



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2004134733/14, 18.04.2003

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
18.04.2003

(30) Конвенционный приоритет:
30.04.2002 US 60/376,606

(43) Дата публикации заявки: 10.05.2005

(45) Опубликовано: 27.08.2008 Бюл. № 24

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: RU 2128486 C1, 10.04.1999. US 6358741,
19.03.2002. МОРОЗОВ В.И. и др.
Фармакотерапия глазных болезней. - М.:
Медицина, с.402-440. WUNDERLICH K. et al.
"Connective tissue growth factor in
retrocorneal membranes and corneal scars",
Ophthalmologica, 2000 Sep-Oct; 214(5), p.341-
346, abstract.

(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу:
30.11.2004

(86) Заявка РСТ:
US 03/12521 (18.04.2003)

(87) Публикация РСТ:
WO 03/092584 (13.11.2003)

Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр. 3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры", пат.пов. Е.Е.Назиной, рег. № 517

(72) Автор(ы):

ФЛИНОР Дебра Л. (US),
ШЕПАРД Аллан (US),
ДЖЕЙКОБСОН Насрин (US),
ПАН Иок-Хоу (US),
КЛАРК Эббот Ф. (US)

(73) Патентообладатель(и):
АЛЬКОН, ИНК. (СН)

(54) АГЕНТЫ, КОТОРЫЕ РЕГУЛИРУЮТ, ИНГИБИРУЮТ ИЛИ МОДУЛИРУЮТ АКТИВНОСТЬ И/ИЛИ
ЭКСПРЕССИЮ ФАКТОРОВ РОСТА СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ (ФРСТ), В КАЧЕСТВЕ
УНИКАЛЬНЫХ СРЕДСТВ ДЛЯ СНИЖЕНИЯ ВНУТРИГЛАЗНОГО ДАВЛЕНИЯ И ЛЕЧЕНИЯ
ГЛАУКОМАТОЗНЫХ РЕТИНОПАТИЙ/ОПТИЧЕСКИХ НЕВРОПАТИЙ

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно к
офтальмологии, и может быть использовано для
снижения внутриглазного давления и обеспечения
нейропротекции ганглиозных клеток сетчатки и
диска глазного нерва. Для этого вводят
композицию, включающую, по меньшей мере, один

нуклеотидный или небелковый агент, который
ингибирует экспрессию фактора роста
соединительной ткани (ФРСТ). Изобретение
представляет новый класс лекарственных средств
для лечения данных заболеваний. 4 н. и 12 з.п. ф-
лы, 4 ил.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21), (22) Application: **2004134733/14, 18.04.2003**(24) Effective date for property rights: **18.04.2003**(30) Priority:
30.04.2002 US 60/376,606(43) Application published: **10.05.2005**(45) Date of publication: **27.08.2008 Bull. 24**(85) Commencement of national phase: **30.11.2004**(86) PCT application:
US 03/12521 (18.04.2003)(87) PCT publication:
WO 03/092584 (13.11.2003)

Mail address:
**129090, Moskva, ul. B.Spasskaja, 25, str. 3,
OOO "Juridicheskaja firma Gorodisskij i
Partnery", pat.pov. E.E.Nazinoj, reg. № 517**

(72) Inventor(s):

**FLINOR Debra L. (US),
ShEPARD Allan (US),
DZhEJKOBSON Nasrin (US),
PAN Iok-Khou (US),
KLARK Ehbbot F. (US)**

(73) Proprietor(s):

AL'KON, INK. (CH)

(54) **AGENTS ADJUSTING, INHIBITING OR MODULATING ACTIVITY AND/OR EXPRESSION OF
CONNECTIVE TISSUE GROWTH FACTORS (CTGF) AS UNIQUE DRUGS FOR INTRAOCULAR
TENSION REDUCTION AND TREATMENT OF GLAUCOMA RETINOPATHIES/OPTICAL
NEUROPATHIES**

(57) Abstract:

FIELD: medicine; ophthalmology.

SUBSTANCE: to achieve the effect, a
composition including at least one non-nucleotide
or non-albumen agent inhibiting expression of

connective tissue growth factor (CTGF) is introduced.

EFFECT: new class of medicines for the listed
diseases.

2 ex, 4 dwg

Предпосылки изобретения

1. Область техники изобретения

Настоящее изобретение относится к области офтальмологических состояний, включающих нейродегенерацию и/или повышенное внутриглазное давление. Конкретнее изобретение обеспечивает композицию, которая понижает внутриглазное давление и обеспечивает офтальмологическое нейропротекторное действие.

2. Описание предшествующего уровня техники

Существует ряд офтальмологических состояний, которые вызваны или усугублены повреждением диска зрительного нерва, деградацией тканей глаза и/или повышением внутриглазного давления. Например, «глаукомы» представляют собой группу заболеваний, ослабляющих зрение, которые приводят к необратимой слепоте, в Соединенных Штатах и в других развитых странах. Первичная открытоугольная глаукома («ПОУГ») является наиболее распространенной формой глаукомы. Данное заболевание характеризуется деградацией трабекулярной сети, приводящей к обструкции нормальной способности внутриглазной жидкости выходить из глаза без смыкания пространства (напр., «угол») между радужной оболочкой глаза и роговицей (Vaughan, D. et al., (1992)). Характерным для такой обструкции при данном заболевании является увеличение внутриглазного давления («ВГД»), приводящее к прогрессирующей потере зрения и слепоте, если его не лечить своевременно должным образом. Было подсчитано, что заболевание поражает от 0,4% до 3,3% всех взрослых людей старше 40 лет (Leske, M.C. et al (1986); Bengtsson, B. (1989); Strong, N.P. (1992)). Более того, распространенность заболевания увеличивается с возрастом на свыше 6% у больных 75 летнего возраста или старше.

Глаукома поражает три различных ткани глаза. Увеличение ВГД связано с ПОУГ вследствие морфологических и биохимических изменений в трабекулярной сети (ТС), ткани, расположенной в углу между роговицей и радужной оболочкой глаза. Большая часть питательной внутриглазной жидкости выходит из переднего сегмента глаза через ТС. Прогрессирующая потеря клеток ТС и увеличение количества внеклеточных продуктов распада клеток в ТС глаз, пораженных глаукомой, приводит к увеличению сопротивляемости оттоку внутриглазной жидкости, таким образом, увеличивая ВГД. Повышенное ВГД, так же как и другие факторы, такие как ишемия, являются причиной дегенеративных изменений в диске зрительного нерва (ДЗН), приводящие к прогрессирующему «придаванию формы чаши» ДЗН и к потере клеток ганглия сетчатки и аксонов. Детальные молекулярные механизмы, обеспечивающие глаукоматозное повреждение ТС, ДЗН и клеток ганглия сетчатки, неизвестны.

