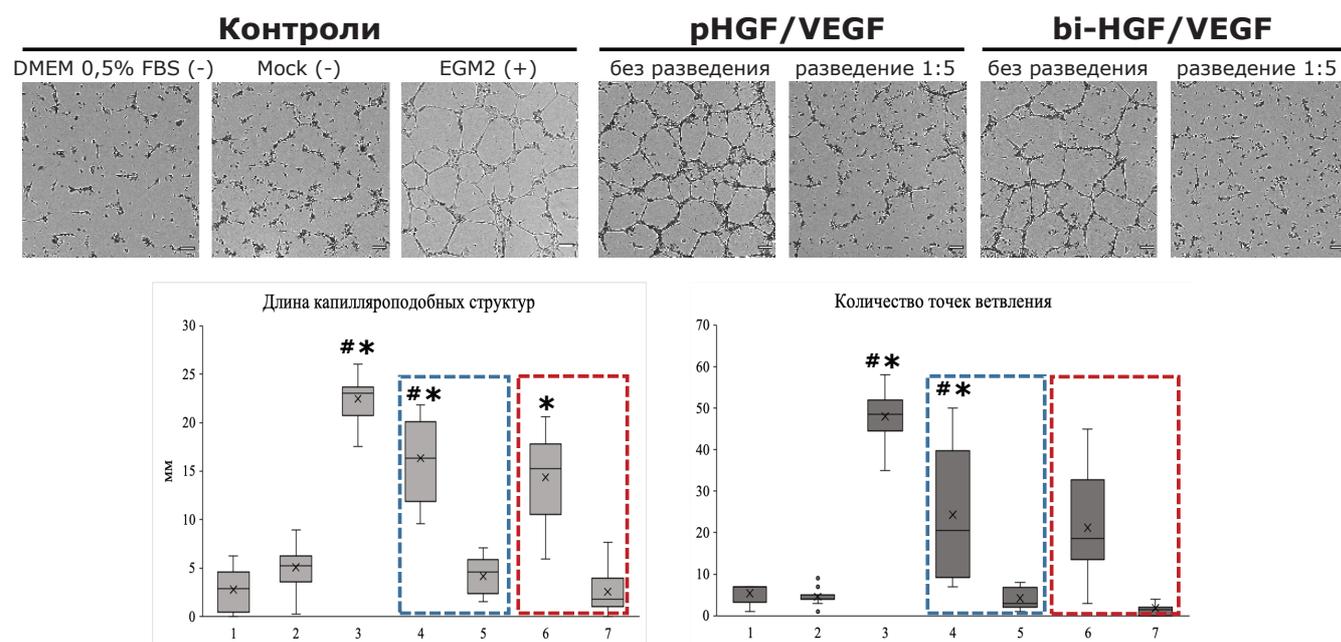
При использовании обеих созданных плазмид наблюдалась значимая продукция АФР, а концентрации белков были выше при трансфекции клеток вектором рHGF/VEGF с двумя независимыми промоторами. Соотношения молярных концентраций HGF/VEGF165 для плазмид рHGF/VEGF и bi-HGF/VEGF составили 1,38:1 и 2,47:1, соответственно.

### *3.2.3 Оценка на культуре HUVEC ангиогенной активности HGF и VEGF165, секретируемых после трансфекции клеток HEK293T плазмидами «рHGF/VEGF» и «bi-HGF/VEGF»*

Оценка биологической активности секретируемых АФР трансфицированными клетками HEK293T проводилась на модели ангиогенеза *in vitro*, описанной ранее. АФР, наработанные в культуре HEK293T обладали способностью стимулировать образование сосудоподобных структур клетками эндотелия. Общая длина капилляроподобных структур была значимо выше для рHGF/VEGF и bi-HGF/VEGF по сравнению с отрицательным контролем - DMEM + 0,5% ФБС. Показатели тубулогенеза также были значимо выше в образце рHGF/VEGF по сравнению с контрольным образцом (ложная трансфекция, или «mock»).

В высоких концентрациях HGF увеличивает подвижность и миграцию эндотелиальных клеток, что может привести к быстрой дестабилизации и разборке образующихся капилляроподобных структур. Это явление первоначально было названо рассеиванием («scattering») и стало причиной того, что в ранних исследованиях HGF упоминался как scattering factor [120] [201]. В культуральной

среде с трансфицированных НЕК293Т детектировалось относительно высокое содержание HGF ( $6,05 \pm 2,25$  нМ для рHGF/VEGF), поэтому для проведения оценки ангиогенеза в *in vitro* модели мы ввели две дополнительные экспериментальные группы с разведенной (1:5) культуральной средой, собранной после трансфекции обеих плазмид. В данных образцах («разведение рHGF/VEGF 1: 5» и «разведение bi-HGF/VEGF 1:5») стабильного образования капилляроподобных структур ожидаемо не наблюдалось (см. Рисунок 8).



**Рисунок 8. Оценка ангиогенной активности HGF и VEGF165, нарабатываемых в культуре НЕК293Т после трансфекции изучаемыми плазмидными конструкциями.**

Цифровые обозначения: 1 – DMEM+0,5% ФБС (отрицательный контроль); 2 - Mock (отрицательный контроль); 3 - EGM-2 (положительный контроль); 4 - «рHGF/VEGF» (без разведения); 5 - «рHGF/VEGF» (разведение 1:5); 6 - «bi-HGF/VEGF» (без разведения); 7 - «bi-HGF/VEGF» (разведение 1:5).

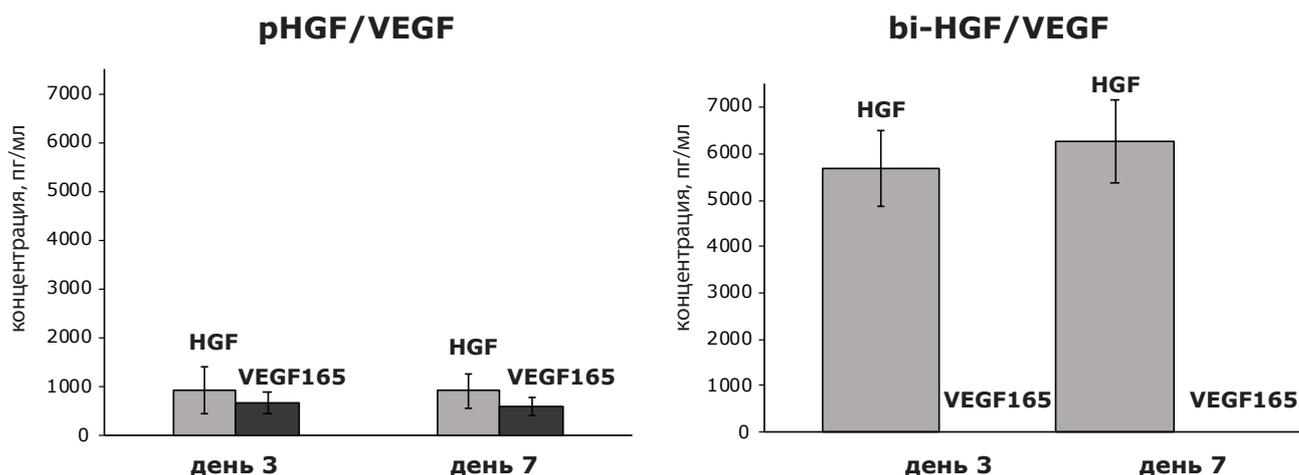
Для общей длины трубочек: (\*)  $p < 0,05$  по сравнению отрицательным контролем DMEM+0,5% ФБС для положительного контроля EGM-2, рHGF/VEGF и bi-HGF/VEGF; (#)  $p < 0,05$  по сравнению с «mock» отрицательным контролем для EGM-2 и рHGF/VEGF.

Для количества точек ветвления: (\*)  $p < 0,05$ , по сравнению с отрицательным контролем DMEM+0,5% ФБС для EGM-2 и rHGF/VEGF; (\*#)  $p = 0,05$  по сравнению с «топок» контролем для EGM-2 и rHGF/VEGF. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Масштабный отрезок соответствует 100 мкм.

### *3.2.4 Исследование продукции целевых белков HGF и VEGF165 в эксплантной культуре скелетных мышц мыши*

Исследование продукции целевых белков HGF и VEGF165 в эксплантной культуре проводилось по ранее описанному методу. При использовании плазмиды bi-HGF/VEGF в эксплантах, выделенных на 3-й день после инъекции наблюдалась продукция только HGF, причем его количество в несколько раз превышало значения, полученные при введении других сконструированных плазмид, а продукция VEGF165 была ниже предела обнаружения метода ИФА.

Введение rHGF/VEGF приводило к эффективной трансфекции и продукции значительных количеств обоих факторов роста мышечными эксплантами, выделенными на 3-й день после инъекции плазмиды (см. Рисунок 9). Содержание HGF и VEGF165, продуцированных эксплантами после инъекции, составило 0,35 и 0,81 нг/мл соответственно на 3 день и 0,49 и 0,82 нг/мл на 7-й день. Соотношение молярных концентраций HGF/VEGF165 равнялось 0,24 на 3-й день и 0,32 на 7-й день.



**Рисунок 9.** Содержание человеческих АФР в среде культивирования мышечных эксплантов, выделенных на 3-й и 7-й день после инъекции мышам плазмид **rHGF/VEGF** и **bi-HGF/VEGF**. Массовые концентрации HGF и VEGF165 в среде культивирования мышечных эксплантов после инъекции плазмиды **rHGF/VEGF** (слева) и **bi-HGF/VEGF** (справа). Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего.

### *3.2.5 Оценка продолжительности продукции факторов роста после однократного введения плазмиды **rHGF/VEGF** в скелетную мускулатуру мыши*

Для исследования длительности экспрессии HGF и VEGF165 после в/м введения 100 мкг вектора **rHGF/VEGF** в скелетную мышцу мышей использовались экспланты, выделенные на 3-й, 7-й и 14-й день после инъекции. Кондиционированную среду собирали на 3-й и 7-й дни культивирования эксплантов, анализ содержания АФР человека проводился методом ИФА.

Введение **rHGF/VEGF** приводит к эффективной трансфекции и продукции значительных количеств обоих факторов роста мышечными эксплантами, выделенными на 3-й день после инъекции плазмиды. Средняя концентрация VEGF165 составила  $760,0 \pm 174,9$  пг/мл, HGF -  $828,3 \pm 302,2$  пг/мл на 3-й день и  $711,75 \pm 171,3$  пг/мл и  $609,7 \pm 261,1$  пг/мл для VEGF165 и HGF, соответственно, на 7-й день культивирования эксплантов. Отношение массовых концентраций

HGF/VEGF165, синтезируемых мышечными эксплантами, было почти одинаковым: 1,08 и 0,86 на 3-й и 7-й дни соответственно (см. Таблицу 2).

В образцах, выделенных на 7-й и 14 дни после инъекции плазмиды VEGF165 не обнаруживался - вероятно, его количество было ниже предела обнаружения ИФА. При этом в эти же временные точки мы детектировали значимые количества HGF. Концентрация HGF, синтезируемого мышечными эксплантами, была в несколько раз ниже, чем на 3-е сутки:  $163,5 \pm 10,7$  и  $226,0 \pm 33,9$  пг/мл на 7-е и 14-е сутки соответственно. Следует отметить, что данный метод установления кинетики экспрессии АФР ограничен особенностями подготовки культуры эксплантов: возможно механическое повреждение мышцы при выделении и перед посадкой на Матригель, так же возможна диффузия АФР в Матригель.

Таблица 2

Время культивирования экспланта	Инъекция + 3 дня*		Инъекция + 7 дней		Инъекция + 14 дней	
	VEGF пг/мл	HGF пг/мл	VEGF пг/мл	HGF пг/мл	VEGF пг/мл	HGF пг/мл
3 дня	$760,0 \pm 174,9$	$828,3 \pm 302,2$	ND***	$163,5 \pm 10,7^{**}$	ND	$226,0 \pm 33,9^{**}$
7 дней	$711,75 \pm 171,3$	$609,7 \pm 261,1$	ND	ND	ND	ND

\* n = 4 на точку ИФА (дни 3 и 7 выделения эксплантов)

\*\* n = 2 на точку ИФА (дни 3 и 7 выделения эксплантов), в других образцах - ND

\*\*\* ND означает «не обнаружено».

### 3.3 Сравнительная оценка продукции HGF и VEGF165 различными вариантами плазмид

В таблице ниже приведены результаты оценки содержания АФР в кондиционированной среде после *in vitro* и *in vivo* трансфекции плазмид различного дизайна, одновременно кодирующих HGF и VEGF165 (см. Таблицу 3). Полученные данные показывают, что векторы, несущие последовательность IRES для осуществления одновременной экспрессии двух АФР обеспечивают синтез белков *in vitro*, однако их количества и соотношения концентраций различаются в зависимости от выбранного IRES. Использование конструкции с двумя отдельными промоторами для каждого из генов обеспечивало продукцию АФР в больших концентрациях, различающихся не более чем в 1,5 раза.

Таким образом, из 7 протестированных бицистронных векторов единственным вектором, показавшим эффективность *in vitro* и *ex vivo* являлся рHGF/VEGF и по сумме результатов данная конструкция стала единственным кандидатом для дальнейшей разработки генотерапевтического лекарственного средства на ее основе.

Таблица 3. Сравнение экспрессии HGF и VEGF165 *in vitro* и *ex vivo* при использовании бицистронных плазмид разного строения

вариант вектора	Экспрессия АФР <i>in vitro</i>			Экспрессия АФР <i>ex vivo</i>					
название	концентрация, нМ		соотношение HGF/VEGF165 5	концентрация, нг/мл				соотношение HGF/VEGF165	
	HGF	VEGF165		HGF день 3	HGF день 7	VEGF165 день 3	VEGF165 день 7	день 3	день 7
EMCV	1,48	0,28	5,42	0	0	0	0	-	-
Bip	2,72	0,27	10,7	0,72	0,48	0	0	-	-
FGF1	0,08	1,59	11,38	0	0	0	0	-	-
bi-HGF/VEGF	0,91	0,64	2,47	5,69	6,28	0	0	-	-
рHGF/VEGF	6,05	5,92	1,38	1,14	1,3	0,5	0,19	2,28	6,67

### 3.4 Оценка ангиогенной эффективности бицистронной плазмиды рHGF/VEGF с генами VEGF165 и HGF на мышинной модели ишемии задней конечности

#### 3.4.1 Обоснование выбора модели для изучения фармакологической активности

Для оценки терапевтической эффективности генотерапевтической конструкции рHGF/VEGF в отношении восстановления перфузии ишемизированной ткани, мы использовали мышиную модель ишемии задних конечностей, разработанную ранее для линии мышей C57/B6 [38] и оптимизированную в лаборатории ангиогенеза Института экспериментальной кардиологии НМИЦ Кардиологии Минздрава РФ [184]. Данная модель воспроизводит состояние критической ишемии конечности у человека и использовалась для исследования терапевтического ангиогенеза в предыдущих работах наших коллег [122] [210] [216].

После иссечения бедренной артерии (a. femoralis) одной из задних конечностей у животных наблюдалось сравнимое снижение скорости перфузии до, приблизительно, 10% по сравнению с интактной конечностью, что указывало на развитие тяжелой ишемии. После индукции односторонней ишемии животных рандомизировали для введения экспериментальных или контрольных растворов в следующие терапевтические группы:

- 1) «pHGF/VEGF» - однократное введение pHGF/VEGF (150 мкг), n = 9
- 2) «pHGF/VEGF» - однократное введение pHGF/VEGF (75 мкг), n = 7
- 3) «пустой вектор» - группа отрицательного контроля с однократным введением экспрессионного вектора, не несущего терапевтических генов (коммерчески доступный pVAX2) (150 мкг), n = 7
- 4) «физиологический раствор» - отрицательный контроль растворителя, группа с введением 0,9% NaCl (150 мкл), n = 8.
- 5) «Неоваскулген» - группа сравнения с однократным введением плазмиды pVEGF165 (150 мкг), n = 8.

Выбор «Неоваскулгена» в качестве положительного контроля обусловлен тем, что данный препарат представляет собой средство для ГТ, обладающее ангиогенным действием за счёт экспрессии VEGF165, и применяется для реваскуляризации при ишемии нижних конечностей.

Внутримышечный инъекционный путь введения обусловлен природой вводимого вещества - плазмиды представляют собой незащищенную ДНК, которая при внутривенном введении подвергается деградации под действием эндонуклеаз, а также захватывается клетками печени и элиминируется за счет фагоцитоза [130]. По данным Kawabata, Takakura и Hashida период полувыведения незащищённой пДНК в плазме крови мышей при внутривенном введении составляет около 10 мин [100], поэтому внутримышечное введение плазмид представляется более перспективным.

