



(19) **UA** ⁽¹¹⁾ **74 163** ⁽¹³⁾ **C2**

(51)МПК ⁷ **A 61K 38/22, 38/17, 38/33,
48/00, A 61P 3/00, 9/00, 15/00,
35/00, 43/00**

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
УКРАИНЫ

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ УКРАИНЫ

(21), (22) Заявка: 2002042717, 04.09.2000

(24) Дата начала действия патента: 15.11.2005

(30) Приоритет: 05.09.1999 IL 131739
10.10.1999 IL 132312

(46) Дата публикации: 15.11.2005

(86) Заявка РСТ:
РСТ/IL00/00525, 20000904

(72) Изобретатель:

Рубинштейн Менахем, IL,
Кохен Батиа, IL,
Баркан Далит, IL

(73) Патентовладелец:

ИЕДА РИСЕРЧ ЭНД ДИВЕЛОПМЕНТ КО. ЛТД.,
IL

(54) ПРИМЕНЕНИЕ ЛЕПТИНА ДЛЯ ИНГИБИРОВАНИЯ АНГИОГЕНЕЗА, ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ
КОМПОЗИЦИЯ И СПОСОБ ИНГИБИРОВАНИЯ АНГИОГЕНЕЗА У МЛЕКОПИТАЮЩИХ

(57) Реферат:

Описано применение лептина для ингибирования пролиферации эндотелиальных клеток и модуляции ангиогенеза. В качестве варианта лептин может применяться вместе с ингибиторами ФРЭС.

Официальный бюлетьн "Промышленная собственность". Книга 1 "Изобретения, полезные модели, топографии интегральных микросхем", 2005, N 11, 15.11.2005. Государственный департамент интеллектуальной собственности Министерства образования и науки Украины.



(19) **UA** ⁽¹¹⁾ **74 163** ⁽¹³⁾ **C2**

(51) Int. Cl.⁷ **A 61K 38/22, 38/17, 38/33,
48/00, A 61P 3/00, 9/00, 15/00,
35/00, 43/00**

MINISTRY OF EDUCATION AND SCIENCE OF
UKRAINE

STATE DEPARTMENT OF INTELLECTUAL
PROPERTY

(12) **DESCRIPTION OF PATENT OF UKRAINE FOR INVENTION**

(21), (22) Application: 2002042717, 04.09.2000

(24) Effective date for property rights: 15.11.2005

(30) Priority: 05.09.1999 IL 131739
10.10.1999 IL 132312

(46) Publication date: 15.11.2005

(86) PCT application:
PCT/IL00/00525, 20000904

(72) Inventor:

Rubinstein Menachem, IL,
Cohen Batya, IL,
Barkan Dalit, IL

(73) Proprietor:

YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO.
LTD., IL

(54) **USE OF LEPTIN FOR INHIBITION OF ANGIOGENESIS, PHARMACEUTICAL FORMULATION AND METHOD FOR INHIBITING ANGIOGENESIS IN MAMMALS**

(57) Abstract:

Disclosed is the use of leptin, optionally together with VEGF inhibitors, for inhibition of endothelial cell proliferation and modulation of angiogenesis.

Official bulletin "Industrial property". Book 1 "Inventions, utility models, topographies of integrated circuits", 2005, N 11, 15.11.2005. State Department of Intellectual Property of the Ministry of Education and Science of Ukraine.



(19) **UA** ⁽¹¹⁾ **74 163** ⁽¹³⁾ **C2**

(51)МПК ⁷ **A 61K 38/22, 38/17, 38/33,
48/00, A 61P 3/00, 9/00, 15/00,
35/00, 43/00**

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ

(12) ОПИС ВІНАХОДУ ДО ПАТЕНТУ УКРАЇНИ

(21), (22) Дані стосовно заявки:
2002042717, 04.09.2000

(24) Дата набуття чинності: 15.11.2005

(30) Дані стосовно пріоритету відповідно до Паризької
конвенції : 05.09.1999 IL 131739
10.10.1999 IL 132312

(46) Публікація відомостей про видачу патенту
(деклараційного патенту): 15.11.2005

(86) Номер та дата подання міжнародної заявки
відповідно до договору РСТ:
РСТ/IL00/00525, 20000904

(72) Винахідник(и):
Рубінштейн Менахем , IL,
Кохен Батіа , IL,
Баркан Даліт , IL

(73) Власник(и):
ЙЄДА РІСЕРЧ ЕНД ДІВЕЛОПМЕНТ КО. ЛТД., IL

(54) ЗАСТОСУВАННЯ ЛЕПТИНУ ДЛЯ ІНГІБУВАННЯ АНГІОГЕНЕЗУ, ФАРМАЦЕВТИЧНА КОМПОЗИЦІЯ ТА СПОСІБ ІНГІБУВАННЯ АНГІОГЕНЕЗУ У ССАВЦІВ

(57) Реферат:
Розкривається застосування лептину,
необов'язково разом з інгібіторами ФРЕС, для

інгібування проліферації ендотеліальних клітин і
модуляції ангіогенезу.

Опис винаходу

Даний винахід відноситься до оборотного інгібування проліферації ендотеліальних клітин і до модуляції ангиогенезу жіночої репродуктивної системи. Більш конкретно, даний винахід відноситься до використання лептину або гомологів або похідних лептину, необов'язково разом з інгібіторами дії ФРЕС (фактор росту ендотеліальних судин), або інгібіторами синтезу ФРЕС для отримання лікарського засобу, що застосовується для інгібування ангиогенезу або для модуляції ангиогенних процесів. Даний винахід також відноситься до застосування лептину або гомологів або похідних лептину, разом з інгібіторами дії ФРЕС або інгібіторами синтезу ФРЕС, при отриманні лікарського засобу, що застосовується для модуляції ангиогенезу в жіночій репродуктивній системі.

У контексті даного опису термін "ангиогенез" означає утворення нових кровоносних судин в тканині або органі. У нормальних фізіологічних умовах ангиогенез у людей або тварин відбувається тільки в дуже специфічних обмежених ситуаціях. Так наприклад, ангиогенез звичайно спостерігається при загоєнні ран, фетальному і ембріональному розвитку, утворенні жовтого тіла, в ендометрії і плаценті і при зростанні жирової тканини.

Термін "ендотелій" означає тонкий шар епітеліальних клітин, які вистилають лімфатичний простір, лімфатичні судини і кровоносні судини. Вважається, що і ангиогенез, що не контролюється, і що контролюється здійснюється схожим образом. Ендотеліальні клітини і періцити, оточені базальною мембраною, утворюють капіляри. Ангиогенез починається з ерозії базальної мембрани, здійснюваної ферментами, що вивільняються ендотеліальними клітинами і лейкоцитами.

Ендотеліальні клітини, які вистилають просвіт кровоносних судин, проникають потім через базальну мембрану. Стимулятори ангиогенезу індукують міграцію ендотеліальних клітин через еродовану базальну мембрану. Мігруючі клітини утворюють "паросток" від батьківської кровоносної судини, в якому ендотеліальні клітини зазнають мітозу і проліферують. Ендотеліальні паростки зливаються один з одним з утворенням капілярних петель, утворюючи нову кровоносну судину.

Постійний, нерегульований ангиогенез має місце при множині різних хворобливих станів, при метастазуванні пухлини і при аномальному зростанні ендотеліальних клітин, і підтримує патологічну поразку, що є при таких станах. Різні патологічні хворобливі стани, при яких має місце нерегульований ангиогенез, об'єднують в загальні групи захворювань, залежних від ангиогенезу або асоційованих з ангиогенезом. Уперше гіпотеза про те, що пухлинне зростання залежить від ангиогенезу була запропонована в 1971 році [Folkman L., Tumor angiogenesis: Therapeutic implication. N. Engl. J. Med. 285:1182-1186, 1971]. У своєму найбільш спрощеному вигляді вона звучить таким чином: "Як тільки з'являється пухлина, кожному підвищенню популяції пухлинних клітин повинно передувати збільшення числа нових капілярів, супроводжуваних пухлину". Появу пухлини в цей час розуміють, як вказівку на наявність перед-судинної фази зростання пухлини, при якій популяція пухлинних клітин, що займає об'єм в декілька кубічних міліметрів і що не перевищує декілька мільйонів клітин, може виживати на існуючих у реципієнті судинах. Розширення об'єму пухлини за межі вказаної фази вимагає індукції утворення нових капілярів. Так, наприклад, мікротастазування в легенях на ранній перед-судинній фазі у мишей не виявляється інакше, як на гістологічних зрізах при високій розрізняльній здатності мікроскопа.