Двадцать лет назад взаимосвязь глазной гипертензии, ишемии и механического искривления диска зрительного нерва интенсивно обсуждалась как главный фактор, являющийся причиной развития потери поля зрения при глаукоме. С тех пор другие факторы, включающие эксайтотоксичность, оксид азота, отсутствие жизненно важных нейротрофических факторов, аномальная глиальная/нейронная взаимосвязь и генетические изменения, были включены в дегенеративный процесс при заболевании. Рассмотрение генетических изменений заслуживает некоторого обсуждения, поскольку оно может в конечном счете определять механизм смерти клетки и обеспечивать определение различных форм глаукомы. За последние 8 лет было картировано свыше 15 различных генов, вызывающих глаукому, и было обнаружено 7 генов, вызывающих глаукому. Данные гены включают шесть картированных генов (GLC1A-GLC1F) и два обнаруженных гена (MYOC и OPTN) первичной открытоугольной глаукомы, два картированных гена (GLC3A-GLC3B) и обнаруженный ген врожденной глаукомы (CYP1B1), два картированных гена и синдрома пигментной дисперсии глаза/пигментной глаукомы и ряд генов, связанных с развитием или форм синдромов глаукомы (FOXC1, PITX2, LMX1B, PAX6).

Таким образом, каждая форма глаукомы может обладать уникальной патологией, и соответственно могут быть необходимы различные терапевтические подходы к лечению заболевания. Например, лекарство, которое вызывает экспрессию гена фермента, осуществляющего деградацию внеклеточного матрикса диска зрительного нерва, не

предотвращает возможную смерть ГКС, вызываемую эксайтотоксичностью или дефицитом нейротрофического фактора. При глаукоме смерть ГКС происходит вследствие процесса, называемого апоптозом (запрограммированная смерть клетки). Было предположено, что различные типы инсультов, которые могут привести к смерти, действуют подобным

5 образом с помощью конвергирования нескольких общих путей. Конъюгирование лекарственного препарата с антителом по ходу протекания общих путей является стратегией, которая может расширить применимость лекарства и увеличить вероятность того, что оно может быть применено при лечении различных форм заболевания. Однако лекарства, которые действуют на множественные метаболические пути, дают
10 нежелательные побочные эффекты с большей вероятностью. С появлением наборов для генетической диагностики для определения специфических форм глаукомы селективные агенты, обеспечивающие нейропротекторное действие, могут быть протестированы с целью понижения степени изменчивости определяемого ответа.

Современная терапия глаукомы направлена на снижение ВГД, главного фактора риска
15 развития и прогрессирования глаукомы. Данные терапии понижают ВГД, но они не действуют непосредственно на патогенетические механизмы, и заболевание продолжает прогрессировать. Таким образом, необходим терапевтический метод снижения ВГД и/или обеспечивающий нейропротекторное действие на диск глазного нерва и/или на клетки ганглия сетчатки посредством патогенных путей.

20 Краткое описание изобретения

В настоящем изобретении преодолены данные и другие недостатки предшествующего уровня техники путем обеспечения метода снижения внутриглазного давления и обеспечением нейропротекторного действия у пациента, которому необходимо введение
25 терапевтически эффективного количества композиции, включающей по крайней мере один нуклеотидный или небелковый агент, который ингибирует экспрессию и/или сигнальный путь фактора роста соединительной ткани (ФРСТ), и фармацевтически приемлемый носитель. В другом аспекте изобретение обеспечивает способ снижения внутриглазного давления с помощью введения пациенту терапевтически эффективного количества агента, который ингибирует экспрессию и/или сигнальный путь ФРСТ. Предпочтительно составы,
30 используемые при осуществлении метода изобретения, будут понижать внутриглазное давление, повышенное в результате увеличения экспрессии ФРСТ или продукта ФРСТ сигнализирования.

В предпочтительных воплощениях композиция согласно изобретению может быть введена наружно, внутрикамерно или посредством имплантата. Обычно общая
35 концентрация ингибитора ФРСТ в композиции согласно изобретению составляет от 0,01% до 2%. В основном способ лечения изобретения чаще всего используется для лечения пациентов, страдающих глаукомой, например глаукомой при нормальном внутриглазном давлении или глазной гипертензии.

Изобретение дополнительно предоставляет способ предотвращения потери поля
40 зрения, связанной с ПОУГ, путем введения пациенту, нуждающемуся в этом, композиции, включающей нуклеотидные или небелковые агенты, которые модулируют экспрессию и/или сигнализирование ФРСТ таким образом, что контролируется внутриглазное давление и обеспечивается защита ганглиозных клеток сетчатки или диска зрительного нерва.

В другом воплощении настоящее изобретение обеспечивает композицию для снижения
45 внутриглазного давления и обеспечивающую офтальмологическое нейропротекторное действие у пациента, нуждающегося в этом. В основном композиция согласно изобретению включает, по крайней мере, один агент, который ингибирует экспрессию и/или сигнализирование фактора роста соединительной ткани (ФРСТ), и фармацевтически применяемый носитель. Общая концентрация ФРСТ в составе изобретения составляет от
50 0,01 до 2%.

Краткое описание чертежей

Следующие чертежи образуют часть настоящего описания и включены в описание, чтобы продемонстрировать определенные аспекты настоящего изобретения. Изобретение

может быть лучше понято с помощью обращения к одному или более данных чертежей совместно с детальным описанием отдельных воплощений представленных в описании.

Фиг.1. Экспрессия гена ФРСТ повышена в глаукоматозных по сравнению с нормальными ТС тканями. Для того чтобы проверить результаты удаления микроматрицы и кДНК, экспрессия мРНК ФРСТ определялась с помощью КПЦР анализа кДНК глаукоматозной по сравнению с таковой нормальной ТС ткани. Числа, расположенные под каждым образцом, относятся к идентификационному номеру кДНК, присвоенному каждому образцу. Человеческая донорная ткань и общее количество РНК были получены, как описано (Wang et al. 2001). «Ср.» представляет величину нормального или глаукоматозного ТС уровней.

Фиг.2. Экспрессия гена ФРСТ повышена в глаукоматозных по сравнению с нормальными ТС клеточными линиями. Для того чтобы проконтролировать результаты удаления микроматрицы и кДНК, экспрессия мРНК ФРСТ определялась с помощью КПЦР анализа кДНК глаукомной по сравнению с нормальными ТС клеточными линиями. Числа, расположенные под каждым образцом, относятся к идентификационному номеру клеточной линии. Человеческие ТМ клеточные линии и общее количество РНК были получены, как описано (Shepard et al. 2001). «НТМ» пул и «ГТМ» пулы относятся к уровням амплификации из объединенных НТМ или ГТМ кДНК.