Основываясь на предыдущих работах нашей лаборатории по изучению ангиогенной активности смеси плазмид с генами HGF и VEGF165 и литературных данных [184] [122] [152], оптимальной для введения была выбрана доза 150 мкг

пДНК на животное. Перед введением плазмиды разводились в 150 мкл 0,9% NaCl. Для увеличения эффективности пДНК вводились по ходу конечности по 50 мкл (50 мкг) в переднюю большеберцовую мышцу, двуглавую и четырехглавую мышцы бедра. Такой объем введения был выбран поскольку ранее было показано, что оптимальным объемом для внутримышечного введения мышам является 25-50 мкл, а введение больших количеств приводит к «утечке» вещества из мышечной ткани [72].

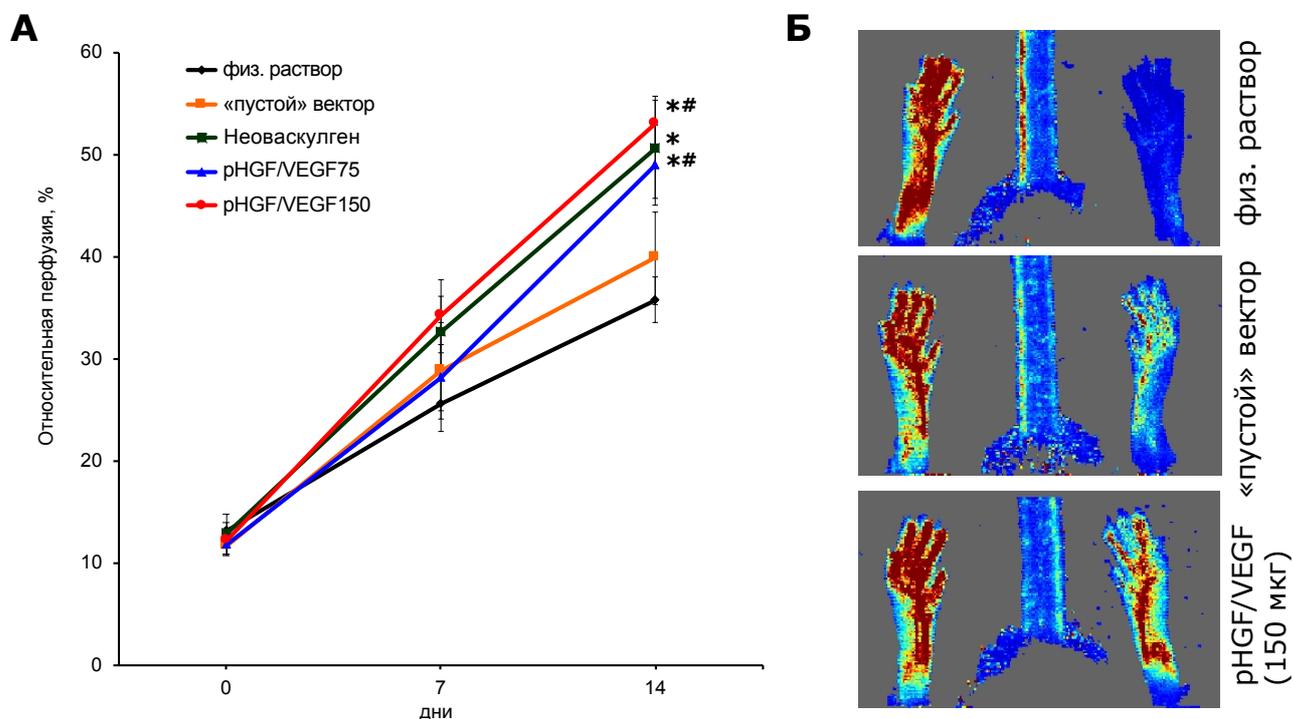
Поскольку известно, что мыши линии C57/B6 обладают выраженной способностью к восстановлению кровоснабжения после ишемии, для оценки восстановления перфузии были выбраны первые 14 дней после индукции ишемии конечности.

В качестве критериев эффективности тестируемой генотерапевтической конструкции использовались: оценка восстановления перфузии в ишемизированной конечности, площадь некроза, а также плотность капилляров и артериол на гистологических препаратах передней большеберцовой мышцы.

#### *3.4.2 Восстановление кровотока в ишемизированной конечности мыши после однократной инъекции рHGF/VEGF*

Спонтанное восстановление кровотока в контрольных растворах к 14-му дню достигало 35-40%. Однократная инъекция «Неоваскулгена» показала свою эффективность и статистически значимое увеличение перфузии к 14-му дню. Введение плазмиды рHGF/VEGF в дозе 150 мкг индуцировало значимое восстановление перфузии задних конечностей уже на 7 день ( $34,14 \pm 3,6\%$  для рHGF/VEGF по сравнению с  $25,51\% \pm 2,59\%$  в контрольной группе, которой вводился физиологический раствор;  $p = 0,04$ ) (см. Рисунок 10). К 14-му дню эти различия увеличились еще больше, а перфузия в группе рHGF/VEGF была в 1,5 раза выше, чем в группе, получавшей физиологический раствор ( $53,06\% \pm 2,71\%$  против  $35,76\% \pm 2,20\%$  соответственно;  $p = 0,006$ ) и в 1,33 раза выше, чем в группе, которой вводился пустой вектор ( $53,06\% \pm 2,71\%$  против  $39,83\% \pm 4,53\%$  соответственно;  $p = 0,018$ ). Использование конструкции рHGF/VEGF в более низкой дозе (75 мкг) по эффективности на 14 сутки не уступало «Неоваскулгену».

Полученные результаты убедительно продемонстрировали восстановление кровотока в ишемизированной задней конечности мыши и подтвердили ангиогенную эффективность плазмиды рHGF/VEGF.



**Рисунок 10. Оценка перфузии ишемизированных конечностей мышей в исследуемых группах.**

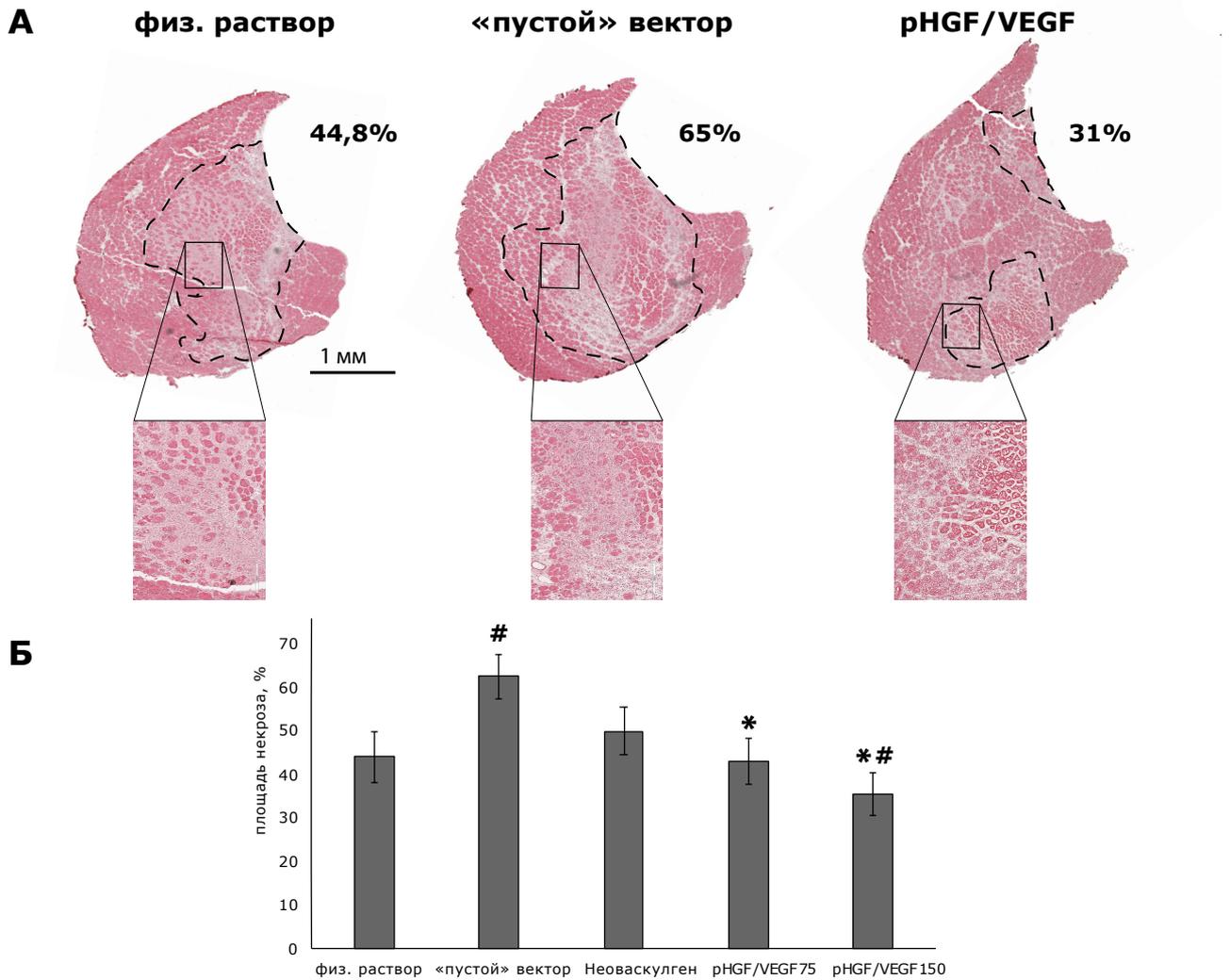
А. График динамики восстановления кровотока в течение 14-ти дней после операции; для группы рHGF/VEGF: (\*)  $p < 0,05$  по сравнению с группой физиологического раствора (отрицательный контроль) на 7-й и 14-й дни соответственно; (#)  $p < 0,05$  по сравнению с группой с введением «пустого» вектора на 14-й день.

Б. Репрезентативные доплерограммы подкожного кровотока в задней конечности у мышей в исследуемых группах, полученные на 14-й день после индукции ишемии. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего.

### 3.4.3 Гистологический анализ распространённости некроза ишемизированных скелетных мышц

Уменьшение некроза является важным показателем эффективности ГТ. Помимо ярко выраженного цианоза в первые дни эксперимента и минимальных трофических изменений эпидермиса на 2-й неделе, прочих признаков значимых некротических изменений ишемизированной конечности у экспериментальных животных не наблюдалось, поэтому оценка некроза проводилась на гистологических срезах *m. tibialis anterior*.

При анализе образцов скелетной мышцы обнаружено, что на большинстве срезов признаки некроза заметны в центральной части мышцы, при этом экспрессия в мышечной ткани VEGF165 и HGF приводила к уменьшению распространённости некроза, вызванного ишемией. Относительная распространённость некроза ткани (площадь некротизированной ткани/общая площадь среза) была значимо ниже в группе rHGF/VEGF (150 мкг) по сравнению с группой «пустого» вектора и по сравнению с группой введения 0,9% NaCl (см. Рисунок 11). При введении rHGF/VEGF в дозе 75 мкг значимая разница в площади некроза была только по сравнению с группой «пустого» вектора.



**Рисунок 11. Гистологический анализ площади некроза ишемизированных скелетных мышц на 14-ый день после операции.**

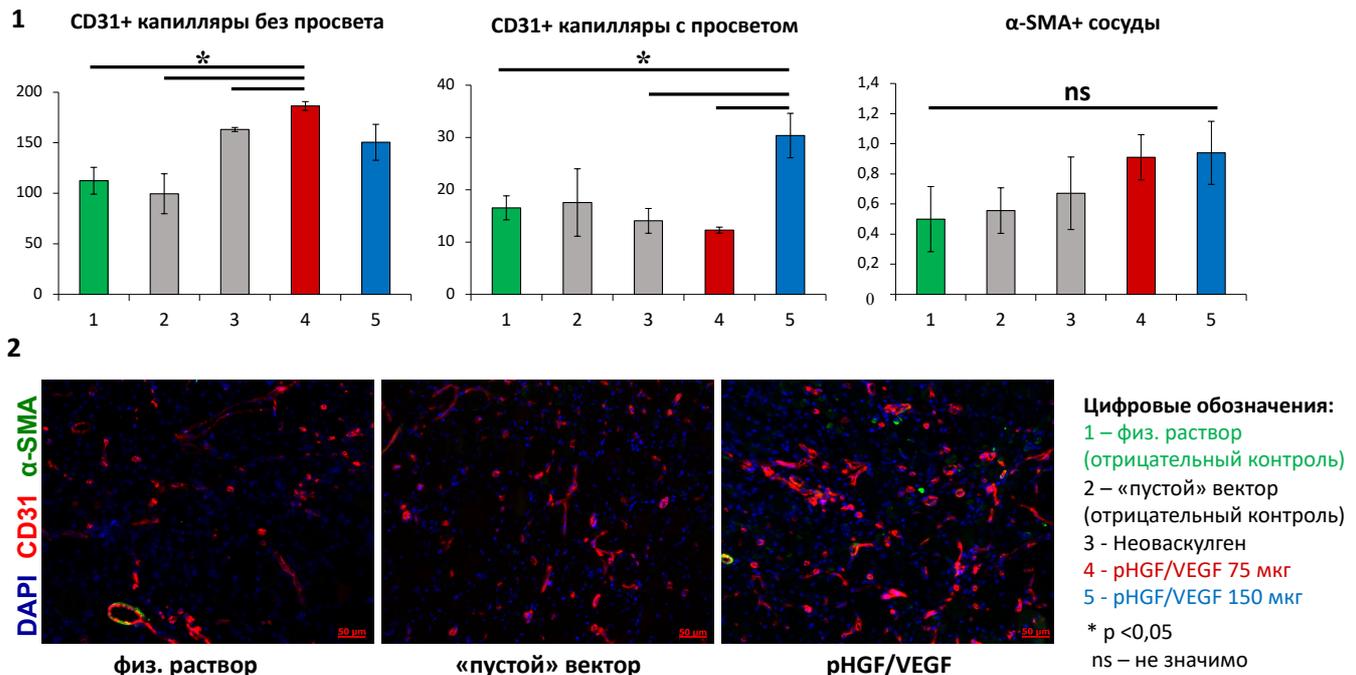
А. Полное сечение *m. tibialis anterior*, окрашенных гематоксилином/эозином. Интересующая область некротической ткани отмечена пунктирной линией; Микрофотографии с большим увеличением демонстрируют признаки некроза мышц, включая отсутствие ядер, потерю морфологии и разрушение волокон, а также отек, сопровождающийся инфильтрацией иммунных клеток.

Б. Показатели площади некроза на срезе (%). Данные представлены как среднее значение  $\pm$  SEM, (\*)  $p < 0,05$  для рHGF/VEGF75 по сравнению с группой с пустым вектором, (#)  $p < 0,05$  по сравнению с группой с физ. раствором.

#### *3.4.4 Оценка васкуляризации ишемизированных скелетных мышц после введения рHGF/VEGF*

Оценку ангиогенеза проводили путем подсчета CD31+ сосудов с просветом и без просвета (капилляры) и  $\alpha$ -SMA+ сосудов (артериол) на ПЗ. Однократное в/м введение плазмиды рHGF/VEGF в дозировках 75 и 150 мкг на животное стимулировало увеличение количества сосудов на ПЗ. При этом на 14-е сутки наибольшее количество капилляров без просвета наблюдалось в группе, в которой рHGF/VEGF была введена в более низкой концентрации (75 мкг), а наибольшее количество сосудов с видимым просветом - в группе рHGF/VEGF 150 мкг. Также отмечается тенденция к увеличению количества  $\alpha$ -SMA+ сосудов у животных, которым вводили рHGF/VEGF, однако, статистически значимых различий по сравнению с группами, которым вводили «пустой» вектор или физиологический раствор не было (см. Рисунок 12).

Таким образом, использование новой бицистронной плазмиды рHGF/VEGF способствует эффективному ангиогенезу в ишемизированной мышце. Данная бицистронная плазмидная конструкция по своей ангиогенной фармакологической активности превосходит как контрольные группы, так и препарат сравнения («Неоваскулген»).