Судинний морфогенез регулюється фактором зростання ендотеліальних судин (ФРЕС), що індукується гіпоксією і його рецепторами в ендотеліальних клітинах Flk 1 і Flt 1. Були також ідентифіковані два інших ангиогенних фактори, ангиопоетин-1 і 2 (Ang 1 і Ang 2), які зв'язуються із спільним рецептором ендотеліальних клітин (Tie 2), [S. Davis, et al., Cell 87, 1161-1169; 1996 P.C. Maisonpierre, et al., Science 277, 55-60, 1997], Ang 1 являє собою агоніст рецептора [C. Suri, et al., Science 282, 468 471, 1998], який конститутивно експресується в багатьох тканинах, тоді як Ang 2 являє собою антагоніст рецептора, експресія якого лімітується сайтами ремоделювання судин. Таким чином, Ang 2 був ідентифікований в фетальних тканинах, в ендотеліальних клітинах, в гладком'язових клітинах і в органах жіночої репродуктивної системи у дорослих мишей і у людей [P.C. Maisonpierre, et al., Science 277, 55-60, 1997; B. Wittenbichler, P.C. Maisonpierre, P. Jones, G.D. Yancopoulos, J.M. Isner, J. Biol. Chem. 273, 18514-18521, 1998; S.J. Mandriota, M.S. Pepper, Circ. Res. 83, 852-859, 1998]. І ФРЕС, і Ang 2 зазнають позитивної регуляції в органах жіночої репродуктивної системи при судинному морфогенезі, тоді як тільки Ang 2 експресується при регресії кровоносних судин. Видно, Ang 2 відмічає ті судини, які підлягають регресії за допомогою апоптозу, хоч індукція апоптозу з допомогою Ang 2 в ендотеліальних клітинах, що культивуються не була показана [B. Wittenbichler, P. C. Maisonpierre, P. Jones, G.D. Yancopoulos, J.M. Isner, J. Biol. Chem. 273, 18514-18521, 1998; J. Holash, et al., Science 284, 1994-1998; D. Hanahan, Science 277, 48-50, 1997].

Специфічне антитіло проти ФРЕС знижує щільність мікросудин і викликає "значне або різке" інгібування зростання трьох пухлин людини, які залежать від ФРЕС як від єдиного медіатора ангиогенезу (у голих мишей). Антитіло не інгібує зростання пухлинних клітин тіла in vitro. [Kirn K. J. et al., Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumor growth in vivo. Nature 362: 841-844, 1993].

Специфічне інгібітор ангиогенезу (AGM-1470) інгібує зростання пухлини і метастазів in vivo, але він менш активний в інгібуванні проліферації пухлинних клітин in vitro. Він інгібує проліферацію ендотеліальних клітин судин на половинному рівні від максимуму, в концентрації на 4 логарифми меншій, ніж інгібує проліферацію пухлинних клітин [Ingber D., et al., Angiogenesis: Synthetic analogues of fumagillin which inhibit angiogenesis and suppress tumor growth. Nature, 48:555-557, 1990]. Є також непрямий клінічний доказ того, що пухлинне зростання залежить від ангиогенезу.

Мікроциркуляція в жировій тканині представляє унікальне явище в судинній системі в зв'язку зі здатністю вказаної системи рости протягом більшої частини життя у дорослому стані [D.L. Crandall, G.J. Hausman, J.G. Krai, Microcirculation 4, 211-232, 1997]. І насправді, коричневі і білі жирові тканини володіють поширеною мережею мікросудин і експресують високі рівні ФРЕС [K.P. Claffey, W.O. Wilkinson, B.M. Spiegelman, J. Biol. Chem 267, 16317-16322, 1992; Q.X. Zhang, et al., J. Suig. Res. 67, 147-154, 1997]. Таким чином, очевидно, що ангіогенез грає важливу роль в зростанні і підтримці жирової тканини. Якщо вказана ангіогенна активність може бути пригнічена або усунена, то жирова тканина буде регресувати.

Огрядність, що визначається як надлишок жиру тіла в порівнянні з масою тіла худого індивідуума, пов'язана з важливими психологічними і медичними захворюваннями, причому останні включають гіпертензію, підвищений рівень ліпідів в крові і інсулін-незалежний цукровий діабет (ІНЗЦД) або діабет типу II. У США нараховується 6-10 мільйонів чоловік з діагнозом ІНЗЦД, включаючи 18% населення у віці 65 років [Hanis et al., Ira. J. Obes., 11:275-283, 1987]. Приблизно 45% чоловіків і 70% жінок з ІНЗЦД є огрядними, і діабет у них в значній мірі коректується або усувається при зниженні ваги [Harris, Diabetes Care, 14 (3): 639-648, 1991].

Y. Zhang et al., 372, 425-431, 1994, передбачив, що однією з молекул, що грає ключову роль в регуляції енергетичного балансу, є об-білок, званий також лептином. Zhang з співавторами також повідомили про клонування і секвенування лептину миші і людини. Опис патенту Об'єднаного Королівства No. 2292382 відноситься, в тому числі, до поліпептидів, об-поліпептидів або їх алейних варіантів або аналогів і до їх використання для модуляції ваги тіла. Зокрема, в GB 2292382 розкривається, що лептини і деякі їх аналоги, такі як агоністи, можуть бути корисні для лікування ожиріння. І насправді, було показано, що отриманий з адипоцитів лептин регулює споживання їжі у гризунів за допомогою його дії на рецептори гіпоталамусу. Більш пізні дослідження показали, що у огрядних суб'єктів підвищений рівень лептину в сироватці крові і що є пряма кореляція між вмістом лептину в сироватці крові і індексом маси тіла (вага в кг, поділена на квадрат росту в м). Розходження між дією лептину як інгібітору споживання їжі і високим рівнем лептину у огрядних індивідуумів привело до створення теорії "лептинової резистентності", де вказаний термін вказує приблизно на те, що огрядні індивідууми не реагують на високий рівень лептину і підтримують свою високу масу тіла. Таким чином, очевидно, що лептин сам по собі неефективний в плані зниження маси жирової тканини [P. Prolo, M.L. Wong, J. Licino, Int. J. Biochem. Cell Biol. 30, 1285-1290, 1998].

У зв'язку з вищесказаним, існує потреба в розробці композиції і способу, дозволяючих інгібувати небажане зростання кровоносних судин, особливо в пухлинах і в жировій тканині. Композиція повинна також бути здатна модулювати утворення капілярів при інших ангіогенних процесах, таких як загоєння ран і репродукція. Композиція і спосіб, що застосовується для інгібування ангіогенезу, повинні бути переважно нетоксичними і характеризуватися незначними побічними ефектами. Якщо ангіогенна активність може бути пригнічена або усунена, то пухлина, хоч і буде бути присутньою, але не буде рости, а також буде регресувати жирова тканина. У хворобливому стані попередження ангіогенезу могло б дозволити уникнути пошкодження, що викликається інвазією нової мікросудинної системи. Терапія, направлена на контроль ангіогенних процесів, могла б привести до толерантності організму або до пом'якшення вказаних захворювань.

Миші, що не містять лептин, характеризуються неродючістю в зв'язку з тим, що лептин необхідний для вивільнення гонадотропін-рилізінг гормону (Г-РГ) з гіпоталамусу. Г-РГ діє на гіпофіз і необхідний для вивільнення гонадотропінів ФСГ і ЛГ. І фактично, ін'єкція липину лептин-дефіцитним мишам усуває їх стерильність. Жінки з дуже низькою масою жирової тканини, як особи з атлетичною статуєю або пацієнти з нервовою анорексією, характеризуються неродючістю в зв'язку з недостатнім рівнем лептину, який продукується жировою тканиною.

Однією з характеристик естрального циклу є ангіогенез в яєчниках, який відбувається при дозріванні фолікулів в яєчнику. Руйнування фолікулів і утворення жовтого тіла пов'язані із значною регресією кровоносних судин. Було показано, що вказані тканини експресують ФРЕС і Ang 2. Терапія, направлена на контроль ангіогенних процесів в жіночій репродуктивній системі, може регулювати фертильність.