Фиг.3. Действие GSK-3 ингибитора на экспрессию гена ФРСТ в глаукоматозных ТС клетках. Для того чтобы определить эффекты ингибирования GSK-3 экспрессии гена ФРСТ, заявители измерили эффекты известного GSK-3 ингибитора SB-216763 (Coghlan, et al. 2000) на обе - базальную и TGF β 2-стимулированную экспрессию мРНК ФРСТ в глаукоматозной ТС клеточной линии (SGTM2697) с использованием КПЦР анализа.

Фиг.4. Действие CDK2 ингибирования на экспрессию гена ФРСТ в глаукоматозных ТС клетках. Для того чтобы определить эффекты CDK ингибирования на экспрессию гена ФРСТ, были измерены эффекты известных CDK2 ингибиторов GW-8510 (Davis, et al. 2001) на обе - базальную и TGF β 2-стимулированную экспрессию мРНК ФРСТ в глаукоматозной ТС клеточной линии (SGTM2697) с использованием КПЦР анализа.

Детальное описание предпочтительных вариантов

Глаукома является гетерогенной группой глазных невропатий, которые обладают конкретными клиническими особенностями. Потеря зрения при глаукоме благодаря селективной смерти ганглиозных клеток сетчатки в невральной сетчатке, которая клинически диагностируется с помощью характерных изменений поля зрения, дефектов слоя нервного волокна и прогрессирующего «придания формы чаши» ДЗН. Одним из главных факторов риска развития глаукомы является глазная гипертензия (повышенное внутриглазное давление, ВГД). ВГД также оказывается вовлеченным в патогенез глаукомы, протекающей при нормальном внутриглазном давлении, при которой пациенты имеют ВГД, рассматриваемое как нормальное. Повышенное ВГД связано с глаукоматозной повышенной сопротивляемостью оттоку внутриглазной жидкости в трабекулярной сети (ТС), небольшой специализированной ткани, расположенной в углу передней камеры глаза между радужной оболочкой и роговицей. Глаукоматозные изменения ТС включают потерю ТС клеток и депонирование и накопление внеклеточных остатков, включающих материал гемолитической бляшки. В дополнение, также присутствуют изменения, которые встречаются в диске зрительного нерва. В глазах, пораженных глаукомой, присутствуют морфологические изменения и изменения изменчивости глиальных клеток ДЗН. Под влиянием повышенного ВГД и/или транзиторных ишемических инсультов происходят изменения в составе внеклеточного матрикса ДЗН и альтерация глиальных клеток и морфологии аксона ганглиозной клетки.

Глаукоматозные изменения ТС отличаются от фиброза, который связан с ответом при ранозаживлении и в основном включает воспаление и последующую пролиферацию миофибробластов; повреждение ткани, узнаваемое воспалительной системой, которая инициирует процесс заживления раны путем стимуляции фибробластов и регенерацию тканей. Смерть или отмирание тканей/клеток заменяется образованием рубцовой ткани, состоящей первоначально из фибрина, который впоследствии заменяется избыточным

количеством внеклеточного матрикса, особенно коллагеном.

ФРСТ представляет собой секретируемый цитокин, который, как известно, увеличивает выработку внеклеточного матрикса (ВКМ), преимущественно вследствие увеличения депонирования коллагена I и фибронектина. Сверхэкспрессия ФРСТ была предварительно
 5 определена как главная причина таких состояний, как склеродермы, фибропролиферативного заболевания, рубцевания и т.д., при которых происходит чрезмерное накопление компонентов ВКМ. Чрезмерное накопление материалов внеклеточного матрикса в области трабекулярной сети (ТС) также является отличительным признаком многих форм глаукомы; подобное увеличение, как предполагается, приводит к
 10 увеличению сопротивляемости оттоку внутриглазной жидкости и, таким образом, увеличенному внутриглазному давлению. Было обнаружено присутствие продукта гена ФРСТ в изолированных тканях и клеточных линиях, адаптированных в человеческих ТС. Таким образом, предполагается, что ФРСТ играет роль в выработке ВКМ ТС. Агенты, которые снижают экспрессию гена ФРСТ, выработку белка или последующие эффекты активации ФРСТ, представляют собой новые средства для снижения ВГД.

Экспрессия ФРСТ может быть индуцирована широким спектром факторов, включающих: TGF- β , VEGF, тромбин, конечный продукт усиленного гликозилирования (AGE), механический стресс и лизофосфатидная кислота (ЛФК) среди других. Специфические индукторы ФРСТ и пути сигнализирования могут меняться в зависимости от
 20 специфического стимулируемого типа клеток. Существуют данные об TGF- β индуцировании ФРСТ, включающей Smads, PLC, PKC и тирозинные киназы для некоторых типов клеток, в то время как RhoA, PKA и цитоскелет, по видимому, вовлечены в индуцирование для других типов клеток. Механический стресс, действующий на фибробласты, индуцирует экспрессию ФРСТ вследствие поражения протеиновых киназ и
 25 тирозинных фосфатаз.

Механизм действия ФРСТ изучен не очень хорошо. ФРСТ, по-видимому, связывается с PDGF рецепторами и ЛНП рецептор-зависимыми белками (ЛРБ), каждый из которых может действовать как сигнализирующий рецептор клеточной поверхности для ФРСТ. У
 30 некоторых типов клеток ФРСТ сигнализация посредством PDGF рецепторов, по-видимому, включает MAPK и PI3K. ФРСТ сигнализация в хондроцитах включает ERK сигнализацию, обеспечивающую пролиферацию клеток, и p38 MAPK сигнализацию, обеспечивающую клеточную дифференцировку. Специфические рецепторы клеточной поверхности и пути сигнализации, используемые ФРСТ, по-видимому, зависят от изучаемого специфического типа клеток.

В патенте США No 5585270 описаны полинуклеотиды, кодирующие ФРСТ. ФРСТ, как было упомянуто, обладает митогенной активностью или возможностью стимулировать клетки-мишени к пролиферации. Также было упомянуто, что он обладает хемотаксической активностью, которая заключается в химически индуцированном передвижении клеток как
 40 результате взаимодействия с особыми молекулами. Белок, по-видимому, играет роль в развитии, росте и восстановлении человеческих тканей. В патенте также описан метод ускорения ранозаживления при нанесении на рану эффективного количества композиции, содержащего очищенный ФРСТ. Полипептид, как было упомянуто, применяется в случае замедленного заживания ран кожи или если необходима стимуляция нормального механизма заживания, например, при ожогах. В патенте не обсуждается глаукома или
 45 дефекты глаза.

В патенте США No 6069006, описание которого является частичным продолжением патента США No 5585270, рассмотренного выше, описываются ФРСТ регуляторные последовательности нуклеиновых кислот. В данном патенте в дальнейшем описываются
 50 методы лечения фиброзных заболеваний и идентификации агентов для лечения фиброзных заболеваний. Специфические агенты, отличные от последовательностей нуклеиновых кислот ФРСТ или полипептидов, не описаны. Нейропротекторное действие на ткани глаза не описывается.