**Рисунок 12. Оценка плотности капилляров и артериол в образцах скелетных мышц.**

1. Графическое представление результатов анализа плотности кровеносных сосудов со средними значениями на поле зрения (ПЗ), (\*) p < 0,05. Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего;

2. Микрофотографии срезов, окрашенных на маркеры эндотелия (CD31) и гладкомышечные клетки сосудов (α-SMA) (увеличение × 200). Масштабный отрезок = 50 мкм

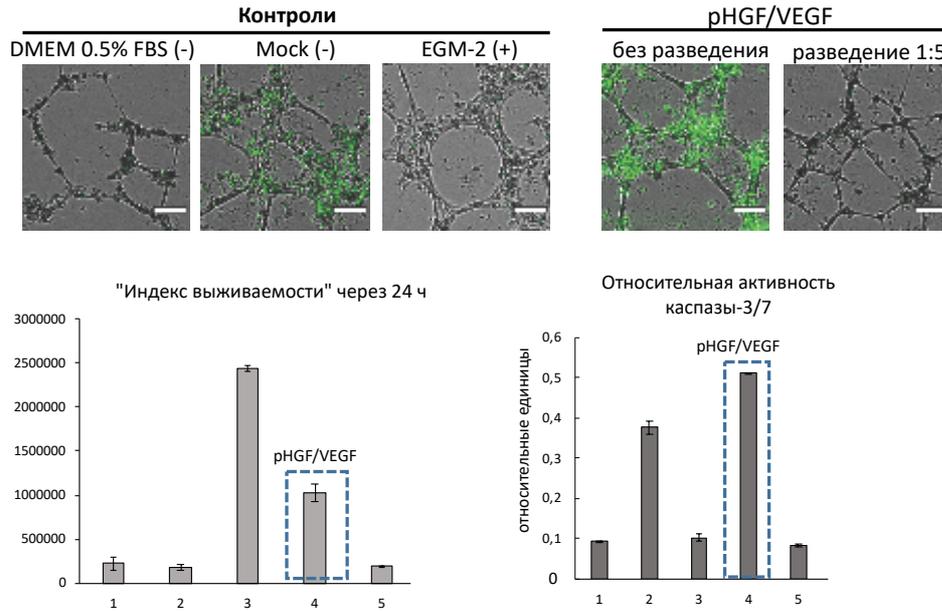
### 3.5 Оценка активности каспаз-3 и 7 и выживаемости эндотелиальных клеток

В наблюдаемое увеличение плотности свой вклад мог внести как непосредственно ангиогенез за счет ветвления кровеносных сосудов и образование новых капилляров, так и уменьшение гибели эндотелиальных клеток в силу наличия у обоих использованных АФР антиапоптотической активности.

Для оценки выживаемости эндотелия использовали *in vitro* модель ангиогенеза, которая была дополнена оценкой выживаемости клеток HUVEC под действием наработанных АФР. Для этого через 24 часа после образования капилляроподобных структур под действием HGF и VEGF165 эндотелиальные

клетки обрабатывались красителями Hoechst 33342 (для визуализации ядер и подсчета клеток) и гомодимером этидия (для оценки жизнеспособности). Рассчитанный «индекс выживаемости» был крайне низким в средах после «ложной» трансфекции («mock» контроль) и отрицательном контроле DMEM+0,5% ФБС. В среде, содержащей VEGF165 и HGF, наработанные трансфицированными HEK293T, данный показатель был выше, а в положительном контроле EGM-2 жизнеспособность сохраняли большинство клеток HUVEC.

Для изучения механизма гибели клеток и влияния ангиогенных факторов роста, продуцируемых после трансфекции rHGF/VEGF нами была проведена оценка активности каспаз-3/7. Наивысшая активность каспаз-3/7 у HUVEC была зарегистрирована после инкубации с образцом среды, собранном после «ложной» трансфекции, а также, с образцом «rHGF/VEGF». При этом в других тестируемых образцах сигнал от субстрата, свидетельствующий об активации ключевых каспаз, задействованных в клеточной гибели, был относительно низкой (см. Рисунок 13). В отрицательном контроле DMEM+0,5% ФБС детектировался очень низкий сигнал субстрата каспаз-3/7, предположительно, из-за практически полного прекращения каких-либо клеточных процессов к 24-м часам с выраженными признаками гибели HUVEC и истончения образованных в культуре трубочек.



**Рисунок 13. Относительная выживаемость и активность каспаз-3/7 в клетках линии HUVEC.** «Индекс выживаемости» клеток определяли по формуле:  $\sum_{\text{площадь Hoechst}} - \sum_{\text{площадь гомодимера этидия}}$

*Hoechst* —  $\sum_{\text{площадь гомодимера этидия}}$

Относительную активность каспаз-3/7 определяли по формуле: суммарная площадь флуоресцирующих объектов с активными каспазами-3/7 (зеленый) / суммарная площадь клеток. Данные представлены как среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Масштабный отрезок представляет 100 мкм.

## Глава 4. Обсуждение

Терапевтический ангиогенез является перспективным методом лечения ишемических заболеваний, а ГТ в перспективе может стать основным инструментом стимуляции роста сосудов. Многообещающим направлением развития данной области является разработка комбинированных подходов, путём создания эффективных бицистронных генотерапевтических векторов для доставки нескольких генов, кодирующих АФР. Целесообразность такого подхода обоснована физиологическими механизмами регуляции ангиогенеза, в котором на разных этапах участвуют различные типы клеток, чья активность регулируется большим числом как про-, так и антиангиогенных сигналов [26]. Ключевую роль играет действие широкого спектра АФР, которые активируют клетки эндотелия и гладкомышечные клетки и могут потенцировать эффекты друг друга. Предыдущие исследования поддерживают концепцию использования для стимуляции ангиогенеза нескольких факторов роста, обладающих плеiotропными эффектами, например, комбинации VEGF165 и bFGF [108], PDGF-B [75], SDF-1a [204], uPA [184], ангиопоэтином-1 [31] [113] и HGF [122] [123].

Особое внимание в своих работах мы уделяем комбинации HGF и VEGF165, взаимодействие которых часто описывается термином «динамический дуэт» [74]. Эффективность использования данной комбинации и вклад плеiotропного действия этих АФР были продемонстрированы в предыдущих работах нашего коллектива на релевантных животных моделях ишемии нижней конечности и инфаркта миокарда [122] [123]. Кроме того, было показано превосходство комбинированного подхода над применением векторов с каждым из генов (HGF или VEGF165) в отдельности.

Целью проведенного исследования стало создание бицистронной плазмидной генотерапевтической конструкции, несущей гены HGF и VEGF165, а также изучение её фармакологической активности. В предыдущих работах с использованием смеси плазмид с генами VEGF165 и HGF на модели ишемии

конечности было показано выраженное увеличение эффективности и стимуляции ангиогенеза при продукции АФР в тканях с соотношением концентраций близком к эквимолярному [122]. Исходя из этого, в настоящей работе ключевым критерием при выборе вектора – потенциального лекарственного «кандидата» было достижение соотношения концентраций HGF и VEGF165, приближающегося к 1:1 при введении пДНК в целевую ткань – скелетную мышцу.

Для одновременной экспрессии двух и более белков применимы мультицистронные конструкции. Например, векторы, включающие внутренние сайты посадки рибосом (IRES). Плазмиды, несущие IRES, позволяют осуществлять одновременную экспрессию нескольких генов, однако, эффективность трансляции, обеспечиваемой IRES, обычно существенно уступает кэп-зависимой инициации, а конечное соотношение концентраций синтезируемых белков варьирует в зависимости от выбранного IRES. В настоящее время наиболее часто используется IRES вируса энцефаломиокардита (EMCV), однако литературные данные указывают на то, что последовательности IRES из генов млекопитающих могут обеспечивать более высокую экспрессию гена, расположенного после последовательности IRES, чем при использовании вирусных IRES. В своей работе Wong с коллегами сравнивали последовательности IRES из генов человека VIP, EIF4G, MYC и VEGF с последовательностью IRES EMCV. Относительная эффективность каждого из IRES оценивалась при трансфекции клеток KB-3-1 путем нормировки уровня продукции репортерного гена, расположенного после последовательности IRES ( $\beta$ -галактозидазы) на уровень продукции репортерного гена, расположенного до последовательности IRES (хлорамфениколацетилтрансферазы). Три из четырех протестированных IRES человека обеспечивали в 5–100 раз большую экспрессию  $\beta$ -галактозидазы, чем IRES EMCV, а наибольшую эффективность показала IRES EIF4G: экспрессия  $\beta$ -галактозидазы, нормированная на экспрессию хлорамфениколацетилтрансферазы в случае использования данного IRES была в 294,8 выше, чем при использовании IRES EMCV [198]. Высокая активность при внутримышечном введении показана также для IRES FGF1, который использовали при внутримышечном введении

мышам в составе бицистронного вектора на основе аденовируса [45] или плазмиды [3], причем в обоих случаях его эффективность превосходила эффективность IRES EMCV. Основываясь на данных предыдущих исследований, для создания бицистронных плазмидных конструкций нами были выбраны IRES EMCV, Bip, FGF1 и eIF4G.

Первая часть исследования была посвящена созданию и изучению экспрессионной активности бицистронных плазмидных конструкций с генами HGF и VEGF165 человека, разделенных последовательностью IRES. Полученные в экспериментах *ex vivo* результаты продемонстрировали отсутствие экспрессии целевых генов при введении плазмиды с IRES EMCV и синтез только HGF при введении плазмиды с IRES Bip, при этом в предварительных экспериментах *in vitro* была показана продукция значительных количеств обоих АФР. Оценка эффективности различных IRES (EMCV, Bip, FGF1 и eIF4G) продемонстрировала существенные различия в продукции HGF и VEGF165 в культуре HEK293T в зависимости от выбранного IRES, а также положения генов относительно этой последовательности. Предсказать подобное поведение, основываясь на опубликованных данных, описывающих эффективность IRES с использованием репортерных генов (GFP,  $\beta$ -галактозидазы и т. д.) или клеток/животных, не относящихся к млекопитающим, для плазмидного вектора практически невозможно, что следует учитывать при разработке невирусных бицистронных систем доставки на основе IRES.

Полученные результаты соотносятся с наблюдениями других исследователей, и указывают на то, что активность промотора, IRES и других структурных единиц вектора может зависеть как от строения плазмидного вектора, так и от вида животного и типа трансфицируемой ткани [198] [109] [153]. В упомянутой выше работе Wong и соавт. была показана вариабельность экспрессионной активности IRES-содержащих плазмид в зависимости от трансфицируемой линии клеток. IRES EIF4G обеспечивал высокую продукцию следующего за ним гена во всех протестированных клеточных линиях: клетках эмбриональной почки человека (HEK293), клетках нейробластомы мыши (N2a),

клетках гепатомы человека (HepG2) и клетках карциномы человека (KB-3-1). В то же время IRES *Bip*, показавший в разы большую чем IRES EMCV экспрессию идущего после него гена в клетках KB-3-1, лишь незначительно отличался от IRES EMCV в клетках N2a и HEK293. IRES MYC лучше функционировал в клетках KB-3-1 и в клетках N2a, но не в клетках HEK293. Напротив, IRES VEGF существенно не отличался от IRES EMCV при трансфекции клеток KB-3-1 и N2a, но уступал IRES EMCV в HEK293 [198]. О разной эффективности последовательности IRES в клеточных линиях также говорит исследование Licursi, в котором на трёх клеточных линиях (NIH 3T3, MEF и Huh 7) было протестировано 13 бицистронных конструкций с различными IRES [109]. В нашей работе мы детектировали продукцию VEGF165, ген которого располагался после последовательности IRES при трансфекции клеток HEK293T, имеющих человеческое происхождение, но при этом не обнаружили значимой продукции VEGF165 *ex vivo* после введения в скелетную мышцу мыши. Возможное объяснение этому феномену ткане- или видоспецифичности активности IRES из различных генов [110]. Показано, что IRES FGF-1 менее эффективен, чем IRES EMCV при трансфекции клеток ретинобластомы 911 аденовирусным вектором, кодирующим гены люцифераз Luc F и Luc R, разделенные последовательностью IRES [45]. Однако, при трансфекции данными конструкциями миобластов C2C12 и при введении в скелетные мышцы, IRES FGF-1 обеспечивал более эффективную и продолжительную экспрессию репортерных генов [3] [45]. В нашей работе вектор с IRES EMCV, несмотря на высокую активность *in vitro*, при инъекции мышам не обеспечивал одновременного синтеза HGF и VEGF165. Недавнее пилотное КИ с использованием бицистронной плазмиды, экспрессирующей VEGF165 и HGF, разделенные IRES, показало эффективность этого лекарственного «кандидата» у пациентов (n = 12) с КИНК [10]. Несмотря на позитивные клинические результаты, информация о дизайне и профиле экспрессии данного вектора *in vitro* в открытом доступе отсутствует. Кроме того, нет опубликованных данных о соотношении концентраций и количествах HGF и VEGF165, продуцируемых после введения данной плазмиды в скелетные мышцы.

Наше исследование подчеркивает важность экспериментальной оценки эффективности вектора в тканях животных. Только использование эксплантной модели скелетной мышцы, выделенной после инъекции исследуемых векторов, позволило принять обоснованное решение о прекращении тестирования плазмид с последовательностью IRES и перейти к генетическим конструкциям другого строения.

Обе плазмиды альтернативного строения: pHGF/VEGF с независимыми промоторами для генов HGF и VEGF165 (CMV и CAG, соответственно) и bi-HGF/VEGF с двунаправленным CMV промотором для обоих генов показали схожие результаты – высокую экспрессию обоих АФР при тестировании в культуре клеток человека (HEK293T). Однако при переходе к *ex vivo* модели эксплантной скелетной мышцы, мы обнаружили, что при использовании плазмиды bi-HGF/VEGF в среде культивирования эксплантов детектируются лишь следовые количества VEGF165, но при этом bi-HGF/VEGF обеспечивает продукцию очень больших количеств HGF (>6 нг/мл). Данный результат показывает зависящее от вида животного или типа клеток изменение профиля экспрессии, механизм которого остается мало изученным. В литературе описаны случаи вариации экспрессии генов, стоящих под контролем двунаправленного промотора, в зависимости от типа клеточной линии. Трансдукция клеток NIH 3T3 (эмбриональные фибробласты мыши) лентивирусом с двунаправленным промотором P<sub>gk1</sub>-CMV (промотор P<sub>gk1</sub>, слитый с минимальным промотором CMV) приводила к умеренной продукции обоих кодируемых белков: GFP и белка устойчивости к пуромицину (Pu<sub>ro</sub>). При трансдукции данным вектором клеток ES (эмбриональные стволовые клетки мыши) было отмечено появление большего количества клеток, устойчивых к пуромицину по сравнению с линией NIH 3T3 [76]. В нашей работе, вероятно, двунаправленный промотор, который был эффективен в клетках человека, в скелетных мышцах мыши подавлялся или не имел необходимого коактиватора транскрипции, что приводило к высокой продукции HGF и отсутствию экспрессии VEGF165. Это наблюдение, в некоторой мере, ставит под сомнение целесообразность экстраполяции данных, полученных на

грызунах, на человека, что формально является основой большинства ДКИ в области ГТ и биофармацевтики. С другой стороны, полученные результаты подчеркивают важность комплексного исследования лекарственных «кандидатов» *in vitro* и *ex vivo* до начала испытаний их фармакологической эффективности на животных моделях.

По результатам исследований на клетках и тканях из семи сконструированных нами векторов только один – плазида рHGF/VEGF с двумя независимыми промоторами для HGF и VEGF165 обеспечивала продукцию обоих белков в достаточных количествах с близким к эквимолярному соотношению концентраций. Стоит особенно отметить, что введение данного вектора в скелетные мышцы мышцей проводилось без каких-либо вспомогательных методов, в отличие от опубликованных работ, где при доставке бицистронных плазмид для увеличения эффективности трансфекции использовали электропорацию [3] [122].

В качестве модели для изучения фармакологической активности бицистронной плазмиды рHGF/VEGF с потенциальным ангиогенным действием была выбрана модель ишемии нижней конечности у мыши. Данная модель релевантна состоянию критической ишемии конечности (КИНК) у человека и неоднократно использовалась для исследования терапевтического ангиогенеза в предыдущих работах как в наших работах и работах наших коллег [122] [210] [216], так и других исследователей [3], [5]. Стоит отметить, что КИНК не является самостоятельной нозологической формой, а представляет собой синдром ряда хронических заболеваний периферических сосудов различной этиологии и патогенеза. КИНК наблюдается при облитерирующем атеросклерозе, диабетической ангиопатии, болезни Рейно, болезни Бюргера и других патологиях, сопровождающихся ишемией конечностей. Существуют различные способы моделирования этого состояния у экспериментальных животных. Обычно они включают перевязку бедренной артерии и её ветвей в месте отхождения или бифуркации.