Даний винахід відноситься до застосування лептину, гомолога лептину або його похідного, необов'язково в поєднанні з інгібітором дії ФРЕС або синтезу ФРЕС, для отримання лікарського засобу, зворотно інгібуючого проліферацію ендотеліальних клітин.

Одним об'єктом даного винаходу є застосування лептину, гомолога лептину або його похідного для отримання лікарського засобу, призначеного для модуляції ангіогенних процесів.

Більш конкретно, розглядається застосування при інгібуванні ангіогенезу.

Інший об'єкт даного винаходу відноситься до застосування лептину, гомолога лептину або його похідного разом з інгібітором дії ФРЕС або синтезу ФРЕС для отримання лікарського засобу для регуляції фертильності у ссавців.

Відповідно до даного винаходу, може використовуватися будь-який відомий фармацевтично прийнятний інгібітор ФРЕС.

Даний винахід також відноситься до фармацевтичних композицій, що модулюють ангіогенні процеси або вагу тіла або фертильність, що включає лептин, гомолог лептину або похідне лептину, необов'язково разом з інгібітором дії ФРЕС або синтезу ФРЕС.

Переважно композицію використовують при захворюваннях, опосередкованих ангіогенезом.

На Фіг.1 показана індукована лептином регресія кровоносних судин і апоптоз жирової тканини у мишей C57BL-ob^{-/-}. Мишам C57Bb-ob^{-/-} ін'єкують мишачий лептин (2×1мкг/г) в момент часу 0 і 9 годин. Через 24 і 48 годин відбирають жирову тканину з черевної порожнини. У зрізах тканин візуалізують кровоносні судини при імунному фарбуванні антитілами до фактора VIII (DAKO A/S, Denmark). Зазначається, що кількість забарвлених

кровеносних судин знижується через 24 і 48 годин після ін'єкції.

На Фіг.2 показана крива доза-відповідь регресії кровоносних судин в жировій тканині у мишей $ob^{-/-}$ через 24 і 48 годин після ін'єкції лептину.

На Фіг.3 показана реіресія з течією часу числа кровоносних судин в жировій тканині мишей $ob^{-/-}$ після ін'єкції мишачого лептину ($2 \times 1 \text{ мкг/г}$).

На Фіг.4 показана опосередкована дентином індукція ангіопоетину-2 (Ang 2), виявлена при аналізі з допомогою реакції зворотної транскрипції-ПЛР РНК в жирових тканинах. Смуга 1 - контроль (немає РНК); смуга 2 - РНК з жирової тканини нормальних мишей C57BL; смуга 3 - РНК з жирової тканини мишей C57BL, яким ін'єкували лептин ($2 \times 5 \text{ мкг/г}$); смуга 4 - РНК з жирової тканини мишей C57BL- $ob^{-/-}$; смуга 5 - РНК з жирової тканини мишей C57BL- $ob^{-/-}$, яким ін'єкували лептин ($2 \times 5 \text{ мкг/г}$). ПЛР реакції завершують до настання насичення. ПЛР праймери Ang2, номер зберігання в GeneBank No.AF004326, відповідають положенням 637-657 (смысловий напрям) і 1167-1147 (зворотний напрям).

На Фіг.5 показана індукція з плином часу Ang2 лептином в жирові тканини у мишей $ob^{-/-}$. Лептин ($2 \times 5 \text{ мкг/г}$) вводять мишам C57BL- $ob^{-/-}$ спільну РНК з жирової тканини екстрагують у вказаний час і аналізують методом блоттингу РНК із зондами до мишачого Ang2, ФРЕС і актину

На Фіг.6 показана залежна від дози індукція Ang2 в жировій тканині мишей $ob^{-/-}$. Лептин вводять мишам C57BL- $ob^{-/-}$ і через 48 годин екстрагують білки жирової тканини. Ang2 аналізують методом імуноблотінгу (50мкг білка/смугу) зі специфічною антисироваткою (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Неспецифічну смугу (N.S.) використовують для нормалізації імуноблотів.

На Фіг.7 показана індукція Ang2 лептином в адипоцитах, що культивуються. Культури недиференційованих перед-адипоцитів мишей 3T3-F442A і диференційованих адипоцитів індукують лептином (1мкг/мл). У різні часові точки екстрагують сумарну РНК і піддають РНК-блотінгу із зондами до мишачого Ang2, ФРЕС і актину. Фіксують індукцію Ang 2 в адипоцитах через 24 години і зниження рівня ФРЕС після диференціації перед-адипоцитів в зрілі адипоцити.

Останнім часом з'явилося повідомлення про те, що лептин діє як ангіогенний фактор. Він індукує проліферацію *in vitro* ендотеліальних клітин пупкової вени, посилює утворення капілярноподібних трубок *in vitro* і індукує ревазуляризацію в рогівці мишей і хоріоналантоїсній оболонці курчати [M.R. Sierra-Honigmann, et al., Science 281, 1683-1686, 1998; A. Bouloumie, H. C. Drexler, M. Lafontan, R. Busse, Circ Res 83, 1059-1066, 1998]. Незважаючи на те, що вказані дослідження, дозволяють передбачити, що лептин здатний індукувати ангіогенез в сайті його продукування, роль лептину як ангіогенного фактора в жировій тканині і в пухлинах все ще недостатньо вивчена.

У рамках даного винаходу було виявлено, що лептин, необов'язково разом з іншими агентами, діє як індуктор регресії кровоносних судин в тканинах і пухлинах. Лептин діє як могутній індуктор експресії ангіостатичного фактора ангіопоетину-2 (Ang2) в різних тканинах, включаючи жирову тканину і пухлини. Ang2 володіє ангіостатичною дією у відсутність ФРЕС. Таким чином, лептин ефективний в плані модуляції ангіогенезу і інгібування небажаного ангіогенезу, особливо ангіогенезу, пов'язаного із зростанням пухлини, зростанням жирової тканини і з естральним циклом.

Даний винахід включає застосування лептину або гомологів лептину або похідних лептину, не обов'язково разом з одним або більше інгібіторами утворення ФРЕС або дії ФРЕС (далі: "інгібітори ФРЕС") як інгібіторів пухлинного ангіогенезу і модуляторів ангіогенезу в репродуктивних органах жінок.

Даний винахід також включає застосування лептину або гомологів лептину або похідних лептину разом з інгібіторами ФРЕС для індукції регресії жирової тканини і для модуляції ангіогенезу в жіночих репродуктивних органах.

Введення лептину або гомологів лептину або похідних лептину, або окремо, або в поєднанні з інгібіторами ФРЕС, людині або тварині з наявністю метастазуючих пухлин в стані передвазуляризації, буде перешкоджати зростанню або розширенню вказаних пухлин.

Введення лептину або гомологів лептину або похідних лептину, в поєднанні з інгібіторами ФРЕС або іншими інгібіторами ангіогенезу, жінкам дозволять модулювати ангіогенез в їх репродуктивних органах.

Захворювання і процеси, які опосередковані ангіогенезом, включають, але не обмежуються вказаними нижче гемангіомою, солідними пухлинами, пухлинами крові, лейкозом, метастазами, телангіектазією, псоріазом, склеродермою, піогеною гранулемою, міокардіальним ангіогенезом, хворобою Крону, бляшкоподібною неоваскуляризацією, утворенням коронарних колатералів, церебральних колатералів, артеріовенозними мальформаціями, ангіогенезом при ішемії кінцівки, захворювання рогівки, почервонінням, неоваскулярною глаукомою, діабетичною ретинопатією, ретролентальною фіброплазією, артритом, діабетичною неоваскуляризацією, дегенерацією жовтої плями, загоєння рани, пептичною виразкою, хворобами, пов'язаними з інфекцією *Helicobacter*, переломи, келоїди, васкулогенез, гематопоез, овуляція, менструальний цикл, утворення плаценти і лихоманку від котячих дряпин.

Введення лептину або гомологів лептину, або похідних лептину, разом з інгібіторами ФРЕС або іншими інгібіторами ангіогенезу, людині або тварині буде знижувати аберантний ангіогенез, пов'язаний з вказаними вище захворюваннями, більш ефективно, ніж один інгібітор ФРЕС або інші інгібітори ангіогенезу без лептину.

