



УКРАЇНА

(19) UA (11) 88257 (13) C2
(51) МПК (2009)

A61K 31/7008

A61K 31/235 (2009.01)

A61K 31/355 (2009.01)

A61K 38/13 (2009.01)

A61K 38/45 (2009.01)

A61P 5/48 (2009.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ЗАСТОСУВАННЯ ІНГІБІТОРА ПРОТЕЇНКІНАЗИ C- α ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ЗАХВОРЮВАНЬ НИРОК, ЩО ПРИЗВОДЯТЬ ДО ПРОТЕЇНУРІЇ, ТА ДІАБЕТИЧНИХ РЕТИНОПАТІЇ, НЕВРОПАТІЇ АБО НЕФРОПАТІЇ

1

2

(21) a200503856

(22) 23.09.2003

(24) 12.10.2009

(86) PCT/DE2003/003165, 23.09.2003

(31) 102 44 453.6

(32) 24.09.2002

(33) DE

(46) 12.10.2009, Бюл.№ 19, 2009 р.

(72) МЕННЕ ЯН, DE, ХАЛПЕР ГЕРМАНН, DE

(73) ФЕНОС ГМБХ, DE

(56) US 6 063 814 A, 16.05.2000

US 5 674 902 A, 07.10.1997

DE 197 40 384 A1, 11.03.1999

MENNE J ET AL: "Protein kinase C alpha deficiency ameliorates the development of diabetic nephropathy in mice with streptozotocin-induced hyperglycemia" KIDNEY AND BLOOD PRESSURE RESEARCH, Bd. 24, Nr. 4-6, 2001, Seite 231

MENNE JAN ET AL: "Protein kinase C alpha deficiency ameliorates the development of diabetic nephropathy in mice with streptozotocin-induced hyperglycemia" JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF NEPHROLOGY, Bd. 12, Nr. Program and Abstract Issue, September 2001 (2001-09), Seite 151A

MEIER MATTHIAS ET AL: "Knockout of protein kinase C alpha protects against the development of albuminuria but not renal hypertrophy." DIABETES, Bd. 52, Nr. Supplement 1, 2003, Seite A50, XP008029526 63rd Scientific Sessions of the American Diabetes Association; New Orleans, LA, USA; June 13-17

DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 23. Oktober 2001 (2001-10-23), VENUGOPAL SENTHIL KUMAR ET AL: "alpha-Tocopherol inhibits hyperglycemia-induced superoxide anion release from human monocytes via inhibition of PKC-alpha" DATABASE MEDLINE [Online] US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM), BETHESDA, MD, US; September 1997 (1997-09), HEMPEL A ET AL:

"High glucose concentrations increase endothelial cell permeability via activation of protein kinase C alpha." XP002292426 Database accession no. NLM9285638 & CIRCULATION RESEARCH. SEP 1997, Bd. 81, Nr. 3, September 1997 (1997-09), Seiten 363-371

(57) 1. Застосування агентів, що інгібують активність протеїнкінази C- α (ПКC- α) для одержання фармацевтичної композиції для лікування і/або профілактики захворювань нирок, що призводять до протеїнурії, діабетичної ретинопатії, діабетичної невропатії і діабетичної нефропатії.

2. Застосування за п. 1, при якому захворюванням нирок, що призводять до протеїнурії, є паренхіматозні захворювання нирок, причому протеїнурією є гломерулярна протеїнурія, тубулярна протеїнурія або гломерулярно-тубулярна змішана протеїнурія, захворюваннями нирок є нефропатія з мінімальними змінами, інші гломерулопатії, амлоїдоз нирок, спадкова тубулопатія, ренально-тубулярний ацидоз, медикаментозно або бактеріально індукований інтерстиціальний нефрит, гостра ниркова недостатність, нефропатія Bence-Jones або трансплантація нирок.

3. Застосування за п. 2, при якому агентом, що інгібує активність протеїнкінази C- α , є антитіло, що реагує з протеїнкіназою C- α , зокрема моноклональне або поліклональне антитіло, таке як гуманізоване антитіло.

4. Застосування за будь-яким з пп. 1-3, при якому агентом, що інгібує активність протеїнкінази C- α , є агент, який одночасно інгібує активність протеїнкіназою C- β .

5. Застосування за будь-яким з пп. 1-4, при якому використовують агент, який специфічно інгібує активність протеїнкінази C- α , у поєднанні з агентом, який специфічно інгібує активність протеїнкінази C- β .

6. Застосування за п. 5, при якому інгібітором є антитіло, що реагує з протеїнкіназою C- β , зокрема антитілом є моноклональне або поліклональне антитіло, переважно, гуманізоване антитіло.

(13) C2

(11) 88257

(19) UA

7. Застосування за п. 6, при якому інгібітор змінює

статус фосфорилування протеїнкінази C- β .

Даний винахід стосується застосування агентів, які зменшують або інгібують експресію і/або активність протеїнкінази C- α (PKC- α), для лікування і/або профілактики коронарної хвороби серця, інфаркту серця, периферичного облітеруючого захворювання, інсульту, асоційованих з протейнурією хвороб нирок, діабетичних пізніх пошкоджень і/або серцево-судинних ускладнень у хворих на цукровий діабет, серцево-судинних ускладнень у хворих з гіпертонією і серцево-судинних ускладнень у хворих з гіперхолестеринемією.

Цукровий діабет є одним з найчастіших захворювань у західному світі, яке зачіпає приблизно 5% населення. Цукровий діабет поділяють на діабет типу I, який виникає, як правило, вже в молодості, і діабет типу II, що називається також старечим цукровим діабетом. Внаслідок порушення метаболізму глюкози у випадку обох форм діабету приходять до тривало підвищених рівнів глюкози в крові, що у відповідних хворих через декілька років призводить до різних ускладнень. Найчастішими і одночасно частіше за все небезпечними ускладненнями є діабетична ретинопатія, яка призводить до втрати зору, діабетична невропатія, яка може привести до ампутації стоп або нижніх кінцівок, і діабетична нефропатія.

Діабетична нефропатія розвивається у приблизно 40% всіх хворих на діабет і у всьому світі є найбільш частою причиною хронічної ниркової недостатності та лікування діалізом. Приблизно від 30% до 40% всіх хворих, що піддаються діалізу, мають діабетичну нефропатію. Оскільки пошкодження нирок за рахунок діабету розвивається тільки повільно, велике клінічне значення має вже рання ідентифікація хворих, що мають підвищений ризик щодо розвитку ниркової недостатності, для того щоб застосовувати придатні терапевтичні заходи. Однією з перших клінічних ознак пошкодження нирок, що починається, є поява так званої мікроальбумінурії. При цьому відбувається виділення 2-1-300мг альбуміну у збірній за 24 години сечі. В нормальному випадку виділяється менш ніж 30мг альбуміну за добу. Мікроальбумінурія виникає в сучасних терапевтичних умовах приблизно у 25% діабетиків з діабетом типу I або типу II (Alzaid, *Diabetes Care*, **19**, 79089 (1996); Klein та ін., *Diabetes Care*, **22**, 743-751 (1999); Valmadrid та ін., *Arch. Intern. Med.*, **160**, 1093-1100 (2000)). Ризик ниркової недостатності, що розвивається, у хворих з мікроальбумінурією приблизно у 10 разів вище, ніж у пацієнтів з нормальним виділенням альбуміну. Діабетична нефропатія, яка характеризується протейнурією більш ніж 300мг/добу і/або обмеженою функцією нирок, розвивається у приблизно 5-10% всіх хворих на діабет і мікроальбумінурію на рік. Також значно підвищений ризик діабетичної ретинопатії, що розвивається, у діабетиків з мікроальбумінурією у порівнянні з діабетиками без мік-

роальбумінурії (Vigstrup і Mogensen, *Acta Ophthalmol. (Copenh.)*, **63**, 530-534 (1985)).

Як показали тривалі дослідження, що інтенсивно проводилися більш ніж протягом десяти років, смертність від серцево-судинних захворювань у діабетиків з діабетом типу I і типу II вже у стадії мікроальбумінурії підвищена приблизно у два рази порівняно з діабетиками без мікроальбумінурії, також згідно з регулюванням звичайних факторів ризику, таких як холестерин і гіпертонія (Rossing та ін., *Bmj*, **313**, 779-784 (1996); Gerstein та ін., *Diabetes Care*, **23**, Suppl. 2, B35-39 (2000); Valmadrid та ін. (2000)). На підвищену смертність від серцево-судинних захворювань слід вказати також у випадку хворих з мікроальбумінурією без цукрового діабету (Gerstein та ін., *Jama*, **286**, 421-426 (2001)).

Існують різні гіпотези, чому мікроальбумінурія являє собою надзвичайно важливий маркер стосовно виникнення ускладнень у хворих на діабет. Згідно з так званою "стіно-гіпотезою" (Deckert, Feldt-Rasmussen та ін., *Diabetologia*, **32**, 219-226 (1989)), втрата негативно заряджених, отже, аніонних, молекул у позаклітинній матриці відповідальна за виникнення альбумінурії, діабетичної ретинопатії і серцево-судинних ускладнень, як, наприклад, коронарна хвороба серця. Ця гіпотеза обґрунтовується даними, встановленими як у випадку людини, так і тваринних модельних систем, і останніми роками підтверджена результатами інших робочих груп.