В патенте США No 6358741 описывается ряд последовательностей нуклеиновых кислот,

происходящих от ФРСТ, которые, как было упомянуто, используются для ингибирования экспрессии ФРСТ в клетке. В данном патенте не обсуждается глаукома, нейропротекторное действие на ткани глаза или нуклеотидные кислоты или непептидные последовательности для ингибирования экспрессии ФРСТ.

ФРСТ, по-видимому, накапливается в больших концентрациях в цитоплазме звездчатых активных астроцитов центральной нервной системы. Был предположен агент, являющийся причиной в механизмах, связанных с активными астроцитами, такими как глиоз (глиальное разрастание) и глиальное образование рубцов, т.е. в процессе, как известно, препятствующем заживлению нервных тканей и росту (Schwab et al. 2000; Schwab et al. 2001). Предполагается, что такой процесс также принимает участие в потере нейронов сетчатки и/или в неспособности к восстановлению аксонов глазного нерва, связанного с глаукомой. В настоящем изобретении было открыто, что снижение ФРСТ обеспечивает средства для защиты обоих дисков диска сетчатки и диска зрительного нерва/нерва.

Таким образом, в одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ снижения ВГД и обеспечение нейропротекторного действия на ганглийные клетки сетчатки с помощью введения композиции, включающей нуклеотидные и непептидные ингибиторы ФРСТ. Кроме того, предполагается, что композиция будет включать компонент, который ингибирует агент, повышающий ФРСТ. Например, было показано, что пероксид водорода (H_2O_2) является индуктором экспрессии гена ФРСТ. Было найдено, что TGF- β , дексаметазон и серотонин также индуцируют экспрессию ФРСТ (Park et al. 2001).

Терапевтические агенты для лечения глаукомы предпочтительно являются небольшими похожими на лекарственные вещества молекулами, которые затрагивают один или более аспектов путей ФРСТ. Предпочтительные терапевтические агенты представляют собой: (1) ингибиторы ФРСТ; (2) ингибиторы агентов, снижающих действие ФРСТ (т.е. ингибиторы ФРСТ сигнализации); (3) ингибиторы агентов, которые повышают экспрессию гена или белка ФРСТ.

Изобретатели протестировали некоторые различные классы соединений с помощью ФРСТ КПЦР анализа на наличие ингибирования базальной и TGF β 2-индуцированной экспрессии гена ФРСТ в клеточной культуре нормальных и глаукоматозных ТС клеток. Небольшие молекулы ингибиторов были направлены на ингибирование GSK-3, CDK, NAALADазы, протеин киназы C, MEK, p38MAPK, ROCK, VEGF, геранилгеранил трансферазы и AGE. Небольшие молекулы агонистов PPAR, 5-HT и P2X7 были также протестированы на наличие активности. Соединения, мишенями которых являются внеклеточные сигналы регулируемые киназы 1 или 2 (ERK1 или ERK2), могут также играть роль при базальной или TGF β 2-индуцированной экспрессии гена ФРСТ. Существует значительная кросс-активность многих ингибиторов GSK-3 и CDK, и возможно, что соединения, которые ингибируют другие мишени, такие как ERK, протеин киназы C или белки семейства STAT, могут быть получены в ингибировании базального или TGF β 2-стимулированного ФРСТ в ТС клетках.

Было найдено два класса соединений, ингибирующих базальную и TGF β 2-индуцированную ФРСТ экспрессию в человеческих ТС клетках: GSK-3 и CDK ингибиторы. Гликоген-синтаза-киназа (GSK-3) является сериновой/треониновой протеин киназой, которая представлена в качестве двух клеточных форм, GSK-3 α и GSK-3 β , полученных и посредством двух генов. GSK-3 α и GSK-3 β идентичны на 95% и различие при ингибировании небольшими молекулами антагонистов не может быть полностью установлено. GSK-3 представляет собой фермент ограничивающий скорость при синтезе гликогена, но он имеет много клеточных мишеней для фосфорилирования, включая гликоген синтазу, β -кератин, eIF2B и tau (обзор в (Cohen and Frame 2001) и (Woodgett 2001)). Прямое включение GSK-3 в экспрессию ФРСТ и сигнализацию не приводится в качестве примеров в литературе.

Циклинзависимые киназы (CDK) обладают разнообразными клеточными функциями, включающими регуляцию цикла клеточного деления, апоптоз, транскрипцию, функционирование нейронов и дифференцировку. Были определены некоторые известные

АТФ-зависимые ингибиторы CDK (Knockaert, Greengard et al. 2002). Ингибирование CDK должно быть исследовано для использования при лечении рака, болезни Альцгеймера, БАС, инсульта, кардиоваскулярного заболевания и других заболеваний. Было показано, что ФРСТ является медиатором, снижающим TGF β пролиферацию фибробластов с помощью стимуляции циклин A-cdk2 (Kothapalli and Grotendorst 2000).

Было установлено, что в классе GSK-3 соединений одно соединение, SB-216763 (Coghlan, Culbert et al. 2000), ингибирует как базальный, так и TGF β 2-индуцируемый ФРСТ уровни в нормальных и глаукоматозных (Фиг.3) человеческих ТС клетках. SB-216763 представляет собой производное имида малеиновой кислоты с ИК₅₀ 34 нМ против GSK-3 α и GSK-3 β в присутствии 0,01 мМ АТФ и K_i 9 нМ (Coghlan, Culbert et al. 2000). Другие соединения класса GSK-3 ингибиторов были протестированы, и было найдено, что они ингибируют базальную, и в некоторых случаях TGF β -индуцированную экспрессию гена ФРСТ в ТС клетках, включающих паулоны (paullones), такие как альстерпаулон, 9-цианопаулон и кенпаулон (Zahareviz, Gussio et al. 1999; Leost, Schultz et al. 2000; Bain, McLauchlan et al. 2003).

В классе соединений CDK был найден относительно селективный ингибитор CDK2, GW-8510 (Davis, Benson et al. 2001), ингибирующий как базальный, так и TGF β 2-индуцируемый уровни в нормальных и глаукоматозных (Фиг.4) человеческих ТС клетках. GW-8510 является эффективным и относительно селективным ингибитором CDK2 с ИК₅₀ 10 нМ. GW-8510 также ингибирует CDK1 и CDK4, но с более низкими величинами ИК₅₀ (110 и 130 нМ) (Davis, Benson et al. 2001). Были протестированы другие соединения класса ингибиторов GSK-3, в результате чего было обнаружено, что они имеют ингибиторную активность, включающую пурваланол А и росковитин (Hardcastle, Golding et al. 2002).

Были протестированы другие классы соединений с помощью ФРСТ КПЦР метода, и было найдено, что они ингибируют базальную и в некоторых случаях TGF β -индуцированную экспрессию гена ФРСТ в ТС клетках, включающих агонисты PPAR, такие как троглитазон, циглитазон (Willson, Brown et al. 2000) и 15(S)HETE.