Классическая модель ишемии задней конечности была разработана Takeshita с соавт. для кроликов и крыс [179] [180], а её модификацию для изучения роли

VEGF165 в формировании новых сосудов у мышей предложил Couffinhal в 1998 году [38]. В данной модели использовали молодых мышей линии C57BL/6 весом 25-35 г. Одностороннюю ишемию нижней конечности у мышей создавали путем лигирования проксимального конца бедренной артерии (*a. femoralis*) и дистальной части подкожной артерии (*a. saphena*) с последующим иссечением бедренной артерии и всех прилегающих боковых ветвей. После операции большинство мышей не использовало ишемизированную конечность в течение первой послеоперационной недели, однако к пятой неделе разница между ишемизированными и неишемизированными конечностями была трудно различима. Приблизительно у 10% мышей в течение первой послеоперационной недели наблюдались признаки некроза пальцев задней конечности, которые быстро заживали в течение следующих недель. Первые 7 дней после операции наблюдался период тяжёлой ишемии (некроз пальцев вследствие нарушения кровоснабжения), затем перфузия постепенно увеличивалась в течение 14-ти дней и достигала плато между 21 и 28 днями. В нашем исследовании для моделирования ишемии бедренная артерия с боковыми ветвями выделялась целиком от начала паховой связки и до ее подколенной бифуркации. Внешних различий в состоянии задних конечностей после операции у мышей из разных экспериментальных групп мы не наблюдали, поэтому оценка степени некроза проводили путём гистологического анализа ишемизированных мышц.

Введение плазмид в дозах 75 и 150 мкг на животное было выбрано на основании предыдущего опыта использования пДНК с генами HGF и VEGF165 и литературных данных. При изучении совместного действия плазмид с генами HGF и VEGF165 мышам вводилось по 100 мкг каждой пДНК (всего 200 мкг пДНК); также показано, что увеличение дозы вводимой плазмиды с геном VEGF165 со 100 до 200 мкг на животное не приводило к увеличению показателей перфузии [122], однако в упомянутой работе для облегчения трансфекции использовали электропарацию. Перед введением все плазмиды разводились в стерильном физиологическом растворе (0,9% NaCl). Экспериментально показано, что оптимальным объемом для в/м введения мышам является 50 мкл: введение

больших количеств раствора приводит к его утечке в окружающие мышцу ткани [72], поэтому в нашей работе для увеличения эффективности трансфекции пДНК вводили по 50 мкл (50 мкг) тремя инъекциями: в переднюю большеберцовую мышцу, двуглавую мышцу бедра и четырехглавую мышцу бедра. Такой же подход используется и у более крупных животных: на модели ишемии конечности у кролика было показано увеличение количества коллатеральных артерий после введения пДНК, кодирующей две изформы HGF в четыре отдельных участках приводящей и полуперепончатой мышцы (по 250 мкг в 250 мкл на инъекцию) [152].

Полученные на модели ишемии задней конечности данные продемонстрировали, что введение 150 мкг рHGF/VEGF индуцировало относительно быстро возникающий ангиогенный ответ с увеличением перфузии: значимое увеличение кровотока по сравнению с введением физиологического раствора достигалось уже на 7-й день и увеличивалось к 14-му дню, сохраняя статистическую значимость. Введения рHGF/VEGF в более низкой дозе (75 мкг на животное) так же показало свою эффективность, а показатели перфузии к 14-м суткам не уступали таковым для группы «Неоваскулгена», который вводили в дозе 150 мкг на животное. Группы животных с введением рHGF/VEGF на 14-й день показали преимущество над обеими контрольными группами (физиологический раствор и «пустая» пДНК).

Сравнение с предыдущими работами показывает, что использование бицистронной плазмиды рHGF/VEGF превосходит по способности восстанавливать кровоток использование смеси двух плазмид с генами HGF и VEGF165. При введении 200 мкг смеси плазмид (по 100 мкг каждой пДНК) статистически значимое увеличение перфузии по сравнению с группой введения «пустого» вектора наблюдалось только на 21-й день, а сравнение с физиологическим раствором не проводилось. Кроме того, введение пДНК сопровождалось электропорацией [122], в то время как в нашей работе вспомогательные методы трансфекции не использовали, а значимое восстановление кровотока при введении 150 мкг рHGF/VEGF достигалось уже на 14-й день.

В качестве положительного контроля мы использовали плазмиду с геном VEGF165, представляющую собой действующее вещество препарата «Неоваскулген». Оценка ангиогенного эффекта рl-VEGF165 в модели ишемии конечности у мышей линии CD-1 в рамках ДКИ этого препарата показала, что двукратное в/м введение пДНК (плазида вводилась на 1-е и 14-е сутки после операции по 50 мкг на животное) приводило к значимому улучшению перфузии на 7-е сутки по сравнению с контрольной группой (введение воды для инъекций) [220]. В нашей работе значимое восстановление кровотока при в/м введении «Неоваскулгена» в дозе 150 мкг на животное наблюдалось только к 14-м суткам.

Отрицательным контролем в эксперименте на животной модели ишемии конечности в нашей работе, помимо физиологического раствора, мы использовали раствор «пустого» вектора рVAX2, на основе которого была создана исследуемая плазида рHGF/VEGF. Такой контроль необходим, поскольку известно, что ДНК обладает способностью вызывать иммунный ответ, причем особенно это характерно для векторов, включающих большое число метилированных цитозин-гуанин динуклеотидных мотивов (CpG) [105] [84]. Это необходимо учитывать в случае использования таких векторов на моделях ангиогенеза, поскольку стимулированное пДНК воспаление [149] ведет за собой активацию моноцитов и их потомков (макрофагов), которые играют значительную роль в капилляро- и артериогенезе [42] [139]. Данное явление связано со способностью макрофагов секретировать АФР и дестабилизировать ВКМ, что способствует миграции эндотелиальных клеток и образованию первичных сосудистых сетей. Однако показанное нами явное преимущество рHGF/VEGF над контрольным «пустым» вектором в восстановлении кровоснабжения ишемизированной ткани дает основание сделать вывод о том, что входящие в пДНК факторы роста HGF и VEGF165 оказывают решающее влияние на перфузию конечности, превосходящее неспецифические ангиогенные эффекты самой пДНК.

Ишемия конечности приводит к формированию некроза скелетных мышц, а в тяжелых случаях - к появлению язвенных дефектов, предотвращение которых является важным показателем эффективности терапевтического ангиогенеза.

Анализ образцов скелетных мышц, выделенных на 14-й день эксперимента показал, что относительная распространённость некроза ткани была значимо ниже в группе rHGF/VEGF (доза 150 мкг на животное) по сравнению с группой введения физиологического раствора.

Стоит обратить внимание на тот факт, что при оценке гистологических срезов в группе введения «пустого» вектора отмечалось увеличение ишемического мышечного повреждения и площади некротической ткани. Поскольку при выделении плазмиды мы использовали расходные материалы EndoFree, обеспечивающие удаление бактериальных эндотоксинов, мы предполагаем, что наблюдаемый эффект связан с последовательностью самой пДНК. Вектор, использованный в нашем исследовании, был получен на основе конструкции pVAX, имеющей в своем сиквенсе вышеупомянутые олигодезоксинуклеотидные мотивы CpG, которые могут активировать иммунные клетки [84] и вызывать некроз опухоли [22]. Экспрессия HGF и VEGF165 после инъекции rHGF/VEGF (в обеих дозах) уменьшала этот негативный эффект, возможно, за счёт антиапоптотического действия АФР и увеличения перфузии мышцы. Подобное явление наблюдалось и в предшествующих работах: введение «пустого» вектора pC4W, на основе которого были сконструированы плазмиды, несущие гены HGF и VEGF165, приводило к образованию обширной зоны некроза, в то время как у животных, которым вводились плазмиды с генами VEGF165, HGF или их смесь, ишемическое повреждение было значимо меньше [122]. Протективная роль HGF в отношении развития некроза вследствие введения пДНК также показана в работе К.А. Рубиной с коллегами: площадь некроза в образцах мышц животных, которым вводили смесь плазмид с генами HGF и Ang-1 (Васкопэтин), была в 2 раза меньше по сравнению с площадью некроза в контрольной группе, которая получала «пустой» вектор pH-CMV1. Кроме того, при введении Васкопэтина частота ампутаций конечности составляла около 33,3% по сравнению с отрицательным контролем (pH-CMV1), где она составила 66,7% [216].

Важно отметить, что так же как и в случае экспериментов *ex vivo*, на модели ишемии конечности мы не применяли никаких методов повышения эффективности

трансфекции пДНК. Обычно используют низковольтную электропорацию, ультразвук или упаковку пДНК в липосомы, однако наши результаты продемонстрировали, что рHGF/VEGF оказывает значительное влияние на перфузию конечностей даже при в/м введении пДНК в незащищённом виде. Введение векторов осуществлялось путем нескольких точечных инъекций вдоль конечности. Мы считаем, что в случае ишемии конечностей такой подход является оптимальным способом введения для стимуляции роста и ремоделирования кровеносных сосудов, позволяя избежать использования методов, направленных на повышение эффективности трансфекции. Показано, что множественные в/м инъекции небольших количеств раствора («muscle chipping») обеспечивают доставку плазмиды к мышечным волокнам с такой же эффективностью, как и инъекция всего раствора сразу, которая, кроме того, может сопровождаться повреждающим ткани гидродинамическим ударом [98]. Клинические протоколы введения ангиогенных препаратов для невирусной ГТ, в целом, поддерживают эту концепцию: поскольку пДНК обладает низкой иммуногенностью целесообразнее проводить дополнительные инъекции препарата, чем усложнять терапевтическую систему или вводить процедуру усиления трансфекции.

Ангиогенный эффект рHGF/VEGF был показан путем оценки плотности CD31+ кровеносных сосудов в тканях. При этом отмечен интересный результат: количество CD31+ кровеносных сосудов с просветом было достоверно выше в группе введения рHGF/VEGF в дозе 150 мкг, чем в остальных группах, однако различия в количестве двух других типов сосудов - CD31+ сосудов без просвета и артериол ( $\alpha$ -SMA+ сосудов) не достигли статистической значимости. При этом при использовании рHGF/VEGF в дозе 75 мкг на животное детектировалось достоверно большее количество CD31+ сосудов без просвета. Это можно объяснить продолжительностью эксперимента (14 дней), которая была недостаточна для формирования зрелых артериол. Сравнение с результатами других исследований подтверждает, что 14 дней может быть недостаточным сроком для оценки подходов стимуляции ангиогенеза. В работе по изучению ангиогенных свойств смеси плазмидных векторов с генами VEGF165 и HGF оценка плотности сосудов

проводилась на 21-й день после операции. При этом наблюдалось статистически значимое увеличение числа капилляров и артериол в группах введения пДНК с генами АФР по сравнению с группой контроля, кроме того введение смеси плазмид оказывало больший ангиогенный эффект, чем введение векторов с каждым из генов (VEGF165 или HGF) отдельно [122]. В другом исследовании ангиогенная активность бицистронных плазмид с генами VEGF165 и HGF (pIRES/VEGF165/HGF) и VEGF165 и Ang-1 (pIRES/ANGPT1/VEGF165) оценивалась в модели ишемии задней конечности у крыс через 12 недель после проведения операции (пДНК вводились в/м по 4 мг четырьмя равными инъекциями). При использовании обеих конструкций наблюдалось увеличение числа  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> и FVIII<sup>+</sup> сосудов, при этом введение pIRES/VEGF165/HGF приводило к образованию значимо большего количества сосудов по сравнению с использованием вектора pIRES/ANGPT1/VEGF165 [8], что ещё раз подчеркивает перспективность использования пары HGF + VEGF165 для ТА.

Плотность капилляров (CD31<sup>+</sup> сосудов) была значимо выше при использовании плазмиды pHGF/VEGF по сравнению с группой «Неоваскулген», в которой, впрочем, наблюдалась тенденция к увеличению количества сосудов по сравнению с отрицательными контролями. Это наблюдение согласуется с результатами, полученными при изучении ангиогенных свойств плазмиды pI-VEGF165 («Неоваскулген»): при её введении мы наблюдали тенденцию к увеличению плотности капилляров (CD34<sup>+</sup> эндотелиоцитов) и артериол ( $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> сосудов), однако различия показателей не достигали статистической значимости, несмотря на довольно продолжительный срок эксперимента (21 и 35 дней) [220].

Новообразованные кровеносные сосуды с CD31<sup>+</sup> ЭК, имеющие просвет и не покрытые муральными клетками (перицитами или гладкомышечными клетками), могли способствовать улучшению перфузии скелетных мышц, а увеличение их количества могло стать результатом совместного действия VEGF165 и HGF. Этот эффект может являться результатом амплификации сигнальных каскадов, активируемых в ЭК при связывании АФР со своими рецепторами: VEGF с VEGFR1 и 2 и HGF с c-Met. При связывании лигандов со своими рецепторами происходит

активация рецепторных тирозинкиназ с последующей активацией множества сигнальных молекул (p38-киназы, ERK1/2 и т.д.), передающих сигнал в ядро. Это, в конечном итоге, увеличивает миграцию клеток эндотелия и стимулирует их пролиферацию, т.е. активирует два основных клеточных механизма ангиогенеза. Предыдущие наши исследования показали, что HGF и VEGF165 могут совместно активировать путь ERK1/2, что приводит к повышенной экспрессии молекулы межклеточной адгезии 1 (ICAM-1) и молекулы адгезии сосудистых клеток (VCAM), а также фосфорилированию киназы фокальной адгезии (FAK) [77]. Это особенно важно, поскольку показано, что HGF в сочетании с VEGF165 индуцирует перестройку цитоскелета и способствуют образованию просвета нового сосуда. Помимо морфогенного потенциала VEGF165 и HGF синергично индуцируют антиапоптотические гены (Bcl-2 и A1), критически важные для выживания ЭК в условиях тяжёлой ишемии и сопутствующего воспаления [199].

В целом, мы можем предположить, что наблюдаемое увеличение перфузии связано с индукцией роста мелких кровеносных сосудов с просветом, вызванной введением rHGF/VEGF. Также можно предположить, что к 14-му дню после введения экспериментальной пДНК в большинстве проанализированных образцов ещё не завершён этап образования просвета в новых сосудах, предшествующий созреванию и стабилизации сосуда (таксису перицитов и гладкомышечных клеток). Стабилизация сосудов стимулируется HGF, который, как известно, привлекает муральные клетки к образованным под действием VEGF капиллярам [178] [119].

Относительно короткий период наблюдения (14 дней) является потенциальным ограничением для интерпретации ангиогенного действия rHGF/VEGF, но может быть увеличен в дальнейших исследованиях для изучения результатов в более поздние сроки, когда, например, может произойти разрешение или уменьшение распространённости некроза в группе введения «пустого» вектора. В ряде работ показано, что большинство плазмид обладают непродолжительной экспрессией в тканях животных. Прекращение продукции терапевтических белков происходит в течение первой недели, а к 10-12 дню

наблюдается лишь остаточный уровень экспрессии [122] [197], поэтому в данной работе срок наблюдения составил 14 дней.

Наблюдаемое увеличение плотности сосудов может быть связано как непосредственно с ангиогенезом - ветвлением существующих сосудов и образованием новых отростков, так, и с уменьшением гибели эндотелиальных клеток. В данной работе мы оценили влияние HGF и VEGF165, синтезированных клетками HEK293T после трансфекции экспериментальными плазмидами, на выживаемость эндотелиальных клеток линии HUVEC и их способность образовывать капилляроподобные структуры. Известно, что АФР способствуют выживанию клеток, т.к. обладают антиапоптотическими эффектами за счёт активации  $\alpha$ -серин/треонин-протеинкиназы (Akt) и сигнального пути MAPK/ERK [120]. Также показано, что HGF защищает ЭК от гипоксического повреждения путём ингибирования p38 MAPK и Bid/Bax и увеличения экспрессии Bcl-2 или Bcl-x1 [201]. Для HGF и VEGF165 известно, что они способствуют выживанию ЭК сосудов за счет индукции антиапоптотических генов Bcl-2 и A1 [199]. Активация некоторых из перечисленных сигнальных путей была показана в предыдущей работе нашего коллектива – использование одновременно VEGF165 и HGF приводило к усилению фосфорилирования ERK1/2 в культуре HUVEC [122]. Наши предыдущие данные также указывают на того, что VEGF165 и HGF совместно модулируют стабильность индуцируемых гипоксией факторов (HIF-1 и -2) и регулируют экспрессию их генов-мишеней, многие из которых связаны с ангиогенным ответом в тканях человека [123].