В нирках сеча віджимається у ниркових тільцях, так званих клубочках. Для запобігання проходженню протейнів, наприклад, альбуміну, кров від сечі відділена мембраною, що називається базальною мембраною. Базальна мембрана має маленькі пори, які дозволяють проникати більш маленьким молекулам крізь базальну мембрану, тоді як протейнові молекули на підставі їх розміру не можуть проходити крізь мембрану. У хворих на мікроальбумінурію все-таки відбувається проникнення протейнів маленького розміру, таких як альбумін, хоча поки розмір пор не збільшується. Як пояснення цього явища можна вказати на те, що в порах, відповідно, на краю пор, є молекули з негативним зарядом, які відштовхують також негативно заряджені протейни (Kverneland, Feldt-Rasmussen та ін., *Diabetologia*, **29**, 634-639 (1986); Deckert, Feldt-Rasmussen та ін., *Ridney Int.*, **33**, 100-106 (1988); Kverneland, Welinder та ін., *Diabetologia*, **31**, 708-710 (1988)). У випадку цих молекул з негативними зарядами йдеться про протеоглікани. Протеоглікани являють собою комплексні макромолекули, які складаються з протейнів, з якими ковалентно зв'язані полісахаридні ланцюги. Полісахаридні ланцюги переважно складаються з гепарансульфату і дуже негативно заряджені. Протеогліканом, що найчастіше зустрічається в організмі, є перлекан. Перлекан являє собою про-

теїн масою 460кДа і має декілька полісахаридних бокових ланцюгів (Murdoch i Iozzo, *Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol.*, **423**, 237-242 (1993); Iozzo, Cohen та ін., *Biochem. J.*, **302**, 625-639 (1994); Murdoch, Liu та ін., *J. Histochem. Cytochem.*, **42**, 239-249 (1994)). У хворих на діабет та мікроальбумінурію гепарансульфат практично відсутній у гломерулярній базальній мембрані. Також у хворих з прогресуючою діабетичною нефропатією гепарансульфат більше неможливо виявити у базальній мембрані, хоча протеїнові ланцюги ще наявні. Цей ефект пояснюється зменшенням синтезом гепарансульфату в гіперглікемічних умовах, які є у діабетиків (Parthasarathy i Spiro, *Diabetes*, **31**, 738-741 (1982); Feldt-Rasmussen та ін. (1988); Nakamura i Myers, *Diabetes*, **37**, 1202-1211 (1988); Nerlich i Schleicher, *Am. J. Pathol.*, **139**, 889-899 (1991); Iceda та ін., *Nephron*, **61**, 415-421 (1992); Scandling i Myers, *Kidney Int.*, **41**, 840-846 (1992); Vernier, Steffes та ін., *Kidney Int.*, **41**, 1070-1080 (1992); Tamsma, van den Born та ін., *Diabetologia*, **37**, 313-320 (1994); Iozzo i San Antoniom, *J. Clin. Invest.*, **108**, 349-355 (2001)). Далі, показано, що гепарансульфат-протеоглікани не тільки запобігають гломерулярній фільтрації альбуміну за рахунок негативного заряду, але й, імовірно, також спільно відповідальні за цілісність розміру пор всередині базальної мембрани (Deckert, Kofoed-Enevoldsen та ін., *Diabetologia*, **36**, 244-251 (1993)). Таким чином, втрата гепарансульфат-протеогліканів з прогресуванням ниркової недостатності призводить до руйнування мікроструктури базальної мембрани. Ці зміни можуть пояснювати, чому при перебігу діабетичної нефропатії приходять до більшої, неселективної протеїнурії з втратою більш крупних протеїнів, таких як імуноглобулін. Гепарансульфат-протеоглікани також є сильними інгібіторами мезангіальної експансії у ниркових тільцях. Це становить великий інтерес, оскільки у хворих на діабет звичайно відбувається стовщення мезангіальної сполучної тканини. Тому не є несподіваним, що втрату гепарансульфат-протеогліканів у хворих на діабет вважають важливою причиною мезангіальної експансії.

Втрата гепарансульфату у діабетиків відбувається, проте, не тільки у нирках, але й майже у всіх інших органах. Так, виразне зменшення кількості гепарансульфату відбувається у випадку сполучної тканини сітківки, скелетного м'яза, стінок артерій і шкіри, а також в еритроцитах. Ендотеліальні клітини також виявляють зменшений синтез гепарансульфату (Yokoyama, Hoyer та ін., *Diabetes*, **46**, 1875-1880 (1997); van der Pijl, Daha та ін., *Diabetologia*, **41**, 791-798 (1998)). Оскільки гепарансульфат-протеоглікани мають важливі антитромботичні властивості, втрата гепарансульфат-протеогліканів може сприяти утворенню мікротромбів, наприклад, у судинах сітківки, і, таким чином, сприяти виникненню діабетичної ретинопатії (Marcum, Fritze та ін., *Am. J. Physiol.*, **245**, H275-33 (1983); Marcum, Me Kempney та ін., *J. Clin. Invest.*, **74**, 341-350 (1984); Marcum i Rosenberg, *Biochemistry*, **23**, 1730-1737 (1984); Marcum, Atha та ін., *J. Biol. Chem.*, **261**, 7507-7517 (1986)). Інші важливі антиатеросклерозні функції гепарансульфат-

протеогліканів (HSHG) полягають у тому, що HSPG інгібують проліферацію гладком'язових клітин судин, за рахунок чого відбувається виникнення пошкоджень артеріальних судин. HSPG, далі, інгібують утворення моноцитів (запальних клітин) у суб-ендотеліальній сполучній тканині. HSPG також інгібують суб-ендотеліальне зв'язування і відкладення ліпопротеїну- α і окиснених LDL, які відіграють вирішальну роль у виникненні артеріосклерозу. HSPG також є важливими регуляторами при ангіогенезі, тобто при утворенні нових судин у пошкоджених ділянках організму (Rosenberg, Shworak та ін., *J. Clin. Invest.*, **100**, 67-75 (1997); Pillarisetti, Trens Cardiovasc. Med., **10**, 60-65 (2000); Iozzo San Antonio (2001)). Втрата гепарансульфат-протеоглікану тому має значення не тільки у випадку виникнення діабетичної нефропатії і діабетичної ретинопатії, але й також при виникненні серцево-судинних ускладнень.

Одним важливим аспектом є те, що у хворих з гіпертонією виникає мікроальбумінурія. До цього часу це явище пояснювали підвищеним тиском у ниркових тільцях, причому припускали, що альбумін "віджимается" у підвищеному ступені. Однак якщо це відповідає дійсності, то треба виходити з того, що хворі з високим артеріальним кров'яним тиском, який залишається незмінним, також мають високий ризик серцево-судинних захворювань, незалежно від того, чи є у них мікроальбумінурія. Це, проте, не відповідає дійсності, як змогли виявити при різних перспективних дослідженнях. Страждаючі на гіпертензію хворі з мікроальбумінурією мають приблизно у два рази більш високу смертність від серцево-судинних захворювань, ніж так само страждаючі на гіпертензію хворі з іншим порівняним профілем ризику, як, наприклад, гіперхолестеринемія, анамнез як наслідок паління і діабет (Sleight, J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst., **1**, 18-20 (2000); Crippa, J. Hum. Hypertens., **16** (доповнення 1), 74-77 (2002); Diercks, van Boven та ін., *Can. J. Cardiol.*, **18**, 525-535 (2002)). Відповідно до цього мікроальбумінурія є незалежним параметром ризику для виникнення та прогнозу серцево-судинних захворювань. Це може пояснюватися тільки тим, що у хворих з мікроальбумінурією відбувається зміна у всій судинній системі. Проте досі незрозуміло, яке порушення у хворих з гіпертонією лежить в основі мікроальбумінурії.

Технічна проблема, що покладена в основу даного винаходу, полягає в одержанні засобів, які можна використовувати для лікування мікроальбумінурії, особливо у хворих на цукровий діабет та хворих з гіпертонією, з метою лікування асоційованих з діабетом пізніх пошкоджень, особливо діабетичної ретинопатії, діабетичної нефропатії і діабетичної невропатії, і серцево-судинних ускладнень, а також асоційованих з гіпертонією серцево-судинних ускладнень, і/або їх запобігання.

Згідно з даним винаходом, технічна проблема, що лежить в його основі, вирішується за рахунок застосування агентів для лікування і/або профілактики захворювань судин, серцево-судинних захворювань, асоційованих з протеїнурією захворювань нирок, діабетичних пізніх пошкоджень і/або серцево-судинних ускладнень у хворих на цукро-

вий діабет, серцево-судинних ускладнень у хворих з ретинопатією і/або серцево-судинних ускладнень у хворих з гіперхолестеринемією, які зменшують або запобігають експресії і/або активності протеїнкінази C- α (PKC- α).

У рівні техніки до цього часу припускалося, що β -ізоформа протеїнкінази C відповідальна за виникнення діабетичних ускладнень. β -Ізоформа, поперше, у підвищеному ступені продукується в тканині хворих на діабет тварин (Inoguchi та ін., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 11059-11063 (1992)) і, по-друге, специфічний до протеїнкінази C- β інгібітор LY333531 у випадку гризунів з діабетом типу I і діабетом типу II призводить до меншої протеїнурії, як ознаки зменшеного пошкодження нирок (Ishii та ін., *J. Mol. Med.*, **76**, 21-31 (1998); Коуа та ін., *Faseb J.*, **14**, 439-447 (2000)).

Створені згідно з винаходом, позбавлені протеїнкінази C- α миші, які не можуть виробляти протеїнкінази C- α , після провокування діабету за допомогою стрептозотоцину несподівано не виявляють жодної альбумінурії. Навпаки, контрольні тварини, які до самої зміни експресії протеїнкінази C- α генетично були у значній мірі ідентичні, виявляють виразну альбумінурію. Подальше дослідження позбавлених протеїнкінази C- α тварин, згідно з винаходом, абсолютно несподівано засвідчило, що тварини в умовах діабету були здатні виробляти гепарансульфат в нормальній концентрації. Навпаки, контрольні тварини в умовах діабету ледве ще могли продукувати гепарансульфат.

Здійснювані згідно з винаходом гістологічні дослідження засвідчили подальші значні зміни у позбавлених протеїнкінази C- α мишей. При використанні імуногістохімічних способів, згідно з винаходом, виявлено, що відсутність протеїнкінази C- α спричинює подальші вагомні відмінності в експресії васкулярного ендотеліального фактора зростання (VEGF) і рецептора (VEGF-R11), що належить до нього. Тоді як у випадку контрольних тварин з діабетом можна виявляти значне збільшення експресованих кількостей VEGF і рецептора VEGF-R11, у позбавлених протеїнкінази C- α тварин встановлено виразно менше збільшення експресованих кількостей VEGF і рецептора VEGF-R11. Цей результат має величезне значення остільки, оскільки підвищена експресія VEGF розглядається як один з найважливіших медіаторів щодо виникнення діабетичної ретинопатії (Aiello і Wong, *Kidney Int. Suppl.*, **77**, 113-119 (2000); Benjamin, *Am. J. Pathol.*, **158**, 1181-1184 (2001)).