Агенты данного изобретения могут быть объединены в различные типы офтальмологических лекарственных форм для доставки в глаз (например, наружно, внутрикамерно или путем имплантации). Агенты предпочтительно объединяют в офтальмологические лекарственные формы для наружного применения для доставки в глаз. Агенты могут быть комбинированы с офтальмологически пригодными консервантами, суфрактантами, веществами, способствующими увеличению вязкости, веществами, способствующими проникновению, буферами, хлоридом натрия и водой для образования водных, стерильных офтальмологических суспензий или растворов. Лекарственные формы в виде офтальмологического раствора могут быть получены растворением агента в физиологически приемлемом изотоническом водном буфере. Кроме того, офтальмологический раствор может включать офтальмологически приемлемые суфрактанты, способствующие растворению агента. Кроме того, офтальмологический раствор может содержать агент, увеличивающий вязкость, такой как гидроксиметилцеллюлозу, гидроксипропилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, метилцеллюлозу, поливинилпирролидон или подобные вещества для улучшения удерживания лекарственной формы в конъюнктивальном мешке. Гелеобразующие агенты также могут быть использованы, включая гелан и ксантановую смолу, но не ограничиваясь ими. Для получения лекарственной формы стерильной офтальмологической мази активный компонент комбинируется в подходящей для лекарства среде, такой как минеральное масло, жидкий ланолин или белый вазелин. Лекарственные формы стерильного офтальмологического геля могут быть получены суспензированием агента с гидрофобной основой, состоящей из, например, карбопола-974 или подобного вещества согласно опубликованным лекарственным составам для получения аналогичных офтальмологических лекарственных форм; могут быть включены стабилизаторы и тонирующие агенты.

Агенты предпочтительно представлены в качестве офтальмологических суспензий или растворов, применяемых наружно, с pH от 4 до 8. Установление точного режима дозирования для каждого индивидуума оставлено на усмотрение клиницистов. Агенты обычно содержатся в данных лекарственных формах в количестве от 0,01 до 5 мас.%, но

5 предпочтительно в количестве от 0,05 до 2 мас.% и наиболее предпочтительно в количестве от 0,1 до 1 мас.%. Лекарственная форма может быть раствором, микроэмульсионной суспензией. Таким образом, при наружном применении 1-2 капель данных лекарственных форм они должны доставляться к поверхности глаза 1-4 раза в день согласно решению квалифицированных в данной области клиницистов.

10 Агенты также могут быть использованы совместно с другими агентами для лечения глаукомы, подобных, но не ограничивающихся β -блокаторами, аналогами простагландинов, ингибиторами карбоангидразы, α_2 антагонистами, миотическими средствами и веществами, обладающими нейтропротекторным действием.

Агент может быть доставлен непосредственно в глаз (например: наружные глазные

15 капли или мази; средства пролонгированного действия в слепом мешке (замкнутом пространстве) или имплантированные в склеру или внутрь глаза; периокулярно, конъюнктивально, введением в теноново пространство, внутрикамерально или введением в стекловидное тело) или парентерально (например: перорально, внутривенно, подкожно или внутримышечным введением; дермально и т.д.) с использованием методик, хорошо

20 известных специалистам в данной области. Следующие составы представляют собой примеры возможных воплощений лекарственных форм данного изобретения.

(а) Офтальмологическая лекарственная, мас.%.
форма для наружного применения:

ФРСТ ингибитор 0,005-5,0

25 Тилоксапол 0,01-0,05

НРМС 0,5

Беналкония хлорид 0,01

Хлорид натрия 0,8

Динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты 0,01

30 NaOH/HCl до pH 7,4

Очищенная вода до 100 мл

В дальнейшем предполагается, что соединения изобретения могут вводиться с помощью внутриглазного устройства.

Следующие примеры включены для демонстрации предпочтительных вариантов

35 изобретения. Специалистами, квалифицированными в данной области, должно быть принято во внимание, что методики, раскрытые в примерах, которые следуют представленным методикам, открытым изобретателем для осуществления изобретения на практике, и таким образом, могут быть рассмотрены в качестве предпочтительных способов при его осуществлении. Однако в свете настоящего открытия специалистам,

40 квалифицированным в данной области, следует принять во внимание, что в приведенные варианты могут быть внесены изменения и получены подобные или похожие результаты без отклонения от духа и идеи изобретения.

Пример 1

Экспрессия ФРСТ в глаукоматозных ТС по сравнению с неглаукоматозными ТС

45 Скрининг с помощью микрочипов

mРНК транскрипт ФРСТ идентифицировали как повышенный в глаукоматозных ТС клетках по сравнению с нормальными ТС клетками с помощью GeneFilter® (Research Genetics) screen.

Пятьсот нг общего количества РНК (TRIzol Reagent; Invitrogen) выделяют из

50 объединенных в пул (6 каждый) нормальных или глаукоматозных ТС клеточных линий, как описано (Shepard et al., IOVS 2001, 42: 3173), и нарабатывают отдельно в присутствии 300 единиц Супертранскрипта II РНазы H - обратной транскриптазы (Invitrogen), 100 мКи [α -³³P]dCTP (10 мКи/мл), 3000 Ки/ммоль; Amersham), 0,33 mM dATP, dGTP, dCTP

(Promega), 3,3 мМ ДТТ, 1X First Strand Buffer (Invitrogen) и 2 мкг олиго-dT при 37°C 90 мин. Радиоактивно меченную кДНК в последствии очищают с помощью Chroma-Spin 100 Columns (Clontech), согласно инструкциям производителя. Один GeneFilter® (GF211; Research Genetics), покрытый ~4000 известных генов, используют для гибридизации с радиоактивно меченной пробой согласно инструкциям производителя. Сначала мембрану подвергают предварительной обработке кипячением в 0,5% ДСН 5 мин. Предварительную гибридизацию на мембране проводят в течение 30 мин при 42°C в роллерном флаконе, содержащем 5 мл MicroHyb (Research Genetics) с 5 мкг поли-dA (Research Genetics) и 5 мкг Cot1 ДНК (Invitrogen), в качестве блокирующих реагентов. Всю радиоактивно меченную пробу кипятят и добавляют в смесь для предварительной гибридизации на 16 ч при 42°C. После гибридизации мембрану промывают дважды 2×SSC/1% ДСН 20 мин и затем дважды 0,5×SSC/1% ДСН 15 мин. Мембрану помещают на бумагу Whatmann 3MM и закладывают в SaranWrap. Изображения проявляют в Storm Phosphorimager (Molecular Dynamics) с использованием максимального разрешения. Изображение проявляют один раз, блот немедленно очищают кипячением в 0,5% ДСН и используют для другой гибридизации с противоположной пробой, т.е. нормальные ТС, следующие за глаукоматозными ТС. Изображения, полученные с помощью двойного зондирования, анализируют с использованием Pathways (Research Genetics) и MS Excel (Microsoft) программного обеспечения. Из 4300 генов на GF211 GeneFilter® ФРСТ (номер доступа GenBank #AA598794) представляет собой один из 7 генов, которые показали соотношение ГТС:НТС >двукратного.