Одним из методов оценки ангиогенной активности веществ *in vitro* является модель образования капилляроподобных структур эндотелиальными клетками на Матригеле. Полученные в данной работе результаты показывают, что эффективность образования капилляроподобных структур *in vitro* сильно зависит от количества жизнеспособных клеток, а продукция дополнительных количеств АФР поддерживает их выживаемость. Для изучения лежащего в основе этого механизма, мы оценили активность каспаз-3/7. В отрицательном контроле (среде, собранной с клеток HEK293T, подвергшихся «ложной» трансфекции) «индекс

выживаемости» клеток был низким, причём наблюдалась выраженная активация каспаз-3/7. Это наблюдение указывает на то, что, возможно, клетки HEK293T, являющиеся иммортализованной линией продуцируют проапоптотические факторы, в т.ч. вызывающие гибель HUVEC. Действительно, связанный с трансфекцией стресс и использование кальций-фосфатного метода для доставки пДНК в клетки могут индуцировать продукцию апоптотических телец и изменять секретом трансфицированных клеток в проапоптотическом направлении. В среде культивирования HEK293, трансфицированных плазмидой bi-HGF/VEGF, выживаемость клеток была выше, чем в «токс» контроле, в то время как флуоресценция расщепленного субстрата каспаз-3/7 была незначительной. Такая картина соответствует литературным данным, о том что в целом, АФР имеют антиапоптотические свойства и могут подавлять активацию белков из семейства каспаз. Интересно, что в HUVEC, обработанных средой с HEK293, трансфицированных rHGF/VEGF, наблюдалась значительная активация каспаз, превышающая таковую в «токс» контроле, в то время как выживаемость клеток была сопоставима с образцом «bi-HGF/VEGF». Следует отметить, что продукция как VEGF165, так и HGF после трансфекции клеток вектором rHGF/VEGF в 3 раза превышала таковую при использовании с bi-HGF/VEGF. Можно предположить, что в высоких концентрациях HGF и/или VEGF165 могут стимулировать активацию каспаз-3/7 и проявление их неапоптотических функций. Всё это в целом, положительно влияет на выживаемость эндотелиальных клеток и их способность образовывать капилляроподобные структуры.

Обнаруженная нами активация каспаз-3/7 в клетках HUVEC, инкубированных со средой HEK293T, трансфицированных плазмидой rHGF/VEGF, не сопровождалась массовой гибелью эндотелиоцитов. Действительно, «индекс выживаемости» в этой культуре оказался значительно выше, чем в отрицательных контролях. Возможно, в данной ситуации продуцируемые АФР стали активаторами т.н. «неапоптотических функций» каспаз-3/7, что соотносится с данными других авторов. Описано участие проапоптотических протеаз (каспаза-3, -7, -2, -8) в несвязанных с клеточной

гибелью процессов, в том числе в регуляции пролиферации, дифференцировки, остео- и миогенезе, миграции и передаче клеточных сигналов [166] [37]. Полученные данные, возможно, говорят о новых плейотропных эффектах VEGF165 и HGF и акцентируют внимание на еще одном важном механизме регуляции ангиогенеза, требующем дальнейшего изучения.

Помимо стимуляции ангиогенеза, комбинация HGF и VEGF165 может оказывать положительное плейотропное влияние на функцию периферических нервов, которая, как известно, нарушается при ишемии конечностей и диабете. Диабетическая нейропатия - болезненное и трудно излечимое состояние, возникающее из-за нарушения трофики нервных волокон вследствие повреждения мелких сосудов и недостаточности кровоснабжения, что в конечном итоге может приводить к слабости и атрофии мышц. Предыдущий опыт использования плазмидной конструкции, несущей ген HGF подтверждает возможность применения данного гена для стимуляции восстановления нервов после травматического повреждения [19], также показано восстановление плотности нейритов в ишемизированных мышцах после трансплантации клеточных пластов, экспрессирующих HGF [20]. Нашими коллегами показано, что локальная экспрессия HGF приводит к увеличению числа нейритов и стимулирует их рост, механизм наблюдаемого процесса включает активацию митогенного сигнального каскада, опосредованного протеинкиназами ERK1/2 [133]. Имеются данные о том, что невирусная доставка HGF улучшает состояние крыс с индуцированной стрептозотоцином диабетической нейропатией, а также уменьшает невропатическую боль [99] [185]. HGF также уменьшает гибель ЭК, вызванную высоким содержанием D-глюкозы [125]. На модели диабетической ишемии задней конечности у крыс показано, что введение пДНК HGF стимулирует образование коллатеральных сосудов и увеличивает кровоток [181]. Учитывая эти данные, а также факт взаимодополняющего ангиогенного действия HGF и VEGF165 и активации ими ERK1/2 сигнального пути можно предположить, что нейропатия может стать одним из предполагаемых показаний для применения rHGF/VEGF. Таким образом, одновременная доставка этих АФР может представлять собой

эффективный генотерапевтический подход, направленный на восстановление кровоснабжения и иннервации тканей, а также облегчение болевых ощущений, сопровождающих ишемию и полинейропатию смешанного генеза.

Актуальность использования HGF как ангиогенного фактора в дополнение к VEGF165 подтверждается появлением первых КИ лекарственных препаратов. Примером служит VM202 (также известный как Engensis), разрабатываемый компанией Helixmith (ранее ViroMed, Южная Корея). VM202 представляет собой плазмиду, несущую две изоформы HGF: с 728 и 723 аминокислотными остатками, предназначенную для лечения сердечно-сосудистых заболеваний и диабетической нейропатии [104] [101]. В недавнем пресс-релизе сообщалось, что в 9-ти месячном КИ третьей фазы DPN 3-1 (N = 500) использование VM202 при диабетической периферической нейропатии не показало статистически значимой разницы в эффективности (уменьшение боли через 3 месяца) по сравнению с плацебо. Однако расширенное исследование DPN 3-1B (N = 101), длившееся 12 месяцев, продемонстрировало безопасность и эффективность VM202: наблюдалось клинически и статистически значимое уменьшение боли по сравнению с плацебо на 6, 9 и 12 месяцы. Пациенты в данных КИ имели почти идентичные демографические и исходные характеристики, тем не менее результаты дополнительных апостериорных статистических анализов показали, что между участниками, включенными в первую и вторую половину испытания, была значительная разница. Компания-производитель определила возможные причины и планирует учесть их в следующих испытаниях [102] [222]. Неоднозначные результаты описанного КИ позволяют судить о том, что одного HGF (даже если он доставляется в двух изоформах) может быть недостаточно для успешного лечения диабетической нейропатии, а положительные терапевтические эффекты можно ожидать при добавлении действия VEGF165.

В настоящее время для облегчения боли при диабетической полинейропатии используют  $\alpha$ -липоевую (тиоктовую) кислоту, являющуюся мощным антиоксидантом. Применение тиоктовой кислоты в дозе 600 мг в день уменьшает боль, парестезии и онемение, вызванные диабетической полинейропатией [207].

Важную роль в поддержании трофики периферических нервов играют витамины группы В (В1, В6, В12). Показана высокая эффективность препарата Мильгамма (содержит бенфотиамин и пиридоксин) в комплексном лечении диабетической полинейропатии [213]. Интересным представляется создание комплексных фармацевтических композиций на основе генотерапевтических и «традиционных» фармакологических препаратов.

С клинической точки зрения важность препаратов нового поколения для ГТ на основе пДНК трудно переоценить, так как применение вирусных векторов для лечения наследственных заболеваний может быть ограничено из-за неблагоприятного соотношения риска и пользы. Возможные побочные эффекты и токсичность адено-, лентивирусов и аденоассоциированных вирусов (AAV), а также высокая стоимость производства препятствуют их широкому распространению в клинической практике [43]. Смерть двух младенцев после острой гепатотоксичности с последующим сепсисом в клинических исследованиях с использованием AAV для лечения X-сцепленной миотубулярной миопатии, который успешно прошёл все доклинические исследования безопасности, вызвала дискуссию о способности гарантировать безопасность вирусных векторов для пациентов [195].

Напротив, плазмидные конструкции показывают благоприятный профиль безопасности, однако требуется разработка подходов, позволяющих увеличить эффективность их применения [78]. Полученные в нашей работе данные важны для потенциальной разработки первого в своем классе комбинированного препарата для генной терапии нарушений ангиогенеза.

## Заключение

Среди многих развивающихся отраслей медицины особый интерес представляет генная терапия, в которой к настоящему времени уже накоплен достаточно большой клинический опыт. Эффективность ГТ напрямую зависит от типа выбранного вектора. Использование вирусных конструкций позволяет осуществлять трансдукцию с высокой эффективностью и длительным периодом экспрессии введенных генов, однако, может вызывать иммунный ответ на сам вектор и приводить к злокачественной трансформации клеток. Плазмидные векторы обладают гораздо более привлекательным профилем безопасности, однако их терапевтическая активность ограничена низкой эффективностью трансфекции и сравнительно небольшими количествами экспрессируемого при однократном введении белка. Впрочем, низкая иммуногенность плазмид, граничащая с полным её отсутствием, делает возможным их повторное введение, что может оказаться путем решения проблемы низкой эффективности однократной инъекции.

Существующая общая схема разработки биологических лекарственных препаратов предполагает их тестирование на клетках человека, а затем на животных - как правило, на мелких грызунах, например, мышах. Опираясь на наши результаты по исследованию различных вариантов бицистронных векторов, мы предполагаем, что такой алгоритм не всегда идеально применим в случае разработки препаратов для ГТ. В ходе исследования нами были созданы и протестированы семь вариантов бицистронных плазмид, и только одна из них показала способность обеспечивать продукцию целевых белков как *in vitro*, так и *in vivo*. Как уже было упомянуто, некоторые плазмидные векторы обладают видоспецифичностью и могут быть эффективны при использовании у человека, но не у грызунов и наоборот. Таким образом, несмотря на наличие большого числа инструментов для предсказания экспрессионной активности вектора,

эмпирический метод, по сути основанный на пути «проб и ошибок» остается единственным эффективным способом нахождения лекарственного «кандидата».

Терапевтический ангиогенез - многообещающая стратегия для облегчения ишемических состояний, и доставка генов использовалась для стимуляции образования и роста кровеносных сосудов. Ранее было показано, что в/м инъекция смеси, содержащей плазмиды, кодирующие фактор роста эндотелия сосудов (VEGF165) и фактор роста гепатоцитов (HGF), приводит к восстановлению кровотока в ишемизированной конечности мыши, и эффективность комбинированной доставки выше, чем при введении каждой из плазмид по отдельности. В настоящей работе мы оценили различные подходы к созданию векторов, обеспечивающих одновременную экспрессию генов HGF и VEGF165, в том числе с внутренними сайтами посадки рибосом (IRES), с двунаправленным промотором или с двумя разными промоторами для каждого гена. Исследования на культуре клеток HEK293T показали, что все плазмиды обеспечивали синтез белков HGF и VEGF165, которые эффективно стимулировали образование капилляроподобных структур эндотелиальными клетками пупочной вены человека (HUVEC), что указывало на наличие у экспрессируемых факторов ангиогенной активности свойства, необходимой для стимуляции ангиогенеза в ткани. Тестирование полученных генотерапевтических конструкций на эксплантной культуре скелетных мышц показало значительные различия между плазмидами: большинство из них не обеспечивали экспрессию значительных количеств HGF и VEGF165: в случае использования конструкций, содержащих последовательность IRES, АФР не детектировались, либо обнаруживались лишь следовые их количества, плазида с двунаправленным промотором bi-HGF/VEGF обеспечивала синтез большого количества HGF, однако продукции VEGF165 не наблюдалось. Только бицистронная плазида с двумя независимыми промоторами (цитомегаловируса (CMV) для HGF и куриного  $\beta$ -актина (CAG) для VEGF165) – pHGF/VEGF обеспечивала продукцию обоих факторов роста в скелетных мышцах в близком к эквимолярному соотношению. Оценка эффективности вектора pHGF/VEGF проводилась на мышинной модели ишемии задних конечностей. В/м

введение рHGF/VEGF вызывало значимое восстановление перфузии по сравнению с введением пустого вектора и физиологического раствора. Эти данные подкреплялись обнаруженным при гистологическом исследовании увеличением плотности капилляров в тканях животных, которым однократно вводили данную плазмиду.

Результаты нашей работы показывают, что однократное введение рHGF/VEGF индуцирует ангиогенез и уменьшает распространенность ишемического некроза, однако влияние введения пДНК на воспалительный ответ необходимо изучить подробнее в ходе доклинических исследований безопасности. Мы также имеем основание предполагать, что полученные данные расширяют представления об эффектах введения «путый» пДНК, что может быть важно при планировании ДКИ других препаратов для ГТ на основе невирусных векторов.

Таким образом, в нашем исследовании описывается первый в своем классе лекарственный «кандидат» для ГТ на основе бицистронной плазмидной конструкции с двумя независимыми промоторами, обеспечивающий доставку в ткани двух важнейших АФР (HGF и VEGF165). Созданный бицистронный плазмидный вектор обладает свойствами, необходимыми для последующей разработки лекарственного препарата для терапии неудовлетворенных медицинских потребностей - заболеваний периферических артерий и связанной с ними ишемии конечностей, диабетической нейропатии и других заболеваний, при которых нарушается сосудистая и нервная трофика.

## Выводы

- 1) Для стимуляции ангиогенеза созданы бицистронные плазмидные генотерапевтические конструкции, кодирующие гены фактора роста гепатоцитов (HGF) и фактора роста эндотелия сосудов (VEGF165). Предложены следующие варианты генетических конструкций: вектор, включающий внутренний сайт посадки рибосом (IRES), том числе последовательности IRES вируса энцефаломиокардита мышей и IRES генов эукариот (Bip, FGF1, EIF4G), вектор с двунаправленным промотором (bi-HGF/VEGF) и вектор с двумя независимыми промоторами (pHGF/VEGF) для HGF и VEGF165.
- 2) Установлено, что созданные бицистронные плазмидные генотерапевтические конструкции обеспечивают экспрессию HGF и VEGF165 при трансфекции в клетки линии HEK293T. Вместе с тем, в зависимости от строения генетической конструкции количества синтезированных белков и соотношения концентраций HGF/VEGF165 значительно различаются. Так, концентрации HGF могут варьировать от 0,08 до 6,05 нМ, концентрации VEGF165 могут варьировать от 0,27 до 5,92 нМ, а соотношения молярных концентраций HGF/VEGF165 от 11,38:1 до 1:1,38 в зависимости от структуры плазмидного вектора.
- 3) На модели ангиогенеза *in vitro* показана способность экспрессируемых факторов HGF и VEGF165 стимулировать образование капиллярподобных структур эндотелиальными клетками HUVEC.
- 4) На эксплантной культуре скелетных мышц мышей установлено, что способностью обеспечивать значимую экспрессию HGF и VEGF165 обладает только бицистронная плазмидная генотерапевтическая конструкция с двумя независимыми промоторами для каждого из генов (pHGF/VEGF). При этом

введение в скелетные мышцы созданных бицистронных конструкций иного строения не приводило к продукции обоих целевых АФР.

5) На модели ишемии задней конечности у мышей установлено, что при однократном внутримышечном введении бицистронной плазмидной конструкции рHGF/VEGF наблюдается

- восстановление перфузии: введение 150 мкг рHGF/VEGF приводило к значимому восстановлению перфузии уже к 7-му дню после инъекции (относительная перфузия составила  $34,14\% \pm 3,6\%$  в группе рHGF/VEGF по сравнению с  $25,51\% \pm 2,59\%$  в контрольной группе). К 14-му дню относительная перфузия составила  $53,06\% \pm 2,71\%$  для группы рHGF/VEGF по сравнению с  $35,76\% \pm 2,20\%$  в группе отрицательного контроля;

- снижение относительной площади некроза, вызванного ишемическим повреждением мышцы (площадь некроза при введении рHGF/VEGF составила 31%, тогда как в контрольной группе этот показатель составил 44,8%);

- статистически значимое увеличение количества капилляров (с просветом и без) относительно контроля, а также отмечается тенденция к увеличению количества артериол (сосудов, окрашивающихся по маркеру гладкомышечных клеток –  $\alpha$ -гладкомышечному актину).

б) Ангиогенное действие бицистронной плазмидной конструкции рHGF/VEGF в определенной мере обусловлено влиянием HGF и VEGF165 на выживаемость эндотелиальных клеток.