Із результатів, згідно з винаходом, випливає, що протеїнкіназа C- α відіграє центральну роль в регуляції утворення гепарансульфат-протеоглікану і у випадку прояву протеїнурії. Одержані згідно з винаходом результати також засвідчують, що протеїнкіназа C- α у випадку прояву протеїнурії відіграє значно більш важливу роль, ніж протеїнкіназа C- β , причому, проте, протеїнкіназа C- β , напевне, здатна брати на себе щонайменше частину функцій протеїнкінази C- α . Одержані згідно з винаходом результати засвідчують далі, що інгібування α -ізоформи протеїнкінази C приводить як до цілеспрямованого захисту від розвитку діабетичних

пізніх ускладнень, таких як діабетична нефропатія, діабетична ретинопатія і/або серцево-судинні ускладнення, так і до цілеспрямованого захисту від розвитку захворювань, які асоціюються з протеїнурією.

Згідно з винаходом, отже, передбачається застосування агентів для лікування і/або профілактики захворювань судин, серцево-судинних захворювань, асоційованих з протеїнурією хвороб нирок, діабетичних пізніх пошкоджень і/або серцево-судинних ускладнень у хворих на цукровий діабет, серцево-судинних ускладнень у хворих з гіпертонією і/або серцево-судинних ускладнень у хворих з гіперхолестеринемією, які зменшують або інгібують експресію і/або активність протеїнкінази C- α (PKC- α).

Згідно з даним винаходом, під терміном "хвороби" або "захворювання" розуміють порушення життєвих процесів в органах або у всьому організмі з наслідком фізичних, психічних, відповідно, розумових змін, що суб'єктивно відчуються, відповідно, об'єктивно встановлюються. Під терміном "ускладнення" або "пізні пошкодження" розуміють захворювання як наслідок певної причини або вторинні захворювання, тобто друге захворювання, що приєднується до первинної картини хвороби.

Згідно з винаходом, у випадку захворювань, які потрібно лікувати, йдеться особливо про захворювання судин, серцево-судинні захворювання, асоційовані з протеїнурією хвороби нирок, про асоційовані чи ні з цукровим діабетом пізні пошкодження і/або серцево-судинні ускладнення, асоційовані чи ні з гіпертонією серцево-судинні ускладнення і/або асоційовані чи ні з гіперхолестеринемією серцево-судинні ускладнення.

Згідно з даним винаходом, під терміном "захворювання судин" або "ангіопатії" розуміють зокрема захворювання артерій, які призводять до функціональних або органічних порушень кровотоку. Згідно з переважним варіантом здійснення винаходу, захворювання судин являє собою периферичне артеріальне облітеруюче захворювання. Під терміном "артеріальне облітеруюче захворювання" розуміють захворювання, яке провокується стенозуючими, відповідно, облітеруючими змінами в артеріях і призводить до порушень кровотоку з ішемією в залежних від постачання кров'ю тканинах або органах. У випадку цукрового діабету особливо приходять до хронічних облітеруючих захворювань, які провокуються, зокрема, облітеруючим артеріосклерозом, а також ангіопатіями і ангіоневропатіями.

Під терміном "серцево-судинні захворювання" розуміють захворювання і порушення, які зачіпають функцію серця і циркуляцію, як, наприклад, стан наповнення і тону судинної системи, потужність викиду серця, нервові і гуморальні механізми зв'язування між серцем і циркуляцією тощо. Згідно з переважним варіантом винаходу, у випадку серцево-судинних захворювань йдеться про коронарну хворобу серця, інфаркт серця і інсульт.

Під терміном "коронарна хвороба серця" розуміють клінічний прояв первинної коронарної недостатності, причому за рахунок звуження або

закупорення вінцевих судин серця відбувається зменшення кровотоку і тим самим зменшення підведення субстратів та кисню, що постачають енергію, до серцевого м'яза.

Під терміном "інфаркт серця" розуміють некроз описаної ділянки серцевого м'яза, який частіше за все безпосередньо виникає як ускладнення при хронічній коронарній хворобі серця. Причиною інфаркту серця є тривале критичне недостатнє кровопостачання при коронарній недостатності і спазми, що продовжуються тривалий час, коронарних судин, особливо в ділянці попереднього ексцентричного стенозу коронарних судин серця. Інфаркт серця часто виникає при фізичному чи психічному навантаженні внаслідок підвищення потреби у кисні серцевого м'яза або при безпосередньому перериванні кровопостачання.

Під терміном "інсульт" або "апоплексія" розуміють ішемічний інфаркт головного мозку внаслідок артеріального порушення кровотоку головного мозку. Інсульт провокується емболіями, які походять від артерioskлеротичних змін, позачерепних судин або від серця, рідше внаслідок стенозу чи церебральних мікроангіопатій.

Згідно з даним винаходом, під виразом "асоційовані з протеїнурією захворювання нирок" розуміють особливо паренхіматозні захворювання нирок, які характеризуються наявністю протеїнів в сечі. У випадку протеїнурії може йтися про гломерулярну протеїнурію, тубулярну протеїнурію або гломерулярно-тубулярну змішану протеїнурію. Виключно ренальне виділення альбуміну та трансферину характеризує селективну протеїнурію, яка виникає, наприклад, при нефропатії з мінімальними змінами. У випадку неселективної протеїнурії в сечі також виявляють імуноглобулін G (IgG). Цю форму протеїнурії можна виявити, наприклад, при амілоїдозі нирок, проте, також у прогресуючій стадії діабетичної нефропатії. В основі тубулярної протеїнурії лежать туболоінтерстиціальні захворювання, які зачіпають реабсорбційні процеси, наслідком чого є екскреція низькомолекулярних протеїнів. Клінічно тубулярна протеїнемія є значною особливо тоді, коли вона асоційована з іншими дефектами проксимального каналця. Тубулярні протеїнурії зустрічаються, зокрема, у випадку таких захворювань, як спадкова тубулопатія, ренально-тубулярний ацидоз, бактеріально або медикаментозно індукований інтерстиціальний нефрит, гостра ниркова недостатність, отруєння важкими металами, нефропатія Bence-Jones та у післяопераційній фазі після трансплантації нирок. В основі гломерулярно-тубулярної змішаної протеїнурії часто лежать первинні гломерулярні захворювання з вираженими вторинними інтерстиціальними змінами.

Згідно з переважним варіантом винаходу, тому у випадку асоційованих з протеїнурією захворювань нирок йдеться особливо про нефропатію з мінімальними змінами, інші гломерулопатії, амілоїдозу нирок, спадкову тубулопатію, ренально-тубулярний ацидоз, медикаментозно або бактеріально індуковану інтерстиціальну нефропатію, гостру ниркову недостатність, нефропатію Bence-

Jones і післяопераційну фазу трансплантації нирок.

Згідно з даним винаходом, під терміном "цукровий діабет" розуміють різні форми порушення метаболізму глюкози з різною етіологією і симптоматикою. Загальною характерною ознакою є відносний або абсолютний дефіцит інсуліну. Захворювання на цукровий діабет характеризуються довготривалим підвищенням рівня глюкози в крові (гіперглікемія) або неадекватним у часі використанням глюкози, що вводиться. Цукровий діабет поділяють на тип I (IDDM) і тип II (NIDDM).

Специфічними для діабету і асоційованими з діабетом хронічними ускладненнями є мікроангіопатія, така як ретинопатія, нефропатія і невропатія, поліневропатія, "діабетична стопа", порушення скелетної, опорної і сполучної тканини, а також макроангіопатія, особливо коронарна хвороба серця, церебральне порушення кровотоку і периферичне артеріальне облітеруюче захворювання.

Під терміном "діабетична ретинопатія" розуміють виникаючу при цукровому діабеті мікроангіопатію очного дна. Формами діабетичної ретинопатії є непроліферативна ретинопатія (ретинопатія очного дна), як крововиливи у сітківку, мікроаневризми, нерівні ексудати, набряк сітківки з втратою гостроти зору, а також проліферативна ретинопатія, причому відбувається додаткове виникнення "ватних" осередків і неоваскуляризації судин у та до сітківки з крововиливами у склоподібне тіло внаслідок ішемії сітківки за рахунок закупорення судин. Проліферативна ретинопатія може призводити до тракційного відшарування сітківки, неоваскулярної глаукоми і втрати зору.

Згідно з даним винаходом, під терміном "діабетична нефропатія", яку називають також як діабетичний гломерулосклероз, розуміють пошкодження гломерулярних ниркових капілярів. Діабетична нефропатія клінічно виражається у протеїнурії, гіпертонії, набряках, дифузному розширенні базальної мембрани, збільшенні мезангія і більш пізніх вузликподібних ущільненнях у клубочкових петлях із звуженням просвіту судини, а також у фібриноїдних відкладеннях на стінці капіляра та мікроаневризмах.

Згідно з даним винаходом, під терміном "діабетична невропатія" розуміють захворювання периферичних нервів. При цьому особливо йдеться про симетричну дистальну чутливо-рухову поліневропатію і автономну невропатію. Периферична поліневропатія звичайно проявляється у нижніх кінцівках, починаючись із стоп, і просувається проксимально далі та нерідко також зачіпає верхні кінцівки. Симптоматологія значно змінюється, причому недуги, такі як болі, відчуття глухоти і парестезія, часто призводять до екзацерації.

Під серцево-судинними ускладненнями при діабеті розуміють, згідно з винаходом, серцево-судинні захворювання та захворювання судин, особливо периферичне облітеруюче захворювання, коронарну хворобу серця, інфаркт серця і інсульт, які виникають внаслідок цукрового діабету.

Згідно з даним винаходом, під терміном "гіпертонія" розуміють високий кров'яний тиск або гіпертонічну хворобу, який/яка характеризується довго-

тривалим підвищенням кров'яного тиску до значень систолічного більш ніж 140 мм рт.ст., і діастолічного більш ніж 90 мм рт.ст. Під виразом "асоційовані з гіпертонією серцево-судинні ускладнення" розуміють, згідно з винаходом, серцево-судинні захворювання та захворювання судин, особливо периферичне облітеруюче захворювання, коронарну хворобу серця, інфаркт серця і інсульт, які виникають внаслідок гіпертонії.

Згідно з даним винаходом, під терміном "гіперхолестеринемія" розуміють підвищену концентрацію холестерину в крові, причому внаслідок діабету може виникати первинна або вторинна гіперхолестеринемія. Гіперхолестеринемія являє собою фактор ризику щодо артерioskлерозу. Під виразом "асоційовані з гіперхолестеринемією серцево-судинні ускладнення" розуміють, згідно з винаходом, серцево-судинні захворювання та захворювання судин, особливо периферичне облітеруюче захворювання, коронарну хворобу серця, інфаркт серця і інсульт, які виникають внаслідок гіперхолестеринемії.