Можливо також модулювати ангиогенний процес в ході генної терапії, як буде показано далі в описі.

Даний винахід включає спосіб лікування захворювання, опосередкованого ангіогенезом, ефективною кількістю лептину або гомологів лептину або похідними лептину, необов'язково разом з інгібіторами ФРЕС або іншими інгібіторами ангіогенезу. Ефективну кількість лептину або гомологів лептину або похідні лептину,

необов'язково разом з інгібіторами ФРЕС або іншими інгібіторами ангіогенезу, вводять пацієнтам у вигляді фармацевтично прийнятної композиції.

Потрібно мати на увазі, що даний винахід включає застосування будь-яких гомологів лептину, які індукують активність по інгібуванню ендотеліальних клітин. Гомологи лептину відносяться до білків, в яких один або більш амінокислотних залишків натурального лептину заміщені іншими амінокислотними залишками або вони делетовані, або один або більше амінокислотних залишків додані до натуральної послідовності лептину, без істотної зміни активності отриманих продуктів в порівнянні з лептином дикого типу. Вказані гомологи отримують за допомогою відомих методів синтезу і/або шляхом направлено мутагенезу, або з використанням будь-яких інших методик для досягнення даної мети.

Будь-який такий гомолог переважно має амінокислотну послідовність, в достатній мірі дупліковану в порівнянні з лептином, так щоб досягалася по суті аналогічна лептину активність. Однією такою активністю є здатність гомолога лептину знижувати вагу тіла мишей ob/ob. Таким чином можна визначити, чи володіє даний гомолог по суті тією ж активністю, що і лептин, за допомогою рутинних експериментальних процедур.

У переважному варіанті реалізації винаходу будь-який такий мутеїн характеризується щонайменше 40% ідентичністю або гомологією своєї послідовності з послідовністю лептину. Більш переважно, він характеризується щонайменше 50%, щонайменше 60%, щонайменше 70%, щонайменше 80% або найбільш переважно щонайменше 90% ідентичністю або гомологією по послідовності.

Гомологи поліпептидів лептину, які можуть використовуватися відповідно до даного винаходу, або нуклеїнова кислота, що кодує їх, включають певний набір по суті відповідних послідовностей у вигляді заміщених пептидів або полінуклеотидів, які можуть бути отримані рутинним способом будь-яким фахівцем зі середнім рівнем знань в даній області без додаткових експериментів, на основі представлених в описі методів. Для отримання докладного опису хімії білків і їх структури [див. Schulz, G.E. et al., Principles of Protein Structure, Springer-Verlag, new York, 1978; і Creighton, T.E., Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, 1983], роботи яких включені в опис як посилання. Для отримання інформації по заміщенню нуклеотидних послідовностей, таких як переважні кодони [див. Ausubel et al., supra, at §§ A.1.-A.1.24 і Sambrook et al./ supra, в додатках C and D].

Переважні зміни, введені в гомологи згідно з даним винаходом, включають такі зміни, які відомі як "консервативні" заміщення. Консервативні заміщення амінокислот в поліпептидах лептину можуть включати синонімічні амінокислоти з групи, яка характеризується досить близькими фізико-хімічними властивостями, так що заміщення з використанням представників вказаної групи дозволяє зберегти біологічну функцію молекули [Grantham, Science, Vol.185, pp.862-864 (1974)]. Очевидно, що вставки і делеції амінокислот можуть також бути введені у вказані вище послідовності без зміни їх функцій, особливо якщо вставки або делеції включають усього декілька амінокислот, наприклад, до тридцяти, і переважно до десяти, і не видаляють або не замінюють амінокислоти, які є такими, що вирішують для функціональної конформації, наприклад, цистеїнові залишки [Anfinsen, "Principles That Govern The Folding of Protein Chains", Science, Vol.181, pp.223-230 (1973)]. Білки і мутеїни, що утворюються при введенні таких делецій і/або вставок, входять в область даного винаходу.

Переважно група синонімічних амінокислот включає ті з них, які приведені в таблиці I. Більш переважно, група синонімічних амінокислот включає ті з них, які приведені в таблиці II; і найбільш переважно група синонімічних амінокислот включає ті з них, які визначені в таблиці III.

ТАБЛИЦЯ I

Переважні групи синонімічних амінокислот

5 Амінокислота Синонімічна група

Ser	Ser, Thr, Gly, Asn
Arg	Arg, Gln, Lys, Glu, His
Leu	Ile, Phe, Tyr, Met, Val, Leu
Pro	Gly, Ala, Thr, Pro
Thr	Pro, Ser, Ala, Gly, His, Gln, Thr
Ala	Gly, Thr, Pro, Ala
Val	Met, Tyr, Phe, Ile, Leu, Val
Gly	Ala, Thr, Pro, Ser, Gly
Ile	Met, Tyr, Phe, Val, Leu, Ile
Phe	Trp, Met, Tyr, Ile, Val, Leu, Phe
Tyr	Trp, Met, Phe, Ile, Val, Leu, Tyr
Cys	Ser, Thr, Cys
His	Glu, Lys, Gln, Thr, Arg, His
Gln	Glu, Lys, Asn, His, Thr, Arg, Gln
Asn	Gln, Asp, Ser, Asn
Lys	Glu, Gln, His, Arg, Lys
Asp	Glu, Asn, Asp
Glu	Asp, Lys, Asn, Gln, His, Arg, Glu
Met	Phe, Ile, Val, Leu, Met
Trp	Trp

U A 7 4 1 6 3 C 2

U A 7 4 1 6 3 C 2

ТАБЛИЦЯ II

Більш переважні групи синонімічних амінокислот

5	Амінокислота	Синонімічна група
	Ser	Ser
	Arg	His, Lys, Arg
10	Leu	Leu, Ile, Phe, Met
	Pro	Ala, Pro
	Thr	Thr
	Ala	Pro, Ala
15	Val	Val, Met, Ile
	Gly	Gly
	Ile	Ile, Met, Phe, Val, Leu
20	Phe	Met, Tyr, Ile, Leu, Phe
	Tyr	Phe, Tyr
	Cys	Cys, Ser
25	His	His, Gln, Arg
	Gln	Glu, Gln, His
	Asn	Asp, Asn
30	Lys	Lys, Arg
	Asp	Asp, Asn
	Glu	Glu, Gln
35	Met	Met, Phe, Ile, Val, Leu
	Trp	Trp

U A

7 4 1 6 3

C 2

C 2

7 4 1 6 3

U A

ТАБЛИЦЯ III

Найбільш переважні групи синонімічних амінокислот

5 Амінокислота Синонімічна група

Ser	Ser
Arg	Arg
Leu	Leu, Ile, Met
Pro	Pro
Thr	Thr
Ala	Ala
Val	Val
Gly	Gly
Ile	Ile, Met, Leu
Phe	Phe
Tyr	Tyr
Cys	Cys, Ser
His	His
Gln	Gln
Asn	Asn
Lys	Lys
Asp	Asp
Glu	Glu
Met	Met, Ile, Leu
Trp	Met

35 Приклади отримання амінокислотних заміщень в білках, які можуть використовуватися для отримання гомологів поліпептидів або білків лептину, з метою застосування в даному винаході, включають будь-які стадії методів, приведених в патентах США RE 33653, 4959314, 4588585 і 4737462 (Mark et al.); 5116943 (Koths et al.), 4965195 (Namen et al.), 4879111 (Chong et al.), 5017691 (Lee et al.) і патент США No. 4904584 (Shaw et al.), який відноситься до білків із заміщеним лізином.

40 В іншому переважному варіанті реалізації даного винаходу будь-який гомолог лептину має амінокислотну послідовність, по суті відповідну такий лептину. Термін "по суті відповідний" охоплює білки з невеликими змінами в послідовності натурального білка, які не впливають на базові характеристики білків, зокрема, на їх здатність індукувати ангіостатичну активність. Тип змін, які в основному розглядаються як такі, що охоплюються терміном "по суті відповідні", являють собою такі зміни, які виникають внаслідок проведення традиційної процедури мутагенезу ДНК, що кодує вказані білки, що приводить до появи декількох мінорних модифікацій, і спосіб скринінгу бажаної активності обговорювався вище.

