



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2015142163, 05.10.2015

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
05.10.2015

Дата регистрации:
21.08.2017

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 05.10.2015

(43) Дата публикации заявки: 07.04.2017 Бюл. № 10

(45) Опубликовано: 21.08.2017 Бюл. № 24

Адрес для переписки:

119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, 1,
Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова, Фонд "Национальное
интеллектуальное развитие"

(72) Автор(ы):

Ткачук Всеволод Арсеньевич (RU),
Рубина Ксения Андреевна (RU),
Парфенова Елена Викторовна (RU),
Семина Екатерина Владимировна (RU),
Сысоева Вероника Юрьевна (RU),
Калинина Наталья Игоревна (RU),
Цоколаева Зоя Ивановна (RU),
Макаревич Павел Игоревич (RU),
Акопян Жанна Алексеевна (RU),
Широкова Галина Васильевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования "Московский государственный
университет имени М.В. Ломоносова" (МГУ)
(RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2449799 C2, 10.05.2012. RU
2497529 C2, 10.11.2013. SHYU KG et al.,
Synergistic effect of angiopoietin-1 and
vascular endothelial growth factor on
neoangiogenesis in hypercholesterolemic rabbit
model with acute hindlimb ischemia, Life
Sciences, 2003, Vol.73, Issue 5, pp.563-579. RU
2385938 C1, 10.04.2010. RU 2385936 C1,
10.04.2010.

**(54) СПОСОБ СТИМУЛЯЦИИ АНГИОГЕНЕЗА В ИШЕМИНИЗИРОВАННЫХ ТКАНЯХ И
КОМБИНИРОВАННОЕ ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО ДЛЯ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ СПОСОБА**

(57) Реферат:

Настоящее изобретение относится к биохимии, в частности к способу стимуляции ангиогенеза в ишемизированных тканях и комбинированному лекарственному средству для его осуществления. Указанное лекарственное средство содержит невирусную плазмидную конструкцию, несущую ген, кодирующий фактор роста гепатоцитов (HGF), и невирусную плазмидную конструкцию, несущую ген, кодирующий ангиопоэтин-1 (Ang-1). Указанные плазмидные конструкции в составе лекарственного средства взяты в массовом соотношении от 2:1 до 1:2 и разведены в

физиологическом растворе. Для осуществления способа стимуляции ангиогенеза в ишемизированных тканях указанное комбинированное лекарственное средство вводят внутримышечно непосредственно в зону ишемии. Настоящее изобретение позволяет повысить эффективность ангиогенеза в ишемизированных тканях за счёт синергетического эффекта от применения комбинации двух указанных выше конструкций. 2 н. и 13 з.п. ф-лы, 9 ил., 3 табл., 3 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C12N 15/00 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2015142163, 05.10.2015**(24) Effective date for property rights:
05.10.2015Registration date:
21.08.2017

Priority:

(22) Date of filing: **05.10.2015**(43) Application published: **07.04.2017** Bull. № 10(45) Date of publication: **21.08.2017** Bull. № 24

Mail address:

119991, Moskva, GSP-1, Leninskie gory, 1,
Moskovskij gosudarstvennyj universitet imeni M.V.
Lomonosova, Fond "Natsionalnoe intellektualnoe
razvitie"

(72) Inventor(s):

**Tkachuk Vsevolod Arsenevich (RU),
Rubina Kseniya Andreevna (RU),
Parfenova Elena Viktorovna (RU),
Semina Ekaterina Vladimirovna (RU),
Sysoeva Veronika Yurevna (RU),
Kalinina Natalya Igorevna (RU),
Tsokolaeva Zoya Ivanovna (RU),
Makarevich Pavel Igorevich (RU),
Akopyan Zhanna Alekseevna (RU),
Shirokova Galina Vasilevna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe byudzhethoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniya "Moskovskij gosudarstvennyj
universitet imeni M.V. Lomonosova" (MGU)
(RU)**

(54) **METHOD OF ANGIOGENESIS AUGMENTATION IN ISCHEMIC TISSUES AND COMBINATION DRUG FOR METHOD IMPLEMENTATION**

(57) Abstract:

FIELD: pharmacology.

SUBSTANCE: drug comprises a non-viral plasmid construct carrying a gene coding for hepatocyte growth factor (HGF) and a non-viral plasmid construct carrying a gene coding for angiopoietin-1 (Ang-1). The mentioned plasmid constructs as parts of the drug are taken in a weight ratio from 2:1 to 1:2 and are diluted in physiological solution. In order to implement a

method of angiogenesis augmentation in ischemic tissues the mentioned combination drug is injected intramuscularly, directly into the ischemic zone.

EFFECT: invention enables to improve the efficiency of angiogenesis in ischemic tissues due to synergistic effect of using combination of the two constructions metioned above.

15 cl, 9 dwg, 3 tbl, 3 ex

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к медицине и фармакологии и может быть использовано для стимуляции ангиогенеза, роста и ремоделирования сосудов, а также восстановления кровоснабжения в ишемизированных тканях, для лечения ряда заболеваний человека, обусловленных нарушением кровоснабжения тканей. Изобретение основано на использовании лекарственного средства, действующим началом которого является комбинация невирусных плазмидных конструкций, несущих гены фактора роста гепатоцитов (HGF) и ангиопоэтина-1 (Ang-1).

Уровень техники

Ишемическая болезнь сердца (ИБС) и критическая ишемия нижних конечностей (КИНК), наряду с ишемическими нарушениями мозгового кровообращения, в настоящее время относят к основным причинам инвалидизации населения.

Лечение КИНК включает целый ряд мер медикаментозного характера, изменение образа жизни, коррекцию сопутствующей патологии, хирургические методы восстановления нарушенного кровотока - шунтирование, ангиопластика, атерэктомия и т.д. Однако существует определенная группа больных с множественными критическими стенозами сосудов нижних конечностей, для которых описанные выше лечебные мероприятия являются неэффективными. То же относится и к лицам, которым уже было выполнено хирургическое вмешательство, в результате чего все последующие операции по восстановлению перфузии становятся крайне затруднительными или невозможными. В связи со сказанным возникает необходимость разработки альтернативных методов лечения КИНК, одним из которых является терапевтический ангиогенез - направление регенеративной медицины, активно развивающееся в последнее время. При лечении ишемических повреждений тканей и органов генная терапия на сегодняшний день общепризнанно считается одним из наиболее эффективных способов терапии.

В силу того, что в основе всех регенеративных процессов лежит ангиогенез, и полноценное восстановление структуры и функции органов и тканей без обеспечения кровотоком невозможно, поиск решений, позволяющих восстановить кровоснабжение в поврежденных тканях, является весьма актуальной задачей.

В основе терапевтического ангиогенеза лежит стимуляция роста и ремоделирования сосудов в ишемизированных тканях с помощью введения рекомбинантных ангиогенных факторов, их генов или прогениторных клеток, способных продуцировать ангиогенные факторы и факторы роста или дифференцироваться в клетки сосудов.

Было показано [Deveza L, Choi J, Yang F. Therapeutic Angiogenesis for Treating Cardiovascular Diseases. Theranostics. 2012; 2(8): 801-814], что введение рекомбинантных факторов в зону ишемии положительно влияет на процессы регенерации за счет индукции ангиогенеза. Однако использование генетических конструкций оказывается более эффективно, поскольку обеспечивает продолжительную экспрессию трансгена в ткани-мишени.

Среди наиболее изученных индукторов ангиогенеза сосудистый фактор роста эндотелия (VEGF), основной фактор роста фибробластов (bFGF), фактор роста гепатоцитов (HGF) и урокиназа (uPA). Было показано [Carmeliet P. VEGF gene therapy: stimulating angiogenesis or angioma-genesis. Nat. Med. 2000; 6: 1102-1113; Traktuev DO, Tsokolaeva ZI, Shevelev AA, Talitskiy KA, Stepanova VV, Johnstone BH, Rahmat-Zade TM, Kapustin AN, Tkachuk VA, March KL, Parfyonova YV. Urokinase gene transfer augments angiogenesis in ischemic skeletal and myocardial muscle. Mol Ther. 2007; 15(11): 1939-1946], что урокиназа эффективно стимулирует ангиогенез в ишемизированных тканях миокарда

и скелетных мышцах. Однако вновь сформированные сосуды без стабилизации подвергаются быстрой регрессии; созревание сосудов и их стабилизация происходит за счет взаимодействия эндотелиальных клеток растущего сосуда с перицитами и за счет продукции последними ангиопоэтина-1 (Ang-1; AGP1), фактора роста тромбоцитов (PDGF-B) и трансформирующего фактора роста (TGF- β).

Из уровня техники известен способ стимуляции регенеративных процессов в ишемизированных тканях, включающий введение в организм больного среды культивирования стромальных клеток из жировой ткани человека, содержащей факторы роста VEGF, HGF, ангиопоэтин и ангиогенин (патент РФ №2497529).

Однако данный способ имеет множественные недостатки, так как, во-первых, использование клеток, выделенных от донора, требует высокой квалификации врача-специалиста, проводящего процедуру изъятия биологического материала у донора, долгой пробоподготовки, которая заключается в длительном культивировании клеток, а также наличие специализированного дорогостоящего оборудования для ведения культуральных работ. Во-вторых, при культивировании клеток используются коммерческие среды, точный состав которых не известен и затрудняет стандартизацию конечного продукта, и кроме того, в составе таких сред могут содержаться продукты животного происхождения, что опасно переносом антигенов/белков животных в организм человека. И, в-третьих, введение прогениторных/стромальных клеток в организм человека может приводить к развитию злокачественных новообразований из этих клеток, а также к неконтролируемому запуску дифференцировки стромальных клеток в нежелательном направлении.

Наиболее близким к заявляемому решению является средство для стимуляции ангиогенеза в ишемизированной ткани, содержащее смесь в растворе 0,9%-ного NaCl плазмидных конструкций pC4W-hVEGFopt, несущую оптимизированный ген hVEGFopt фактора роста эндотелия сосудов, и pC4W-hHGFopt, несущую оптимизированный ген hHGFopt фактора роста гепатоцитов (патент РФ №2449799).

Однако из многочисленных зарубежных клинических испытаний следует, что эффективность терапии на основе плазмид или вирусов с геном VEGF оказалась невысокой. В частности, результаты фазы III клинических испытаний генно-терапевтического препарата на основе VEGF165 показали безопасность препарата, но статистически значимый терапевтический эффект при лечении ишемии миокарда отсутствовал [Duncan J Stewart, Michael JB Kutryk, David Fitchett, Michael Freeman, Nancy Camack, Yinghua Su, Anthony Delia Siega, Luc Bilodeau, Jeffrey R Burton, Guy Proulx, Sam Radhakrishnan, and for the NORTHERN Trial Investigators. VEGF Gene Therapy Fails to Improve Perfusion of Ischemic Myocardium in Patients With Advanced Coronary Disease: Results of the NORTHERN Trial. Mol. Therapy. 2009; 17(6): 1109-1115]. По всей вероятности, это обусловлено тем, что временное повышение в тканях продукции одного из факторов, инициирующих формирование кровеносных сосудов de novo, приводит к образованию незрелых сосудов, которые без стабилизации довольно быстро регрессируют [Makarevich P, Tsokolaeva Z, Shevelev A, Rybalkin I, Shevchenko E, Beloglazova I, Vlasik T, Tkachuk V, Parfyonova Ye. Combined transfer of human VEGF165 and HGF genes renders potent angiogenic effect in ischemic skeletal muscle. PLoSOne. 2012; 7(6): e38776].

Раскрытие изобретения

Задачей настоящего изобретения является разработка эффективного способа стимуляции ангиогенеза в ишемизированных тканях, а также создание комбинированного лекарственного средства, которое обеспечивает эффективный терапевтический ангиогенез.

Поставленная задача решается тем, что способ стимуляции ангиогенеза в ишемизированных тканях включает внутримышечное введение непосредственно в зону ишемии терапевтически эффективного количества комбинированного лекарственного средства, включающего невирусную плазмидную конструкцию, несущую ген, кодирующий фактор роста гепатоцитов, и невирусную плазмидную конструкцию, несущую ген, кодирующий ангиопоэтин-1, взятых в массовом соотношении от 2:1 до 1:2, разведенных в физиологическом растворе.

Предпочтительно в качестве вектора, несущего гены, кодирующие фактор роста гепатоцитов и ангиопоэтина-1, использовать плазмиду рН-CMV1.

Предпочтительно в качестве гена, кодирующего фактор роста гепатоцитов, использовать ген, имеющий последовательность нуклеотидов, представленную на фиг. 1.

Предпочтительно в качестве гена, кодирующего ангиопоэтин-1, использовать ген, имеющий последовательность нуклеотидов, представленную на фиг. 2.

Предпочтительно в качестве физиологического раствора использовать стерильный изотонический раствор хлорида натрия.

Предпочтительно вводить комбинированное средство в количестве из расчета 50-55 мкг средства/1 кг веса.

Предпочтительно использовать суммарную концентрацию плазмид в физиологическом растворе составляющую от 1 до 5 мг/мл.

Предпочтительно вводить комбинированное средство однократно или многократно, но не чаще одного раза в неделю до достижения терапевтического эффекта.

Также поставленная задача решается тем, что комбинированное лекарственное средство на основе невирусных конструкций, содержит плазмидную конструкцию, несущую ген, кодирующий фактор роста гепатоцитов, и плазмидную конструкцию, несущую ген, кодирующий ангиопоэтин-1, взятых в массовом соотношении от 2:1 до 1:2 и разведенных в физиологическом растворе.

Предпочтительно использовать средство с суммарной концентрацией плазмид в физиологическом растворе от 1 до 5 мг/мл.

Предпочтительно использовать в плазмидной конструкции в качестве вектора, несущего гены, кодирующие фактор роста гепатоцитов и ангиопоэтина-1, плазмиду рН-CMV1.

Предпочтительно в качестве гена, кодирующего фактор роста гепатоцитов, использовать ген, имеющий последовательность нуклеотидов, представленную на фиг. 1.