Згідно з даним винаходом, під терміном "протеїнкіназа С" або "PKC" розуміють сімейство протеїнів, яке відіграє істотну роль в трансдукції, причому протеїни PKC виконують внутріклітинні регуляторні функції шляхом фосфорилювання субстратів, таких як ферменти, фактори транскрипції і/або цитоскелетні протеїни. Активація протеїнів PKC приводить, наприклад, до активації інших протеїнкіназ, включаючи мітогенактивовану протеїнкіназу (MAPK), які, таким чином, є субстратом протеїнів PKC. Протеїни протеїнкінази С являють собою основні рецептори складних ефірів форболу. Сімейство протеїнів протеїнкінази С в клітинах ссавців включає щонайменше дванадцять ізоформ, які поділяють на три різні підсімейства. Так звані звичайні (традиційні) ізоформи протеїнкінази С (сPKC) включають ізоформи PKC- α , PKC- β і сплайсинговий варіант β II, а також PKC- γ . Так звані нові ізоформи протеїнкінази (нPKC) включають ізоформи PKC-дельта, PKC-епсилон, PKC-ета і PKC-тета. Так звані атипіві ізоформи протеїнкінази С (аPKC) включають ізоформи PKC-дзета і PKC-лямбда (також відома як PKC-йота). Наступними ізоформами є PKC-мю (також позначають як протеїнкіназа D), а також споріднені PKC кінази (PRK), які являють собою можливо власні підсімейства (Toker, *Frontiers in Biosciences*, 2, d1134-1147 (1998)). Ізоформи PKC розрізняються як своїми амінокислотними послідовностями, так і також кодуєчими амінокислотні послідовності нуклеотидними послідовностями (Coussens та ін., *Sciences*, 233, 859-866 (1986)). Протеїни PKC усі в цілому мають доменову структуру. Також розрізняються їхні клітинні типи експресії, механізми їх активації та їхня специфічність до субстрату.

Більшість ізоформ протеїнкінази С перед активацією не зв'язана з мембраною і дифузно розподілена у цитоплазмі. Активізація активності кожної ізоформи за рахунок обробки клітин похідним форболу 12-О-тетрадеканойлфорбол-13-ацетатом призводить до ізоферментспецифічних змін клітинної морфології, а також до швидкого селективного перерозподілу різних ізоферментів PKC у

різних субклітинних структурах. α -Ізоформа протеїнкінази С концентрується особливо в ендоплазматичному ретикулумі та на краю клітини, тоді як β II-ізоформа PKC концентрується у збагачених актином мікрофіламентах цитоскелета. Специфічність до субстрату ізоформ PKC щонайменше частково опосередковується субклітинним розподілом активованих ізоферментів протеїнкінази С.

Під терміном "протеїнкіназа С- α " розуміють протеїн, який активується іонами кальцію і діацилгліцерином, причому активована протеїнкіназа С- α концентрується особливо в ендоплазматичному ретикулумі та біля краю клітини. Амінокислотна послідовність PKC- α і кодуєча PKC- α нуклеотидна послідовність описані Coussens та ін., *Sciences*, 233, 859-866 (1986). Протеїн PKC- α має подібну доменову структуру, як і решта протеїнів сPKC. Протеїн включає псевдосубстратний домен, збагачену цистеїном ділянку, кальційзв'язувальний домен і каталітичний домен. PKC- α може активуватися діацилгліцерином, складним ефіром форболу, фосфатидилсерином і кальцієм.

Згідно з даним винаходом, під виразом "агенти, які зменшують або інгібують експресію протеїнкінази С- α " слід розуміти такі засоби, які, як в умовах *in vitro*, так і в умовах *in vivo*, повністю запобігають або принаймні зменшують синтез функціональноздатного протеїну PKC- α , причому інгібуються або зменшуються транскрипція кодуєчої PKC- α послідовності ДНК у комплементарній послідовності мРНК, процесинг мРНК, трансляція мРНК у поліпептидному ланцюзі, процесинг поліпептиду і/або посттрансляційні модифікації поліпептиду. Застосування агентів, які зменшують або інгібують експресію протеїнкінази С- α , отже, може призводити до того, що або взагалі не продукується жодний функціональноздатний, наприклад, активований, протеїн PKC- α , або, проте, зменшується кількість продукованого функціональноздатного, наприклад, активованого, протеїну PKC- α . Застосування агентів, які зменшують або інгібують експресію протеїнкінази С- α , проте, також може призводити до того, що продукується функціональнонездатний, наприклад, неактивований, протеїн PKC- α або тільки частково функціональноздатний протеїн PKC- α .

Згідно з даним винаходом, під виразом "агенти, які зменшують або інгібують активність протеїнкінази С- α " розуміють такі засоби, які, як в умовах *in vitro*, так й в умовах *in vivo*, можуть повністю або частково еліминувати біологічну активність функціональноздатного протеїну PKC- α . Повну або часткову інактивацію протеїну PKC- α можна здійснювати, наприклад, тим, що використуваного агента прямо вводять у взаємодію з протеїном PKC- α . Пряма взаємодія між агентом і протеїном PKC- α може здійснюватися, наприклад, за рахунок ковалентного або нековалентного зв'язування. За рахунок взаємодії між агентом і протеїном PKC- α можуть відбуватися також, наприклад, хімічні зміни протеїнкінази, які призводять до втрати біологічної активності протеїнкінази. Взаємодія може також приводити, наприклад, до специфічної деструкції PKC- α . Агенти, які зменшують або інгібують актив-

ність протеїнкінази C- α , проте, можуть являти собою також такі, які модифікують або елімінують чи зв'язують специфічні субстрати, структури-мішені або молекули-мішені РКС- α так, що таким чином зменшують або повністю "паралізують" біологічну активність протеїну РКС- α . Агенти, які зменшують або інгібують активність протеїнкінази C- α , можуть являти собою також такі, які запобігають транслокації РКС- α після активації, наприклад, за рахунок обробки форболом, в ендоплазматичний ретикулум або до краю клітини, так що РКС- α не може вступати у взаємодію з специфічними до неї субстратами, структурами-мішенями або молекулами-мішенями.

Згідно з особливо переважним варіантом здійснення винаходу, у випадку використовуваних згідно з винаходом агентів йдеться про агентів, які специфічно зменшують або інгібують експресію і/або активність РКС- α , але, проте, не експресію і/або активність інших ізоформ РКС, наприклад, РКС- β .

Згідно з винаходом, агенти, які специфічно зменшують або інгібують експресію і/або активність РКС- α , обирають з групи, що складається з нуклеїнових кислот, які зменшують або інгібують експресію гена протеїнкінази C- α ; вміщуючих нуклеїнову кислоту векторів, що містять вектори клітин-хазяїв, інгібуючих або зменшуючих експресію протеїнкінази C- α речовин, інгібуючих транслокацію протеїнкінази C- α речовин, антагоністів активності протеїнкінази C- α і інгібіторів активності протеїнкінази C- α .

Згідно з винаходом, нуклеїнову кислоту, що використовується, переважно обирають з групи, яка складається з

- а) кодуючої людську протеїнкіназу C- α нуклеїнової кислоти або її фрагмента;
- б) нуклеїнової кислоти, яка є комплементарною нуклеїновій кислоті за п. а), або її фрагмента;
- с) нуклеїнової кислоти, яку одержують шляхом заміщення, приєднання, інверсії і/або делеції однієї чи декількох основ нуклеїнової кислоти за п. а) або п. б), або її фрагмента; і
- д) нуклеїнової кислоти, що має гомологію більш ніж 80%, до нуклеїнової кислоти за пп. а) - с), або її фрагмента.

Згідно з даним винаходом, під поняттям "нуклеїнова кислота, що кодує протеїнкіназу C- α або її фрагмент" розуміють нуклеїнову кислоту, що кодує протеїн РКС- α або його фрагмент, який включає функціональні домени, особливо псевдосубстратний домен, збагачену цистеїном ділянку, кальційзв'язувальний домен і каталітичний домен нативної протеїнкінази C- α . Згідно з переважним варіантом здійснення винаходу, використовувана згідно з винаходом нуклеїнова кислота кодує людську РКС- α , відповідно, її частини.

Термін "гомологія" означає, згідно з винаходом, ідентичність послідовностей щонайменше на 80%, переважно, щонайменше на 85% і особливо переважно щонайменше більш ніж на 90%, 95%, 97% і 99%. Відомий фахівцю вираз "гомологія" означає, таким чином, ступінь спорідненості між двома або декількома молекулами нуклеїнових

кислот, який визначається збігом між послідовностями.

У випадку використовуваної згідно з винаходом нуклеїнової кислоти може йтися про послідовність ДНК або РНК, особливо в лінійній формі. Нуклеїнова кислота може являти собою нуклеїнову кислоту, виділену з природних джерел, наприклад, з еукаріотичних тканин, переважно з тканин ссавців, більш переважно з людських тканин, або може бути одержана синтетичним шляхом.

Згідно з винаходом, особливо передбачається, що використовувана як агент нуклеїнова кислота, якщо вона вбудована у вектор, особливо у вектор експресії, у клітині-хазяїні в антизмістовій орієнтації до промотору, може пригнічувати експресію гена людської протеїнкінази C- α . При інсерції використовуваної згідно з винаходом нуклеїнової кислоти в антизмістовій орієнтації у вектор, тобто за наявності антизмістової конструкції використовуваної згідно з винаходом нуклеїнової кислоти, нуклеїнова кислота транскрибується як антизмістова нуклеїнова кислота. У випадку транскрипції нативного гена РКС- α клітини потім одержаний антизмістовий транскрипт використовуваної згідно з винаходом нуклеїнової кислоти за рахунок копуляції азотистих основ згідно з Уотсоном-Криком зв'язують з транскриптом мРНК, що перебуває у змстовій орієнтації, нативного гена протеїнкінази C- α з утворенням дуплексної структури. Таким способом селективно перешкоджають трансляції мРНК нативного гена РКС- α у поліпептиді і специфічно інгібують експресію нативної РКС- α , не інгібуючи експресію інших клітинних ізоформ РКС.

Згідно з переважним варіантом здійснення винаходу передбачається, що використовувана для одержання антизмістових конструкцій нуклеїнова кислота включає не всю кодуєчу РКС- α послідовність, а тільки її фрагменти. Ці фрагменти включають щонайменше 10 нуклеотидів, переважно щонайменше 50 нуклеотидів, особливо переважно щонайменше 200 нуклеотидів, причому "перенапружені" фрагментами нуклеотидні ділянки кодуєчої РКС- α послідовності обирають таким чином, що при експресії фрагментів в антизмістовій орієнтації у клітині відбувається специфічне інгібування експресії РКС- α , особливо людської РКС- α , але, однак, не інгібування інших ізоформ РКС, наприклад, β -ізоформ РКС.