## Список сокращений и обозначений

АФР - ангиогенный фактор роста

БСА - бычий сывороточный альбумин

в/в – внутривенно

ВКМ – внеклеточный матрикс

в/м - внутримышечно

ГТ – генная терапия

ДКИ – доклиническое исследование

ЗПА – заболевания периферических артерий

ИФА – иммуноферментный анализ

КИ – клиническое исследование

КИНК – критическая ишемия нижних конечностей

СМА - спинальная мышечная атрофия

пДНК - плазмидная ДНК

ПЗ – поле зрения

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ФБС - фетальная бычья сыворотка

ФСБ – фосфатно-солевой буфер

ЭДТА - этилендиаминтетрауксусная кислота

ЭК – эндотелиальная клетка

$\alpha$ -SMA – альфа-гладкомышечный актин

AAV - аденоассоциированный вирус

ADA – аденозинадезаминаза

ADME - абсорбция, распределение, метаболизм и экскреция

Akt - альфа-серин/треонин-протеинкиназа

BDNF - фактор роста нервов

bFGF – основной фактор роста фибробластов

bGH - бычий гормон роста

Bip - белок связывающий иммуноглобулин

CAG - ген  $\beta$ -актина цыпленка

CD31 – кластер дифференцировки 31

CMV – цитомегаловирус

CpG - цитозин-гуанин динуклеотидные мотивы

CPPs - полимерные и пептидные конструкции

DAPI – 4,6-диамидино-2-фенилиндол

DMEM - среда Игла в модификации Дальбекко

DOPE – диолеилфосфатидилэтаноламин

DOSPA – 2,3-диолеилокси-N-[2(спермин-карбоксамидо)этил]-N,N-диметил-1-пропанамина трифторацетат

EEF1A1 - промотор фактора элонгации трансляции 1 альфа

EGM-2 - среда культивирования эндотелиальных клеток 2

eIF4G – эукариотический фактор инициации трансляции 4 G

EMA - Европейское агентство лекарственных средств

EMCV – вирус энцефаломиокардита

FAK - киназа фокальной адгезии

FDA - Администрацией по продуктам питания и лекарствам США

GFP - зеленый флуоресцентный белок

HEK293T - клеточная линия, полученная из эмбриональных почек человека

HEPES - 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота

HGF – фактор роста гепатоцитов

HUVEC - эндотелиальные клетки пупочной вены человека

ICAM-1 - молекула межклеточной адгезии 1

IRES - внутренний сайт посадки рибосом

KanR - ген устойчивости к канамицину

LB - лизогенная среда

MCP-1 – моноцитарный хемоаттрактант 1

NF- $\kappa$ B – ядерный фактор  $\kappa$ B

NLS - сигнальная последовательность ядерной локализации

n.s. – не значимо

ORF – открытая рамка считывания

ori - точка начала репликации

PAMAM – поли(амидоамино)дендример

PDEAEMA – поли(аминоэфир), поли(2-диэтиламиноэтилметакрилат)

PDGF - тромбоцитарный фактор роста

PEI - поли(этиленамин)

Pgk1 - промотор фосфоглицераткиназы

PK/PD – фармакокинетика/фармакодинамика

poly A - участок полиаденилирования

PRG4 - протеогликан 4

RFP - красный флуоресцентный белок

SCID - синдром тяжелого комбинированного иммунодефицита

SV40 - вирус обезьян

TAE – трис-ацетатный буфер

TGF- $\beta$  - трансформирующий фактор роста

uPa – урокиназа

VCAM - молекула адгезии сосудистых клеток

VEGF – эндотелиальный фактор роста сосудов

vs. – по сравнению

## Список литературы

1. Adachi N., Lieber M. R. Bidirectional gene organization: A common architectural feature of the human genome // *Cell*. 2002. № 7 (109). С. 807–809.
2. Al-dosari M. S., Gao X. Nonviral gene delivery: Principle , Limitations , and Recent Progress // *AAPS J*. 2009. № 4 (11).
3. Allera-moreau C. [и др.]. Long term expression of bicistronic vector driven by the FGF-1 IRES in mouse muscle 2007. (12). С. 1–12.
4. Anderson W. F. Human gene therapy // *Science*. 1992. № 5058 (256).
5. Banfi A. [и др.]. Therapeutic angiogenesis due to balanced single-vector delivery of VEGF and PDGF-BB // *The FASEB Journal*. 2012.
6. Banks G. A. [и др.]. RESEARCH ARTICLE A model for the analysis of nonviral gene therapy 2003. С. 1766–1775.
7. Barandon L. [и др.]. Reduction of infarct size and prevention of cardiac rupture in transgenic mice overexpressing FrzA // *Circulation*. 2003. (108).
8. Barc P. [и др.]. A combination of VEGF165/HGF genes is more effective in blood vessels formation than ANGPT1/VEGF165 genes in an in vivo rat model // *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 2016. № 7 (9). С. 12737–12744.
9. Barc P. [и др.]. Treatment of Critical Limb Ischemia by pIRES/VEGF165/HGF Administration // *Annals of Vascular Surgery*. 2019. (60). С. 346–354.
10. Barc P. [и др.]. Treatment of Critical Limb Ischemia by pIRES/VEGF165/HGF Administration // *Annals of Vascular Surgery*. 2019. (60). С. 346–354.
11. Barc P. [и др.]. Double VEGF/HGF Gene Therapy in Critical Limb Ischemia Complicated by Diabetes Mellitus // *Journal of Cardiovascular Translational Research*. 2020.
12. Baum C. [и др.]. Mutagenesis and Oncogenesis by Chromosomal Insertion of gene

transfer vectors // *Hum Gene Ther.* 2006. № 3 (17). С. 253–263.

13. Baumgartner I. [и др.]. Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia // *Circulation.* 1998. № 12 (97). С. 1114–23.

14. Baumgartner I. [и др.]. Lower-extremity edema associated with gene transfer of naked DNA encoding vascular endothelial growth factor // *Ann Intern Med.* 2000. № 11 (132). С. 880–884.

15. Belch J. [и др.]. Effect of fibroblast growth factor NV1FGF on amputation and death: a randomised placebo-controlled trial of gene therapy in critical limb ischaemia // *Lancet.* 2011. № 9781 (377). С. 1929–37.

16. Belousova N. [и др.]. Circumventing Recombination Events Encountered with Production of a Clinical-Grade Adenoviral Vector with a Double-Expression Cassette // *Mol Pharmacol.* 2006. № 5 (70). С. 1488–1493.

17. Bergmann C. [и др.]. Arteriogenesis depends on circulating monocytes and macrophage accumulation and is severely depressed in op/op mice // *Journal of leukocyte biology.* 2006. № 1 (80). С. 59–65.

18. Bessis N., Garciascozar F. J., Boissier M. Immune responses to gene therapy vectors: influence on vector function and effector mechanisms // *Gene Ther.* 2004. С. 10–17.

19. Boldyreva M. [и др.]. Plasmid-based gene therapy with hepatocyte growth factor stimulates peripheral nerve regeneration after traumatic injury // *Biomedicine and Pharmacotherapy.* 2018. № November 2017 (101). С. 682–690.

20. Boldyreva M. A. [и др.]. Transplantation of adipose stromal cell sheet producing hepatocyte growth factor induces pleiotropic effect in ischemic skeletal muscle // *International Journal of Molecular Sciences.* 2019. № 12 (20).

21. Bonner W. M. Protein migration into nuclei. I. Frog Oocyte Nuclei In Vivo Accumulate Microinjected Histones , Allow Entry to Small Proteins , and Exclude Large Proteins // *J Cell Biol.* 1975. № 2 (64). С. 421–430.

22. Bosnjak M. [и др.]. Electrotransfer of different control plasmids elicits different antitumor effectiveness in B16.F10 melanoma // *Cancers (Basel).* 2018. № 2 (10). С. 37.

23. Bouard D., Cosset F. Viral vectors: from virology to transgene expression // *Br J Pharmacol.* 2009. № 2 (157). С. 153–165.
24. Brunner S. [и др.]. Cell cycle dependence of gene transfer by lipoplex, polyplex and recombinant adenovirus // *Gene Ther.* 2000. № 5 (7). С. 401–407.
25. Cao Y. Therapeutic angiogenesis for ischemic disorders: what is missing for clinical benefits? // *Discov Med.* 2010. (9). С. 179–84.
26. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis // *Nat Med.* 2000. № 4 (6). С. 389–395.
27. Carmeliet P., Jain R. Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases // *Nature Reviews Drug Discovery.* 2011. № 6 (10). С. 417–27.
28. Carmeliet P., Jain R. K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis // *Nature.* 2011. № 7374 (473). С. 298–307.
29. Cavazzana-calvo M. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)– X1 disease // *Science.* 2012. № 2000 (669). С. 669–72.
30. Chalothorn D., Faber J. Strain-dependent variation in collateral circulatory function in mouse hindlimb // *Physiol Genom.* 2010. № 3 (42). С. 469–79.
31. Chen F. [и др.]. Adeno-associated virus vectors simultaneously encoding VEGF and angiopoietin-1 enhances neovascularization in ischemic rabbit hind-limbs // *Acta Pharmacol Sin.* 2007. № 4 (28). С. 493–502.
32. Chen W. [и др.]. The endothelial tip-stalk cell selection and shuffling during angiogenesis // *Journal of Cell Communication and Signaling.* 2019. № 3 (13). С. 291–301.
33. Chiuchiolo M. J., Crystal R. G. Gene therapy for alpha-1 antitrypsin deficiency lung disease // *Annals of the American Thoracic Society.* 2016. № August (13). С. S352–S369.
34. Cicone F. [и др.]. Cardiac radionuclide imaging in rodents: a review of methods, results, and factors at play // *Front Med.* 2017. № 35 (4). С. 1–11.
35. Cleutjens J. P. [и др.]. The infarcted myocardium: simply dead tissue, or a lively target for therapeutic interventions // *Cardiovasc Res.* 1999. (44). С. 232–41.

36. Cohen R. N. [и др.]. Quantification of plasmid DNA copies in the nucleus after lipoplex and polyplex transfection // *J Control Release*. 2009. № 2 (135). С. 166–174.
37. Connolly P. F., Jäger R., Fearnhead H. O. New roles for old enzymes: Killer caspases as the engine of cell behavior changes // *Frontiers in Physiology*. 2014. № April (5 APR).
38. Couffinhal T. [и др.]. Mouse model of angiogenesis // *The American journal of pathology*. 1998. № 6 (152). С. 1667–79.
39. Couffinhal T. [и др.]. Mouse models to study angiogenesis in the context of cardiovascular diseases // *Frontiers in Bioscience*. 2009. № 14 (Volume). С. 3310.
40. Curradi M. [и др.]. Molecular Mechanisms of Gene Silencing Mediated by DNA Methylation // *Mol Cell Biol*. 2002. № 9 (22). С. 3157–3173.
41. Cutroneo K. R. Gene Therapy for Tissue Regeneration // *J Cell Biochem*. 2003. № 2 (88). С. 418–425.
42. Daniel C. [и др.]. Extracellular DNA traps in inflammation, injury and healing // *Nature Reviews Nephrology*. 2019. № 9 (15). С. 559–575.
43. David R. M., Doherty A. T. Viral Vectors: The Road to Reducing Genotoxicity // *Toxicol. Sci*. 2016. (155).
44. Dean D., Strong D., Zimmer W. Nuclear entry of nonviral vectors // *Gene Ther*. 2005. № 11 (12). С. 881–90.
45. Delluc-Clavières A. [и др.]. Efficient gene transfer in skeletal muscle with AAV-derived bicistronic vector using the FGF-1 IRES // *Gene Therapy*. 2008. С. 1090–1098.
46. Deutekom J. C. T. Van, Ommen G. B. Van Advances in Duchenne muscular dystrophy gene therapy 2003. № 10 (4). С. 774–783.
47. Deveza L., Choi J., Yang F. T. Therapeutic angiogenesis for treating cardiovascular diseases // *Theranostics*. 2012. № 8 (2). С. 801–14.
48. Douin V. [и др.]. Use and comparison of different internal ribosomal entry sites (IRES) in tricistronic retroviral vectors // *BMC Biotechnology* 2004., 2004. № 16 (4).
49. Dowty M. E. [и др.]. Plasmid DNA entry into postmitotic nuclei of primary rat myotubes // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995. № 10 (92). С. 4572–4576.
50. Dubensky T. J., Sauter S. Generation of retroviral packaging and producer cell lines

- for large-scale vector production with improved safety and titer // *Methods Mol Med*. 2003. (76). С. 309–30.
51. Dzau V. J. [и др.]. Current perceptions of cardiovascular gene therapy // *Am J Cardiol*. 2003. № 03 (9149). С. 18–23.
52. EMEA Summary of product characteristics - Glybera // 2012.
53. EMEA Summary of product characteristics - Imlygic // 2016.
54. Emerman M., Temin H. Genes with promoters in retrovirus vectors can be independently suppressed by an epigenetic mechanism // *Cell*. 1984. С. 449–467.
55. Emerman M., Temin H. Comparison of promoter suppression in avian and murine retrovirus vectors // *Nucleic Acids Res*. 1986. № 23 (14). С. 9381–96.
56. Erbacher P. [и др.]. Putative Role of Chloroquine in Gene Transfer into a Human Hepatoma Cell Line by DNA / Lactosylated Polylysine Complexes // *Exp Cell Res*. 1996. № 1 (225). С. 186–194.
57. FDA Chemistry, Manufacturing, and Control (CMC) Information for Human Gene Therapy Investigational New Drug Applications (INDs); Draft Guidance for Industry 7/2018 [Электронный ресурс]. URL: <https://www.fda.gov/media/113760/download>.
58. FDA Summary Basis for Regulatory Action - ZOLGENSMA // 2019.
59. Featherstone C., Darby M. K., Gerace L. A Monoclonal Antibody Against the Nuclear Pore Complex Inhibits Nucleocytoplasmic Transport of Protein and RNA In Vivo // *J Cell Biol*. 1988. № 4 (107). С. 1289–1297.
60. Felgner J. H. [и др.]. Enhanced Gene Delivery and Mechanism Studies with a Novel Series of Cationic Lipid Formulations // *J Biol Chem*. 1994. № 4 (269). С. 2550–2561.
61. Felipe P. De Skipping the co-expression problem: the new 2A «CHYSEL» technology 2004. (6). С. 1–6.
62. Ferrara N., Davis-Smyth T. The Biology of Vascular Endothelial Cell Growth Factor Isoforms // *Endocrine Reviews*. 1997. № 1 (18). С. 4–25.
63. Ferrara N., Gerber H.-P., LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors // *Nat Med*. 2003. № 6 (9). С. 669–76.
64. Ferrari S., Geddes D. M., Alton E. W. F. W. Barriers to and new approaches for gene therapy and gene delivery in cystic fibrosis 2002. № 11 (54). С. 1373–1393.

65. Fischer C., Schneider M., Carmeliet P. Principles and therapeutic implications of angiogenesis, vasculogenesis and arteriogenesis // Handbook of experimental pharmacology. 2006. С. 157–212.
66. Fowkes F., Price J. Gene therapy for critical limb ischaemia: the TAMARIS trial // Lancet. 2011. № 9781 (377). С. 1894–6.
67. Fraisl P. [и др.]. Regulation of Angiogenesis by Oxygen and Metabolism // Developmental Cell. 2009. № 2 (16). С. 167–179.
68. Fukino K. [и др.]. Genetic background influences therapeutic effectiveness of VEGF // Biochem Biophys Res Commun. 2003. (310). С. 143–147.
69. Gam J. J. [и др.]. A ‘ poly-transfection ’ method for rapid , one-pot characterization and optimization of genetic systems 2019. № 18 (47). С. 1–11.
70. Gao X., Huang L. Cationic liposome-mediated gene transfer // Gene Ther. 1995. № 3 (35). С. 1027–1036.
71. Gazit G. [и др.]. Use of the glucose starvation-inducible glucose-regulated protein 78 promoter suicide gene therapy of murine fibrosarcoma // Cancer Research. 1999. № 13 (59). С. 3100–3106.
72. Gehling A. M. [и др.]. Evaluation of Volume of Intramuscular Injection into the Caudal Thigh Muscles of Female and Male BALB/c Mice (Mus musculus) // Journal of the American Association for Laboratory Animal Science. 2018. № 1 (57). С. 35–43.
73. Gerhardt H. [и др.]. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. The journal of cell biology // The Journal of cell biology. 2003. № 6 (161). С. 1163–7.
74. Gerritsen M. E. HGF and VEGF: A Dynamic Duo // Circulation Research. 2005. № 3 (96). С. 272–273.
75. Gianni-Barrera R. [и др.]. Long-term safety and stability of angiogenesis induced by balanced single-vector co-expression of PDGF-BB and VEGF164 in skeletal muscle // Scientific Reports. 2016.
76. Golding M. C., Mann M. R. W. A bidirectional promoter architecture enhances lentiviral transgenesis in embryonic and extraembryonic stem cells // Gene Therapy. 2011.