Предпочтительно в качестве гена, кодирующего ангиопоэтин-1, использовать ген, имеющий последовательность нуклеотидов, представленную на фиг. 2.

Предпочтительно в качестве физиологического раствора использовать стерильный изотонический раствор хлорида натрия.

Предпочтительно использовать средство, содержащее плазмидную конструкцию, несущую ген, кодирующий фактор роста гепатоцитов, и плазмидную конструкцию, несущую ген, кодирующий ангиопоэтин-1, взятых в массовом соотношении 1:1.

Технический результат от использования предлагаемого способа лечения и комбинированного лекарственного средства, содержащего смесь плазмидных невирусных конструкций рН-CMV1-HGFopt и рН-CMV1-Ang-1opt, заключается в обеспечении эффективного ангиогенеза в ишемизированных тканях, а именно, в увеличении числа вновь образованных сосудов, их стабилизации и устойчивости к апоптозу, а также в уменьшении площади некроза в ишемизированных тканях. Данный

результат был получен за счет синергического эффекта двух плазмидных конструкций, несущих гены фактора роста гепатоцитов (HGF) и ангиопоэтина-1 (Ang-1 или AGP1).

Монокомпонентная генная терапия не оказывает такого терапевтического эффекта, как комбинированная терапия с использованием нескольких плазмидных конструкций.

5 В ряде модельных экспериментов *in vivo* нами ранее было показано, что введение одной плазмиды, содержащей ген ангиопоэтина, не вызывает восстановление кровотока на модели ишемии нижней конечности мыши. Использование же плазмиды с фактором HGF в этих целях оказывает необходимый терапевтический эффект, однако, этот эффект является непродолжительным вследствие нестабильности вновь образованных сосудов.

10 Таким образом, комбинированное генное лекарственное средство на основе невирусных конструкций, несущих гены фактора роста гепатоцитов и ангиопоэтина-1, обеспечивает комплексное воздействие на ключевые процессы, необходимые регенерации органов и тканей - оказывает антиапоптотическое действие, способствующее выживанию клеток, и индуцирует формирование стабильных и функционально зрелых сосудов.

15 Действующим началом предлагаемого лекарственного средства является комбинация невирусных плазмидных конструкций, несущих гены HGF и Ang-1. После введения в поврежденную ткань плазмидные конструкции экспрессируются в течение одной-двух недель, обеспечивая многократное повышение продукции HGF и Ang-1. Биомишенями этих белковых факторов являются специфичные рецепторы на поверхности клеток, 20 белки *c-met* и *Tie2*.

HGF представляет собой гликопротеин, исходно идентифицированный как митоген для гепатоцитов, участвующий в регенерации печени. HGF также стимулирует пролиферацию эпителиоцитов (эпителия легких, почки, эпидермиса). Кроме этого, HGF является антиапоптотическим фактором и фактором роста, индуцирующим ангиогенез. 25 Известно, что при связывании HGF с его рецептором *c-met* происходит активация тирозин-киназного сигнального каскада HGF, что приводит к активации пролиферации и миграции клеток эндотелиальных клеток с последующим формированием капиллярноподобных структур. В органах и тканях HGF секретируется стромальными мезенхимальными клетками и действует на окружающие клетки как 30 мультифункциональный цитокин, облегчая их миграцию, деградацию внеклеточного матрикса и морфогенез, что делает его центральным фактором роста, регулирующим процессы регенерации и ангиогенеза.

Ангиопоэтин-1 представляет собой фактор стабилизации сосуда, который регулирует формирование полноценного зрелого сосуда, привлекая гладкомышечные клетки и 35 уменьшая проницаемость сосудов. В норме Ang-1 также продуцируется перицитами и гладкомышечными клетками и оказывает стимулирующее действие на ангиогенез, но механизм его действия заключается в стабилизации вновь образованных сосудов. Известно, что вновь образованные сосуды подвергаются регрессии, если они не стабилизируются за счет контактного взаимодействия с перицитами. Экспериментальные 40 данные свидетельствуют о том, что *Tie2/Ang-1*-зависимый каскад сигнализации стимулирует хемотаксис эндотелиальных клеток и потенцирует их взаимодействие с перицитами, тем самым способствуя стабилизации вновь сформированных сосудов. Кроме того, Ang-1 уменьшает проницаемость сосудов и обладает противовоспалительной активностью.

45 В основе предлагаемого изобретения лежит комбинация двух плазмидных конструкций, несущих гены, кодирующие HGF и Ang-1 и способ их применения. Эти конструкции представляют собой невирусные векторы для экспрессии HGF и Ang-1 человека в эукариотических клетках.

В качестве генов, кодирующих HGF_{opt} и Ang-1_{opt}, предлагается использовать запатентованные ранее оптимизированные нуклеотидные последовательности, где последовательность HGF_{opt} представлена на фиг. 1 (патент РФ №2385936), а последовательность Ang-1_{opt} - на фиг. 2 (патент РФ №2385938)

5 Для повышения уровня продукции HGF и Ang-1 в трансфицированных клетках была оптимизирована природная последовательность кДНК этих генов. Среди триплетов нуклеотидов, кодирующих аминокислоты белковых последовательностей природных генов HGF и Ang-1, были выявлены наиболее редко встречаемые последовательности в генах человека. Выявленные редкие триплеты, а также соседние с ними триплеты
10 были заменены на триплеты, кодирующие ту же аминокислоту, но при этом наиболее часто встречающиеся в генах человека. Далее, из исходных генов в кодирующих белок областей теми же методами были удалены сигналы деградации мРНК и сигналы полиаденилирования, что привело к увеличению стабильности мРНК генов HGF и Ang-1. После модификации все аминокислоты природных генов HGF и Ang-1 остались
15 неизменными.

Кроме того, следует отметить, что плазмидные конструкции созданы на основе вектора рН-CMV1 (например, следующих компаний - производителей: Genlantis (<http://www.genlantis.com>), SnapGene (www.snapgene.com), amsbio (www.amsbio.com) и др.) в который встроены гены фактора роста гепатоцитов и ангиопоэтина-1, и представляют
20 собой невирусные векторы для экспрессии лекарственных белков в эукариотических клетках под контролем высокоэффективных промоторов. Данные плазмиды содержат усиленный промотор для эффективной и высокой экспрессии трансгена в целевых клетках и показывают достижение наилучшего результата. Оптимизация последовательности гена фактора роста гепатоцитов HGF (HGF_{opt}) и ангиопоэтина-1
25 (AGP, AGP_{opt}) привела к повышению продукции HGF и Ang-1 в системах *in vitro* и *in vivo*. Следует отметить, что реализация изобретения возможна также с использованием иных плазмидных конструкций, созданных на основе других векторов, содержащих усиленный промотор для эффективной и высокой экспрессии трансгена в целевых клетках. Среди них векторы, созданные на основе рсDNA3.1 плазмиды, рVAX1 плазмиды,
30 рIRES плазмиды, плазмиды нового поколения рН-CMV1, рC4W и т.д. На основании проведенного сравнительного анализа экспрессии трансгенов с использованием метода ELISA для оценки концентрации факторов HGF и Ang-1, экспрессируемых клетками после трансфекции плаزمидами, был выбран наиболее эффективный вектор рН-CMV1.

Таким образом, предлагаемый комбинированный плазмидный генно-терапевтический
35 препарат обеспечивает продукцию двух взаимодополняющих факторов HGF и Ang-1, является более эффективным препаратом следующего поколения, стимулирующим восстановление структуры и функции поврежденных тканей за счет стимуляции ангиогенеза, антиапоптотического эффекта и, как следствие, общей регенерации поврежденных тканей.

40 Краткое описание чертежей

Изобретение поясняется чертежами.

На фиг. 1 представлена нуклеотидная последовательность гена фактора роста гепатоцитов HGF_{opt}. Показана последовательность нуклеотидов гена HGF_{opt} (верхние
45 строчки) в сравнении с последовательностью нуклеотидов природного гена фактора роста гепатоцитов человека (средние строчки). Показана также последовательность аминокислот кодируемого белкового продукта (нижние строчки). Жирным шрифтом выделена область, кодирующая белок. Подчеркнуты триплеты нуклеотидов, подвергшиеся оптимизации.

На фиг. 2 представлена нуклеотидная последовательность Ang-1opt. Показана последовательность нуклеотидов гена AGP1opt (верхние строчки) в сравнении с последовательностью нуклеотидов природного гена ангиопоэтина-1 человека (средние строчки). Показана также последовательность аминокислот кодируемого белкового продукта (нижние строчки). Жирным шрифтом выделена область, кодирующая белок. Подчеркнуты триплеты нуклеотидов, подвергшиеся оптимизации.

На фиг. 3 показана функциональная карта плазмиды pH-CMV1.

На фигуре 4 отображена динамика восстановления перфузии ишемизированной конечности в зависимости от концентрации вектора, содержащего кДНК для экспрессии ангиогенных факторов HGF и Ang-1 (■ 5 мкг, ▲ 20 мкг, ✕ 50 мкг, ✱ 100 мкг и ● 200 мкг ДНК; N=5). betaGal (→) - контрольная плазида, не вызывающая терапевтический эффект, содержащая кДНК бета-галактозидазы, и использованная для оценки эффективности трансфекции. Цифрой 1 отмечены эффективные дозировки, цифрой 2 - неэффективные.

На фигуре 5 показана динамика восстановления перфузии ишемизированной конечности в зависимости от соотношения плазмидных векторов (плазида с кДНК HGF и плазида с кДНК Ang-1) в предлагаемом лекарственном средстве (N=5). Цифрой 3 отмечен график динамики восстановления перфузии ишемизированной конечности при соотношении HGF+ Ang-1 - 1:1, цифрой 4 - 2:1, цифрой 5 - 1:2.

На фигуре 6 показано влияние комбинированного препарата на восстановление кровотока в ишемизированной задней конечности мыши. Верхняя панель - график восстановления кровотока в конечности, оцененного по величине перфузии тканей подошвы кровью. Цифрой 6 отмечен график контрольной группы (n=29), цифрой 7 - при использовании заявляемого средства (n=23). Различия между опытной и контрольной группами достоверны на 14-й и 21-й день (N=25, * p<0,05). Нижняя панель - пример лазерного доплеровского сканирования, где цифрой 8 отмечены задние конечности с нормальным уровнем кровотока.

На фигуре 7 отображено влияние комбинированного препарата на плотность капилляров и артериол в ишемизированной мышце задней конечности мыши. Верхняя панель - результаты обсчета плотности сосудов на срезах мышц, представленные как среднее количество сосудов в одном поле зрения. Результаты даны как среднее значение на группу + стандартное отклонение (цифрой 9 обозначены результаты при использовании контрольной плазмиды, 10 - комбинированного препарата). Нижняя панель - микрофотографии срезов мышц, окрашенных на маркеры капилляров (CD31) (серая область на выделенном фрагменте) и артериол (α -SMA) (светло-серые участки на выделенном фрагменте).

На фигуре 8 показано влияние комбинированного препарата на размер некроза ишемизированных мышц задней конечности мыши. Верхняя панель - средние значения площади некроза на срезах мышц (N=5, *p<0,05). Нижняя панель - репрезентативные фотографии срезов мышц, окрашенных гематоксилином и эозином. Под цифрой 11 приведены результаты при применении комбинированного препарата, 12 - результаты контрольной группы.

На фигуре 9 показано влияние комбинированного препарата на развитие некрозов и ампутаций конечности А и В. Макроскопическая картина сохранной конечности у животного из опытной группы (7 сутки); С - культя конечности с некрозом голени у животного из контрольной группы контрольной плазмиды (7-ые сутки, доплерография не выполнялась).

Осуществление изобретения

Приготовление заявляемого комбинированного средства осуществляли следующим образом.

Для трансформации и наработки плазмидной ДНК рН-CMV1-HGFopt, которая содержит ген фактора роста гепатоцитов, использовали штамм *E. coli* XL1Blue-HGFopt, производный от штамма *E. coli* XL1-Blue.

Для трансформации и наработки плазмидной ДНК рН-CMV1-AGPopt, которая содержит ген ангиопоэтина 1, использовали штамм *E. coli* XL1-Blue-AGPopt, производный от штамма *E. coli* XL1-Blue.

Исходный штамм *E. coli* XL1-Blue является музейным и хранится во Всероссийской Коллекции Промышленных Микроорганизмов.

Трансформированные штаммы *E. coli* XL1-Blue-AGPopt и *E. coli* XL1Blue-HGFopt отличаются от исходного штамма *E. coli* XL1-Blue устойчивостью к антибиотику ампициллину, обеспечиваемой введенной в состав штамма плазмидой рН-CMV1-HGFopt или рН-CMV1-AGPopt.

Штаммы-продуценты XL1Blue-HGFopt и XL1Blue-AGPopt для наработки плазмидных ДНК получали трансформацией исходного штамма *E. coli* XL1-Blue плазмидой, соответственно, рН-CMV1-HGFopt или рН-CMV1-AGPopt, с последующим отбором рекомбинантных клонов на среде LB с ампициллином при 37°C.

Технология получения штаммов-продуцентов трансформацией исходного штамма плазмидой не зависит от типа плазмиды (рН-CMV1-HGFopt или рН-CMV1-AGPopt), поэтому проводили два идентичных процесса получения трансформированного штамма, содержащего одну из плазмид рН-CMV1-HGFopt или рН-CMV1-AGPopt.