Згідно з винаходом, передбачається, що вищезгадану нуклеїнову кислоту, відповідно, її придатний фрагмент вбудовують у вектор під контролем щонайменше одного елемента регуляції експресії, причому нуклеїнову кислоту або її фрагмент вбудовують в антизмістовій орієнтації до елементів регуляції експресії. Після введення вектора в клітину, наприклад, клітину ссавця, особливо в людську клітину, таким способом нуклеїнова кислота або її фрагмент може експресуватися в антизмістовій орієнтації і завдяки цьому можна ефективно інгібувати експресію нативної РКС- α клітини. У випадку вектора йдеться переважно про плазмідну, космідну, бактеріофаг або вірус.

Даний винахід тому стосується також вектора, який включає кодуєчу РКС- α нуклеотидну послі-

довність або фрагмент під функціональним контролем щонайменше одного елемента регуляції експресії, причому нуклеїнова кислота або її фрагмент вбудовується в антизмистовій орієнтації до елемента регуляції. У випадку елемента регуляції експресії йдеться особливо про промотор, місце зв'язування рибосом, сигнальну послідовність або 3'-термінатор транскрипції.

Наступний варіант здійснення винаходу стосується клітини-хазяїна, яка містить вищеписаний вектор. У випадку клітини-хазяїна йдеться особливо про клітину ссавця, переважно людську клітину. Згідно з особливо переважним варіантом, у випадку людської клітини йдеться про зрілу стовбурову клітину.

Згідно з переважним варіантом здійснення винаходу, для інгібування експресії РКС- α використовують синтетично одержувані антизмистові олігонуклеотиди, які включають щонайменше 10 нуклеотидів, переважно щонайменше 50 нуклеотидів, особливо переважно щонайменше 200 нуклеотидів. Такі антизмистові олігонуклеотиди можна прямо використовувати для інгібування експресії РКС- α , тобто не потрібно вбудовувати у вектор і експресувати в клітинних умовах. Згідно з особливо переважним варіантом здійснення, у випадку цих специфічних до РКС- α антизмистових олігонуклеотидів мова йде про продукт ISIS 3521 фірми Isis Pharmaceuticals, який є сильним селективним інгібітором експресії протеїнкінази- α . Згідно з іншим особливо переважним варіантом здійснення винаходу, у випадку використовуваних згідно з винаходом специфічних до РКС- α антизмистових олігонуклеотидів мова йде про антизмистові олігодезоксинуклеотиди, описані Busutti та ін., J. Surg. Pathol., 63, 137-142 (1996).

Згідно з винаходом, як вищезгадані нуклеїнові кислоти, вміщуючі ці нуклеїнові кислоти вектори, так і вміщуючі вектори клітини-хазяїни можна використовувати як агентів для лікування і/або профілактики захворювань судин, серцево-судинних захворювань, асоційованих з протеїнуриєю захворювань нирок, асоційованих з цукровим діабетом пізніх пошкоджень і/або серцево-судинних ускладнень, асоційованих з гіпертонією серцево-судинних ускладнень і/або асоційованих з гіперхолестеринемією серцево-судинних ускладнень, наприклад, в рамках генотерапії.

Згідно з наступним переважним варіантом здійснення винаходу передбачається, що для інгібування або зменшення експресії протеїнкінази- α використовують активатор протеїнкінази C- α . Активатором переважно є похідне форболу, особливо 12-О-тетрадеканолфорбол-13-ацетат (TPA) або форбол-12,13-дибутират (PDBu). Відомо, що інкубування клітин, наприклад, з PDBu протягом періоду часу від 16 до 24 годин приводить до повної регуляції за типом зворотного зв'язку РКС- α (Busutti та ін., J. Surg. Res., 63, 137-142 (1996)). Також відомо, що обробка за допомогою більш високої концентрації TPA, наприклад, 1,6 мкМ, повністю інгібує експресію РКС- α . Згідно з винаходом, тому передбачається обробка хворої тканини за допомогою складних ефірів форболу в концентрації переважно більш ніж 1,6 мкМ протягом пері-

оду часу щонайменше 15 годин для блокування частково або повністю експресії РКС- α у відповідних тканинах або органах.

Згідно з наступним переважним варіантом здійснення винаходу передбачається використання інгібітора для інгібування або зменшення активності протеїнкінази- α . Згідно з даним винаходом, під терміном "інгібітор" розуміють речовину, яка конкуруюче інгібує біологічну активність протеїнкінази C- α , алостерично змінює просторову структуру РКС- α або інгібує РКС- α шляхом інгібування субстрату.

Згідно з переважним варіантом здійснення винаходу, інгібітором є специфічно реагуюче з протеїнкіназою C- α антитіло. Під терміном "антитіло" розуміють поліпептиди, які кодуються по суті геном імуноглобуліну, відповідно, генами імуноглобулінів, або їх фрагменти, які можуть специфічно зв'язувати і розпізнавати аналізовану речовину, тобто антиген. За рахунок зв'язування антитіла з РКС- α інгібується його біологічна активність. Згідно з винаходом, антитіла проти протеїнкінази C- α можуть знаходитися у вигляді інтактних імуноглобулінів або у вигляді ряду фрагментів, які утворюються за рахунок розщеплення за допомогою різних пептидаз. Використовуване згідно з винаходом поняття "антитіло" стосується також модифікованих антитіл, наприклад, олігомерних антитіл, відновлених антитіл, окиснених антитіл і маркованих антитіл. Поняття "антитіло" включає також фрагменти антитіл, які одержують або шляхом модифікування всього антитіла, або de novo при використанні способів рекомбінації ДНК. Поняття "антитіло" тому включає як інтактні молекули, так і їх фрагменти, такі як Fab, F(ab')₂ і Fv, які можуть зв'язуватися з епітопними детермінантами. Ці фрагменти антитіл зберігають здатність селективно зв'язувати відповідний антиген. Способи одержання антитіл, відповідно, їх фрагментів відомі з рівня техніки.

Згідно з переважним варіантом здійснення винаходу, використовуваним згідно з винаходом для інгібування активності протеїнкінази C- α антитілом є моноклональне або поліклональне антитіло. Згідно з винаходом, антитіло може являти собою також гуманізоване антитіло. Згідно з особливо переважним варіантом здійснення винаходу, використовуваними для інгібування активності протеїнкінази C- α антитілами є такі, як описані Goodnight та ін., J. Biol. Chem., 270, 9991-10001 (1995).

Згідно з іншим переважним варіантом здійснення винаходу передбачається, що використовуваний, згідно з заявкою, для інгібування РКС- α інгібітор змінює статус фосфоритування протеїнкінази C- α і завдяки цьому інгібує і принаймні зменшує активність РКС- α . З публікації Tasinato та ін., Biochem. J., 334, 243-249 (1998) відомо, що α -токоферол може інактивувати клітинну протеїнкіназу C- α тим, що змінюється статус фосфорилування РКС- α . Згідно з особливо переважним варіантом здійснення винаходу, тому передбачається застосування α -токоферолу для інгібування активності РКС- α і внаслідок цього для лікування і/або профілактики захворювань судин, серцево-судинних захворювань, асоційованих з протеїнури-

єю захворювань нирок, діабетичних пізніх пошкоджень і/або серцево-судинних ускладнень у хворих на цукровий діабет, серцево-судинних ускладнень у хворих з гіпертонією і/або серцево-судинних ускладнень у хворих з гіперхолестеринемією.

Згідно з наступним переважним варіантом здійснення винаходу передбачається застосування антагоністів РКС- α для лікування і/або профілактики захворювань судин, серцево-судинних захворювань, асоційованих з протейнурією захворювань нирок, діабетичних пізніх пошкоджень і/або серцево-судинних ускладнень у хворих на цукровий діабет, серцево-судинних ускладнень у хворих з гіпертонією і/або серцево-судинних ускладнень у хворих з гіперхолестеринемією. Згідно з даним винаходом, під терміном "антагоніст" розуміють речовину, яка конкурує з РКС- α стосовно зв'язування з специфічним до РКС- α субстратом, проте, після зв'язування з субстратом не проявляючи такої ж дії, як РКС- α . Під антагоністами розуміють також речовини, які на підставі своєї структури адаптуються до інактивної конформації специфічного до РКС- α субстрату і тому запобігають активації субстрату за рахунок РКС- α .

Згідно з переважним варіантом здійснення винаходу, як антагоніст для інгібування активності РКС- α використовують похідне РКС- α , яке, правда, може зв'язуватися з субстратами нативної РКС- α , проте, після зв'язування з ними не може проявляти таку ж біологічну дію, як нативна РКС- α .

Згідно з даним винаходом, під "похідними" розуміють функціональні еквіваленти або деривати протейнінази С- α , які одержують при збереженні основної структури РКС- α за рахунок заміни атомів або молекулярних груп, відповідно, залишків і/або амінокислотні послідовності яких відрізняються від людських або тваринних молекул РКС- α , що природно зустрічаються, щонайменше в одному положенні, які, проте, по суті мають високий ступінь гомології в амінокислотній ділянці. Згідно з винаходом, поняття "похідне" включає також злиті протеси, у випадку яких в N-термінальній частині, відповідно, у C-термінальній частині знаходяться функціональні домени іншого протешу, наприклад, іншого інгібітора РКС- α .

Відмінність між похідним і нативною РКС- α може виникати, наприклад, за рахунок мутацій, як, наприклад, за рахунок делецій, заміщень, інсерцій, приєднань, заміни основ і/або рекомбінацій кодуєчих амінокислотні послідовності РКС- α нуклеотидних послідовностей. Саме собою зрозуміло, що при цьому може йтися також про варіації послідовностей, що природно зустрічаються, наприклад, про послідовності з іншого організму або про послідовності, які мутуються природним способом, або мутації, які цілеспрямовано вводять у відповідні послідовності за допомогою звичайних, відомих фахівцю засобів, наприклад, хімічних агентів і/або фізичних агентів.

Згідно з наступним переважним варіантом здійснення винаходу, як антагоніст для інгібування активності РКС- α використовують аналог РКС- α .