45 Потрібно розуміти, що даний винахід включає розгляд застосування будь-якого похідного лептину, який індукує інгібуючу активність ендотелію у разі його нанесення, необов'язково з інгібітором ФРЕС або іншими інгібіторами ангіогенезу. Даний винахід включає застосування повного білка лептину, застосування похідних білка лептину і використання біологічно активних фрагментів білка лептину. Похідні лептину згідно з даним винаходом містять один або більше хімічних фрагментів, приєднаних до нього, включаючи водорозчинні полімери, такі як поліетиленгліколь. Отримані з поліетиленгліколю похідні можуть бути моно-, ди-, три- або тетра-пегільованими, наприклад, моно-пегільованими на N-кінці. Переважні моно-пегільовані на N-кінці похідні лептину, що необов'язково містять (пегільований) метіонин на N-кінці.

55 Були описана різні інгібітори активності ФРЕС або утворення ФРЕС, і вони можуть використовуватися в поєднанні з лептином для підвищення міри інгібування ангіогенезу. У число вказаних інгібіторів входять 3,7-диметил-1-пропаргілксантин (ДМПК) як А2-антагоніст, 7-(бета-гідроксietил)теофілін, 8-фенілтеофілін, антагоніст А2-рецептору аденозину ХСК (8-(3-хлорстирил)кофеїн), теобромін, антагоніст варіанту ФРЕС - розчинний рецептор ФРЕС sFLT-1, траніласт, 8-(3-оксо-4,5,6-тригідрокси-3h-ксантен-9-il)-1-нафтойна кислота, сурамин і тромбоцитарний фактор-4 [E.Hashimoto, et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 204, 318-24, 1994; S.Fisher, R.Knoll, D.Renz, G.F.Karliczek, W.Schaper, Endothelium 5, 155-165, 1997; H.Takagi, G.L.King, G.S.Robinson, N.Ferrara, L.P.Aiello, Invest Ophthalmol. Vis. Sci. 31, 2165-2176, 1996; E.Barcz, et al., Oncol. Rep. 5, 517-520, 1998; G.Siemeister, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 4625-4629, 1998; W Roeckl, et al., Exp. Cell Res. 241, 161-170, 1998; S.Komaya et al., Br. J. Pharmacol. 127, 537-545, 1999; K. Igarashi et al., Int. J. Mol. Med. 2, 211-215, 1998; J.Waltenberger et al., J. Mol. Cell Cardiol. 28, 1523-1529, 1996; S.Grengorinovich et al., J. Biol. Chem. 270, 15059-15065, 1995].

Різні інгібітори ангиогенезу описані в літературі, і вони можуть застосовуватися в поєднанні з лептином для більш ефективного інгібування ангиогенезу, ніж у разі їх використання окремо. У число вказаних інгібіторів входять K1-5 [Cao, R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 5728-5733, 1999], ангиостатин, ендостатин, BV-94 і AGM-1470 [Bergers G. et al., Science 284, 808-812, 1999].

У рамки даного винаходу включається також використання векторів експресії, що кодують лептин або гомологи лептину, що вводяться в рамках генної терапії, необов'язково разом з інгібіторами дії або утворення ФРЕС або з іншими інгібіторами ангиогенезу, для інгібування ангиогенезу в пухлинах. Такі лікарські засоби можуть застосовуватися в методах лікування, що включають внутрішньовенну, внутрішньоартеріальну, внутрішньочеревну, внутрішньом'язову, підшкірну, назальну, пероральну або легеневу системи доставки.

Даний винахід включає також використання векторів експресії, що кодують лептин або гомологи лептину, що вводяться в рамках генної терапії, в поєднанні з інгібіторами дії або утворення ФРЕС або з іншими інгібіторами ангиогенезу, що застосовуються для регресії жирової тканини. Така терапія може бути корисна при лікуванні захворювання, вибраного з групи, що складається з діабету, високого тиску крові і високого рівня холестерину, як частина комбінованої терапії, що включає використання лікарського засобу для лікування таких розладів. Вказані лікарські засоби можуть використовуватися в методах терапії, що включають внутрішньовенну, внутрішньоартеріальну, внутрішньочеревну, внутрішньом'язову, підшкірну, назальну, пероральну або легеневу системи доставки.

Опосередковані ангиогенезом захворювання включають, не обмежуючись приведеним списком, ожиріння, солідні пухлини, пухлини крові, такі як лейкоз, метастази пухлин, доброякісні пухлини, наприклад, гемангіоми, акустичні невриноми, нейрофіброми, трахоми і піогенні гранулеми, ревматоїдний артрит, псоріаз, очні ангиогенні захворювання, наприклад, діабетичну ретинопатію, синдром Террі, дегенерацію жовтої плями, відторгнення трансплантата рогівки, неоваскулярну глаукому, ретролентальну фіброплазію, почервоніння, синдрм Ослера-Уейббера, мікардіальний ангиогенез, бляшкову ревазуляризацію, телангіектазію, гемофілічну артропатію, ангиофіброму і грануляцію раневої поверхні.

Лептин або гомологи лептину або похідні лептину, необов'язково в поєднанні з ФРЕС і іншими інгібіторами або інгібіторами ангиогенезу корисні при лікуванні захворювань, що характеризуються надмірною або аномальною стимуляцією ендотеліальних клітин. Вказані захворювання включають, не обмежуючись ними, адгезії кишкової тканини, хвороба Крону, артеріосклероз, склеродерму, і гіпертрофічні рубці, наприклад, келоїди.

Лептин або гомологи лептину або похідні лептину, необов'язково разом з інгібіторами ФРЕС або іншими інгібіторами ангиогенезу, можуть використовуватися в поєднанні з іншими композиціями і процедурами для лікування захворювань. Так, наприклад, пухлина може бути піддана традиційному лікуванню хірургічним шляхом, опроміненню або хіміотерапії в поєднанні з лептином або гомологами лептину або похідними лептину, необов'язково разом з інгібіторами ФРЕС або іншими інгібіторами ангиогенезу, і згодом лептин або гомологи лептину або похідні лептину, необов'язково разом з інгібіторами ФРЕС або іншими інгібіторами ангиогенезу, можуть бути введені пацієнту для продовження стану спокою мікрометастазів і для стабілізації і інгібування зростання будь-якої залишкової первинної пухлини.

Крім того, лептин або гомологи лептину або похідні лептину, необов'язково разом з інгібіторами ФРЕС або іншими інгібіторами ангиогенезу, можуть бути об'єднані з фармацевтично прийнятними наповнювачами. Композиції, придатні для парентерального введення, включають водні і неводні стерильні розчини для ін'єкції, які можуть містити антиоксиданти, буфери, бактеріостатичні речовини і розчинені засоби, які роблять композицію ізотонічною відносно крові передбачуваного реципієнта; при цьому водні і неводні стерильні суспензії можуть також включати засоби, сприяючі суспендуванню, і згущувачі. Композиції можуть бути представлені у вигляді стандартної разової дози або у вигляді контейнерів з множинною дозою, наприклад, у вигляді закритих ампул і флаконів, і можуть зберігатися у висушеному виморожуванні (ліофілізованому) стані, для використання яких потрібно безпосередньо перед їх застосуванням додати стерильний рідкий носій, наприклад, воду для ін'єкцій. Розчини і суспензії для негайної ін'єкції після приготування можуть бути отримані з стерильних порошоків, гранул і таблеток описаного раніше вигляду.

Композиції можуть необов'язково включати матрицю з пролонгованим вивільненням, таку як біорозкладальні полімери, для створення терапевтичних композицій. Матриця з пролонгованим вивільненням в контексті даного опису являє собою матрицю, приготувану з матеріалів, звичайно полімерів, які здатні розкладатися шляхом ферментативного кислотного/основного гідролізу або при розчиненні. При введенні в організм матриця зазнає дії ферментів і рідин тіла. Матрицю з пролонгованим вивільненням бажано вибирати з біологічно сумісних матеріалів, таких як ліпосоми, полілактиди (полімолочна кислота), полігліколід (полімер гліколевої кислоти), співполімери полілактиду і гліколіду (співполімери молочної кислоти і гліколевої кислоти), поліангідриди, поли(орто)ефір, поліпептиди, гіалуронова кислота, колаген, хондроїтинсульфат, карбонові кислоти, жирні кислоти, фосфоліпіди, полісахариди, нуклеїнові кислоти, поліамінокислоти, амінокислоти, такі як фенілаланін, тирозин, ізолейцин, полінуклеотиди і полівінілпіролідон.