Для получения компетентных клеток бактерии исходного штамма *E. coli* XL1-Blue высевали в стерильную пробирку емкостью 15 мл, содержащую 5 мл среды LB (1 л среды LB содержит 10 г триптона, 5 г дрожжевого экстракта, 10 г NaCl, pH среды доводят до 7,5 при помощи 1 М NaOH и стерилизуют автоклавированием). Пробирку инкубировали в течение ночи при 37°C в воздушном термостате. Культуру бактерий перенесли в коническую стеклянную колбу емкостью 2 л, содержащую 400 мл среды LB и инкубировали в шейкере-инкубаторе при 37°C с покачиванием (300 об/мин) до того момента, когда оптическая плотность суспензии бактерий, измеренная при 600 нм, не составила 0,5. Далее суспензию клеток перенесли в охлажденные до 4°C центрифужные стаканы емкостью 250 мл и центрифугировали в рефрижераторной центрифуге при 3000 g в течение 30 мин при 4°C. Осадок клеток суспендировали в 200 мл охлажденного до 4°C стерильного раствора 50 мМ CaCl₂ и инкубировали суспензию при 0°C (во льду) в течение 30 мин, после чего суспензию клеток снова перенесли в охлажденные до 4°C центрифужные стаканы и центрифугировали в рефрижераторной центрифуге при 3000 g в течение 30 мин при 4°C. Осадок клеток суспендировали в 40 мл охлажденного до 4°C стерильного раствора 50 мМ CaCl₂, добавляли 6 мл стерильного глицерина, аликвотировали по 1 мл в ампулы для замораживания клеточных культур и замораживали в жидком азоте. Ампулы хранили при температуре минус 70°C.

Трансформацию компетентных клеток *E. coli* плазмидой проводили следующим образом. Ампулу с суспензией компетентных клеток, хранящуюся при минус 70°C, помещали в лед, дожидались размораживания, и 100 мкл суспензии переносили в стерильную пробирку емкостью 1,5 мл, находящуюся во льду. К суспензии бактерий добавили 1 мкл стерильного раствора 1 мкг/мл плазмидной ДНК в буфере TE (10 мМ Tris-HCl, 0,2 мМ EDTA) и инкубировали в течение 15 мин при 0°C (во льду). Далее пробирку помещали в водяную баню с температурой воды 43°C и инкубировали в течение 60 сек. После инкубации суспензию бактерий перенесли на чашку Петри с

микробиологическим агаром, приготовленным на среде LB и дополнительно содержащим 0,3 мг/мл ампициллина, и инкубировали в течение ночи при 37°C.

Колонии переносили в стерильные стеклянные колбы объемом 100 мл, содержащие 50 мл среды ТВ с 0,3 мг/мл ампициллина и инкубировали в шейкере-инкубаторе при 37°C с покачиванием (300 об/мин) в течение ночи для получения биомассы и измерения выхода плазмиды.

Синтез генов и плазмид осуществляли с помощью стандартной технологии и оборудования, применяемых для решения подобных задач в генной инженерии.

Модификация последовательности гена HGF проводилась таким образом, чтобы при ее включении в состав эукариотического вектора обеспечивался более высокий уровень экспрессии HGF в трансфицированных клетках.

Данный результат достигался модификацией природной последовательности гена HGF, в основе которой лежала вырожденность генетического кода. Последовательность модифицировали таким образом, чтобы триплеты нуклеотидов, кодирующие аминокислоты белковой последовательности фактора роста гепатоцитов, встречались в генах человека наиболее часто. При этом использовали опубликованные в открытых источниках данные по частотам встречаемости ко донов.

Дизайн оптимизированной последовательности нуклеотидов, кодирующей фактор роста гепатоцитов человека HGF, производили следующим образом. Используя частоты встречаемости кодонов, приведенные на веб-сайте http://del.mediaglyphs.org/mg/bf/nucs_aa.html, среди триплетов нуклеотидов, кодирующих аминокислоты белковой последовательности природного гена HGF, выявляли такие, которые встречаются в генах человека наиболее редко. Выявленные редкие триплеты, а также соседние с ними триплеты меняли на триплеты, кодирующие ту же аминокислоту, но при этом встречающиеся в генах человека наиболее часто. Кроме того, с целью повышения стабильности матричной РНК HGF такими же методами из кодирующей белок области природного гена HGF удаляли сигналы разрушения мРНК "АТТТА" и сигналы полиаденилирования "ААТААА" (Barreau C., Paillard L., Osborne B.H. Nucleic Acids Research, 2005, Vol. 33, pp. 7138-7150). В результате благодаря вырожденности генетического кода все аминокислоты природного гена HGF остались неизменными. Получена последовательность нуклеотидов гена фактора роста гепатоцитов HGFopt, представленная на фиг. 1.

кДНК фактора роста гепатоцитов человека HGF получали методом RT-PCR с использованием в качестве матрицы суммарной РНК из печени человека и клонировали в экспрессионный вектор pcDNA3 (Invitrogen, США) с получением плазмиды pcDNA3-hHGF и в экспрессионный вектор pH-CMV1 с получением плазмиды pH-CMV1-hHGF. Плазмиду pH-CMV1-HGFopt, несущую оптимизированный ген HGFopt, получали методом генно-инженерного конструирования как описано ниже.

На первой стадии:

- 40 - химически синтезированную пару олигонуклеотидов
VEC01 (AGCTTGGCATCCGGTACTGTTGGTAAAGCCACCATG) и
VEC02 (GTACCATGGTGGCTTTACCAACAGTACCGGAATGCCA) отжигали, смешивали и клонировали в расщепленный рестриктазами HindIII и Acc65I вектор pUC19 с получением промежуточной плазмиды pUC-KNA;
- 45 - химически синтезированную пару олигонуклеотидов
VEC03 (GCCATGGAGATCTG) и VEC04 (AATTCAGATCTCCATGGCTGCA) отжигали, смешивали и клонировали в расщепленный рестриктазами PstI и EcoRI вектор pBluescriptII-SK⁺ с получением промежуточной плазмиды pBSKN.

На второй стадии проводили серию реакций амплификации с использованием плазмиды pcDNA3-hHGF в качестве матрицы и пар химически синтезированных олигонуклеотидов:

- 5 - HGF3F (GCGGATCCATGTGGGTGACCAAGCTGCTG) и HGF4R (GGGCGGGGTCGATCTTGATCAGGGTGGTC),
- HGF5F (GATCAAGATCGACCCCGCCCTGAAGATCAAGACC) и HGF6R (GTTCTTGGTACATCTATTGGCACACTGGTC),
- HGF7F (GCCAATAGATGTACCAGGAACAAGGGCCTGCCATTC) и HGF8R (GCTGGGCCCTGCAGGTCCTTGCCCCGGTAGCTGGAAGGCAGAAAGC),
- 10 - HGF11F (CGGAGCTCATGCATCCAGGGCCAGGGCGAGGGCTAC) и HGF12R (GGATTCGGCAGTAGTTCTCCCGCAGGTCC),
- HGF13F (GGACCTGCGGGAGAАCTACTGCCGGAATCC) и HGF14R (GGCCAGATCTGGTCTGGGACAGGTTGCC),
- HGF15F (GACCAGATCTGGCCTGACCTGTTCAA) и HGF16R (GATGTGCCGGTGCAGGTCCTCCATG),
- 15 - HGF17F (GGACCTGCACCGGCACATCTTCTGG) и HGF18R (GCGCCCGGGTGGTCCAGGTTACGATGGTAGG),
- HGF21F (GCGAGCTCGAAGACCAAGCAGCTGCGGGTGGTGAACGGGATCCCAAC) и HGF22R (GCCGCAGATGTGCTTGTCTTCTGTATCTCAGACTAACC),
- 20 - HGF23F (GAAACAAGCACATCTGCGGCGGCTCCCTGATCAAGGAG) и HGF26R (GTAGTTAGGCAGGTCGATGGTGTGCTCACAAA),
- HGF25F (GATCAGATCTGGTGTGCTGATGAAGCTGGCCAGG) и HGF26R (GTAGTTAGGCAGGTCGATGGTGTGCTCACAAA),
- HGF27F (ATCGACCTGCCTAACTACGGATGC) и HGF28R (GCCACCCGCAGCAGGCCGTCGTAGTTGATCAGTCCAG),
- 25 - HGF29F (GACGGCCTGCTGCGGGTGGCCACCTGTACATCATGGG) и HGF30R (GCGAGCTCGAAGACCTTGTAGGTCAGGATGATCTTGTGGATCC) в качестве прямого и обратного праймеров.

В результате получали фрагменты ДНК, соответственно, HGF3-4, HGF5-6, HGF7-8, HGF11-12, HGF13-14, HGF15-16, HGF17-18, HGF21-22, HGF23-26, HGF25-26, HGF27-28, HGF29-30, которые очищали при помощи электрофореза в агарозном геле и электроэлюции.

- На третьей стадии проводили серию реакций амплификации с использованием
- 35 - фрагментов ДНК HGF3-4 и HGF5-6 в качестве матрицы и олигонуклеотидов HGF3F и HGF6R в качестве праймеров;
 - фрагментов ДНК HGF5-6 и HGF7-8 в качестве матрицы и олигонуклеотидов HGF5F и HGF8R в качестве праймеров,
 - фрагментов ДНК HGF11-12 и HGF13-14 в качестве матрицы и олигонуклеотидов HGF11F и HGF14R в качестве праймеров;
 - 40 - фрагментов ДНК HGF15-16 и HGF17-18 в качестве матрицы и олигонуклеотидов HGF15F и HGF18R в качестве праймеров;
 - фрагментов ДНК HGF21-22 и HGF23-26 в качестве матрицы и олигонуклеотидов HGF21F и HGF26R в качестве праймеров;
 - фрагментов ДНК HGF25-26 и HGF27-28 в качестве матрицы и олигонуклеотидов HGF25F и HGF28R в качестве праймеров;
 - 45 - фрагментов ДНК HGF27-28 и HGF29-30 в качестве матрицы и олигонуклеотидов HGF27F и HGF30R в качестве праймеров.

В результате получали фрагменты ДНК, соответственно, HGF3-6, HGF5-8, HGF11-

14, HGF15-18, HGF21-26, HGF25-28, HGF27-30, которые очищали при помощи электрофореза в агарозном геле и электроэлюции.

На четвертой стадии проводили реакции амплификации с использованием

5 - фрагментов ДНК HGF3-6 и HGF5-8 в качестве матрицы и олигонуклеотидов HGF3F и HGF8R в качестве праймеров;

- фрагментов ДНК HGF25-28 и HGF27-30 в качестве матрицы и олигонуклеотидов HGF25F и HGF30R в качестве праймеров.

В результате получали фрагменты ДНК, соответственно, HGF3-8 и HGF25-30, которые очищали при помощи электрофореза в агарозном геле и электроэлюции.

10 На пятой стадии фрагмент ДНК HGF3-8

- расщепляли рестриктазами *Vam*HI и *Apa*I и клонировали в расщепленный теми же рестриктазами вектор pBluescriptII-SK⁺ с получением промежуточной плазмиды pBSK-HGF3-8;

15 - фрагмент ДНК HGF11-14 расщепляли рестриктазами *Bgl*II и *Sac*I и клонировали в расщепленную теми же рестриктазами плазмиду pBSKN с получением промежуточной плазмиды pBSKN-HGF11-14;

- фрагмент ДНК HGF15-18 расщепляли рестриктазами *Bgl*II и *Sma*I и клонировали в расщепленную теми же рестриктазами плазмиду pBSKN с получением промежуточной плазмиды pBSKN-HGF15-18;

20 - фрагмент ДНК HGF21-24 расщепляли рестриктазами *Bgl*II и *Sac*I и клонировали в расщепленную теми же рестриктазами плазмиду pBSKN с получением промежуточной плазмиды pBSKN-HGF21-24;

25 - фрагмент ДНК HGF25-30 расщепляли рестриктазами *Bgl*II и *Sac*I и клонировали в расщепленную теми же рестриктазами плазмиду pBSKN с получением промежуточной плазмиды pBSKN-HGF25-30.

Встраивание соответствующих последовательностей ДНК подтверждали секвенированием.

На шестой стадии

30 - химически синтезированную пару олигонуклеотидов HGF9S (GGAGAACTACTGCCGGAACCC) и HGF10A

(TCGAGGGTTCGGCAGTAGTTCTCCTGCA), *Vam*HI-SbfI фрагмент плазмиды pBSK-HGF3-8 и *Xho*I-EcoRI фрагмент плазмиды pсDNA3-hHGF клонировали в вектор

35 pBluescriptII-SK⁺, расщепленный рестриктазами *Vam*HI и *Eco*RI, с получением промежуточной плазмиды pBSK-HGF3-10Z;

- *Sac*I-*Bgl*II фрагмент плазмиды pBSKN-HGF11-14 и *Bgl*II-*Sma*I фрагмент плазмиды pBSKN-HGF15-18 клонировали в вектор pBluescriptII-SK⁺, расщепленный рестриктазами *Sac*I и *Sma*I, с получением промежуточной плазмиды pBSK-HGF11-18;

40 - химически синтезированную пару олигонуклеотидов HGF31S (TACAAGGTGCCACAGTCCTGATATCTGCAGT) и

HGF32A (CTAGACTGCAGATATCAGGACTGTGGCACCT), *Sac*I-*Bgl*II фрагмент плазмиды pBSKN-HGF21-24 и *Bgl*II-*Bbs*I фрагмент плазмиды pBSKN-HGF25-30

клонировали в вектор pBluescriptII-SK⁺, расщепленный рестриктазами *Sac*I и *Xba*I, с получением промежуточной плазмиды pBSK-HGF21-32.

45 Встраивание соответствующих последовательностей ДНК подтверждали секвенированием.

На седьмой стадии

- химически синтезированную пару олигонуклеотидов HGF1S (CATGTGG) и HGF2A

(GTCACCCA) и BstEII-Acc65I фрагмент плазмиды pBSK-HGF3-10Z клонировали в плазмиду pUC-KNA, расщепленную рестриктазами NcoI и Acc65I, с получением промежуточной плазмиды pUC-KHGF1-10Z;

- химически синтезированную пару олигонуклеотидов HGF19S

5 (CGTGATCTCTTGCGCCAAGACCA) и HGF20A (TGCTTGGTCTTGGCGCAAGAGATCACG) и SacI-SmaI фрагмент плазмиды pBSK-HGF11-18 клонировали в плазмиду pBSK-HGF21-32, расщепленную рестриктазами SacI и BbsI, с получением промежуточной плазмиды pBSK-HGF11-32.

10 Встраивание соответствующих последовательностей ДНК подтверждали секвенированием.