Згідно з даним винаходом, під терміном "аналог протейнінази С" розуміють сполуки, які не мають ідентичної з протейніназою С- α амінокислотної послідовності, однак тривимірна структура яких дуже подібна до такої протейнінази С- α . Використовувані згідно з винаходом аналог РКС- α переважно мають подібні, специфічні до субстрату властивості, такі як РКС- α , тобто можуть зв'язуватися з специфічними до РКС- α субстратами, однак переважно не мають каталітичних властивостей РКС- α . У випадку використовуваних згідно з винаходом аналогів протейнінази С- α тому може йтися, наприклад, про сполуки, які містять відповідальні за зв'язування протейнінази С- α з субстратами РКС- α амінокислотні залишки у придатній конформації і які тому можуть імітувати основні властивості місця зв'язування протейнінази С- α , проте без присутності таких же самих каталітичних властивостей, як протейніназа С- α .

Згідно з наступним варіантом здійснення винаходу передбачається, що для лікування і/або профілактики захворювань судин, серцево-судинних захворювань, асоційованих з протейнурією захворювань нирок, діабетичних пізніх пошкоджень і/або серцево-судинних ускладнень у хворих на цукровий діабет, серцево-судинних ускладнень у хворих з гіпертонією і/або серцево-судинних ускладнень у хворих з гіперхолестеринемією використовують агенти, які зменшують або інгібують експресію і/або активність не тільки протейнінази С- α (РКС- α), але й одночасно експресію і/або активність протейнінази С- β (РКС- β). Takahashi і Kamimura у J. Invest. Dermatol., 117, 605-611 (2001) повідомляють, що імуносупресор циклоспорин А одночасно зменшує експресію α - β I- і β II-ізоформ протейнінази С. Згідно з особливо переважним варіантом здійснення винаходу, тому передбачається застосування циклоспорину А для зменшення експресії РКС- α і РКС- β і, таким чином, для лікування вищезгаданих захворювань.

Згідно з наступним переважним варіантом здійснення винаходу передбачається, що агента, який специфічно зменшує або інгібують експресію і/або активність протейнінази С- α , використовують в поєднанні з агентом, який специфічно зменшує або інгібують експресію і/або активність протейнінази С- β . Згідно з винаходом, під терміном "протейніназа С- β " розуміють як протейніназу С- β I, так і сплайсинговий варіант β II.

Згідно з винаходом передбачається, що агент, який зменшує або інгібують експресію і/або активність протейнінази С- β , обирають з групи, що складається з нуклеїнових кислот, які зменшують або інгібують експресію гена протейнінази С- β , вміщуючих нуклеїнову кислоту векторів, що містять вектори клітин-хазяїв, інгібуючих або зменшуючих експресію протейнінази С- β речовин, інгібуючих транслокацію протейнінази С- β речовин, антагоністів активності протейнінази С- β і інгібіторів активності протейнінази С- β .

Згідно з переважним варіантом здійснення винаходу, використовувану як агента нуклеїнову кислоту обирають з групи, що складається з

а) кодує людську протеїнкіназу С-β нуклеїнової кислоти або її фрагмента;

б) нуклеїнової кислоти, яка є комплементарною нуклеїновій кислоті за п. а), або її фрагмента;

с) нуклеїнової кислоти, яку одержують шляхом заміщення, приєднання, інверсії і/або делеції однієї або декількох основ нуклеїнової кислоти за п. а) або п. б), або її фрагмента; і

д) нуклеїнової кислоти, що має гомологію більш ніж 80%, до нуклеїнової кислоти за пп. а) - с), або її фрагмента.

Згідно з переважним варіантом здійснення винаходу, використовується згідно з винаходом нуклеїнова кислота кодує людську РКС-α, відповідно, її частини.

У випадку використовуваної згідно з винаходом нуклеїнової кислоти може йтися про послідовність ДНК або РНК, особливо в лінійній формі. Нуклеїновою кислотою може бути нуклеїнова кислота, що виділяється з природних джерел, наприклад, з еукаріотичних тканин, переважно з тканин ссавців, більш переважно з людських тканин, або нуклеїнова кислота може бути одержана синтетичним шляхом.

Згідно з винаходом, особливо передбачається, що використовується як агент нуклеїнова кислота, якщо вона вбудована у вектор, особливо у вектор експресії, у клітині-хазяїні в антизмстовій орієнтації до промотору, може інгібувати експресію гена людської протеїнкінази С-β. При інсерції використовуваної згідно з винаходом нуклеїнової кислоти в антизмстовій орієнтації у вектор, тобто за наявності антизмстової конструкції використовуваної згідно з винаходом нуклеїнової кислоти, нуклеїнова кислота транскрибується як антизмстова нуклеїнова кислота. У випадку транскрипції гена нативної РКС-β клітини, потім одержаний антизмстовий транскрипт використовуваної згідно з винаходом нуклеїнової кислоти можна зв'язувати з транскриптом мРНК, що перебуває у змістовій орієнтації, гена нативної протеїнкінази С-β з утворенням дуплексної структури. Таким способом селективно перешкоджають трансляції мРНК гена нативної РКС-β у поліпептиді і специфічно інгібують експресію нативної РКС-β, не інгібуючи експресії інших клітинних ізоформ РКС.

Згідно з переважним варіантом здійснення винаходу передбачається, що використовується для одержання антизмстових конструкцій нуклеїнова кислота включає не всю кодуєчу РКС-β послідовність, а тільки її фрагменти. Ці фрагменти включають щонайменше 10 нуклеотидів, переважно щонайменше 50 нуклеотидів, особливо переважно щонайменше 200 нуклеотидів, причому "перенапружені" фрагментами нуклеотидні ділянки кодуєчої РКС-β послідовності обирають таким чином, що при експресії фрагментів в антизмстовій орієнтації у клітині відбувається специфічне інгібування експресії РКС-β, особливо людської РКС-β, але, проте, не інгібування інших ізоформ РКС.

Згідно з винаходом передбачається, що вищезгадану нуклеїнову кислоту, відповідно, її придатний фрагмент вбудовують у вектор під контролем щонайменше одного елемента регуляції експресії,

причому нуклеїнову кислоту або її фрагмент вбудовують в антизмстовій орієнтації до елементів регуляції експресії. Після введення вектора у клітину, наприклад, клітину ссавця, особливо в людську клітину, таким чином, нуклеїнова кислота або її фрагмент може експресуватися в антизмстовій орієнтації і завдяки цьому можна ефективно інгібувати експресію нативної РКС-β клітини. У випадку вектора йдеться переважно про плазмиду, космиду, бактеріофаг або вірус.

Даний винахід тому стосується також вектора, який включає кодуєчу РКС-β нуклеотидну послідовність або фрагмент під функціональним контролем щонайменше одного елемента регуляції експресії, причому нуклеїнова кислота або її фрагмент вбудовується в антизмстовій орієнтації до елемента регуляції. У випадку елемента регуляції експресії йдеться особливо про промотор, місце зв'язування рибосом, сигнальну послідовність або 3'-термінатор транскрипції.

Наступний варіант здійснення винаходу стосується клітини-хазяїна, яка містить вищеописаний вектор. У випадку клітини-хазяїна йдеться особливо про клітину ссавця, переважно людську клітину. Згідно з особливо переважним варіантом, у випадку людської клітини йдеться про зрілу стовбурову клітину.

Згідно з переважним варіантом здійснення винаходу, для інгібування експресії РКС-β використовують синтетично одержувані антизмстові олігонуклеотиди, які включають щонайменше 10 нуклеотидів, переважно щонайменше 50 нуклеотидів, особливо переважно щонайменше 200 нуклеотидів. Такі антизмстові олігонуклеотиди можна прямо використовувати для інгібування експресії РКС-β, тобто не потрібно вбудовувати у вектор і експресувати в клітинних умовах.

Згідно з наступним переважним варіантом здійснення винаходу, для інгібування активності протеїнкінази С-β передбачається використання специфічно реагуючого з протеїнкіназою С-β антитіла або його придатного фрагмента. Згідно з винаходом, у випадку антитіла може йтися про моноклональне або поліклональне антитіло. Використовуванням згідно з винаходом антитілом може бути також гуманізоване антитіло.

Згідно з наступним переважним варіантом здійснення винаходу, для інгібування активності протеїнкінази С-β передбачається використання речовини, яка змінює статус фосфорилювання протеїнкінази С-β.

Згідно з іншим переважним варіантом здійснення винаходу, для інгібування активності протеїнкінази С-β передбачається використання похідного або аналога протеїнкінази С-β, які діють як антагоністи РКС-β. У випадку використовуваних згідно з винаходом похідних або аналогів РКС-β йдеться про речовини, які конкурують з нативною РКС-β щодо зв'язування з специфічними до РКС-β субстратами, однак після зв'язування з субстратами не проявляючи такої ж дії, як РКС-β.

Згідно з особливо переважним варіантом здійснення винаходу, для специфічного інгібування або зменшення експресії і/або активності протеїн-

кінази С- β використовують сполуки, описані в наступних документах: патент США 5491242, патент США 5661173, патент США 5481003, патент США 5668152, патент США 5672618, Міжнародна заявка на патент WO-95/17182, Міжнародна заявка на патент WO-95/35294 і Міжнародна заявка на патент WO-02/...

Наступний переважний варіант здійснення винаходу стосується застосування агентів, які специфічно зменшують або інгібують експресію і/або активність протеїнкінази С- α (РКС- α), для одержання фармацевтичної композиції з метою лікування і/або профілактики коронарної хвороби серця, інфаркту серця, периферичного облітеруючого захворювання, інсульту, асоційованих з протеїнурією захворювань нирок, діабетичних пізніх пошкоджень і/або серцево-судинних ускладнень у хворих на цукровий діабет, серцево-судинних ускладнень у хворих з гіпертонією і серцево-судинних ускладнень у хворих з гіперхолестеринемією. Згідно з винаходом, у випадку серцево-судинних ускладнень йдеться переважно про коронарну хворобу серця, інфаркт серця, периферичне облітеруюче захворювання та інсульт. У випадку діабетичних пізніх пошкоджень йдеться особливо про діабетичну ретинопатію, діабетичну невропатію і діабетичну нефропатію.