Скрининг субтракции кДНК

ФРСТ определяют независимо в качестве PCR-Select™ скрининга субтракции кДНК (Clontech), используемой для скрининга мРНК транскриптов, которые различно экспрессируются в глаукоматозных по сравнению с нормальными ТС клетками.

Семьсот мкг общего количества РНК (TRIzol Reagent; Invitrogen) выделяют из объединенных в пул (7 каждый) нормальных или глаукоматозных ТС клеточных линий, как описано (Shepard et al., IOVS 2001). Испытуемую (глаукоматозную) и ведущую (нормальную) поли А+ РНК с помощью двух циклов поли А+ селекции на олиго-dT латексных шариках с использованием набора Nucleotrap mRNA Midi (Clontech). Все последующие стадии PCR-Select™ субтракции кДНК проводят согласно методологии набора Clontech (каталог # K1804-1).

Различные скрининги полученных субтракцией библиотек кДНК представляются существенными согласно инструкциям в наборе PCR-Select™ Differential Screening (Clontech каталог #K1808-1). Выбранный ряд различно экспрессируемых клонов кДНК подтверждается также виртуальным Northern анализом. Список всех возможных различно экспрессируемых клонов устанавливают вычитанием библиотеки кДНК пробы ТС клеток, полученных с помощью Clontech. Транскрипты ФРСТ (номер доступа GenBank #XM_037055.1) находятся в данном списке и добавлены в библиотеку глаукоматозной кДНК.

Пример 2

Выделение РНК и получение первой нити кДНК

Общее количество РНК выделяют из ТС клеток с использованием реагента Trizol® согласно инструкциям производителя (Life Technologies). Первую нить кДНК получают из 1 мкг общего количества РНК с использованием выбранных случайным образом гексамеров и TaqMan Reverse Transcription reagents согласно инструкциям производителей (PE Biosystems, Foster City, CA). 100 мкл реакции подвергают 20-кратному разведению для достижения эффективной концентрации кДНК 0,5 нг/мкл.

Количественная ПЦР

Различную экспрессию ФРСТ подтверждают количественной РП-ПЦР в реальном масштабе времени (КПЦР) с использованием ABI Prism® 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems), главным образом, как описано (Shepard et al., IOVS 2001, 42: 3173). Праймеры для амплификации ФРСТ конструируют с использованием программного

обеспечения Primer Express (Applied Biosystems) и отжигают с комплементарными экзонами GenBank номер доступа #NM_001901.1 (CAGCTCTGACATTCTGATTGCGAA, нт 1667-1689 и TGCCACAAGCTGTCCAGTCT, нт 1723-1742) с образованием ампликона длиной 76 н.п. Амплификация ФРСТ стандартизируют для экспрессии 18S рибосомной РНК с использованием праймеров, сконструированных к гену 18S рРНК (поступление в GenBank #X03205 GTCCCTGCCCTTTGTACACAC, нт 1680-1700 и CGATCCGAGGGCCTCACTA, нт 1730-1749), с помощью которых образуется ампликон длиной 69 н.п. SYBR® Green I химический состав, окрашивающий двухцепочечную ДНК, (Applied Biosystems) используют для амплификации ФРСТ или 18S кДНК. Специфичность ФРСТ и 18S пар праймеров определяют по продукту ПЦР с помощью совмещения последовательностей, анализа в агарозном геле и анализа кривой диссоциации с использованием программного обеспечения ABI Prism® 770 SDS Dissociation Curve (Applied Biosystems). ФРСТ или 18S рРНК реакции состоит из 1X SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), праймера концентрацией 50 нМ и 2,5 нг кДНК в конечном объеме 50 мкл. Термические условия цикла составляют 50°C, 2 мин, 95°C 10 мин с последующими 40 циклами при 95°C, 15 с, 60°C, 1 мин. Определение относительной концентрации РНК проводят с использованием метода построения относительной стандартизационной кривой, как описано в PE Biosystems User Bulletin #2 (<http://docs.appliedbiosystems.com/pebi docs/04303859.pdf>).

Анализ данных проводили с помощью программного обеспечения SDS версия 1.9.1 (Applied Biosystems) и MS Excel (Microsoft). Плазмиду, содержащую целевую последовательность ДНК ФРСТ или 18S, используют для получения стандартизационной кривой. Данные КПЦР представляют как значение $\pm$ СО.

Все составы и/или методы, раскрытые и заявленные, могут быть выполнены и осуществлены без чрезмерного проведения опытов в свете настоящего открытия. Так как композиции и методы данного изобретения были описаны в терминах предпочтительных вариантов, специалистам в данной области очевидно, что вариации могут быть применены к композициям и/или методам и стадиям или последовательностям стадий метода, описанного без отклонения от концепции, духа и идей изобретения. Более конкретно, очевидно, что конкретные агенты, которые родственны химически и структурно могут быть замещены агентами, описанными для достижения подобных результатов. Все подобные замены и модификации очевидны для специалистов в данной области и являются в духе, идее и концепции изобретения, как определено в формуле изобретения.

Ссылки

Следующие ссылки, в степени, обеспечивающей методические или другие детали, дополнительно к приведенным далее, включены в описание в качестве ссылки.

Патенты США

6069006

6358741

Книги

Другие публикации

Bain, J., H. McLauchlan, et al., "The specificities of protein kinase inhibitors: an update" *Biochem J* 371 (Pt 1): 119-204 (2003).

Coghlan, M.P. et al., "Selective small molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 modulate glycogen metabolism and gene transcription" *Chem Biol* 7(10): 793-803 (2000).

Cohen, P. and Frame, S., "The renaissance of GSK3" *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(10): 769-776 (2001).

Davis, S.T. et al., "Prevention of chemotherapy-induced alopecia in rats by CDK inhibitors" *Science* 291(5501): 134-137 (2001).

Hardcastle, I.R. et al., "Designing inhibitors of cyclin-dependent kinases" *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42: 325-348 (2002).

Knockaert, M. et al., "Pharmacological inhibitors of cyclin-dependent kinases"

Trends Pharmacol Sci 23(9): 417-425 (2002).

Kothapalli, D. and Grotendorst, G.R., "CTGF modulates cell cycle progression in cAMP arrested NRK fibroblasts" J Cell Physiol 182(1): 119-126 (2000).

Leost, M. et al., "Paullones are potent inhibitors of glycogen synthase kinase-3beta and cyclin-dependent kinase 5/p25" Eur J Biochem 267(19): 5983-5994 (2000).