На восьмой стадии NcoI-Zsp2I фрагмент плазмиды pBSKN-HGF3-10Z и Zsp2I-Acc65I фрагмент плазмиды pBSKN-HGF11-32 клонировали в плазмиду pUC-KHGF1-10Z, расщепленную рестриктазами NcoI и Acc65I, с получением промежуточной плазмиды pUC-HGFopt.

15 Встраивание соответствующих последовательностей ДНК подтверждали рестриктным анализом полученной плазмиды.

На девятой стадии HindIII-SbfI фрагмент и SbfI-XbaI фрагмент плазмиды pUC-HGFopt клонировали в экспрессионный вектор pH-CMV1, расщепленный рестриктазами HindIII и XbaI, с получением плазмиды pH-CMV1-HGFopt. Правильность встраивания 20 оптимизированного гена HGFopt и соответствие дизайну его нуклеотидной последовательности подтверждали рестриктным анализом и секвенированием полученной плазмиды.

Модификация последовательности гена ангиопоэтина-1 проведена таким образом, чтобы при ее включении в состав эукариотического вектора обеспечивался более 25 высокий уровень экспрессии целевого белка в клетках, трансфицированных сконструированным вектором.

Дизайн оптимизированной последовательности нуклеотидов, кодирующей ангиопоэтин-1 человека, производили следующим образом. Используя частоты встречаемости кодонов, приведенные на веб-сайте http://de1.mediaglyphs.org/mg/bf/nucs_aa.html, среди триплетов нуклеотидов, кодирующих аминокислоты белковой 30 последовательности природного гена ангиопоэтина-1, выявляли такие, которые встречаются в генах человека наиболее редко. Выявленные редкие триплеты, а также соседние с ними триплеты меняли на триплеты, кодирующие ту же аминокислоту, но при этом встречающиеся в генах человека наиболее часто. Кроме того, с целью 35 повышения стабильности матричной РНК ангиопоэтина-1 такими же методами из кодирующей белок области природного гена ангиопоэтина-1 удаляли сигналы разрушения мРНК "АТТТА" и сигналы полиаденилирования "ААТААА". В результате благодаря вырожденности генетического кода все аминокислоты природного гена ангиопоэтина-1 остались неизменными.

40 Получена следующая последовательность нуклеотидов гена AGPopt ангиопоэтина 1, представленная на фиг. 2.

кДНК ангиопоэтина-1 получали методом RT-PCR с использованием в качестве матрицы суммарной РНК из печени человека и клонировали в экспрессионный вектор pсDNA3 (Invitrogen, США) с получением плазмиды pсDNA3-hAGP и в экспрессионный 45 вектор pH-CMV1 с получением плазмиды pH-CMV1-hAGP. Плазмиду pH-CMV1-AGPopt, несущую оптимизированный ген AGPopt, получали методом генно-инженерного конструирования, как описано ниже.

На первой стадии

- химически синтезированную пару олигонуклеотидов
VEC01 (AGCTTGGCATCCGGTACTGTTGGTAAAGCCACCATG) и
VEC02 (GTACCATGGTGGCTTTACCAACAGTACCGGAATGCCA) отжигали, смешивали
и клонировали в расщепленный рестриктазами HindIII и Acc65I вектор
pUC19 с получением промежуточной плазмиды pUC-KNA;

- химически синтезированную пару олигонуклеотидов
VEC05 (AGCTTGGCATCCGGTACTGTTGGTAAAGCCACCATGG) и
VEC06 (GATCCATGGTGGCTTTACCAACAGTACCGGAATGCCA) отжигали, смешивали
и клонировали в расщепленный рестриктазами HindIII и BamHI вектор pBluescriptII-SK⁺
с получением промежуточной плазмиды pBSK-KNB.

На второй стадии проводили серию реакций амплификации с использованием
плазмиды pcDNA3-hAGP в качестве матрицы и пар химически синтезированных
олигонуклеотидов

- AGP1F (GCGGATCCATGACCGTGTTCCTGTCCCTTTGCCTTCCTGGCCG) и
AGP2R (GTGAATTCTCCAGCAGCTGGATCTCCAGCCGGGAGGTCTGATTCAGCACC),

- AGP39F (GAGCCCGGGGCTGGAAGGAATATAAAATGG) и
AGP40R (CCATCAGCTCAATTCTCAGCATG),

- AGP41F (CATGCTGAGAATTGAGCTGATGG) и

AGP42R (GTGGCCCTTCAGGTACAGCCTGTAGTTCTGCTTTTC),

- AGP43F (CAGAACTACAGGCTGTACCTGAAGGGCCACACTGG) и

AGP44R (GCACCGTGCAGGATCAGGCTGC),

- AGP45F (GCAGCCTGATCCTGCACGGTGC) и

AGP46R (CATCCTCCGGTCAGCATGAGG),

- AGP47F (CCTCATGCTGACCGGAGGATG) и AGP48R (CGGATCCATGGTTCTGGCC

GGCAGTATAGAACATTCATTCAGATTG в качестве прямого и обратного праймеров.

В результате получали фрагменты ДНК, соответственно, AGP1-2, AGP39-40, AGP41-
42, AGP43-44, AGP45-46, AGP47-48, которые очищали при помощи электрофореза в
агарозном геле и электроэлюции.

На третьей стадии проводили реакцию амплификации с использованием фрагментов
ДНК AGP39-40 и AGP41-42 в качестве матрицы и олигонуклеотидов AGP39F и AGP42R
в качестве праймеров; а также реакцию амплификации с использованием фрагментов
ДНК AGP45-46 и AGP47-48 в качестве матрицы и олигонуклеотидов AGP45F и AGP48R
в качестве праймеров. В результате получали фрагменты ДНК, соответственно, AGP39-
42 и AGP45-48, которые очищали при помощи электрофореза в агарозном геле и
электроэлюции.

На четвертой стадии проводили реакцию амплификации с использованием фрагментов
ДНК AGP39-42 и AGP43-44 в качестве матрицы и олигонуклеотидов AGP39F и AGP44R
в качестве праймеров; а также реакцию амплификации с использованием фрагментов
ДНК AGP43-44 и AGP45-48 в качестве матрицы и олигонуклеотидов AGP43F и AGP48R
в качестве праймеров. В результате получали фрагменты ДНК, соответственно, AGP39-
44 и AGP43-48, которые очищали при помощи электрофореза в агарозном геле и
электроэлюции.

На пятой стадии проводили реакцию амплификации с использованием фрагментов
ДНК AGP39-44 и AGP43-48 в качестве матрицы и олигонуклеотидов AGP39F и AGP48R
в качестве праймеров. В результате получали фрагмент ДНК AGP39-48, который
очищали при помощи электрофореза в агарозном геле и электроэлюции.

На шестой стадии фрагмент ДНК AGP1-2 расщепляли рестриктазами BamHI и EcoRI
и клонировали в расщепленный теми же рестриктазами вектор pBluescriptII-SK⁺ с

получением промежуточной плазмиды pBSK-AGP1-2;

химически синтезированные пары олигонуклеотидов:

- AGP11S (GCAGACCAATGAGATCCTGAAGATCCAC) и AGP12A (CTTCAGGATCTCATTTGGTCTGCTGCA),

5 - AGP13S (GAGAAGAACAGCCTGCTGGAGCACAAGATCCTGG) и AGP14A (TCTTGTGCTCCAGCAGGCTGTTCTTCTCGTGGAT),

- AGP15S (AGATGGAGGGCAAGCACAAGGAGGAGCT) и AGP16A

(CCTCCTTGTGCTTGCCCTCCATCTCCAGGA) клонировали в вектор pBluescriptII-SK+, расщепленный рестриктазами PstI и SacI, с получением промежуточной плазмиды pBSK-
10 AGP11-16

химически синтезированные пары олигонуклеотидов:

- AGP19S (GGGCCTGGTGACCCGGCAGACCTACATCATCCAG) и AGP20A (GATGTAGGTCTGCCGGGTCACCAGGCCCTGCA),

15 - AGP21S (GAGCTGGAGAAGCAGCTGAACAGAGCCACCACCA) и AGP22A (TGGCTCTGTTTCAGCTGCTTCTCCAGCTCCTGGAT),

- AGP23S (ACAACAGCGTGCTGCAGAAGCAGCAGCTGGAGCT) и

AGP24A (CCAGCTGCTGCTTCTGCAGCACGCTGTTGTTGGTGG) клонировали в вектор pUC19, расщепленный рестриктазами PstI и SacI, с получением промежуточной плазмиды pUC-AGP19-24;

20 химически синтезированные пары олигонуклеотидов:

- AGP31S (GTACCAGGCCGGCTTCAACAAGAGCGGCATCTACACCATC) и AGP32A (GTGTAGATGCCGCTCTTGTGAAGCCGGCCTG),

- AGP33S (TACATCAACAACATGCCCCGAGCCCAAGAAGGTGTTCTGCA) и

AGP34A (GAACACSTTCTTGGGCTCGGGCATGTTGTTGATGTAGATG) клонировали

25 в вектор pBluescriptII-SK+, расщепленный рестриктазами PstI и Acc65I, с получением промежуточной плазмиды pBSK-AGP31-34;

химически синтезированные пары олигонуклеотидов:

- AGP5S (CAGCTACTCCCTGCGGTCCACCACC) и

AGP6A (CATCATGGTGGTGGACCGCAGGGAGTAGCTGGGGCC),

30 - AGP7S (ATGATGATTCGGCCTCTGGACTTTTGATATCTGCAG) и

AGP8A (GATCCTGCAGATATCAAAAGTCCAGAGGCCGAAT) и NcoI-ApaI фрагмент

плазмиды pcDNA3-hAGP клонировали в плазмиду pBSK-KNB, расщепленную рестриктазами NcoI и BamHI, с получением промежуточной плазмиды pBSK-AGPN-8.

35 Фрагмент ДНК AGP39-48 расщепляли рестриктазами BamHI и SmaI и клонировали

в расщепленный теми же рестриктазами вектор pBluescriptII-SK+ с получением промежуточной плазмиды pBSK-AGP39-48. Встраивание соответствующих последовательностей ДНК подтверждали секвенированием.

На седьмой стадии

40 - химически синтезированную пару олигонуклеотидов

AGP3S (CATGACCGTGTTCCTGTCCTTTGCCTTCC) и

AGP4A (AGGCAAAGGACAGGAACACGGT) и PstI-SacI фрагмент плазмиды pBSK-AGP11-16 клонировали в плазмиду pUC-KNA, расщепленную рестриктазами NcoI и EcoRI, с получением промежуточной плазмиды pUC-KAGP3-2;

45 - химически синтезированную пару олигонуклеотидов

AGP9S (AATTCACCTGTCCACCTACAAGCTGGAGAAGCAGCTGCTGCA) и AGP10A

(GCAGCTGCTTCTCCAGCTTGTAGGTGGACAGTG) и PstI-SacI фрагмент плазмиды pBSK-AGP11-16 клонировали в вектор pUC19, расщепленный рестриктазами EcoRI и SacI, с получением промежуточной плазмиды pUC-AGP9-16;

- химически синтезированные пары олигонуклеотидов
 AGP25S (GATGGACACCGTGCACAACCTGGTGAACCTGTGCACCAAGG) и
 AGP26A (GGTGCACAGGTTACCAGGTTGTGCACGGTGTCCATCAGCT),
 AGP27S (AGGGCGTGCTGCTGAAGGGCGGCAAGAGAGAGGA) и
 5 AGP28A (СТСТТСТТСТТТГССГСССТТТСАГСАГСАГСССТТСТТ),
 AGP29S (AGAGAAGCCSTTCCGGGACTGCGCCGACGTGTACAAGCTTG) и
 AGP30A (AATTCAAGCTTGTACACGTCCGGCGCAGTCCCGGAAGGGCTT) клонировали
 в плазмиду рUC-AGP19-24, расщепленную рестриктазами SacI и EcoRI, с получением
 промежуточной плазмиды рUC-AGP19-30;

10 - химически синтезированные пары олигонуклеотидов
 AGP35S (ACATGGACGTGAACGGCGGCGGCTGGACCGT) и
 AGP36A (GATCACGGTCCAGCCGCGCCGTTTACGTCCATGTTGCA),
 AGP37S (GATCCAGCACCGGGAGGACGGCAGCCTGGACTTCCAGCGCT) и
 AGP38A (СТАГАГСАГСТГГААГТССАГГСТГССГТССТСССГГТГСТГ) клонировали
 15 в плазмиду рBSK-AGP31-34, расщепленную рестриктазами PstI и XbaI, с получением
 промежуточной плазмиды рBSK-AGP31-38. HindIII-NcoI фрагмент плазмиды рBSK-
 AGP39-48 клонировали в плазмиду рBSK-AGPN-8, расщепленную рестриктазами HindIII
 и NcoI, с получением промежуточной плазмиды рBSK-AGP39-8. Встраивание
 соответствующих последовательностей ДНК подтверждали секвенированием.

20 На восьмой стадии

- HindIII-EcoRI фрагмент плазмиды рUC-KAGP3-2 и EcoRI-NcoI фрагмент плазмиды
 рсDNA3-hAGP клонировали в плазмиду рBSK-AGPN-8, расщепленную рестриктазами
 HindIII и NcoI, с получением промежуточной плазмиды рBSK-KAGP;

- химически синтезированную пару олигонуклеотидов
 25 AGP17S (GGACACCCTGAAGGAGGAGAAGGAGAACCTGCA) и
 AGP18A (GGTTCTCCTTCTCCTCCTTCAAGGGTGTCCAGCT) и SbfI-HindIII фрагмент
 плазмиды рUC-AGP19-30 клонировали в плазмиду рUC-AGP9-16, расщепленную
 рестриктазами SacI и HindIII, с получением промежуточной плазмиды рUC-AGP9-30;
 - Acc65I-Eco47III фрагмент плазмиды рBSK-AGP31-38 клонировали в плазмиду рBSK-
 30 AGP39-8, расщепленную рестриктазами Acc65I и SmaI, с получением промежуточной
 плазмиды рBSK-AGP31-8.

Встраивание соответствующих последовательностей ДНК подтверждали рестриктным
 анализом и секвенированием полученных плазмид.