Згідно з даним винаходом, під "фармацевтичною композицією" або "лікарським засобом" розуміють використовувану з діагностичною, терапевтичною і/або профілактичною метою, отже, сприяючу або відновлюючу здоров'я людського або тваринного організму суміш, яка включає щонайменше одну натуральну або синтетично одержану біологічно активну речовину, що проявляє терапевтичну дію. Фармацевтична композиція може являти собою як тверду, так і рідку суміш. Наприклад, включаючи біологічно активну речовину фармацевтична композиція може містити один або декілька фармацевтично прийнятних компонентів. Крім того, фармацевтична композиція може включати звичайно використовувані у даній галузі добавки, як, наприклад, стабілізатори, допоміжні засоби, мастила, порофори, емульгатори або інші речовини, що звичайно використовуються для одержання фармацевтичної композиції.

Згідно з винаходом передбачається особливо застосування агентів, які специфічно зменшують або інгібують експресію і/або активність протеїнкінази С- α (РКС- α), як біологічно активної речовини для одержання лікарського засобу з метою лікування і/або профілактики вищезгаданих захворювань. Згідно з переважним варіантом здійснення винаходу, використовувані для одержання фармацевтичних композицій агенти обирають з групи, що складається з нуклеїнових кислот, які зменшують або інгібують експресію гена протеїнкінази С- α ; вміщуючих нуклеїнову кислоту векторів, що містять вектори клітин-хазяїв, інгібуючих або зменшуючих експресію протеїнкінази С- α речовин, інгібуючих транслокацію протеїнкінази С- α речовин, антагоністів активності протеїнкінази С- α та інгібіторів активності протеїнкінази С- α .

У випадку використовуваних для одержання запропонованої згідно з винаходом фармацевтич-

ної композиції агентів йдеться особливо переважно про антизмистові олігонуклеотиди кодуючого протеїнкіназу С- α гена, токоферол, похідні форболу, похідні протеїнкінази С- α або аналоги протеїнкінази С- α .

Згідно з переважним варіантом здійснення винаходу передбачається, що фармацевтичну композицію використовують для парентерального, особливо внутрішньовенного, внутрішньом'язового, черезшкірного або підшкірного введення. Лікарський засіб, що містить використовувані згідно з винаходом агенти, переважно знаходиться у формі для ін'єкції або інфузії.

Згідно з наступним варіантом здійснення винаходу передбачається, що фармацевтичну композицію, яка містить використовувані згідно з винаходом агенти, вводять перорально. Наприклад, лікарський засіб вводять у рідкій формі як розчин, суспензію або емульсію, або у твердій формі як таблетку.

Даний винахід тому стосується також фармацевтичних композицій для профілактики і/або лікування коронарної хвороби серця, інфаркту серця, периферичного облітеруючого захворювання, інсульту, що проходить з протеїнурією захворювань нирок, діабетичних пізніх пошкоджень і/або серцево-судинних ускладнень у хворих на цукровий діабет, серцево-судинних ускладнень у хворих з гіпертонією і серцево-судинних ускладнень у хворих з гіперхолестеринемією, що включають щонайменше один агент, який специфічно зменшує або інгібуює експресію і/або активність протеїнкінази С- α (РКС- α), як біологічно активну речовину.

Згідно з переважним варіантом здійснення, агентів, що містяться у фармацевтичній композиції, обирають з групи, яка складається з нуклеїнових кислот, що зменшують або інгібують експресію гена протеїнкінази С- α ; вміщуючих нуклеїнову кислоту векторів, що містять вектори клітин-хазяїв, інгібуючих або зменшуючих експресію протеїнкінази С- α речовин, інгібуючих транслокацію протеїнкінази С- α речовин, антагоністів активності протеїнкінази С- α і інгібіторів активності протеїнкінази С- α .

Запропонована згідно з винаходом композиція особливо переважно містить антизмистові олігонуклеотиди кодуючого протеїнкіназу С- α гена, токоферол, похідні форболу, похідні протеїнкінази С- α або аналоги протеїнкінази С- α .

Згідно з наступним переважним варіантом здійснення, запропонована згідно з винаходом фармацевтична композиція містить щонайменше одну іншу біологічно активну речовину. У випадку іншої біологічно активної речовини йдеться особливо про агента, який специфічно зменшує або інгібуює експресію і/або активність протеїнкінази С- β .

Агента, що зменшує або інгібуює експресію і/або активність протеїнкінази С- β , переважно обирають з групи, що складається з нуклеїнових кислот, які зменшують або інгібують експресію гена протеїнкінази С- β ; вміщуючих нуклеїнову кислоту векторів, що містять вектори клітин-хазяїв, інгібуючих або зменшуючих експресію протеїнкінази С- β речовин,

інгібуючих транслокацію протеїнкінази C- β речовин, антагоністів активності протеїнкінази C- β і інгібіторів активності протеїнкінази C- β .

Подальші переважні варіанти здійснення винаходу впливають із залежних пунктів формули винаходу.

Винахід пояснюється докладніше за допомогою наступних фігур і прикладів.

На Фіг.1 показано виділення альбуміну в сечі позбавлених РКC- α мишей з цукровим діабетом та без цукрового діабету (контроль) і мишей SV129 з діабетом та без діабету (контроль). При цьому концентрацію альбуміну визначали при використанні непрямого твердофазового імуноферментного аналізу (ELISA). Певні величини вмісту альбуміну відносили до концентрації креатиніну. Миші SV129 і РКC- $\alpha^{-/-}$ без діабету мають порівнянну частку альбумін/креатинін, яка, як правило, складає менше 10г/моль. Навпаки, у мишей SV129 з діабетом частка значно вище ($p=0,04$). Значення у випадку мишей РКC- $\alpha^{-/-}$ з діабетом значно нижче, ніж значення у випадку мишей SV129 з діабетом ($p<0,001$). Поперечна риска означає середнє значення. Значення визначали за допомогою U-критерію Mann-Whitney.

На Фіг.2 показана гломерулярна експресія VEGF у випадку позбавлених РКC- α мишей з цукровим діабетом та без цукрового діабету (контроль) і мишей SV129 з діабетом та без діабету (контроль). При цьому на групу тварин напівкількісно оцінювали, відповідно, 40 клубочків при використанні імуногістохімічних способів, причому проводили поділ на слабку, середню і сильну імунофлуоресценцію. Значення розраховували за допомогою U-критерію Mann-Whitney. Експресія VEGF у випадку тварин з діабетом значно вища, ніж у випадку контрольних тварин ($p<0,001$). Проте експресія VEGF у випадку тварин SV129 з діабетом значно вища, ніж у випадку тварин РКC- $\alpha^{-/-}$ з діабетом ($p<0,001$).

На Фіг.3 показана гломерулярна експресія рецептора II VEGF у випадку позбавлених РКC- α мишей з цукровим діабетом та без цукрового діабету (контроль) і мишей SV129 з діабетом та без діабету (контроль). При цьому на групу тварин напівкількісно оцінювали, відповідно, 40 клубочків при використанні імуногістохімічних способів, причому здійснювали поділ на слабку, середню і сильну імунофлуоресценцію. Значення розраховували за допомогою U-критерію Mann-Whitney. Експресія VEGFR-II у випадку тварин з діабетом значно вища, ніж у випадку контрольних тварин ($p<0,001$). Проте експресія VEGFR-II у випадку тварин SV129 з діабетом значно вища, ніж у випадку тварин РКC- $\alpha^{-/-}$ з діабетом ($p<0,001$).

На Фіг.4 показана гломерулярна експресія перлекану у випадку позбавлених РКC- α мишей з цукровим діабетом та без цукрового діабету (контроль) і мишей SV129 з діабетом та без діабету (контроль). При цьому на групу тварин напівкількісно оцінювали, відповідно, 40 клубочків при використанні імуногістохімічних способів, причому проводили поділ на слабку, середню і сильну імунофлуоресценцію. Значення, розраховували за

допомогою U-критерію Mann-Whitney. Експресія перлекану у випадку тварин SV129 з діабетом значно нижча, ніж у випадку контрольних тварин SV129 ($p<0,001$).

Приклад 1

Експериментальне провокування діабету

При використанні мишей, яких утримували в стандартизованих умовах при температурі 22°C і які мали вільний доступ до корму та води, відповідно до дозволу товариства за охорони тварин Нимської Саксонії, проводили наступні досліді.

Перед початком досліді у всіх тварин, виходячи з сироватки, визначали рівень цукру в крові. Результати наведені у таблиці 1. У 16 контрольних мишей SV129 і 14 позбавлених протеїнкінази C- α (РКC- $\alpha^{-/-}$) мишей SV129 індукували діабет шляхом ін'єкції стрептозотоцину. Стрептозотоксин приводить до руйнування продукуючих інсулін клітин островкового апарату підшлункової залози. За рахунок виникаючого в результаті дефіциту інсуліну приходять до тривало підвищених рівнів цукру в крові, тобто до гіперглікемії, і тим самим до цукрового діабету. Для провокування гіперглікемії тваринам у дні 1 та 4 інтраперитонеально вводили, відповідно, 125мг стрептозотоцину/кг маси тіла. З цією метою стрептозотоксин розчиняли в 50мМ розчині цитрату натрію із значенням pH=4,5. Для контролю 7 мишам SV129 і 6 мишам РКC- $\alpha^{-/-}$ інтраперитонеально у дні 1 та 4 вводили тільки розчинник. Потім у мишей кожні 2 дні відбирали краплю крові з хвоста для контролю рівня цукру в крові. Визначення вмісту цукру в крові здійснювали за допомогою вимірювального приладу Glucometer Elite[®] фірми Байер. Для визначення використовували тест-смужки Glucometer Elite Sensor[®].

На 7-10 день у тварин, яким був введений стрептозотоксин, був провокований діабет при вмісті цукру в крові понад 350мг/дл. Вихідні значення перед ін'єкцією стрептозотоцину складали в середньому 200мг/дл. У тварин, які одержували тільки розчинник, не відбулося жодного підвищення рівня цукру в крові і у них не виявили цукрового діабету. Через 10 днів після першої ін'єкції тварин спостерігали протягом наступних 8 тижнів. Впродовж цього часу кожні два тижні контролювали вміст цукру в крові, для того щоб упевнитися, що тварини з діабетом далі залишалися хворими на діабет. Вміст цукру у тварин з діабетом впродовж цього часу коливався в середньому у межах близько 500-550мг/дл, а у випадку тварин без діабету складали близько 200мг/дл.

Через 8 тижнів тварин анестезували наркотичним засобом авертіном. Під наркозом потім із сплетення очних вен відбирали 400мкл крові і з сечового міхура шляхом пункції за допомогою голки 27G відбирали всю сечу. Після цього нирки через черевну аорту перфундували за допомогою лактатаого розчину Рінгера і нирки видаляли. Тварин негайно після цього умиротворяли під наркозом. Вміст цукру в крові потім визначали із сироватки. Рівні цукру в крові наведені у таблиці 1. Як можна бачити, тварини з діабетом мають приблизно у 2,5-3 рази більш високий вміст глюкози, ніж на початку досліді і також у порівнянні з контрольними тваринами без діабету.