Park, S.K., Kim, J., Seomun, Y., Choi, J., Kim, D.H., Han, I.O., Lee, E.H., Chung, S.K., Joo, C.K., "Hydrogen Peroxide is a Novel Inducer of Connective Tissue Growth Factor," Biochem. Biophys. Res. Commun. 284(4): 966-971 (2001).

Schwab, J.M., Postler, E., Nguyen, T.D., Mittelbronn, M., Meyermann, R., Schluesener, H.J., "Connective Tissue Growth Factor is Expressed by a Subset of Reactive Astrocytes in Human Cerebral Infarction," Neuropathol. Appl. Neurobiol. 26(5): 434-440 (2000).

Schwab, J.M., Beschorner, R., Nguyen, T.D., Meyermann, R., Schluesener, H.J., "Differential Cellular Accumulation of Connective Tissue Growth Factor Defines a Subset of Reactive Astrocytes, Invading Fibroblasts, and Endothelial Cells Following Central Nervous System Injury in Rats and Humans," J. Neurotrauma 18(4): 377-388 (2001).

Shepard et al., IOVS 42: 3173 (2001).

Wang et al., Mol. Vis.7: 89-94 (2001).

Willson, T.M. et al., "The PPARs: from orphan receptors to drug discovery" J Med Chem 43(4): 527-550 (2000).

Woodgett, J.R., "Judging a protein by more than its name: GSK-3" Sci STKE 2001(100): RE12 (2001).

Zaharevitz, D.W. et al., "Discovery and initial characterization of the paullones, a novel class of small-molecule inhibitors of cyclin-dependent kinases" Cancer Res 59(11): 2566-2569 (1999).

Формула изобретения

1. Способ снижения внутриглазного давления и обеспечение нейропротекторного действия у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение терапевтически эффективного количества композиции, включающей, по меньшей мере, один ненуклеотидный или небелковый агент, который ингибирует экспрессию фактора роста соединительной ткани (ФРСТ) и фармацевтически приемлемый носитель.

2. Способ по п.1, в котором указанное введение является наружным, внутрикамерным или посредством имплантата.

3. Способ по п.1, в котором общая концентрация указанного ингибитора ФРСТ в указанной композиции составляет от 0,01 до 2%.

4. Способ по п.1, в котором указанный пациент страдает от глаукомы или глазной гипертензии.

5. Способ по п.4, в котором указанная глаукома является глаукомой при нормальном глазном давлении.

6. Способ снижения внутриглазного давления у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение терапевтически эффективного количества композиции, включающей по меньшей мере один ненуклеотидный или небелковый агент, который ингибирует экспрессию фактора роста соединительной ткани (ФРСТ) и фармацевтически приемлемый носитель.

7. Способ по п.6, в котором указанное введение является наружным, внутрикамерным или посредством имплантата.

8. Способ по п.6, в котором общая концентрация указанного ингибитора ФРСТ в указанной композиции составляет от 0,01 до 2%.

9. Способ по п.6, в котором указанный пациент страдает глаукомой или глазной гипертензией.

10. Способ по п.9, в котором указанная глаукома является глаукомой при нормальном глазном давлении.

11. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором ингибитором ФРСТ является SB-216763, альстерпаулон, 9-цианопаулон, кенпаулон, GW-8510, пурваланол А, росковитин, троглитазон, циглитазон или 15(S)HETE.

12. Способ предотвращения потери поля зрения, связанной с первичной
5 открытоугольной глаукомой (ПОУГ), включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, композиции, включающей нуклеотидный или небелковый агент, который ингибирует экспрессию фактора роста соединительной ткани (ФРСТ), так что внутриглазное давление контролируется и обеспечивается защита ганглиозных клеток сетчатки и диска глазного нерва.

10 13. Способ по п.12, в котором ингибитором ФРСТ является SB-216763, альстерпаулон, 9-цианопаулон, кенпаулон, GW-8510, пурваланол А, росковитин, троглитазон, циглитазон или 15(S)HETE.

14. Композиция для снижения внутриглазного давления и обеспечения
нейропротекторного действия у пациента, нуждающегося в этом, включающая, по меньшей
15 мере, один нуклеотидный или небелковый агент, который ингибирует экспрессию фактора роста соединительной ткани (ФРСТ) и фармацевтически приемлемый носитель.

15. Композиция по п.14, в которой общая концентрация указанного ингибитора ФРСТ составляет от 0,01 до 2%.

16. Композиция по любому из пп.14 или 15, в которой ингибитором ФРСТ является SB-
20 216763, альстерпаулон, 9-цианопаулон, кенпаулон, GW-8510, пурваланол А, росковитин, троглитазон, циглитазон или 15(S)HETE.