35 На девятой стадии EcoRI-BsrGI фрагмент плазмиды рUC-AGP9-30 и Acc65I-BamHI
 фрагмент плазмиды рBSK-AGP31-8 клонировали в плазмиду рBSK-KAGP, расщепленную
 рестриктазами EcoRI и BamHI, с получением промежуточной плазмиды рBSK-KAGPort.
 Встраивание соответствующих последовательностей ДНК подтверждали рестриктным
 анализом полученной плазмиды.

40 На десятой стадии HindIII-BamHI фрагмент плазмиды рBSK-KAGPort клонировали
 в высокоэффективный экспрессионный вектор рН-СМV1, расщепленный рестриктазами
 HindIII и BamHI, с получением плазмиды рН-СМV1-AGPort. Правильность встраивания
 оптимизированного гена AGPort и соответствие дизайну его нуклеотидной
 последовательности подтверждали рестриктным анализом и секвенированием
 45 полученной плазмиды. Функциональная карта плазмиды рН-СМV1, предназначенной
 для экспрессии генов HGF и ангиопоэтина-1 человека в клетках млекопитающих,
 представлена на фиг. 3.

Способ терапевтического ангиогенеза заключался во введении внутримышечно
 терапевтически эффективного количества физиологического раствора, содержащего

смесь плазмидных конструкций pH-CMV-HGFopt и pH-CMV-Ang-1opt в концентрации суммарно 1 мг/мл. Комбинированное лекарственное средство получали смешением концентратов ингредиентов в заданных соотношениях и разведением в растворе стерильного 0,9%-ного NaCl до концентрации 1 мг/мл.

5 Пример 1

Комбинированное средство получали путем смешивания растворов двух плазмид в массовом соотношении 1:1. Полученную смесь разводили изотоническим раствором хлорида натрия (0,9% NaCl) до получения концентрации активных компонентов (основного вещества) 1 мкг/мл.

10 Препарат использовали в виде раствора плазмид для внутримышечного введения по 4 мг основного вещества в 4 мл стерильного изотонического раствора хлорида натрия (концентрация основного вещества составит 1 мг/мл) в стерильных стеклянных флаконах объемом 5 мл.

Пример 2

15 Подбор оптимальной и эффективной дозы для внутримышечного введения осуществляли в экспериментах по изучению динамики восстановления перфузии ишемизированной конечностей (мыши C57/Black, N=5) при введении плазмид в разных концентрациях.

Предлагаемое комбинированное лекарственное средство оказывает эффект в дозе
20 от 3 мг/75 кг веса до 10 мг/75 кг веса, при внутримышечном введении. С целью использования наиболее эффективной и безопасной лечебной дозы была выбрана доза 4 мг на 75 кг массы тела, что соответствует 53,3 мкг/кг веса. Как показали эксперименты по введению предлагаемого комбинированного лекарственного средства лабораторным животным в этой дозе, а также тысячекратно их превышающих показали безопасность
25 его использования. Эксперименты по изучению динамики восстановления перфузии ишемизированной конечностей (мыши C57/Black, N=5) при введении плазмид в разных концентрациях показали (фиг. 4), что максимальный терапевтический эффект у мышей наблюдается при введении предлагаемого комбинированного средства в дозе 50 мкг ДНК.

30 Исходя из данных таблицы 1 видно, что при дозировке 20 мкг предлагаемого комбинированного средства экспрессия ангиогенных факторов HGF и Ang-1 присутствует, однако, терапевтический эффект оказывается недостаточен для эффективного восстановления ишемии у мышей (фиг. 4). Введение предлагаемого комбинированного средства в концентрациях ниже 50 мкг (5 мкг и 20 мкг) вызывает
35 эффект восстановления перфузии ишемизированной конечности, сравнимый с введением контрольной плазмиды, содержащей кДНК betaGal. При использовании дозы предлагаемого комбинированного средства 50 мкг экспрессия ангиогенных факторов увеличивается более чем в 2 раза. Использование больших концентрации предлагаемого средства для трансфекции не вызывает увеличения наработки трансенов (ангиогенных
40 факторов), и, в то же время, не дают повышения терапевтического эффекта по сравнению с дозой в 50 мкг (фиг. 4). При использовании больших концентраций ДНК (100 мкг и 200 мкг) увеличения терапевтического эффекта не наблюдается, поскольку при этих концентрациях кривая выходит на плато к 21-му дню после начала эксперимента. Таким образом, сделан вывод о том, что достаточной и наиболее эффективной дозой для
45 внутримышечного введения мышам является 50-55 мкг предлагаемого комбинированного средства (таблица 1). Однако у людей терапевтический эффект достигается и при введении указать интервал значений от 40 мкг/1 кг веса до 133,3 мкг/1 кг веса.

Концентрация ангиогенных факторов HGF и Ang-1 в среде культивирования
 5 экспланта мышцы мыши, взятой через 72 ч после введения предлагаемого лекарственного
 средства в различных концентрациях (соотношение плазмид 1:1, N=4, p<0,05).

Трансген	Содержание трансгена, экспрессируемого тканями после трансфекции лекарственным средством			
	20 мкг	50 мкг	100 мкг	200 мкг
Конц. HGF, мкг/мл	0,4	1,3	1,42	0,6
Конц. Ang-1, мкг/мл	0,4	1,9	2,0	1,5

Таким образом, использование предлагаемого лекарственного средства свыше 50
 15 мкг при трансфекции не вызывает какого-либо усиления наработки трансгенов в ткани
 мышцы, и не улучшает терапевтический эффект. Несмотря на то что введение больших
 концентрация предлагаемого лекарственного средства не является токсичным.

Так как предлагаемое лекарственное средство представляет собой смесь двух плазмид,
 отличающихся между собой участками кДНК, кодирующими гены факторов роста
 20 (HGF и Ang-1), которые при этом находятся под идентичными промоторами, что
 предполагает схожий уровень экспрессии трансгена, было предположено, что
 оптимальное соотношение плазмид в составе препарата 1:1. Терапевтический эффект
 по восстановлению перфузии ишемизированной конечности достигается и при
 соотношении плазмид для экспрессии генов HGF и Ang-1 от 1:2 до 2:1 (фиг. 5). Исходя
 25 из наших экспериментальных данных, полученных ранее по анализу трансфекции
 клеток *in vitro* и тканей *in vivo* (фиг. 5), сделан вывод о том, что оптимальным
 соотношением плазмид в предлагаемом лекарственном средстве является 1:1.

При этом происходит локальная доставка генетического материала в поврежденную
 зону и локальная сверхэкспрессия факторов роста, последовательность которых
 30 закодирована в плазмиде, что и обеспечивает направленный рост сосудов в зону ишемии
 и вслед за этим эффективную регенерацию поврежденной ткани.

Таким образом, в результате проведенных исследований был сделан вывод о том,
 что оптимальной лекарственной формой предлагаемого средства является
 35 изотонический раствор плазмидных ДНК, кодирующих факторы HGF и Ang-1, в
 соотношении 1:1. Оптимальной и наиболее эффективной дозой для внутримышечного
 введения является 4 мг средства на 75 кг веса.

Пример 3

Для исследования специфической терапевтической активности комбинированного
 40 генного лекарственного средства, предназначенного для индукции роста новых
 кровеносных сосудов и восстановления кровоснабжения тканей ишемизированных
 нижних конечностей, было изучено влияние препарата на восстановление кровотока
 в ишемизированной конечности мыши с помощью лазерного доплеровского
 сканирования, изучено влияние препарата на восстановление васкуляризации
 ишемизированной конечности мыши, частоту ампутаций и размер некроза
 45 ишемизированной конечности мыши. В работе была использована модель ишемии
 задней конечности мыши, подробно описанная ранее в работах Couffinhal с соавторами
 [Couffinhal T., Silver M., Kearney M., Sullivan A., Witzenbichler B. et al. Impaired collateral
 vessel development associated with reduced expression of vascular endothelial growth factor in
 ApoE^{-/-} mice. *Circulation*. 1999; Jun 22; 99(24): 3188-3198.] в собственной модификации.

В экспериментах использовали мышей линии C57/Black; наркоз вводили с помощью интраперитонеальной инъекции, операцию проводили под стереомикроскопом Olympus SZX16 (Olympus). В левой бедренной области мышцы выполняли разрез по линии проекции a. femoralis. Бедренную артерию выделяли на протяжении ее дистальной части и перевязывали шелковой нитью размером 6/0 проксимальнее точки подколенной бифуркации с сохранением интактных v. femoralis и n. ischiadicus.

При внутримышечном введении комбинированный препарат вводили в m. tibialis anterior трехкратно непосредственно после индукции ишемии в суммарном объеме 200 мкл (концентрация плазмидной ДНК составила 1 мкг/мкл). В контроле мышам при таких же условиях вводили контрольную плазмиду, в качестве которой использован рhCMU1 - пустой вектор, без вставки гена, в суммарном объеме 200 мкл (концентрация плазмидной ДНК составила 1 мкг/мкл).

Для оценки восстановления подкожного кровотока на подошвенной поверхности задних лап мышей использовали лазерный доплеровский сканер (Laser Doppler Imaging System, Moor). Измерения проводили сразу после операции и затем каждые 5 дней вплоть до 20-х суток. В экспериментальную обработку включали только данные, полученные при условии, что разница в результатах двух последовательных измерений, проведенных с интервалом в 5 минут, не превышала 5%. Для исключения влияния внешних факторов данные обрабатывали в виде отношения условных значений кровотока в ишемизированной конечности к кровотоку в интактной (здоровой) лапе у одной и той же мыши. Данные представлены в формате среднего \pm стандартное отклонение (СО); планки погрешности на графиках отражают СО. Статистическая оценка различий показателей перфузии проводилась по U-критерию Манна-Уитни, значимыми принимались отличия при $p < 0,05$. На приведенном рисунке (фиг. 6) видно, что максимальный эффект восстановлению кровотока от введения комбинированного препарата регистрировался на 20-е сутки. При этом в группе отрицательного контроля (введение контрольной плазмиды) отмечалась четкая тенденция к слабой перфузии тканей кровью и выходу ее на плато на уровне 40% от нормы между 15-ми и 20-ми сутками. При введении комбинированного препарата отмечалось значительное улучшение восстановления кровотока: перфузия тканей к 20-му дню превышала 60% от уровня перфузии в здоровой конечности. В целом, следует отметить, что использование комбинированного препарата характеризовалось более динамичной реперфузией конечности уже к 15-му дню: кровоток в этой точке был достоверно выше в опытной группе, чем в контроле, однако, максимальным этот эффект становился лишь к 20-м суткам. Полученные результаты убедительно демонстрируют эффективность использования комбинированного препарата для восстановления кровотока в ишемизированной задней конечности мыши.

Для оценки специфической ангиогенной эффективности по восстановлению кровотока с использованием комбинированного препарата мы исследовали его влияние на рост сосудов в ишемизированной конечности мыши. Образцы мышц, полученные на 15-е сутки после экспериментальной ишемии и введения предлагаемого средства (или контрольной плазмиды), замораживали в жидком азоте в среде O.C.T. Tissue-Tek (Sakura) и делали криосрезы толщиной 7 мкм для иммунофлуоресцентного окрашивания. Препараты анализировали при помощи инвертированного флуоресцентного микроскопа Axiovert 200M (Zeiss). Документирование изображений и последующую их обработку производили с помощью цифровой видеокамеры AxioCam HRC (Zeiss) в программах Axiovision 3.1 (Zeiss) и MetaMorph 7.1.0.0 (Universal Imaging Corporation). Для каждого криосреза m. tibialis anterior, окрашенного двойным флуоресцентным методом на

присутствие антигенов CD31 и α -SMA, с помощью цифровой фотокамеры получали серию изображений, на которых проводили подсчет количества CD31-положительных и α -SMA-положительных структур с последующей статистической обработкой данных. Данные представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение (СО). Сравнение количества капилляров проводили с помощью t-критерия Стьюдента, сравнение плотности SMA-положительных структур - с помощью U-критерия Манна-Уитни; в обоих случаях значимыми считались различия с $p < 0,05$.

При анализе окрашенных криосрезов образцов ткани мышц и подсчете капилляров и артериол (после усреднения на поле зрения с увеличением в 200 раз) оказалось, что к 15-му дню плотность капилляров (число капилляров в единице поля зрения) (CD31-положительных структур) была достоверно выше на срезах, полученных от животных, которым вводили комбинированный препарат, по сравнению с введением контролем. Что касается плотности артериол, была отмечена лишь тенденция к ее увеличению в группе комбинированный препарат по сравнению с контролем. При этом статистическая значимость различий была больше 0,05 (фиг. 7 и данные Таблицы 2).

Таблица 2.

Влияние комбинированного препарата на плотность капилляров и артериол на срезах ишемизированных мышц задней конечности мыши.

Образец	α -SMA (+) сосуды	P по сравнению с контролем*	CD31 (+) капилляры	P по сравнению с контролем *
Контроль	4,2 \pm 1,9	-	362,9 \pm 124,12	-
Комбинированный препарат	5,15 \pm 2,9	0,21	520,1 \pm 41,17*	0,003

* t-критерий Стьюдента; данные представлены как $M \pm$ стандартное отклонение.

При окрашивании криосрезов с помощью гематоксилина-эозина признаками некроза являлись разрушение нормальной морфологии волокон (на поперечном срезе волокно здоровой скелетной мышцы имеет полигональную форму с периферически расположенными ядрами), кариолизис, инфильтрация клетками воспаления или замещение мышц рубцовой тканью. При оценке площади некроза на криосрезках ишемизированных мышц было обнаружено, что площадь некроза в образцах мышц, которым вводили комбинированный препарат, была более чем в 2 раза меньше по сравнению с площадью некроза в образцах мышц, которым вводили контрольную плазмиду (фиг. 8, верхняя панель).

Представленные результаты по исследованию влияния комбинированного препарата на развитие некроза в ишемизированной конечности свидетельствуют о его тканепротективном действии, которое обусловлено как ангиогенным эффектом HGF и Ang-1, так и анти-апоптотическим эффектом этих факторов на клетки ткани.