77. Golocheikine A. [и др.]. Cooperative signaling for angiogenesis and neovascularization by VEGF and HGF following islet transplantation // *Transplantation*. 2010. № 7 (90). С. 725–31.
78. Goswami R. [и др.]. Gene Therapy Leaves a Vicious Cycle // *Front. Oncol.* 2019. (9). С. 1–25.
79. Griffioen A. W., Molema G. Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation // *Pharmacol Rev.* 2000. № 2 (52). С. 237–68.
80. Gu Y. [и др.]. A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase II Study of Hepatocyte Growth Factor in the Treatment of Critical Limb Ischemia // *Molecular Therapy*. 2019. № 12 (27). С. 2158–2165.
81. Gunzburg W. H. Retroviral gene therapy – where now? 2003. № 7 (9). С. 277–278.
82. Gupta R., Tongers J., Losordo D. Human Studies of Angiogenic Gene Therapy // *Circ Res.* 2009. № 8 (105). С. 724–36.
83. Hacein-bey-abina S., Schmidt M. A Serious Adverse Event after Successful Gene Therapy for X-Linked Severe Combined Immunodeficiency 2003. С. 255–266.
84. Häcker G., Redecke R., Häcker H. Activation of the immune system by bacterial CpG-DNA // *Immunology*. 2002. № 3 (105). С. 245–51.
85. Hennecke M. [и др.]. Composition and arrangement of genes define the strength of IRES-driven translation in bicistronic mRNAs 2001. № 16 (29). С. 3327–3334.
86. Himori N., Matsuura A. A simple technique for occlusion and reperfusion of coronary artery in conscious rats // *Am J Physiol.* 1989.
87. Houck K. A. [и др.]. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms // *Biol Chem.* 1992. № 36 (267). С. 26031–26037.
88. Houk B. E. [и др.]. Pharmacokinetics of plasmid DNA in the rat // *Pharmaceutical Research*. 2001. № 1 (18). С. 67–74.
89. Houk B., Hochhaus G., Hughes J. Kinetic modeling of plasmid DNA degradation in rat plasma // *AAPS PharmSci.* 1999. № 3 (1). С. 15–20.
90. Irvine R. A. [и др.]. DNA Methylation Has a Local Effect on Transcription and

Histone Acetylation 2002. № 19 (22). С. 6689–6696.

91. Isner J. [и др.]. Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF165 in patient with ischaemic limb // *Lancet*. 1996. (10). С. 370–4.
92. Iwaguro H. [и др.]. Endothelial progenitor cell vascular endothelial growth factor gene transfer for vascular regeneration // *Circulation*. 2002. № 6 (105). С. 732–8.
93. Jang H. S. [и др.]. A novel ex vivo angiogenesis assay based on electroporation-mediated delivery of naked plasmid DNA to skeletal muscle // *Molecular Therapy*. 2004. № 3 (9). С. 464–474.
94. Jetten N. [и др.]. Local delivery of polarized macrophages improves reperfusion recovery in a mouse hind limb ischemia model // *PloS one*. 2013. № 7 (8).
95. Kamiya H. [и др.]. Intracellular trafficking and transgene expression of viral and non-viral gene vectors 2001. (52). С. 153–164.
96. Kamiya H. [и др.]. Visualization of intracellular trafficking of exogenous DNA delivered by cationic liposomes // *Biochem Biophys Res Commun*. 2002. (298). С. 591–597.
97. Kamiya H., Akita H., Harashima H. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations in gene therapy 2003. № 21 (8). С. 990–996.
98. Karagyaur M. [и др.]. A bicistronic plasmid encoding brain-derived neurotrophic factor and urokinase plasminogen activator stimulates peripheral nerve regeneration after injury // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2020. № 3 (372). С. 248–255.
99. Kato N. [и др.]. Nonviral gene transfer of human hepatocyte growth factor improves streptozotocin-induced diabetic neuropathy in rats // *Diabetes*. 2005. № 3 (54). С. 846–854.
100. Kawabata K., Takakura Y., Hashida M. The Fate of Plasmid DNA After Intravenous Injection in Mice: Involvement of Scavenger Receptors in Its Hepatic Uptake // *Pharm Res*. 1995. № 6 (12). С. 825–830.
101. Kessler J. A. [и др.]. Double-blind, placebo-controlled study of HGF gene therapy in diabetic neuropathy // *Annals of Clinical and Translational Neurology*. 2015. № 5 (2). С. 465–478.

102. Kessler J. A. [и др.]. Gene therapy for diabetic peripheral neuropathy: A randomized, placebo-controlled phase III study of VM202, a plasmid DNA encoding human hepatocyte growth factor // *Clinical and Translational Science*. 2021. № October 2020. С. 1–9.
103. Khalil I. A. [и др.]. Uptake Pathways and Subsequent Intracellular Trafficking in Nonviral Gene Delivery // *Pharmacol Rev*. 2006. № 1 (58). С. 32–45.
104. Kibbe M. [и др.]. Safety and efficacy of plasmid DNA expressing two isoforms of hepatocyte growth factor in patients with critical limb ischemia // *Gene Therapy*. 2016. № 3 (23). С. 306–12.
105. Krieg A. The role of CpG motifs in innate immunity // *Curr Opin Immunol*. 2000. № 1 (12). С. 35–43.
106. Lechardeur D. [и др.]. Metabolic instability of plasmid DNA in the cytosol: a potential barrier to gene transfer // *Gene Therapy*. 1999. № 4 (6). С. 482–497.
107. Ledley T., Ledley F. Multicompartmental, numerical-model of cellular events in the pharmacokinetics of gene therapies // *Hum Gene Ther*. 1994. (5). С. 679–91.
108. Lee J. [и др.]. Combined administration of naked DNA vectors encoding VEGF and bFGF enhances tissue perfusion and arteriogenesis in ischemic hindlimb // *Biochem Biophys Res Commun*. 2007. № 4 (360). С. 752–8.
109. Licursi M. [и др.]. In vitro and in vivo comparison of viral and cellular internal ribosome entry sites for bicistronic vector expression // *Gene Therapy*. 2011.
110. Licursi M. [и др.]. In vitro and in vivo comparison of viral and cellular internal ribosome entry sites for bicistronic vector expression 2011. № 6 (18). С. 631–636.
111. Liebert M. A. Current Status of Gendicine in China: Recombinant Human Ad-p53 Agent for Treatment of Cancers // *Gene Medicine*. 2005. № 9 (16). С. 1016–1027.
112. Lindsey M. L. [и др.]. Guidelines for experimental models of myocardial ischemia and infarction // *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. 2018. № 4 (314). С. H812–H838.
113. Liu X. [и др.]. Synergistically therapeutic effects of VEGF165 and angiopoietin-1 on ischemic rat myocardium // *Scandinavian cardiovascular journal: SCJ*. 2007. № 2 (41). С. 95–101.

114. Luby-Phelps K. [и др.]. Hindered diffusion of inert tracer particles in the cytoplasm of mouse 3T3 cells // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987. № 14 (84). С. 4910–4913.
115. Ludtke J. J., Sebestyén M. G., Wolff J. A. The Effect of Cell Division on the Cellular Dynamics of Microinjected DNA and Dextran // *Mol Ther*. 2002. № 5 (5). С. 579–588.
116. Lukacs G. L. [и др.]. Size-dependent DNA Mobility in Cytoplasm and Nucleus // *J Biol Chem*. 2000. № 3 (275). С. 1625–1629.
117. Luttun A. [и др.]. Loss of placental growth factor protects mice against vascular permeability in pathological conditions // *Biochem Biophys Res Commun*. 2002. № 2 (295). С. 428–34.
118. Ma G. [и др.]. Gene medicine for cancer treatment: Commercially available medicine and accumulated clinical data in China // *Drug Des Devel Ther*. 2008.
119. Ma H. [и др.]. Mechanisms of hepatocyte growth factor-mediated vascular smooth muscle cell migration // *Circ Res*. 2003. № 11 (93). С. 1066–73.
120. Ma P. C. [и др.]. Downstream signalling and specific inhibition of c-MET/HGF pathway in small cell lung cancer: implications for tumour invasion // *Br J Cancer*. 2007. № 3 (97). С. 368–77.
121. Madonna R. [и др.]. Hepatocyte growth factor: Molecular biomarker and player in cardioprotection and cardiovascular regeneration // *Thrombosis and Haemostasis*. 2012. № 4 (107). С. 656–661.
122. Makarevich P. [и др.]. Combined transfer of human VEGF165 and HGF genes renders potent angiogenic effect in ischemic skeletal muscle // *PLoS ONE*. 2012. № 6 (7).
123. Makarevich P. I. [и др.]. Angiogenic and pleiotropic effects of VEGF165 and HGF combined gene therapy in a rat model of myocardial infarction // *PLoS ONE*. 2018. № 5 (13). С. 1–25.
124. Małecki M., Przybyszewska M., Janik P. Construction of a bicistronic proangiogenic expression vector and its application in experimental angiogenesis in vivo // *Acta Biochimica Polonica*. 2003. № 3 (50). С. 875–882.

125. Matsumoto K., Nakamura T. Emerging multipotent aspects of hepatocyte growth factor // *J Biochem.* 1996. (119). C. 591–600.
126. Matsumoto R., Al. E. Vascular endothelial growth factor-expressing mesenchymal stem cell transplantation for the treatment of acute myocardial infarction // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005. № 6 (25). C. 1168–73.
127. Mebratu Y., Tesfaigzi Y. How ERK1/2 Activation Controls Cell Proliferation and Cell Death Is Subcellular Localization the Answer? // *Cell Cycle.* 2009. № 8 (8). C. 1168–75.
128. Miller A. M., Dean D. A. Tissue-specific and transcription factor-mediated nuclear entry of DNA // *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2009. № 7–8 (61). C. 603–613.
129. Min J. K. [и др.]. Hepatocyte growth factor suppresses vascular endothelial growth factor-induced expression of endothelial ICAM-1 and VCAM-1 by inhibiting the nuclear factor- $\kappa$ B pathway // *Circulation Research.* 2005. № 3 (96). C. 300–307.
130. Mintzer M. A., Simanek E. E. Nonviral Vectors for Gene Delivery // *Chem Rev.* 2009. № 2 (109). C. 259–302.
131. Mislick K. A., Baldeschwieler J. D. Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996. № 22 (93). C. 12349–12354.
132. Mizuguchi H. [и др.]. IRES-Dependent Second Gene Expression Is Significantly Lower Than Cap-Dependent First Gene Expression in a Bicistronic Vector AND 2000. № 4 (1). C. 376–382.
133. Molokotina Y. D. [и др.]. Combined Action of GDNF and HGF Up-Regulates Axonal Growth by Increasing ERK1/2 Phosphorylation // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2019. № 3 (167). C. 413–417.
134. Morishita R. [и др.]. Therapeutic angiogenesis induced by human recombinant hepatocyte growth factor in rabbit hind limb ischemia model as cytokine supplement therapy // *Hypertension.* 1999. № 6 (33). C. 1379–84.
135. Morishita R. [и др.]. Safety Evaluation of Clinical Gene Therapy Using Hepatocyte Growth Factor to Treat Peripheral Arterial Disease // *Hypertension.* 2004. № 2 (44). C. 203–209.

136. Morishita R. [и др.]. Therapeutic angiogenesis using hepatocyte growth factor (HGF) // *Curr Gene Ther.* 2004. (2). С. 199–206.
137. Morishita R. [и др.]. Phase I/IIa clinical trial of therapeutic angiogenesis using hepatocyte growth factor gene transfer to treat critical limb ischemia // *Arteriosclerosis, thrombosis and vascular biology.* 2011. № 3 (31). С. 713–20.
138. Mourão M. A., Hakim J. B., Schnell S. Connecting the dots: The effects of macromolecular crowding on cell physiology // *Biophysical Journal.* 2014. № 12 (107). С. 2761–2766.
139. Mukwaya A. [и др.]. Factors regulating capillary remodeling in a reversible model of inflammatory corneal angiogenesis // *Scientific Reports.* 2016. № March (6). С. 1–15.
140. Nakamura T., Mizuno S. The discovery of Hepatocyte Growth Factor (HGF) and its significance for cell biology, life sciences and clinical medicine // *Proceedings of the Japan Academy Series B: Physical and Biological Sciences.* 2010. № 6 (86). С. 588–610.
141. Ngoi S. M., Chien A. C., Lee C. G. L. Exploiting Internal Ribosome Entry Sites in Gene Therapy Vector Design // *Current Gene Therapy.* 2004. (4). С. 15–31.
142. Niebuhr A. [и др.]. Long-term safety of intramuscular gene transfer of non-viral FGF1 for peripheral artery disease // *Gene Therapy.* 2012. № 3 (19). С. 264–70.
143. Nikol S. [и др.]. Naked plasmid DNA encoding fibroblast growth factor type 1 for the treatment of end-stage unreconstructible lower extremity ischemia: preliminary results of a phase I trial // *J Vasc Surg.* 2002. № 5 (35). С. 930–6.
144. Nikol S. [и др.]. Therapeutic angiogenesis with intramuscular NV1FGF improves amputation-free survival in patients with critical limb ischemia // *Mol Ther.* 2008. № 5 (16). С. 972–8.
145. Nowak-Sliwinska P. [и др.]. Consensus guidelines for the use and interpretation of angiogenesis assays / P. Nowak-Sliwinska, K. Alitalo, E. Allen, A. Anisimov, A. C. Aplin [и др.], Springer Netherlands, 2018. 425–532 с.
146. O'Connor T., Crystal R. Genetic medicines: treatment strategies for hereditary disorders. // *Nat Rev Genet.* 2006. № 4 (7). С. 1–76.

147. Oh Y. Prolonged organ retention and safety of plasmid DNA administered in polyethylenimine complexes // *Gene Therapy*. 2001. (8). С. 1587–1592.
148. Pack D. W. [и др.]. DESIGN AND DEVELOPMENT OF POLYMERS FOR GENE DELIVERY // *Nature reviews. Drug discovery*. 2005. № July (4). С. 581–593.
149. Paludan S. R. Activation and Regulation of DNA-Driven Immune Responses // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2015. № 2 (79). С. 225–241.
150. Parker S., Al E. Plasmid DNA malaria vaccine: tissue distribution and safety studies in mice and rabbits // *Hum Gene Ther*. 1999. (10). С. 741–758.
151. Parra-Guillén Z. P. [и др.]. Gene Therapy: A Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Modelling Overview // *Pharm Res*. 2010. С. 1487–1497.
152. Pyun W. B. [и др.]. Naked DNA expressing two isoforms of hepatocyte growth factor induces collateral artery augmentation in a rabbit model of limb ischemia // *Gene Therapy*. 2010. № 12 (17). С. 1442–1452.
153. Qin J. Y. [и др.]. Systematic comparison of constitutive promoters and the doxycycline-inducible promoter // *PLoS ONE*. 2010.
154. Rajagopalan S. [и др.]. Regional angiogenesis with vascular endothelial growth factor in peripheral arterial disease: a phase II randomized, double-blind, controlled study of adenoviral delivery of vascular endothelial growth factor 121 in patients with disabling intermittent cl // *Circulation*. 2003. (16). С. 1933–38.
155. Ramamoorth M., Narvekar A. Non viral vectors in gene therapy- an overview // *J Clin Diagn Res*. 2015. № 1 (9). С. 1–6.
156. Rosenberg S. [и др.]. Gene transfer into humans--immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction // *N Engl J Med*. 1990. № 9 (323).
157. Rosengart T. K. [и др.]. Phase I Assessment of Direct Intramyocardial Administration of an Adenovirus Vector Expressing VEGF121 cDNA to Individuals With Clinically Significant Severe Coronary Artery Disease // *Circulation*. 1999. № 5 (100). С. 468–74.
158. San H. [и др.]. Safety and Short - Term Toxicity of a Novel Cationic Lipid Formulation for Human Gene Therapy // *Hum Gene Ther*. 1993. № 6 (4). С. 781–788.