Переважно біорозкладальна матриця являє собою матрицю одного з приведених варіантів: полілактид, полігліколід або співполімер полілактид-гліколіду (співполімери молочної кислоти і гліколевої кислоти). Бажано, щоб полімери імплантувалися в безпосередній близькості від місця доставки лікарської речовини, наприклад, в жировій тканині або в місці пухлини, або імплантувалися так, щоб лептин або похідні лептину, необов'язково разом з інгібіторами ФРЕС або іншими інгібіторами ангиогенезу, повільно вивільнялися з наданням системної дії. Біорозкладальні полімери і їх застосування детально описані, наприклад, в роботі Брема з співавт. [Brem et al., J. Neurosurg. 74:441-446 (1991)], яка повністю включена в даний опис як посилання.

Фармацевтичні композиції, що модулюють ангіогенез, згідно з даним винаходом, можуть знаходитися в твердій, рідкій або аерозольній формі і можуть вводитися будь-яким відомим способом. Приклади твердих терапевтичних композицій включають пілюлі, креми і стандартні дозовані форми, що імплантуються. Пілюлі можуть вводитися перорально, лікувальні креми можуть застосовуватися місцево. Стандартні дози, що імплантуються можуть вводитися місцево, наприклад, в місці пухлини, або можуть імплантуватися для надання системної дії при вивільненні лікарської композиції, що модулює ангіогенез, наприклад, підшкірно. Приклади рідких композицій включають композиції, відповідні для ін'єкцій підшкірно, внутрішньовенно, внутрішньоартеріально, і композиції, придатні для місцевого і внутрішньочного введення. Приклади аерозольних композицій включають композиції для інгаляції, що вводяться в легені.

Потрібно розуміти, що додатково до інгредієнтів, вказаних вище, композиції згідно з даним винаходом можуть включати інші засоби, що традиційно використовуються в даній області техніки при виготовленні типів композицій, що розглядаються. Можуть бути необов'язково включені цитотоксичні засоби або інші засоби в поєднанні з лептином або гомологами лептину або похідними лептину, необов'язково разом з інгібіторами ФРЕС або іншими інгібіторами ангіогенезу, для забезпечення подвійного терапевтичного ефекту у пацієнта.

Композиції згідно з даним винаходом можуть вводитися з використанням стандартних способів. Загалом, поєднання можуть вводитися за допомогою місцевого (включаючи трансбуккальний і сублінгвальний) або парентерального (включаючи підшкірний, внутрішньочеревний, внутрішньом'язовий, внутрішньовенний, внутрішньошкірний, внутрішньомозковий, інтрацеребровентрикулярний, внутрішньочерепний, інтраспінальний, внутрішньотрахеальний і епідуральний), кризьшкірного, внутрішньовагінального, внутрішньоматочного, перорального, ректального, очного (включаючи інтравитреальний і інтракамеральний) або інтраназального способів введення.

Можуть також використовуватися осмотичні міні-насоси для забезпечення доставки високих концентрацій, що контролюється лептину або похідних лептину, необов'язково разом з інгібіторами ФРЕС або іншими інгібіторами ангіогенезу, через канюлю до потрібного місця, наприклад, безпосередньо до місця метастатичного зростання або в судинну мережу вказаної пухлини, що утворюється.

Дозування лептину або похідних лептину, необов'язково разом з інгібіторами ФРЕС або іншими інгібіторами ангіогенезу, згідно з даним винаходом залежить від природи захворювання або хворобливого стану, який збираються лікувати, і інших клінічних факторів, таких як вага і тягар стану людини або тварини і спосіб введення сполуки. Для лікування людей або тварин може вводитися від приблизно 0,5мг/кілограм до 10мг/кілограм лептину або гомолога лептину або похідного лептину, необов'язково разом з прийнятною дозою інгібітору ФРЕС або інгібітору утворення ФРЕС або інших інгібіторів ангіогенезу. В залежності від напівперіоду існування лептину або гомолога лептину або похідного лептину в організмі конкретної тварини або людини, лептин або гомолог лептину або похідне лептину може вводитися від декількох разів на день до одного разу на тиждень. Переважні стандартні дозовані форми композиції являють собою такі, які містять інгредієнт, що вводиться у вигляді денної дози або стандартної одиниці, добової суб-дози або її відповідної фракції. Способи даного винаходу охоплюють як однократні, так і багаторазове введення, здійснюване або одночасно, або через деякий період часу.

Композиції з лептином або гомологом лептину або похідним лептину можуть бути представлені у вигляді стандартних дозованих форм і можуть бути приготовані з використанням традиційних фармацевтичних методик. Такі методики включають стадію приведення в контакт активного інгредієнта і фармацевтичного(их) носія(ів) або наповнювача(ів). Загалом, композиції виготовляються за допомогою створення рівномірного і тісного контакту між активним інгредієнтом і рідкими носіями або тонкоподрібненими твердими носіями або ними обома і потім, при необхідності, придання форми продукту.

Переважні стандартні дозовані форми композиції являють собою такі, які містять інгредієнт, що вводиться у вигляді добової дози або стандартної одиниці, добової суб-дози або її відповідної фракції. Потрібно розуміти, що в доповнення до інгредієнтів, вказаних вище, композиції згідно з даним винаходом можуть включати інші засоби, що традиційно використовуються в даній області техніки при отриманні композицій вказаного типу.

Потрібно розуміти, що даний винахід розрахований на застосування як на людях, так і у ветеринарії.

Нижче даний винахід ілюструється приведеними прикладами, які не треба трактувати як такі, що обмежують область даного винаходу. Навпаки, потрібно чітко розуміти, що даний винахід відноситься до різних інших варіантів реалізації, модифікацій і еквівалентів, які можуть виникнути у фахівців в даній області після ознайомлення з даним описом, без відходу від концепції даного винаходу і/або тематики, вказаної в прикладеній формулі винаходу.

Приклади

Приклад 1

Індукція регресії кровоносних судин лептином

Для дослідження впливу лептину на гомеостаз кровоносних судин в жировій тканині дорослих тварин самицям мишей лінії C57BL-ob^{-/-} 8-10-тижневого віку в стані ожиріння і позбавлених ендогенного лептину, проводять в/ч ін'єкцію мишачого лептину (0,1-5мкг/г) в момент часу 0 і 9 годин. Помітна втрата ваги відмічається до 48 годин у мишей, що отримували >2x1мкг/г лептину (65,4±0,5г в порівнянні з 62,7±1,0г; n=6). Жир з черевної порожнини видаляють і фіксують через 24 і 48 годин після першої ін'єкції і проводять підрахунок кровоносних судин після фарбування укладених в парафін зрізів з антитілами до фактора VIII [D.D.Wagner et al., J. Cell Biol. 95, 355-360 (1982)]. Спостерігається значне зниження числа кровоносних судин (198±1 судин на 5 полів з високим розрізненням (ПВР, x400) у контрольних мишей; 159±2,5 судин на 5 ПВР у мишей після лікування лептином (2x1мкг/г) після 24 годин і 106±7,5 судин на 5 ПВР після 48 годин). На

Фіг.1 показані мікрофотографії кровоносних судин в зрізах жирової тканини. На Фіг.2 показана крива залежності від дози регресії кровоносних судин, і на Фіг.3 показаний розвиток вказаної регресії з течією часу.

Приклад 2

Лептин індукує ангіопоедин 2 (Ang2) в жировій тканині

Був вивчений механізм, за допомогою якого лептин індукує регресію кровоносних судин в жировій тканині, шляхом вимірювання його ефекту на рівень експресії ангіогенного і ангіостатичного факторів. Виділяють сумарну РНК з жирової тканини мишей ліній C57BL/6 та C57BL/6-ob^{-/-} в момент часу 0 і через 24 години після першого введення лептину. Сумарну РНК виділяють за допомогою реагенту TRI. Зворотну транскрипцію проводять в об'ємі 20мкл з використанням зворотної транскриптази РНК-ази H⁻ (Superscript II, GIBCO-BRL) з 1мкг (N) 6-випадкового праймеру (New England Biolabs) відповідно до інструкції виробника. Аліквоту (2мкл) продукту зворотної транскрипції використовують для ПЛР з ДНК-полімеразою VENT (New England Biolabs) і з використанням наступних смислових і антисмислових праймерів: мРНК muAng-2, номер зберігання в GeneBank No. AF4326, нуклеотиди 637-657 і 1147-1167; muVEGF, номер зберігання в GeneBank No.M95200, нуклеотиди 385-406 і 962-980; мРНК muActin, номер зберігання в GeneBank No. J00691 нуклеотиди 1670-1691 і 2452-2431. ПЛР реакції зупиняють перед насиченням. Було виявлено, що мРНК Ang2 експресується в жировій тканині нормальних мишей і не експресується у мишей ob^{-/-}. Крім того, ін'єкція лептину індукує експресію Ang2 у обох типів мишей (Фіг.4). Приведені результати показують, що лептин є могутнім індуктором ангіостатичного фактора Ang2.