Для оценки частоты некрозов и ампутаций ишемизированной конечности была использована мышечная модель лигирования и пересечения а. femoralis на границе средней и нижней 1/3 бедра с сохранением n. ischiadicus. После операции животным в m. bicepsfemoris однократно вводили 200 мкл раствора, содержащего 200 мкг комбинированного препарата или 200 мкл раствора контрольной плазмиды в той же концентрации. На 7-е сутки проводилась оценка протяженности некроза конечности и/или наличие ампутации конечности. Встречаемость патологических изменений приведена в виде частоты/процентов, оценка значимости различий проводилась с помощью критерия χ^2 , значимыми считались различия с уровнем $p < 0,05$. Было

обнаружено, что при введении контрольной плазмиды частота ампутаций составила 66,7% в контрольной группе, а в группе мышей, которым вводили комбинированный препарат, частота ампутаций была снижена практически на 50% и составила 33,3%. Полученные в эксперименте данные суммированы в Таблице 3.

Таблица 3.

Частоты некрозов и ампутаций к 7 суткам среди мышей BALB-c после введения плазмид (* р в сравнении с контрольной плазмидой = 0,045).

Группа	Дистальные некрозы	Средние некрозы	Высокие некрозы	Всего
Опытная группа (N=6)	1	1	0*	2/6 (33,3%)
Контрольная плазида (N=6)	0	2	2	4/6 (66,7%)

На снимках (фиг. 9) приведены макроскопические картины наблюдавшиеся в группах исследования некротических изменений после введения плазмид и соответствующие им изменения при доплеровском сканировании.

Обобщая результаты, полученные моделях ишемии *in vivo*, можно сделать вывод о том, что комбинированное лекарственное средство на основе невирусных конструкций, несущих гены фактора роста гепатоцитов и ангиопоэтина 1 человека, обладает специфической биологической активностью: при введении в мышцы с нарушенным кровоснабжением стимулирует восстановления перфузии тканей конечности кровью, их васкуляризацию, уменьшает некроз тканей и способствует сохранению конечности.

(57) Формула изобретения

1. Способ стимуляции ангиогенеза в ишемизированных тканях, включающий внутримышечное введение непосредственно в зону ишемии терапевтически эффективного количества комбинированного лекарственного средства, включающего невирусную плазмидную конструкцию, несущую ген, кодирующий фактор роста гепатоцитов, и невирусную плазмидную конструкцию, несущую ген, кодирующий ангиопоэтин-1, взятых в массовом соотношении от 2:1 до 1:2, разведенных в физиологическом растворе.

2. Способ по п. 1, характеризующийся тем, что в плазмидной конструкции в качестве вектора, несущего гены, кодирующие фактор роста гепатоцитов и ангиопоэтина-1, используют плазмиду рН-CMV1.

3. Способ по п. 1, характеризующийся тем, что в качестве гена, кодирующего фактор роста гепатоцитов, используют ген, имеющий последовательность нуклеотидов, представленную на фиг. 1.

4. Способ по п. 1, характеризующийся тем, что в качестве гена, кодирующего ангиопоэтин-1, используют ген, имеющий последовательность нуклеотидов, представленную на фиг. 2.

5. Способ по п. 1, характеризующийся тем, что в качестве физиологического раствора используют стерильный изотонический раствор хлорида натрия.

6. Способ по п. 1, характеризующийся тем, что комбинированное средство вводят в количестве из расчета 50-55 мкг средства / 1 кг веса.

7. Способ по п. 1, характеризующийся тем, что суммарная концентрация плазмид в физиологическом растворе составляет от 1 до 5 мг/мл.

8. Способ по п. 1, характеризующийся тем, что комбинированное средство вводят однократно или многократно, но не чаще одного раза в неделю до достижения

терапевтического эффекта.

9. Комбинированное лекарственное средство для стимуляции ангиогенеза в ишемизированных тканях на основе невирусных конструкций, содержащее плазмидную конструкцию, несущую ген, кодирующий фактор роста гепатоцитов, и плазмидную
5 конструкцию, несущую ген, кодирующий ангиопоэтин-1, взятых в массовом соотношении от 2:1 до 1:2 и разведенных в физиологическом растворе.

10. Комбинированное лекарственное средство по п. 9, характеризующееся тем, что суммарная концентрация плазмид в физиологическом растворе составляет от 1 до 5 мг/мл.

11. Комбинированное лекарственное средство по п. 9, характеризующееся тем, что в плазмидной конструкции в качестве вектора, несущего гены, кодирующие фактор
10 роста гепатоцитов и ангиопоэтина-1, используют плазмиду рН-CMV1.

12. Комбинированное лекарственное средство по п. 9, характеризующееся тем, что в качестве гена, кодирующего фактор роста гепатоцитов, использован ген, имеющий
15 последовательность нуклеотидов, представленную на фиг. 1.

13. Комбинированное лекарственное средство по п. 9, характеризующееся тем, что в качестве гена, кодирующего ангиопоэтин-1, использован ген, имеющий последовательность нуклеотидов, представленную на фиг. 2.

14. Комбинированное лекарственное средство по п. 9, характеризующееся тем, что
20 в качестве физиологического раствора используют стерильный изотонический раствор хлорида натрия.

15. Комбинированное лекарственное средство по п. 9, характеризующееся тем, что плазмидная конструкция, несущая ген, кодирующий фактор роста гепатоцитов, и плазмидная конструкция, несущая ген, кодирующий ангиопоэтин-1, взяты в массовом
25 соотношении 1:1.

30

35

40

45

СПОСОБ СТИМУЛЯЦИИ АНГИОГЕНЕЗА В
ИШЕМИНИЗИРОВАННЫХ ТКАНЯХ И
КОМБИНИРОВАННОЕ ЛЕКАРСТВЕННОЕ
СРЕДСТВО ДЛЯ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ
СПОСОБА

1 AAGCTTGGCA TTCCGGTACT GTTGGTAAAG CCACCATGTG GGTGACCAAG
1 CTCCAGAGGG ATCCGCCAGC CCGTCCAGCA GCACCATGTG GGTGACCAAA
M W V T K

51 CTGCTGCCAG CCCTGCTGCT GCAGCATGTC CTCCTGCATC TCCTCCTGCT
51 CTCCTGCCAG CCCTGCTGCT GCAGCATGTC CTCCTGCATC TCCTCCTGCT
L L P A L L L Q H V L L H L L L L

101 CCCCATCGCC ATCCCCTATG CAGAGGGACA AAGGAAAAGA AGAAATACAA
101 CCCCATCGCC ATCCCCTATG CAGAGGGACA AAGGAAAAGA AGAAATACAA
P I A I P Y A E G Q R K R R N T I

151 TTCATGAATT CAAAAAATCA GCAAAGACCA CCCTGATCAA GATCGACCCC
151 TTCATGAATT CAAAAAATCA GCAAAGACTA CCSTAATCAA AATAGATCCA
H E F K K S A K T T L I K I D P

201 GCCCTGAAGA TCAAGACCAA AAAAGTGAAT ACTGCAGACC AGTGTGCCAA
201 GCACTGAAGA TAAAAACCAA AAAAGTGAAT ACTGCAGACC AATGTGCTAA
A L K I K T K K V N T A D Q C A N

251 TAGATGTACC AGGAACAAGG GCCTGCCATT CACTTGCAAG GCTTTTGTTT
251 TAGATGTACT AGGAATAAAG GACTTCCATT CACTTGCAAG GCTTTTGTTT
R C T R N K G L P F T C K A F V F

301 TTGATAAAGC AAGAAAACAA TGCCCTCTGGT TCCCSTTCAA TAGCATGTCA
301 TTGATAAAGC AAGAAAACAA TGCCCTCTGGT TCCCSTTCAA TAGCATGTCA
D K A R K Q C L W F P F N S M S

351 AGTGGAGTGA AAAAAGAATT TGGCCATGAA TTTGACSTCT ATGAAAACAA
351 AGTGGAGTGA AAAAAGAATT TGGCCATGAA TTTGACSTCT ATGAAAACAA
S G V K K E F G H E F D L Y E N K

401 AGACTACATT AGAAACTGCA TCAATTGGTAA AGGACGCAGC TACAAGGGAA
401 AGACTACATT AGAAACTGCA TCAATTGGTAA AGGACGCAGC TACAAGGGAA
D Y I R N C I I G K G R S Y K G T

451 CAGTATCTAT CASTAAGAGT GGCATCAAAT GTCAGCCCTG GAGTTCATG
451 CAGTATCTAT CASTAAGAGT GGCATCAAAT GTCAGCCCTG GAGTTCATG
V S I T K S G I K C Q P W S S M

501 ATACCACACG AACACAGCTT TCTGCCTTCC AGCTACCGGG GCAAGGACCT
501 ATACCACACG AACACAGCTT TTTGCCTTCG AGCTATCGGG GTAAGACCT
I P H E H S F L P S S Y R G K D L

ФИГ.1

551 GCAGGAGAAC TACTGCCGGA ACCCTCGAGG GGAAGAAGGG GGACCCTGGT
 551 ACAGGAAAAC TACTGTCGAA ATCCTCGAGG GGAAGAAGGG GGACCCTGGT
 Q E N Y C R N P R G E E G G P W C
 601 GTTTCACAAG CAATCCAGAG GTACGCTACG AAGTCTGTGA CATTCTCAG
 601 GTTTCACAAG CAATCCAGAG GTACGCTACG AAGTCTGTGA CATTCTCAG
 F T S N P E V R Y E V C D I P Q
 651 TGTTCAGAAG TTGAATGCAT GACCTGCAAT GGGGAGAGTT ATCGAGGTCT
 651 TGTTCAGAAG TTGAATGCAT GACCTGCAAT GGGGAGAGTT ATCGAGGTCT
 C S E V E C M T C N G E S Y R G L
 701 CATGGATCAT ACAGAATCAG GCAAGATTTG TCAGCGCTGG GATCATCAGA
 701 CATGGATCAT ACAGAATCAG GCAAGATTTG TCAGCGCTGG GATCATCAGA
 M D H T E S G K I C Q R W D H Q T
 751 CACCACACCG GCACAAATTC TTGCCGAAA GATATCCCGA CAAGGGCTTT
 751 CACCACACCG GCACAAATTC TTGCCGAAA GATATCCCGA CAAGGGCTTT
 P H R H K F L P E R Y P D K G F
 801 GATGATAAAT ATTGCCGCAA TCCCGATGGC CAGCCGAGGC CATGGTGCTA
 801 GATGATAAAT ATTGCCGCAA TCCCGATGGC CAGCCGAGGC CATGGTGCTA
 D D N Y C R N P D G Q P R P W C Y
 851 TACTCTTGAC CCTCACACCC GCTGGGAGTA CTGTGCAATT AAAACATGCG
 851 TACTCTTGAC CCTCACACCC GCTGGGAGTA CTGTGCAATT AAAACATGCG
 T L D P H T R W E Y C A I K T C A
 901 CTGACAATAC TATGAATGAC ACTGATGTTT CTTTGGAAAC AACTGAATGC
 901 CTGACAATAC TATGAATGAC ACTGATGTTT CTTTGGAAAC AACTGAATGC
 D N T M N D T D V P L E T T E C
 951 ATCCAGGGCC AGGGCGAGGG CTACAGGGC ACTGTCAATA CCATTTGGAA
 951 ATCCAAGGTC AAGGAGAAGG CTACAGGGC ACTGTCAATA CCATTTGGAA
 I Q G Q G E G Y R G T V N T I W N
 1001 TGGAATTC AATGTCAGCGTT GGGATCTCA GTATCCTCAC GAGCATGACA
 1001 TGGAATTC AATGTCAGCGTT GGGATCTCA GTATCCTCAC GAGCATGACA
 G I P C Q R W D S Q Y P H E H D M
 1051 TGAATCTGAA AATTTCAAG TGCAAGGACC TGCGGGAGAA CTAATGCCGG
 1051 TGAATCTGAA AATTTCAAG TGCAAGGACC TACGAGAAAA TTAATGCCGG
 T P E N F K C K D L R E N Y C R
 1101 AATCCAGATG GGTCTGAATC ACCCTGGTGT TTTACCACTG ATCCAAACAT
 1101 AATCCAGATG GGTCTGAATC ACCCTGGTGT TTTACCACTG ATCCAAACAT
 N P D G S E S P W C F T T D P N I

ФИГ. 1 (продолжение)

1151 CCGAGTTGGC TACTGCTCCC AAATTCCAAA CTGTGATATG TCACATGGAC
 1151 CCGAGTTGGC TACTGCTCCC AAATTCCAAA CTGTGATATG TCACATGGAC
 R V G Y C S Q I P N C D M S H G Q

 1201 AAGATTGTTA TCGTGGGAAT GGCAAAAATT ATATGGGCAA CCTGTCCCAG
 1201 AAGATTGTTA TCGTGGGAAT GGCAAAAATT ATATGGGCAA CTTATCCCAA
 D C Y R G N G K N Y M G N L S Q

 1251 ACCAGATCTG GCCTGACCTG TTCAATGTGG GACAAGAACA TGGAGGACCT
 1251 ACAAGATCTG GACTAACATG TTCAATGTGG GACAAGAACA TGGGAAGACTT
 T R S G L T C S M W D K N M E D L

 1301 GCACCGGCAC ATCTTCTGGG AACCAGATGC AAGTAAGCTG AATGAGAATT
 1301 ACATCGTCAT ATCTTCTGGG AACCAGATGC AAGTAAGCTG AATGAGAATT
 H R H I F W E P D A S K L N E N Y

 1351 ACTGCCGAAA TCCAGATGAT GATGCTCATG GACCCCTGGT GCTACACGGGA
 1351 ACTGCCGAAA TCCAGATGAT GATGCTCATG GACCCCTGGT GCTACACGGGA
 C R N P D D D A H G P W C Y T G

 1401 AATCCACTCA TTCCTTGGGA TTATGTCCCT ATTTCTCGTT GTGAAGGTGA
 1401 AATCCACTCA TTCCTTGGGA TTATGTCCCT ATTTCTCGTT GTGAAGGTGA
 N P L I P W D Y C P I S R C E G D