159. Schertzer J. D., Lynch G. S. Plasmid-based gene transfer in mouse skeletal muscle by electroporation // *Methods Mol Biol.* 2008. (433). С. 15–125.
160. Scholz D. [и др.]. Contribution of arteriogenesis and angiogenesis to postocclusive hindlimb perfusion in mice // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology.* 2002. № 7 (34). С. 775–787.
161. Sebestyén M. [и др.]. DNA vector chemistry: the covalent attachment of signal peptides to plasmid DNA. // *Nat Biotechnol.* 1998. № 1 (16). С. 80–85.
162. Semenza G. L. Targeting HIF-1 for cancer therapy // *Nat. Rev. Cancer.* 2003. (3). С. 721–732.
163. Seroogy C. M., Fathman C. G. The application of gene therapy in autoimmune diseases // *Gene Therapy.* 2000. (7). С. 9–13.
164. Shaheen S. M. [и др.]. Quantitative analysis of condensation / decondensation status of pDNA in the nuclear sub-domains by QD-FRET // *Nucleic Acids Res.* 2011. № 7 (39). С. 1–12.
165. Shahid I. [и др.]. *Recent Advances in Angiogenesis Assessment Methods and their Clinical Applications* под ред. D. Simionescu, 2017.
166. Shalini S. [и др.]. Old, new and emerging functions of caspases // *Cell Death and Differentiation.* 2015. № 4 (22). С. 526–539.
167. Shigematsu H. [и др.]. Randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial of hepatocyte growth factor plasmid for critical limb ischemia // *Gene Therapy.* 2010. № 9 (17). С. 1152–1161.
168. Shigematsu H. [и др.]. Transfection of human HGF plasmid DNA improves limb salvage in Buerger’s disease patients with critical limb ischemia // *Int Angiol.* 2011. С. 140–9.
169. Siafakas N. M., Antoniou K. M., Tzortzaki E. G. Role of angiogenesis and vascular remodeling in chronic obstructive pulmonary disease // *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2007. № 4 (2). С. 453–62.
170. Siemerink M. J. [и др.]. Endothelial Tip Cells in Ocular Angiogenesis: Potential Target for Anti-Angiogenesis Therapy // *Journal of Histochemistry and Cytochemistry.* 2013. № 2 (61). С. 101–115.

171. Spark Therapeutics I. LUXTURNA (voretigene neparvovec-rzyl) [package insert] // 2017. С. 1–16.
172. Stabile E. [и др.]. Impaired arteriogenic response to acute hindlimb ischemia in CD4-knockout mice // *Circulation*. 2003. № 2 (108).
173. Stewart M. Gene transfer in vivo with DNA–liposome complexes: safety and acute toxicity in mice // *Hum Gene Ther*. 1992. (3). С. 267–275.
174. Stone A. [и др.]. Combinatorial Prg4 and Il-1ra Gene Therapy Protects Against Hyperalgesia and Cartilage Degeneration in Post-Traumatic Osteoarthritis // *Human Gene Therapy*. 2018. № 2 (30). С. 225–235.
175. Sulpice E. [и др.]. Cross-talk between the VEGF-A and HGF signalling pathways in endothelial cells // *Biology of the Cell*. 2009. № 9 (101). С. 525–539.
176. Sun L., Al. E. Mesenchymal stem cells modified with angiopoietin-1 improve remodeling in a rat model of acute myocardial infarction // *Biochem Biophys Res Commun*. 2007. № 3 (357). С. 779–84.
177. Szekanecz Z. [и др.]. Chemokines and angiogenesis in rheumatoid arthritis // *Front Biosci (Elite Ed)*. 2009. (1). С. 44–51.
178. Taher T. [и др.]. Hepatocyte growth factor triggers signaling cascades mediating vascular smooth muscle cell migration // *Biochem Biophys Res Commun*. 2002. № 1 (298). С. 80–6.
179. Takeshita S. [и др.]. Therapeutic angiogenesis. A single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model // *Journal of Clinical Investigation*. 1994. № 2 (93). С. 662–670.
180. Takeshita S. [и др.]. Endothelium-dependent relaxation of collateral microvessels after intramuscular gene transfer of vascular endothelial growth factor in a rat model of hindlimb ischemia // *Circulation*. 1998. № 13 (98). С. 1261–3.
181. Taniyama Y. [и др.]. Therapeutic angiogenesis induced by human hepatocyte growth factor gene in rat diabetic hind limb ischemia model: Molecular mechanisms of delayed angiogenesis in diabetes // *Circulation*. 2001. № 19 (104). С. 2344–2350.
182. Thomas C. E., Ehrhardt A., Kay M. A. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy // *Nat Rev Genet*. 2003. № 5 (4). С. 346–358.

183. Thomas S., Al E. Tissue distribution of liposome-mediated epidermal growth factor receptor antisense gene therapy // *Cancer Gene Ther.* 2003. (10). С. 518–528.
184. Traktuev D. O. [и др.]. Urokinase Gene Transfer Augments Angiogenesis in Ischemic Skeletal and Myocardial Muscle // *Molecular Therapy.* 2007. № 11 (15). С. 1939–1946.
185. Tsuchihara T. [и др.]. Nonviral retrograde gene transfer of human hepatocyte growth factor improves neuropathic pain-related phenomena in rats // *Molecular Therapy.* 2009. № 1 (17). С. 42–50.
186. Tsurumi Y. [и др.]. Direct intramuscular gene transfer of naked DNA encoding vascular endothelial growth factor augments collateral development and tissue perfusion // *Circulation.* 1996. № 12 (94). С. 3281–3290.
187. Tuszynski M. H. Growth-factor gene therapy for neurodegenerative disorders // *Lancet Neurol.* 2002. № 1 (1). С. 51–57.
188. Varga C. M., Hong K., Lauffenburger D. A. Quantitative Analysis of Synthetic Gene Delivery Vector Design Properties // *Molecular Therapy.* 2001. № 5 (4). С. 17–23.
189. Vile R. G., Russell S. J., Lemoine N. R. Cancer gene therapy: hard lessons and new courses // *Gene Ther.* 2000. № 1 (7). С. 2–8.
190. Waehler R., Russell S. J., Curiel D. T. Engineering targeted viral vectors for gene therapy // *Nat Rev Genet.* 2007. № 8 (8). С. 573–587.
191. Walsh C. E. Gene therapy Progress and Prospects : Gene therapy for the hemophilias // *Gene Ther.* 2003. № 12 (10). С. 999–1003.
192. Wasungu L., Hoekstra D. Cationic lipids , lipoplexes and intracellular delivery of genes // *J Control Release.* 2006. (116). С. 255–264.
193. Westvik T. [и др.]. Limb ischemia after iliac ligation in aged mice stimulates angiogenesis without arteriogenesis // *J Vasc Surg.* 2009. № 2 (49).
194. Wilke M. [и др.]. Efficacy of a peptide-based gene delivery system depends on mitotic activity // *Gene Ther.* 1996. № 12 (3). С. 1133–1142.
195. Wilson J. M., Flotte T. R. Moving Forward After Two Deaths in a Gene Therapy Trial of Myotubular Myopathy // *Hum. Gene Ther.* 2020. (31).

196. Wolff J. [и др.]. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo // *Science*. 1990. № 4949 Pt 1 (247). С. 1465–1468.
197. Wolff J. A., Budker V. The mechanism of naked DNA uptake and expression // *Adv Genet*. 2005.
198. Wong E.-T., Ngoi S.-M., Lee C. Improved co-expression of multiple genes in vectors containing internal ribosome entry sites (IRESes) from human genes // *Gene Therapy*. 2002. (9). С. 337–344.
199. Xin X. [и др.]. Hepatocyte growth factor enhances vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis in vitro and in vivo // *American Journal of Pathology*. 2001. № 3 (158). С. 1111–1120.
200. Xue Y. [и др.]. Anti-VEGF agents confer survival advantages to tumor-bearing mice by improving cancer-associated systemic syndrome // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008. № 47 (105).
201. Yamamoto K. [и др.]. Contribution of Bcl-2, but Not Bcl-xL and Bax, to Antiapoptotic Actions of Hepatocyte Growth Factor in Hypoxia-Conditioned Human Endothelial Cells // *Cell*. 2001.
202. Yang X. P. [и др.]. Echocardiographic assessment of cardiac function in conscious and anesthetized mice // *Am J Physiol*. 1999.
203. Yin Shan N., D'Amore P. A. Therapeutic angiogenesis for cardiovascular disease // *Current Controlled Trials in Cardiovascular Medicine*. 2001. № 6 (2). С. 278–285.
204. Yu J. [и др.]. Combination of stromal-derived factor-1alpha and vascular endothelial growth factor gene-modified endothelial progenitor cells is more effective for ischemic neovascularization // *Journal of vascular surgery*. 2009. № 3 (50). С. 608–16.
205. Zhang F. [и др.]. A Ubiquitous Chromatin Opening Element (UCOE) confers resistance to DNA methylation-mediated silencing of lentiviral vectors // *Molecular Therapy*. 2010. № 9 (18). С. 1640–1649.
206. Zhou Y. [и др.]. Co-expression of human adenosine deaminase and multidrug resistance using a bicistronic retroviral vector // *Hum Gene Ther*. 1998. № 3 (9). С. 287–9.

207. Ziegler D. [и др.]. Oral treatment with alpha-lipoic acid improves symptomatic diabetic polyneuropathy: the SYDNEY 2 trial // *Diabetes Care*. 2006. (29). С. 2365–2370.
208. Zinder N., Lederberg J. Genetic exchange in Salmonella // *J Bacteriol*. 1952. № 5 (64). С. 679–699.
209. Zornoff L. A. M. [и др.]. Original Article Experimental Myocardium Infarction in Rats: Analysis of the Model // *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 2008. № 4 (93). С. 403–408.
210. Болдырева М. А. [и др.]. Генная терапия на основе рекомбинантной плазмиды с геном фактора роста нервов (NGF) стимулирует ангиогенез и восстановление кровоснабжения ишемизированной задней конечности мыши // *Гены & Клетки*. 2014. № 4 (9). С. 1–7.
211. Карпов А. А. [и др.]. Моделирование постинфарктной сердечной коронарной артерии у крыс : техника и методы морфофункциональной оценки // *Биомедицина*. 2014. (3). С. 32–48.
212. Конилова О. А. [и др.]. Кислород-индуцированная ретинопатия как экспериментальная модель ретинопатии недоношенных детей // *Офтальмологические ведомости*. 2013. № 3 (6). С. 37–42.
213. Мкртумян А. М., Подачина С. В. Мильгамма® композитум – высокая эффективность при любых формах диабетической нейропатии // «Эффективная фармакотерапия. Эндокринология». 2009. (4).
214. Моргун Е. И., Роговая О. С., Воротеляк Е. А. Модель ишемизированной длительно незаживающей кожной раны: клеточная гибель и механизмы ранозаживления // *Современные технологии в медицине*. 2018. № 4 (10). С. 69–77.
215. Наумова А. В. Создание комплекса подходов для неинвазивного исследования сердца методами магнитно - резонансной томографии и спектроскопии 2018.
216. Рубина К. А. [и др.]. Эффективность сочетанного использования плазмидных конструкций, содержащих гены HGF и ангиопоэтина-1, для восстановления кровотока в ишемизированных тканях // *Гены & Клетки*. 2018. № 1 (12). С. 1–9.

217. Суковатых Б. С. [и др.]. Эффективность моноклеарной фракции аутологичного костного мозга в лечении экспериментальной критической ишемии конечности // Экспериментальная хирургия. 2015. № 4 (23). С. 365–371.
218. Талицкий К. А. [и др.]. Эффективность терапевтического ангиогенеза у больных с хронической ишемией нижних конечностей // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2011. № 3 (6). С. 10.
219. Червяков Ю. В. [и др.]. Пятилетние результаты лечения больных хронической ишемией нижних конечностей с использованием генной терапии // Ангиология и сосудистая хирургия. 2016. (22).
220. Юдин М. А. [и др.]. Оценка системного распределения и ангиогенного эффекта р1-VEGF165 в модели ишемии конечностей // Патология кровообращения и кардиохирургия. 2015. № 4–2 (19). С. 33–42.
221. Gene Therapy Clinical Trials Worldwide Database [Электронный ресурс]. URL: <https://a873679.fmphost.com/fmi/webd/GTCT>.
222. Gene Therapy Phase 3 Trial for Painful Diabetic Peripheral Neuropathy Using Engensis (or VM202), a plasmid DNA engineered to express human HGF proteins by simple intramuscular injections [Электронный ресурс]. URL: <https://pipelinereview.com/index.php/2020021973821/DNA-RNA-and-Cells/Gene-Therapy-Phase-3-Trial-for-Painful-Diabetic-Peripheral-Neuropathy-Using-Engensis-or-VM202-a-plasmid-DNA-engineered-to-express-human-HGF-proteins-by-simple-intramuscul.html>.

## Приложения

### Последовательности IRES из генов EMCV, Vip, FGF1 и eIF4G

EMCV (575 bp), источник: IRESite

([http://iresite.org/IRESite\\_web.php?page=view&entry\\_id=140](http://iresite.org/IRESite_web.php?page=view&entry_id=140))

CCCCTCTCCCTCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGGAATAA  
 GGCCGGTGTGCGTTTGTCTATATGTTATTTCCACCATATTGCCGTCTTTTGG  
 CAATGTGAGGGCCCGGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCTAGG  
 GGTCTTTCCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTCGTGAAGG  
 AAGCAGTTCCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCTGTAGCGACCC  
 TTTGCAGGCAGCGGAACCCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAA  
 AGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCCAGTGCCACG  
 TTGTGAGTTGGATAGTTGTGGAAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATT  
 CAACAAGGGGCTGAAGGATGCCCAGAAGGTACCCCATTTGTATGGGATCTGA  
 TCTGGGGCCTCGGTGCACATGCTTTACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAAAA  
 CGTCTAGGCCCCCGAACCCACGGGGACGTGGTTTTCTTTGAAAAACACGA  
 TGATAAT

FGF1 IRES A (168 bp) источники:

IRESite ([http://iresite.org/IRESite\\_web.php?page=view&entry\\_id=519](http://iresite.org/IRESite_web.php?page=view&entry_id=519)), EMBL

(<http://rfam.xfam.org/family/RF00387#tabview=tab1>)

CGCTCCAGGGGAATCAGGGCATCGCCTCCTTTTCTGGGAGGACACTCCCTTC  
 TGATGGTGAATGGGAACTCCCTTCCTCCTGCAGCAGCCTGCCTGCAGCTGTC  
 CTGGTAGAACAGTGTGGACATTGCAGAAGCTGTCACTGCCCCAGAAAGAAA  
 GCACCCCAGAGCC

Bip IRES (222 bp) источники:

IRESite ([http://iresite.org/IRESite\\_web.php?page=view&entry\\_id=593](http://iresite.org/IRESite_web.php?page=view&entry_id=593),

[http://iresite.org/IRESite\\_web.php?page=view&entry\\_id=570](http://iresite.org/IRESite_web.php?page=view&entry_id=570)), EMBL

(<http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/X87949.1>), Genbank

([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NM\\_005347](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NM_005347))

AGGTCGACGCCGCCAAGACAGCACAGACAGATTGACCTATTGGGGTGTTT  
CGCGAGTGTGAGAGGGAAGCGCCGCGGCCTGTATTTCTAGACCTGCCCTTC  
GCCTGGTTCGTGGCGCCTTGTGACCCCGGGCCCCTGCCGCCTGCAAGTCGGA  
AATTGCGCTGTGCTCCTGTGCTACGGCCTGTGGCTGGACTGCCTGCTGCTGC  
CCA ACTGGCTGGCAAG

eIF4G IRES (368 bp) источники:

IRESite ([http://iresite.org/IRESite\\_web.php?page=view&entry\\_id=548](http://iresite.org/IRESite_web.php?page=view&entry_id=548)), EMBL

(<http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/D12686>), Genbank

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/219612>)

TCTAGATGGGGGTCCTGGGCCCCAGGGTGTGCAGCCACTGACTTGGGGACT  
GCTGGTGGGGTAGGGATGAGGGAGGGAGGGGCATTGTGATGTACAGGGCT  
GCTCTGTGAGATCAAGGGTCTCTTAAGGGTGGGAGCTGGGGCAGGGACTAC  
GAGAGCAGCCAGATGGGCTGAAAGTGGA ACTCAAGGGGTTTCTGGCACCTA  
CCTACCTGCTTCCCGCTGGGGGGTGGGGAGTTGGCCCAGAGTCTTAAGATTG  
GGGCAGGGTGGAGAGGTGGGCTCTTCCTGCTTCCCACTCATCTTATAGCTTT  
CTTTCCCCAGATCCGAATTCGAGATCCAAACCAAGGAGGAAAGGATATCAC  
AGAGGAGATC