Рівень і індукція мРНК Ang2 лептином в жировій тканині мишей ob^{-/-} досліджували потім методом РНК-блотінгу за допомогою специфічних зондів до Ang2 і ФРЕС. Виділяють сумарну РНК з жирової тканини за допомогою набору TRI реагентів (Molecular Research Center Inc.). Зразки РНК (15мкг) розрізняють електрофорезом в 1% агарозному гелі в MOPS-формальдегідному буфері, переносять на нейлонову мембрану (Hybond N, Amersham) в буфері 20XSSC, після чого мембрану нагрівають протягом 2 годин при температурі 80°C у вакуумній печі. Потім проводять попередню гібридизацію мембрани (6 годин, 42°C) з денатурованою ДНК сперми лосося (100мкг/мл в 50% формаміді, SxSSC, 4х розчин Денхарда і 0,5% ДСН). Потім додають зонд, що містить [³²P]дЦТФ ДНК (1х10⁶расп/мл), отриманий при випадковому приму ванні, і продовжують гібридизацію протягом 18 годин при 42°C. Потім мембрану промивають при кімнатній температурі (1хSSC, 0,1% ДСН - двічі; 0,25х330, 0,1% ДСН і 0,1хSSC, 0,1% ДСН - двічі; по 30 хвилин кожна промивка) і проводять ауторадіографію. Потім проводять повторну гібридизацію блотів з використанням ³²P-мічених проб, відповідних актину мишей, з метою демонстрації еквівалентних кількостей РНК в блоті. Після введення лептину відмічається значна індукція Ang2 (2,9±0,4 рази, P<0,05, n=3 через 24 години і 16,0±0,31 рази, P<0,01, n=3 через 48 годин; Фіг.5). Кінетика експресії Ang2 відповідає кінетиці апоптозу і регресії кровоносних судин. Відмічається лише незначна індукція рівня мРНК ФРЕС (1,4±0,1 рази, n=3 через 48 годин; Фіг.5).

Залежність індукції Ang2 лептином в жировій тканині від дози вивчали методом імуноблотінгу через 48 годин після першої ін'єкції лептину. Виділяють клітинні екстракти з жирової тканини за допомогою набору TRI реагентів (Molecular Research Center Inc.) паралельно проведенню екстракції сумарної РНК. Наносять на 10% ДСН-поліакриламідний гель 50мкг білка. Імуноблот-аналіз проводять з використанням 5мкг специфічних козлиних антитіл до людського Ang2. Рівень Ang2 був нижче за межу визначення в жировій тканині контрольних мишей ob^{-/-}, тоді як введення 2х1мкг/г лептину було досить для високого рівня індукції Ang2 (Фіг.6).

Приклад 3

Лептин індукує ангіопоедин 2 (Ang2) в адипоцитах, що культивуються

Раніше повідомлялося про деякі види периферичної активності лептину [M.R.Sierra-Honigsmann, et al., Science 281, 1683-1686, 1998; A.Bouloumie, H.C.Drexler, M.Lafontan, R.Busse, Circ. Res. 83, 1059-1066, 1998; B.Cohen, D.Novick, M.Rubinstein, Science 274, 1185-1188, 1996; D.Barkan, et al., Endocrinology 140, 1731-1738, 1999]. Для дослідження того, чи може лептин діяти безпосередньо на адипоцити, автори досліджували ефект лептину на мишачі пре-адипоцити 3T3-F442A, які відомі тим, що приводять до утворення жироподібної тканини при імплантуванні їх безтимусним мишам [H. Green, O.Kehinde, J. Cell Physiol. 101, 169-171, 1979; S.Mandrup, T.M. Loftus, O.A.MacDougald, F.P.Kuhajda, M.D.Lane, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94., 4300-4305, 1997]. Мишачі пре-адипоцити Swiss 3T3-F442A [H.Green, O. Kehinde, Cell 5, 19-27, 1975] вирощують в середовищі DMEM (GIBCO) з 10% сироватки теляти. Для диференціювання клітин, що злилися підтримують на середовищі DMEM з добавкою 10% фетальної сироватки теляти (ФСТ) протягом шести днів. Середовище замінюють кожні 48 годин. До кінця вказаного періоду більшість клітин придбаває характерну для адипоцитів морфологію, що визначається біохімічними і морфологічними критеріями. Лептин (1мкг/мл) додають до культур диференційованих і недиференційованих клітин. РНК виділяють з клітин культури, як описано для випадку з жировою тканиною в прикладі 2, і піддають РНК-блотінгу. Показано, що лептин індукує експресію мРНК Ang2 в диференційованих адипоцитах 3T3-F442A і не індукує її в пре-адипоцитах. Видно, мРНК Ang2 проявляється до 24 годин. мРНК ФРЕС конститутивно експресується в пре-адипоцитах і далі індукується лептином. Рівень мРНК ФРЕС був помітно нижче в зрілих адипоцитах і трохи індукувався доданням лептину (Фіг.7). Отримані результати дозволяють передбачити, що лептин індукує ангіостатичний сигнал в зрілих адипоцитах і ангіогенні сигнали в пре-адипоцитах.

Приклад 4

Вплив лептину плюс інгібітору ФРЕС на зниження жирової маси

Ангіостатична активність індукованого лептином Ang2 міняє напрям на протилежний в присутності ФРЕС. Крім того, в попередніх прикладах відмічалася помірна індукція ФРЕС лептином. У зв'язку з цим, самицям мишей лінії

C57BL-ob^{-/-} 8-10-тижневого віку в стані ожиріння і позбавлених ендогенного лептину, проводять в/ч ін'єкцію мишачого лептину (0,1-5мкг/г) в момент часу 0 і 9 годин. Паралельно 8-10-тижневим самицям мишей лінії C57BL-ob^{-/-} в стані ожиріння ін'єкують в/ч в момент часу 0 і 9 годин мишачий лептин (0,1-5мкг/г) спільно з антагоністом A2 рецептора аденозину ХСК, який відомий як інгібітор ФРЕС [H.Takagi, G.L.King, G.S.Robinson, N.Ferrara, L.P.Aiello, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 37, 2165-2176, 1996]. До 48 годин відмічається помітне зниження ваги у мишей, що отримали $\geq 2 \times 1 \text{ мкг/г}$ одного лептину ($65,4 \pm 0,5 \text{ г}$ в порівнянні з $62,7 \pm 1,0 \text{ г}$, $n=6$). Значно більша втрата ваги відмічається у мишей, яким вводили поєднання лептину і ХСК.

Потрібно розуміти, що приведений вище опис відноситься тільки до переважних варіантів реалізації винаходу і що можливі різні і численні модифікації і зміни без відходу від концепції і тематики даного винаходу, які визначені в прикладеній формулі винаходу.