25

30

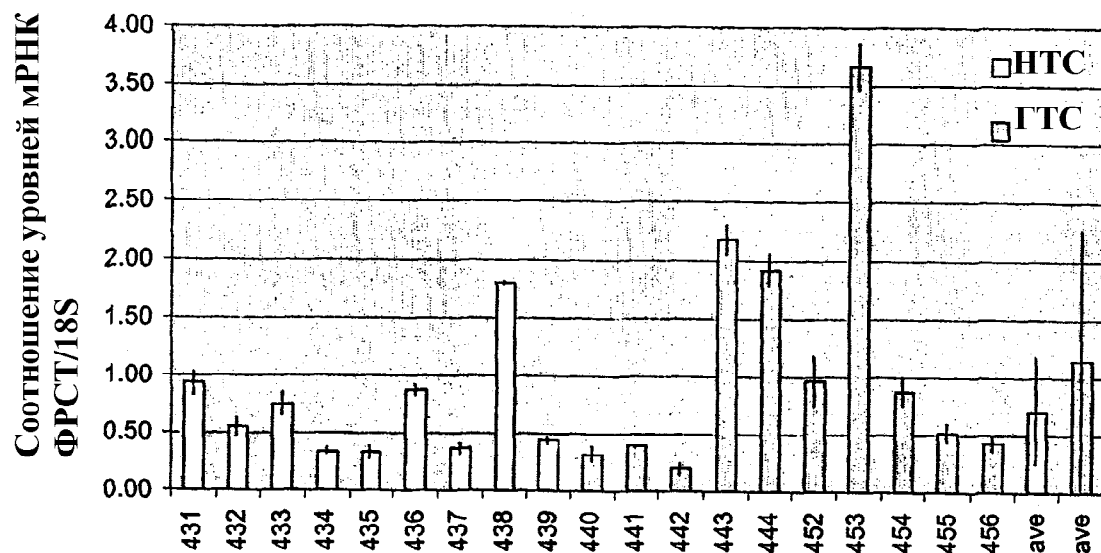
35

40

45

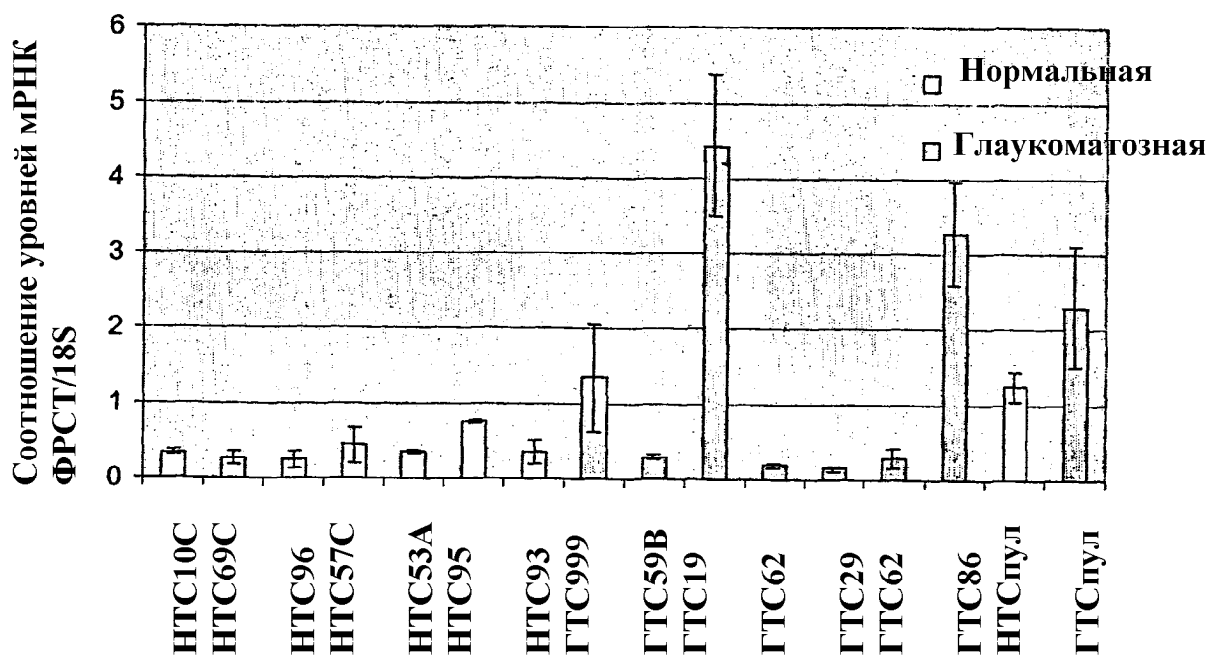
50

КПЦР профиль ФРСТ в НТС/ГТС тканях



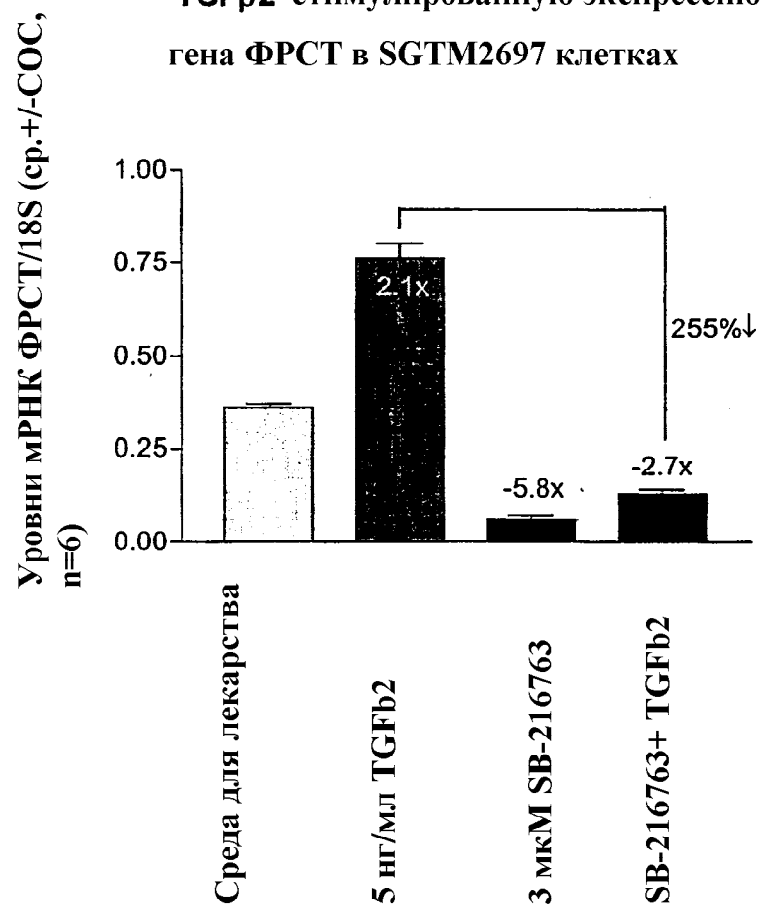
ФИГ.1

КПЦР профиль ФРСТ в клеточных линиях с удаленной кДНК



ФИГ.2

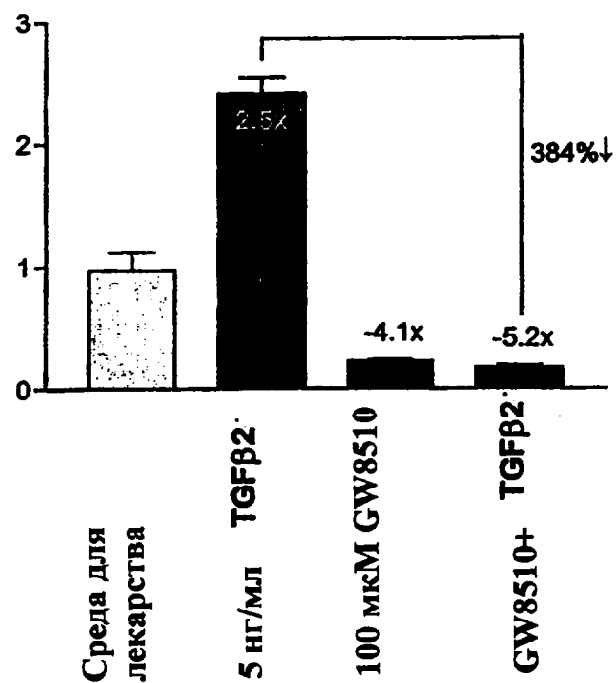
Эффекты на SB-216763 на базальную и
TGF β 2-стимулированную экспрессию
гена ФРСТ в SGTМ2697 клетках



ФИГ.3

**Эффекты на GW-8510 на базальную и
TGF β 2-стимулированную экспрессию
гена ФРСТ в SGTМ2697 клетках**

Уровни мРНК ФРСТ/18S (ср. +/- СОС,
n=6)



ФИГ.4