 1451 TACCACACCT ACCATCGTGA ACCTGGACCA CCCCCTGATC TCTTGCGCCA
 1451 TACCACACCT ACAATAGTCA ATTTAGACCA TCCCCTAATA TCTTGTGCCA
 T T P T I V N L D H P V I S C A K

 1501 AGACCAAGCA GCTGCGGGTG GTGAACGGGA TCCCAACACG AACAAACATA
 1501 AAACGAACA ATTGCGAGTT GTAATGGGA TTCCAACACG AACAAACATA
 T K Q L R V V N G I P T R T N I

 1551 GGATGGATGG TTAGTCTGAG ATACAGAAAC AAGCACATCT GCGGCGGCTC
 1551 GGATGGATGG TTAGTTTGAG ATACAGAAAT AACATATCT GCGGAGGATC
 G W M V S L R Y R N K H I C G G S

 1601 CCTGATCAAG GAGAGTTGGG TTCTTACTGC ACGACAGTGT TTCCCTTCTC
 1601 ATTGATAAAG GAGAGTTGGG TTCTTACTGC ACGACAGTGT TTCCCTTCTC
 L I K E S W V L T A R Q C F P S R

 1651 GAGACTTGAA AGATTATGAA GCTTGGCTTG GAATTCATGA TGTCCACGGA
 1651 GAGACTTGAA AGATTATGAA GCTTGGCTTG GAATTCATGA TGTCCACGGA
 D L K D Y E A W L G I H D V H G

 1701 AGAGGAGATG AGAAATGCAA ACAGGTTCTC AATGTTTCCC AGCTGGTATA
 1701 AGAGGAGATG AGAAATGCAA ACAGGTTCTC AATGTTTCCC AGCTGGTATA
 R G D E K C K Q V L N V S Q L V Y

ФИГ. 1 (продолжение)

1751 TGGCCCTGAA GGATCAGATC TGGTCTGAT GAAGCTGGCC AGGCCTGCTG
 1751 TGGCCCTGAA GGATCAGATC TGGTTTTAAT GAAGCTTGCC AGGCCTGCTG
 G P E G S D L V L M K L A R P A V

1801 TCCTGGATGA TTTTGTGAGC ACCATCGACC TGCCTAACTA CGGATGCACA
 1801 TCCTGGATGA TTTTGTTAGT ACGATTGATT TACCTAATTA TGGATGCACA
 L D D F V S T I D L P N Y G C T

1851 ATTCCCTGAAA AGACCAGTTG CAGTGTMTAT GGCTGGGGCT ACACTGGACT
 1851 ATTCCCTGAAA AGACCAGTTG CAGTGTMTAT GGCTGGGGCT ACACTGGATT
 I P E K T S C S V Y G W G Y T G L

1901 GATCAACTAC GACGGCTGC TCGGGTGGC CCACCTGTAC ATCATGGGAA
 1901 GATCAACTAT GATGGCTAT TACGAGTGGC ACATCTCTAT ATAATGGGAA
 I N Y D G L L R V A H L Y I M G N

1951 ATGAGAAATG CAGCCAGCAT CATCGAGGGA AGGTGACTCT GAATGAGTCT
 1951 ATGAGAAATG CAGCCAGCAT CATCGAGGGA AGGTGACTCT GAATGAGTCT
 E K C S Q H H R G K V T L N E S

2001 GAAATATGTG CTGGGGCTGA AAAGATTGGA TCAGGACCAT GTGAGGGGGA
 2001 GAAATATGTG CTGGGGCTGA AAAGATTGGA TCAGGACCAT GTGAGGGGGA
 E I C A G A E K I G S G P C E G D

2051 TTATGGTGGC CCACTTGTMT GTGAGCAACA TAAAATGAGA ATGGTCTCTG
 2051 TTATGGTGGC CCACTTGTMT GTGAGCAACA TAAAATGAGA ATGGTCTCTG
 Y G G P L V C E Q H K M R M V L G

2101 GTGTCAATTGT TCCTGGTCGT GGATGTGCCA TTCCAAATCG TCCTGGTATT
 2101 GTGTCAATTGT TCCTGGTCGT GGATGTGCCA TTCCAAATCG TCCTGGTATT
 V I V P G R G C A I P N R P G I

2151 TTTGTCCGAG TAGCATATTA TGCAAAATGG ATCCACAAGA TCATCCTGAC
 2151 TTTGTCCGAG TAGCATATTA TGCAAAATGG ATACACAAAA TTATTTTTAAC
 F V R V A Y Y A K W I H K I I L T

2201 CTACAAGGTG CCACAGTCCT GATATCTGCA GTCTAGA
 2201 ATATAAGGTA CCACAGTCAT AGCTGAAGTA AGTGTGT
 Y K V P Q S *

ФИГ. 1 (продолжение)

551 GCTGGAGAAG CAGCTGCTGC AGCAGACCAA TGAGATCCTG AAGATCCACG
 551 GCTAGAGAAG CAACTTCTTC AACAGACAAA TGAAATCTTG AAGATCCATG
 L E K Q L L Q Q T N E I L K I H E

601 AGAAGAACAG CCTGCTGGAG CACAAGATCC TGGAGATGGA GGGCAAGCAC
 601 AAAAAACAG TTTATTAGAA CATAAAATCT TAGAAATGGA AGGAAAACAC
 K N S L L E H K I L E M E G K H

651 AAGGAGGAGC TGGACACCTT GAAGGAGGAG AAGGAGAACC TGCAGGGCCT
 651 AAGGAAGAGT TGGACACCTT AAAGGAAGAG AAAGAGAACC TTCAAGGCTT
 K E E L D T L K E E K E N L Q G L

701 GGTGACCCGG CAGACCTACA TCATCCAGGA GCTGGAGAAG CAGCTGAACA
 701 GGTTACTCGT CAAACATATA TAATCCAGGA GCTGGAAAAG CAATTAAACA
 V T R Q T Y I I Q E L E K Q L N R

751 GAGCCACCAC CAACAACAGC GTGCTGCAGA AGCAGCAGCT GGAGCTGATG
 751 GAGCTACCAC CAACAACAGT GTCCTTCAGA AGCAGCAACT GGAGCTGATG
 A T T N N S V L Q K Q Q L E L M

801 GACACCGTGC ACAACCTGGT GAACCTGTGC ACCAAGGAGG GCGTGCTGCT
 801 GACACAGTCC ACAACCTTGT CAATCTTTGC ACTAAAGAAG GTGTTTTACT
 D T V H N L V N L C T K E G V L L

851 GAAGGGCGGC AAGAGAGAGG AAGAGAAGCC CTTCCGGGAC TGCGCCGACG
 851 AAAGGGAGGA AAAAGAGAGG AAGAGAAACC ATTTAGAGAC TGTGCAGATG
 K G G K R E E E K P F R D C A D V

901 TGTACCAGGC CGGCTTCAAC AAGAGCGGCA TCTACACCAT CTACATCAAC
 901 TATATCAAGC TGGTTTTAAT AAAAGTGGAA TCTACACTAT TTATATTAAT
 Y Q A G F N K S G I Y T I Y I N

951 AACATGCCCG AGCCCAAGAA GGTGTTCTGC AACATGGACG TGAACGGCGG
 951 AATATGCCAG AACCCAAAAA GGTGTTTTGC AATATGGATG TCAATGGGGG
 N M P E P K K V F C N M D V N G G

1001 CGGCTGGACC GTGATCCAGC ACCGGGAGGA CGGCAGCCTG GACTTCCAGC
 1001 AGGTTGGAAT GTAATACAAC ATCGTGAAGA TGGAAGTCTA GATTTCCAAA
 G W T V I Q H R E D G S L D F Q R

1051 GGGGCTGGAA GGAATATAAA ATGGGTTTTG GAAATCCCTC CGGTGAATAT
 1051 GAGGCTGGAA GGAATATAAA ATGGGTTTTG GAAATCCCTC CGGTGAATAT
 G W K E Y K M G F G N P S G E Y

1101 TGGCTGGGGA ATGAGTTTTAT TTTTGCCATT ACCAGTCAGA GGCAGTACAT
 1101 TGGCTGGGGA ATGAGTTTTAT TTTTGCCATT ACCAGTCAGA GGCAGTACAT
 W L G N E F I F A I T S Q R Q Y M

ФИГ.2 (продолжение)

```

1151 GCTGAGAATT GAGCTGATGG ACTGGGAAGG GAACCGAGCC TATTCACAGT
1151 GCTAAGAATT GAGTTAATGG ACTGGGAAGG GAACCGAGCC TATTCACAGT
      L R I E L M D W E G N R A Y S Q Y

1201 ATGACAGATT CCACATAGGA AATGAAAAGC AGAACTACAG GCTGTACCTG
1201 ATGACAGATT CCACATAGGA AATGAAAAGC AAAACTATAG GTTGTATTTA
      D R F H I G N E K Q N Y R L Y L

1251 AAGGGCCACA CTGGGACAGC AGGAAAACAG AGCAGCCTGA TCCTGCACGG
1251 AAAGGTCACA CTGGGACAGC AGGAAAACAG AGCAGCCTGA TCTTACACGG
      K G H T G T A G K Q S S L I L H G

1301 TGCTGATTTT AGCACTAAAG ATGCTGATAA TGACAACTGT ATGTGCAAAT
1301 TGCTGATTTT AGCACTAAAG ATGCTGATAA TGACAACTGT ATGTGCAAAT
      A D F S T K D A D N D N C M C K C

1351 GTGCCCTCAT GCTGACCGGA GGATGGTGGT TTGATGCTTG TGGCCCCTCC
1351 GTGCCCTCAT GTTACAGGA GGATGGTGGT TTGATGCTTG TGGCCCCTCC
      A L M L T G G W W F D A C G P S

1401 AATCTGAATG GAATGTTCTA TACTGCCGGC CAGAACCATG GAAACTGAA
1401 AATCTAAATG GAATGTTCTA TACTGCCGGA CAAAACCATG GAAACTGAA
      N L N G M F Y T A G Q N H G K L N

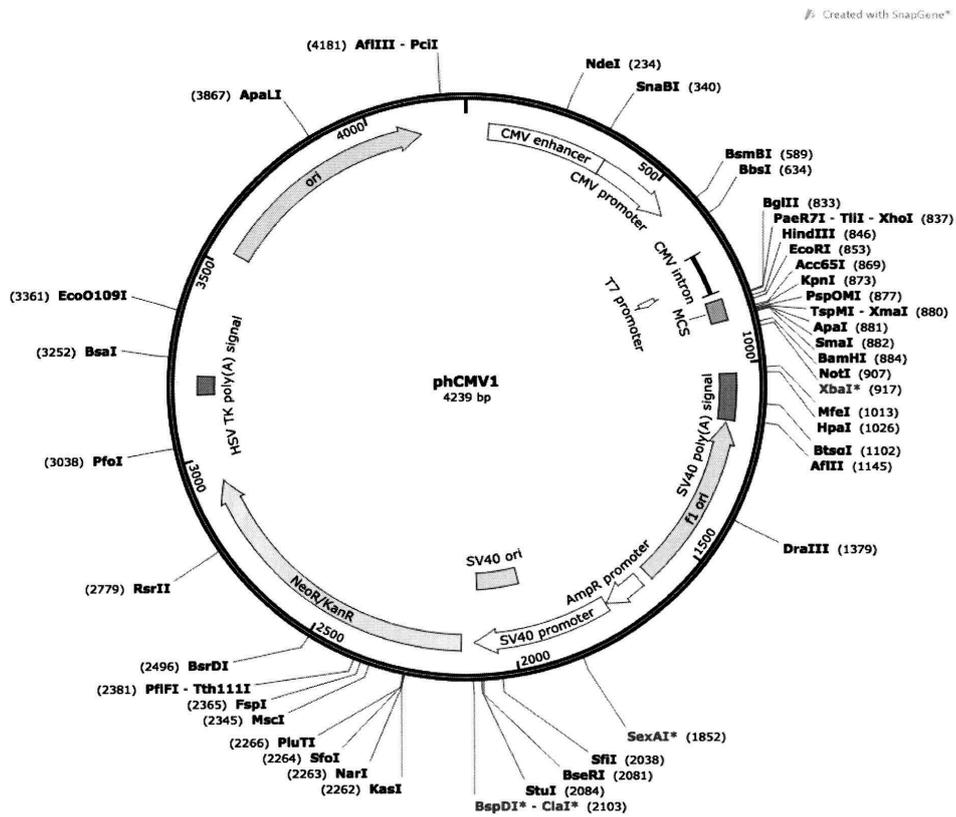
1451 TGGGATAAAG TGGCACTACT TCAAAGGGCC CAGCTACTCC CTGCGGTCCA
1451 TGGGATAAAG TGGCACTACT TCAAAGGGCC CAGTTACTCC TTACGTTCCA
      G I K W H Y F K G P S Y S L R S T

1501 CCACCATGAT GATTCGGCCT CTGGACTTTT GATATCTGCA GGATCC
1501 CAACTATGAT GATTCGACCT TTAGATTTTT GAAAGCGCAA TGTCAG
      T M M I R P L D F *