Формула винаходу

1. Застосування лептину або гомолога лептину, або його похідного, самого чи разом з інгібітором ФРЕС і/або інгібітором ангиогенезу, для отримання лікарського засобу, корисного для інгібування ангиогенезу.
2. Застосування за п. 1, що включає інгібітор ангиогенезу.
3. Застосування за будь-яким одним з попередніх пп., яке відрізняється тим, що інгібітор ФРЕС вибирають з ДМПК, антагоніста A2-7-(бета-гідроксietил)теофіліну, 8-фенілтеофіліну, антагоніста A2 рецептора аденозину - ХСК, теоброміну, варіанту антагоніста ФРЕС - sFLT-1, траніласту, 8-(3-оксо-4,5,6-тригідрокси-3h-ксантен-9-іл)-1-нафтоїної кислоти, сураміну і тромбоцитарного фактора-4.
4. Застосування за п. 1, де вказаний ангиогенез пов'язаний з ростом жирової тканини.
5. Фармацевтична композиція для інгібування ангиогенезу, що містить лептин або гомолог лептину, або його похідне, як такий чи разом з інгібітором ФРЕС і/або інгібітором ангиогенезу.
6. Фармацевтична композиція за п. 5, яка відрізняється тим, що ангиогенез пов'язаний з ростом жирової тканини.
7. Спосіб інгібування ангиогенезу у ссавців, що включає введення суб'єкту фармацевтичної композиції за п.5 у придатній дозованій лікарській формі і з використанням відповідного способу введення.
8. Спосіб за п. 7, який відрізняється тим, що вказаний ангиогенез пов'язаний з ростом жирової тканини.
9. Суміш для застосування в інгібуванні ангиогенезу, що містить лептин і інгібітор ФРЕС.

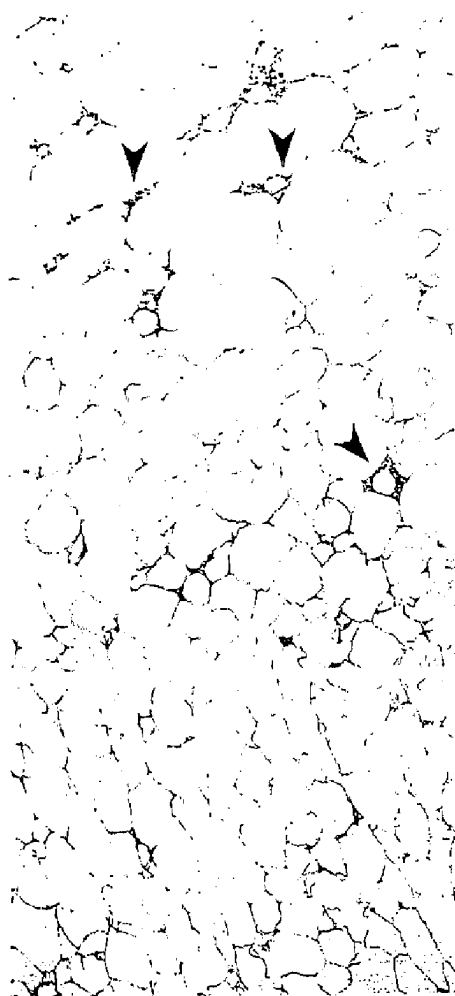
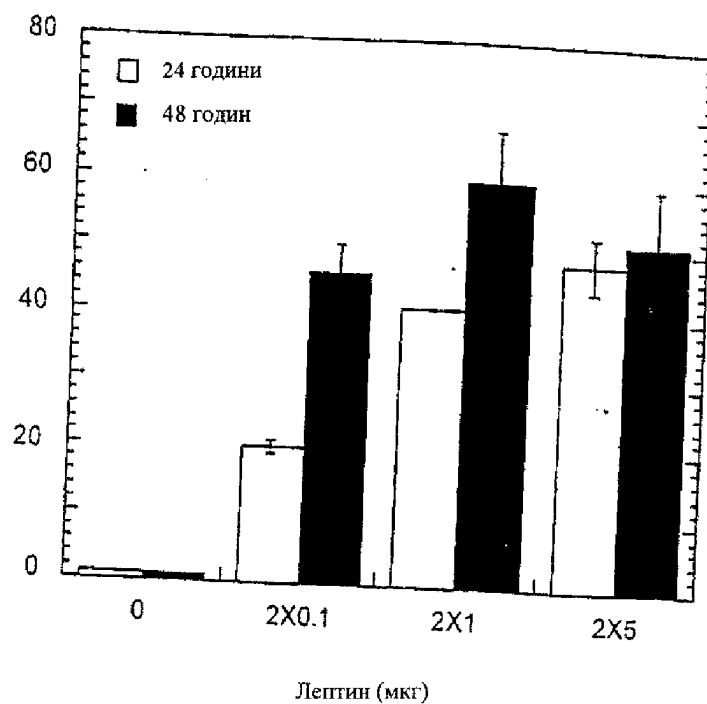
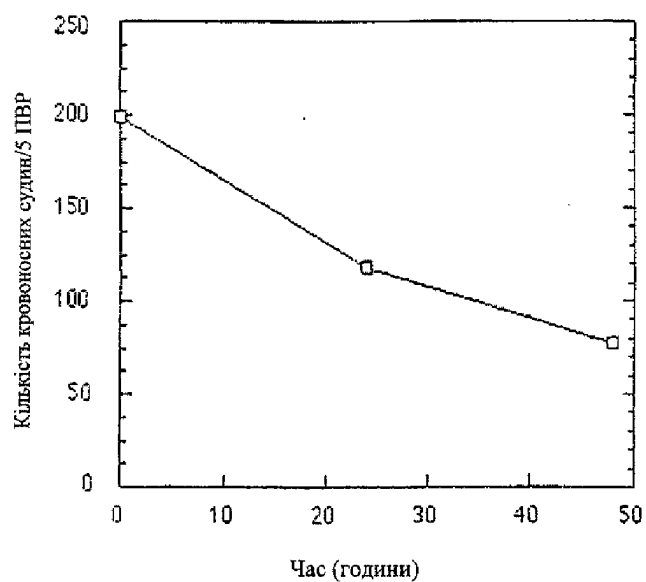


Fig. 1



Фиг. 2



Фиг. 3

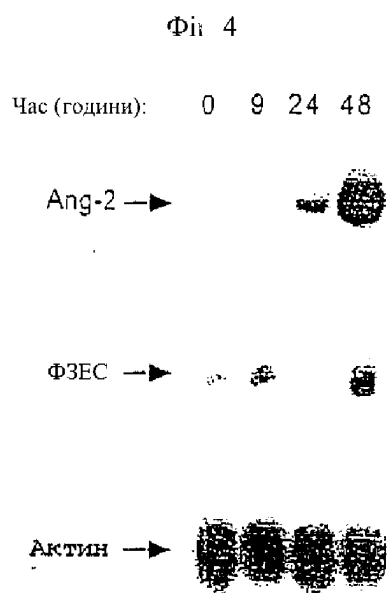
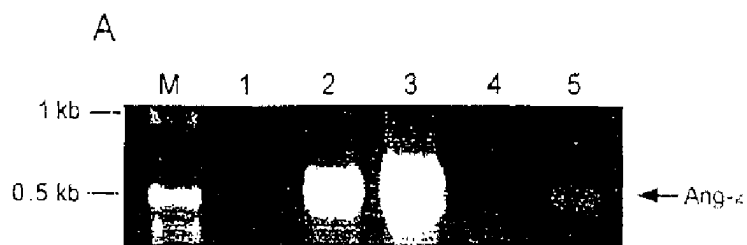


Fig. 6

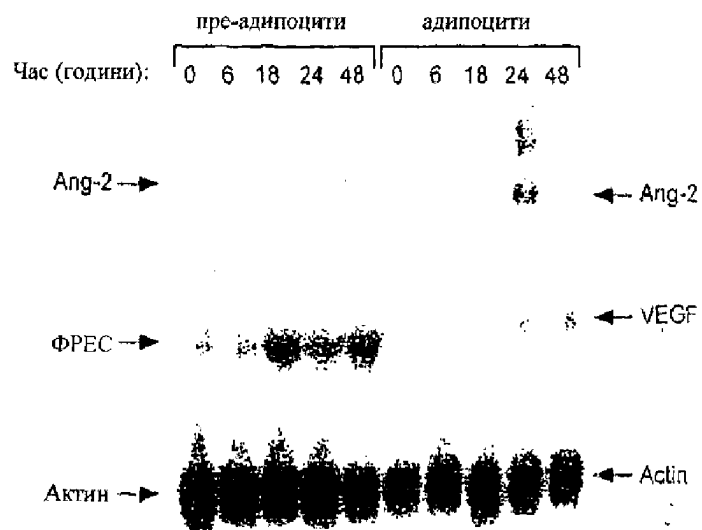


Fig. 7

Офіційний бюлетень "Промислова власність". Книга 1 "Винаходи, корисні моделі, топографії інтегральних мікросхем", 2005, N 11, 15.11.2005. Державний департамент інтелектуальної власності Міністерства освіти і науки України.