Таблиця 1

Вміст глюкози в сироватці у мишей з діабетом та без діабету
до початку дослідження і наприкінці дослідження

	Вміст глюкози в сироватці до початку дослідження (мг/дл)	Вміст глюкози в сироватці наприкінці дослідження (мг/дл)
SV129, контроль (n=7)	205±40	223±43
SV129, з діабетом (n=16)	192±36	505±80*
PKC- $\alpha^{-/-}$, контроль (n=6)	223±27	197±21
PKC- $\alpha^{-/-}$, з діабетом (n=14)	225±31	589±98*

*: $p < 0,001$ у порівнянні з контрольними тваринами без діабету.

Приклад 2

Визначення концентрації альбуміну

Виникнення альбумінуриї у хворих на діабет є відомим явищем. Тому визначали виділення альбуміну в сечі позбавлених РКC- α мишей з цукровим діабетом та без цукрового діабету (контроль) і мишей SV129 з діабетом та без діабету (контроль). З цією метою визначали концентрацію альбуміну у зібраній сечі. Для визначення концентрації альбуміну використовували непрямий твердофазовий імуноферментний аналіз (ELISA) (Albuwell M[®], фірма Exocell Inc., Філадельфія, США). Цей ELISA є специфічним для мишачого альбуміну. Визначення здійснювали відповідно до вказівок виробника. Для того, щоб можна було враховувати коливання у виділенні сечі, певні значення вмісту альбуміну співвідносили до концентрації креатиніну в сечі. Результати показані на Фіг.1. При цьому виявилось, що миші SV129 і РКC- $\alpha^{-/-}$ без діабету мають порівнянну частку альбумін/креатинін, яка, як правило, складає величину нижче 10г/моль. Навпаки, у випадку мишей SV129 з діабетом ця частка значно вище ($p=0,004$). Середнє значення складає 21,5г/моль відносно до 7,48г/моль у контрольних тварин SV129 без діабету. У порівнянні з цим, у випадку мишей РКC- $\alpha^{-/-}$ з діабетом не відбувається жодного значного збільшення альбумінуриї. Частка альбумін/креатинін складає завжди нижче 20г/моль і середнє значення знаходиться при 10,2г/моль. Середнє значення у випадку контрольних мишей РКC- $\alpha^{-/-}$ без діабету складає 8,5г/моль. Значення у випадку мишей РКC- $\alpha^{-/-}$ з діабетом значно нижче, ніж значення у випадку мишей SV129 з діабетом ($p < 0,001$). Результати показані на Фіг.1.

Приклад 3

Визначення експресії VEGF і рецептора-II VEGF

Як зазначено вище у прикладі 1, всіх тварин по закінченні дослідження умертвляли. Безпосередньо після цього виймали нирки і заморожували при температурі -70°C . Наступний аналіз вийнятих нирок показав у ниркових тільцях (клубочках) контрольних тварин з діабетом значне збільшення експресії судинного ендотеліального фактора зростання (VEGF) і рецептора-II VEGF (VEGFR-II). Виявлення експресії VEGF і VEGFR-II здійснювали за допомогою імуногістохімічних способів. Для цього заморожені при температурі -70°C нирки

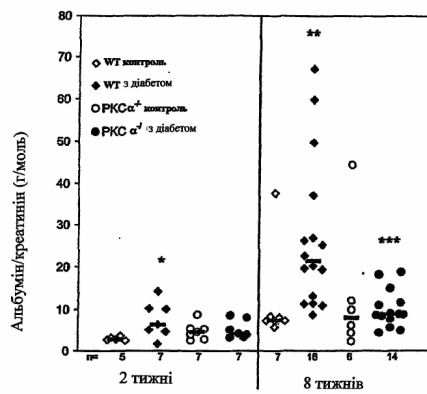
розрізали в замороженому стані з одержанням зрізів завтовшки 6мм і висушували на повітрі. Потім заморожені зрізи фіксували за допомогою холодного ацетону, висушували на повітрі і промивали за допомогою Трис-буфера (TBS: 0,05M Трис-буфера, 0,15M NaCl, pH=7,6). Заморожені зрізи потім інкубували протягом 60 хвилин у вологій камері з первинним поліклональним "кролячим" антитілом проти мишачого VEGF (Santa Cruz, A-20), відповідно, VEGFR-II (Santa Cruz, C-1158). Після нового промивання за допомогою TBS зрізи інкубували протягом 30 хвилин при кімнатній температурі з Су3-маркованим вторинним "антикролячим" антитілом (Jackson Immunoresearch Laboratories, 711-165-152) і ще раз промивали за допомогою TBS. Потім препарати оцінювали і фототрафували при використанні мікроскопа Zeiss Axioplan-2 (Zeiss, Jena, Німеччина). У випадку всіх тварин оцінювали, відповідно, 40 ниркових тільць, причому інтенсивність флуоресценції поділяли на сильну, середню і слабку. При цьому у контрольних тварин SV129 з діабетом виявлено значне збільшення ($p < 0,001$) експресії VEGF і VEGFR-II у порівнянні з контрольними тваринами без діабету. У порівнянні з цим збільшення експресії у мишей SV129 і РКC- $\alpha^{-/-}$ з діабетом виражене значно менше ($p < 0,001$). Результати показані на Фіг.2 і 3.

Приклад 4

Визначення експресії перлекану

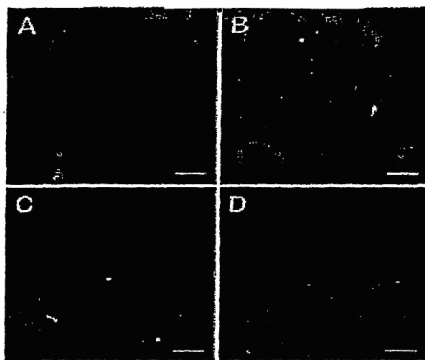
Оскільки встановлену різну експресію VEGF можна пояснювати не тільки відмінністю в альбумінуриї, досліджували експресію гепарансульфат-протеоглікану, перлекану, у нирках тварин з діабетом та без діабету при використанні імуногістохімічних способів. При цьому, як описано у прикладі 3, готували і фіксували криозрізи нирок. Як перше антитіло використовували моноклональне антитіло пацюків, спрямоване проти мишачого перлекану (RDI Systems, A7L6). Як вторинне антитіло використовували Су3-марковане осличе антипацюкове антитіло (Jackson Immunoresearch Laboratories, 712-165-153). Імуногістохімічне дослідження зрізів абсолютно несподівано засвідчило, що перлекан у випадку контрольних мишей з діабетом вже не виявляється або ще ледве виявляється (див. Фіг.4). Таким чином, ані в клубочку, ані в стінці судини артеріол перлекан не можна виявити. Навпаки, експресія перлекану у випадку мишей SV129 і РКC- $\alpha^{-/-}$ залишається незмінною або лише трохи зменшується. Оскільки відсутність

гепарансульфату як одного з основних медіаторів має значення для виникнення протеїнурії, слід

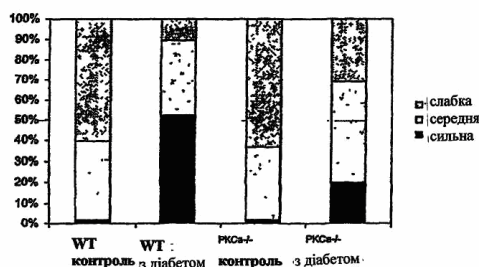


Альбумінурія після 2 і 8 тижнів гіперглікемії. Середнє значення відмічене у вигляді смужки; *: $p < 0,05$ до контролю; **: $p < 0,01$ до контролю; ***: $p < 0,01$ до SV129 з діабетом

Фіг.1



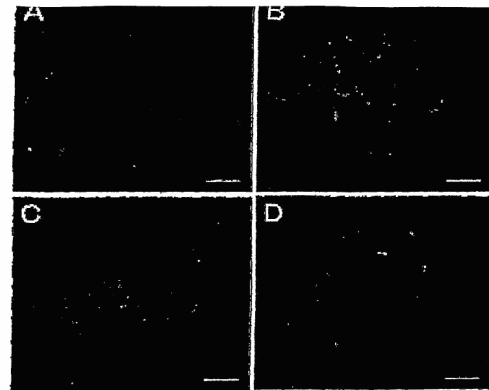
В



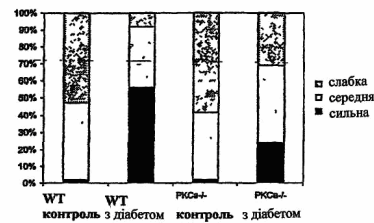
Показна імуногістохімічна оцінка експресії VEGF-R1 у контрольних мишей (A,B) і мишей $PKC\alpha^{+}$ (C,D) з напівкількісною оцінкою

Фіг.3

виходити з того, що цей результат може пояснювати відсутність альбумінурії.

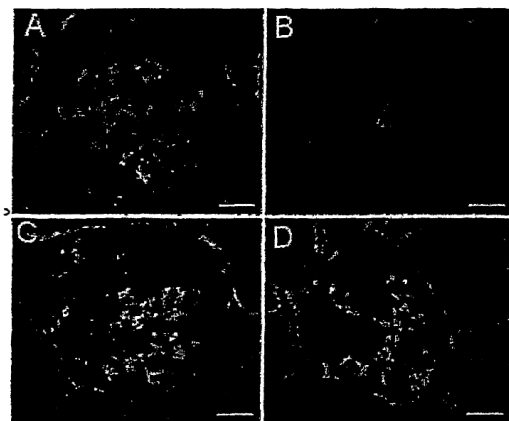


Е



Показна імуногістохімічна оцінка експресії VEGF у контрольних мишей (A,B) і мишей $PKC\alpha^{+}$ (C,D) з напівкількісною оцінкою (Е)

Фіг.2



Імуногістохімічне дослідження зрізів засвідчує, що гепарансульфат-протеоглікан у контрольних тварин з діабетом (B) вже не виявляється або ще ледь виявляється, проте у мишей $PKC\alpha^{+}$ з діабетом (D) утворюється в нормальній концентрації

Фіг.4