```

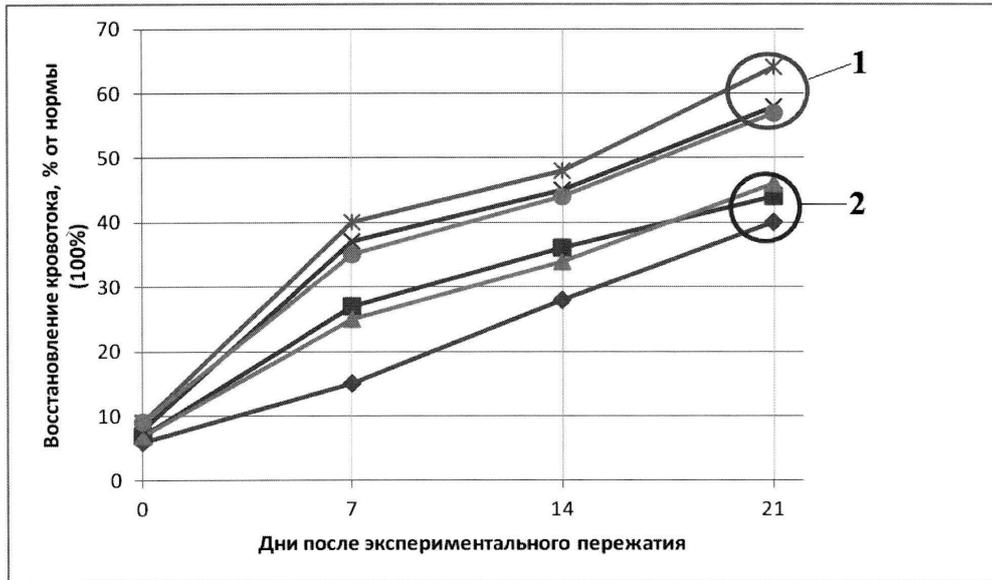
ФИГ. 2 (продолжение)

СПОСОБ СТИМУЛЯЦИИ АНГИОГЕНЕЗА В
ИШЕМИНИЗИРОВАННЫХ ТКАНЯХ И
КОМБИНИРОВАННОЕ ЛЕКАРСТВЕННОЕ
СРЕДСТВО ДЛЯ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ
СПОСОБА



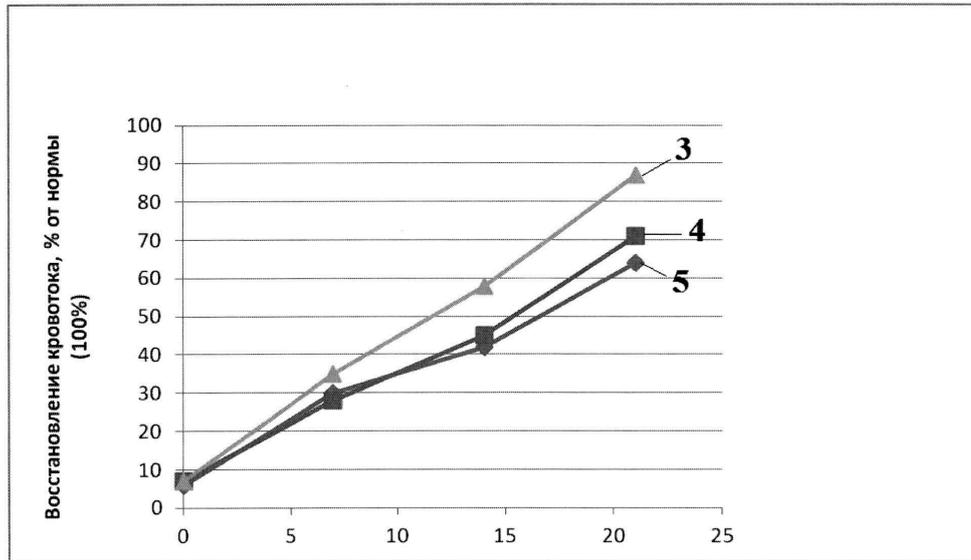
ФИГ. 3

СПОСОБ СТИМУЛЯЦИИ АНГИОГЕНЕЗА В
ИШЕМИНИЗИРОВАННЫХ ТКАНЯХ И
КОМБИНИРОВАННОЕ ЛЕКАРСТВЕННОЕ
СРЕДСТВО ДЛЯ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ
СПОСОБА



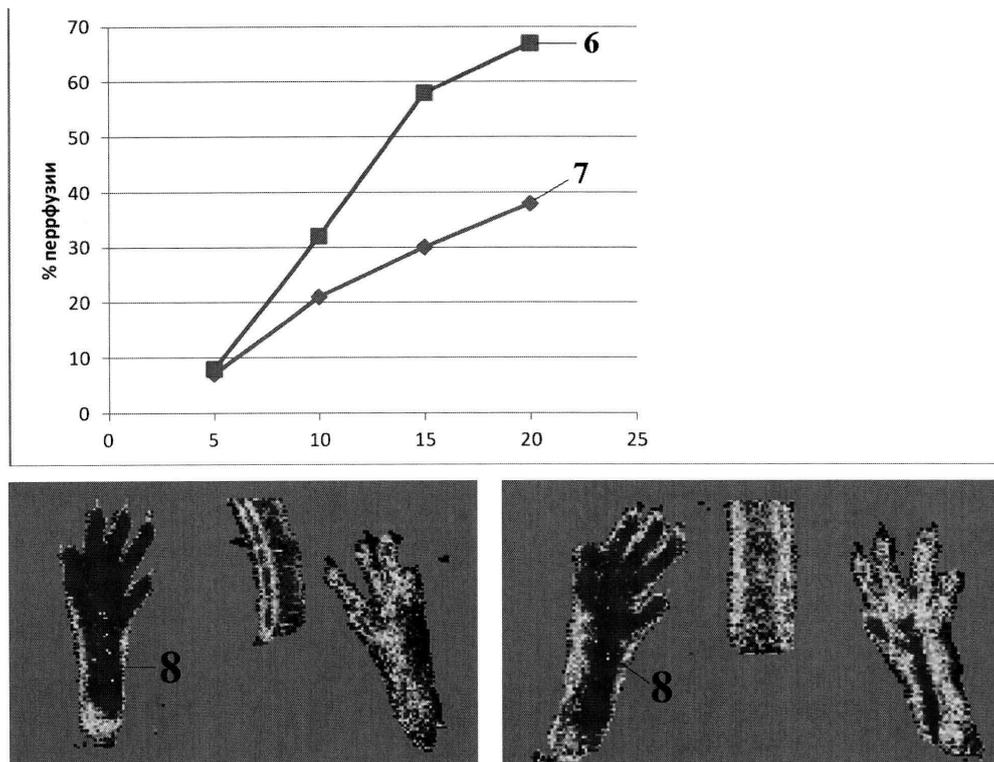
ФИГ. 4.

СПОСОБ СТИМУЛЯЦИИ АНГИОГЕНЕЗА В
ИШЕМИНИЗИРОВАННЫХ ТКАНЯХ И
КОМБИНИРОВАННОЕ ЛЕКАРСТВЕННОЕ
СРЕДСТВО ДЛЯ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ
СПОСОБА



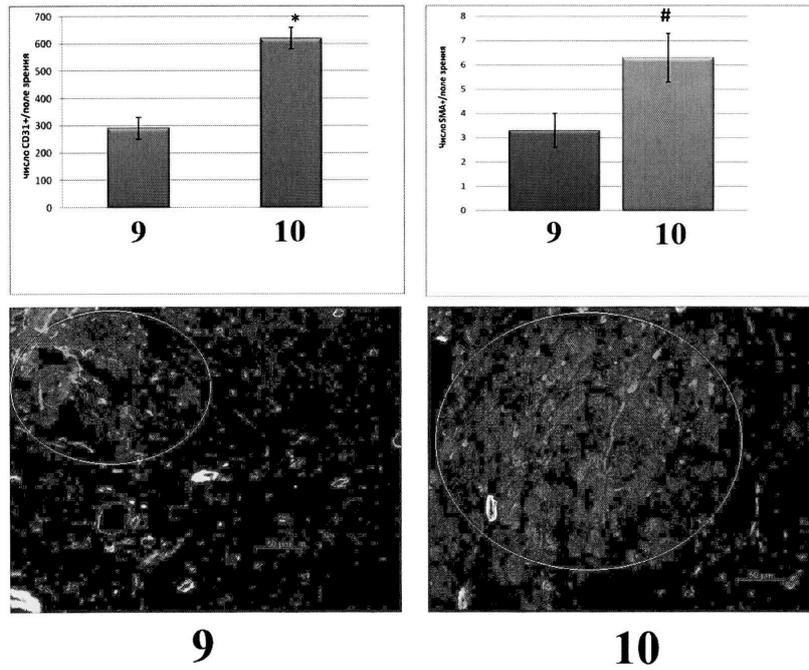
ФИГ. 5.

СПОСОБ СТИМУЛЯЦИИ АНГИОГЕНЕЗА В
ИШЕМИНИЗИРОВАННЫХ ТКАНЯХ И
КОМБИНИРОВАННОЕ ЛЕКАРСТВЕННОЕ
СРЕДСТВО ДЛЯ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ
СПОСОБА



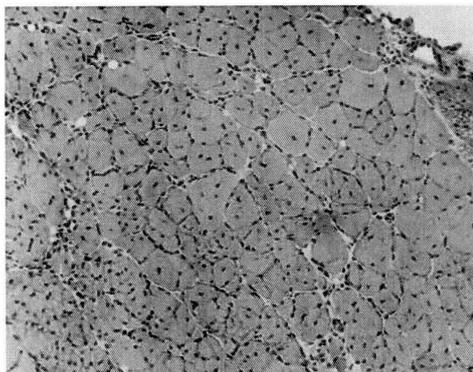
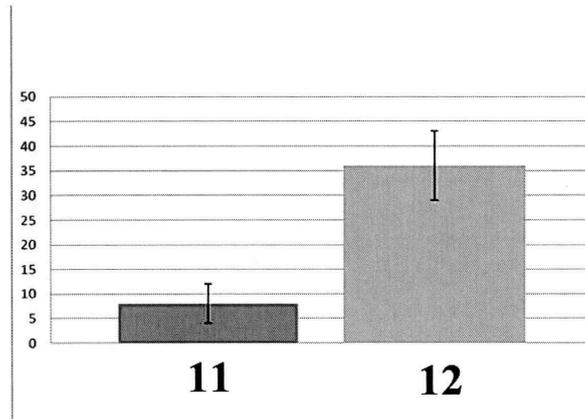
ФИГ. 6.

СПОСОБ СТИМУЛЯЦИИ АНГИОГЕНЕЗА В
ИШЕМИНИЗИРОВАННЫХ ТКАНЯХ И
КОМБИНИРОВАННОЕ ЛЕКАРСТВЕННОЕ
СРЕДСТВО ДЛЯ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ
СПОСОБА

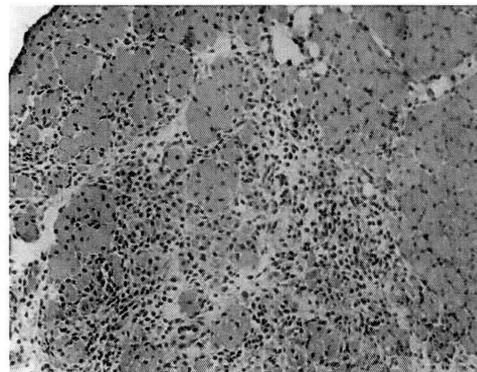


ФИГ. 7.

СПОСОБ СТИМУЛЯЦИИ АНГИОГЕНЕЗА В
ИШЕМИНИЗИРОВАННЫХ ТКАНЯХ И
КОМБИНИРОВАННОЕ ЛЕКАРСТВЕННОЕ
СРЕДСТВО ДЛЯ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ
СПОСОБА



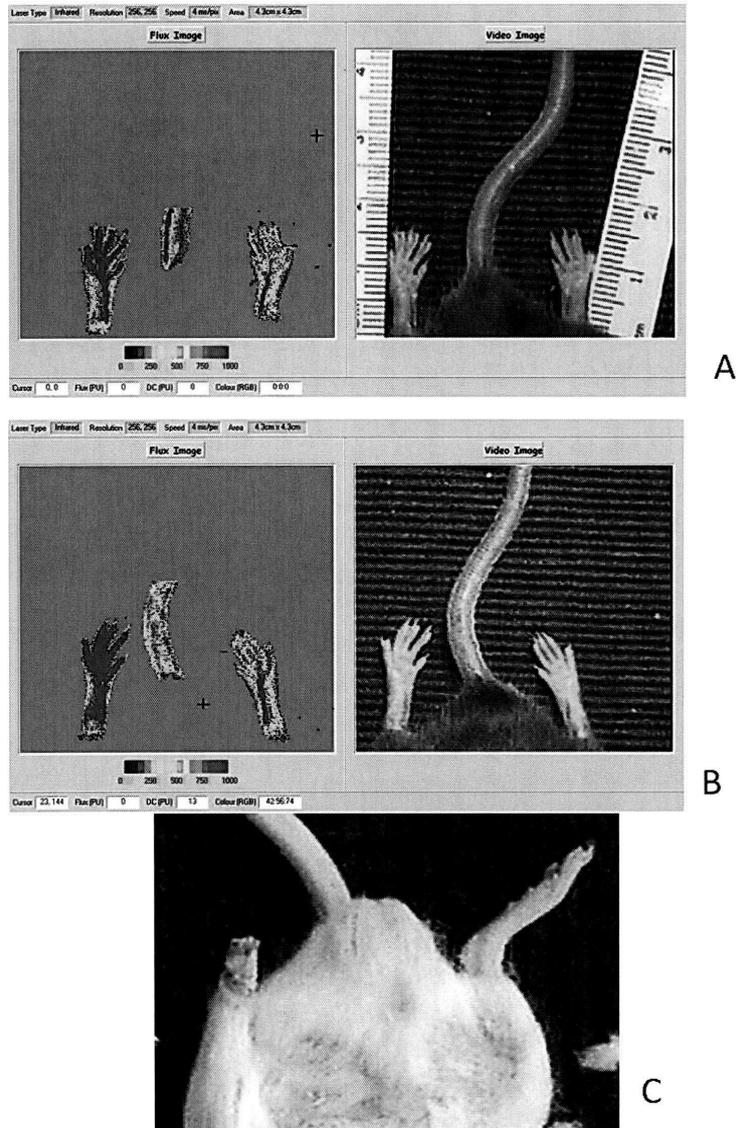
11



12

ФИГ. 8.

СПОСОБ СТИМУЛЯЦИИ АНГИОГЕНЕЗА В
ИШЕМИНИЗИРОВАННЫХ ТКАНЯХ И
КОМБИНИРОВАННОЕ ЛЕКАРСТВЕННОЕ
СРЕДСТВО ДЛЯ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ
СПОСОБА



ФИГ. 9.