



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **72146** (13) **U**
(51) МПК (2012.01)
A61K 38/00
A61B 10/02 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2012 00618	(72) Винахідник(и): Кайдашев Ігор Петрович (UA), Куценко Неля Леонідівна (UA), Весніна Людмила Едуардівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 19.01.2012	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.08.2012	(73) Власник(и): ВИЩИЙ ДЕРЖАВНИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД УКРАЇНИ "УКРАЇНЬСКА МЕДИЧНА СТОМАТОЛОГІЧНА АКАДЕМІЯ", вул. Шевченка, 23, м. Полтава, 36024, Україна (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.08.2012, Бюл.№ 15	

(54) СПОСІБ МОДУЛЯЦІЇ ВНУТРІШНЬОКЛІТИННОЇ ЕКСПРЕСІЇ ЯДЕРНОГО ФАКТОРУ kV

(57) Реферат:

Спосіб модуляції внутрішньоклітинної експресії ядерного фактору kV включає застосування фармацевтичних засобів для модуляції NF-kB. Як фармацевтичний засіб використовується агоніст ППАР-γ рецепторів піоглітазон.

U
72146
UA

Корисна модель належить до галузей біології та медицини та може бути використана при патологіях, що супроводжуються порушенням NF-kB-сигнального шляху.

Відомо, що родина транскрипційних факторів NF-kB бере участь в регуляції відповіді клітин на несприятливі зовнішні впливи, пошкодження, а також - запальних процесів і імунних реакцій.

5 Активація NF-kB контролює експресію багатьох генів, які кодують продукцію цитокінів, хемокинів, рецепторів імунокомпетентних клітин, молекул клітинної адгезії, факторів росту та реактантів гострої фази. Тому прямо або опосередковано NF-kB контролює біологічно важливі функції клітин, в тому числі процеси вродженої та набутої імунної відповіді. Серед чисельних регуляторів каскадів, пов'язаних з NF-kB, чільне місце посідають ядерні рецептори, такі як
10 рецептори, які активують проліферацію пероксисом (ГТПАР) (Bonizzi G., Karin M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity // Trends Immunol.-2004.-Vol.25.-P.280-288.; Bottex-Gauthier C, Pollet S., Favier A.,Vidal D.R. The Rel/NF-kappa-B transcription factors complex role in cell regulation // Pathol. Biol. (Paris).-2002.-Vol. 50.-P. 204-211).

15 В лікуванні будь-якої патології, пов'язаної з порушенням внутрішньоклітинного механізму, залучені NF-kB-сигнальні шляхи. Тому модуляція функціонування NF-kB є необхідним фактором в терапії багатьох захворювань. В зв'язку з цим втручання має бути вузько направленим та прицільно дозованим для забезпечення терапевтичного ефекту, не провокуючи погіршення самопочуття.

Відомо декілька десятків ендегенних та екзогенних агентів, здатних пригнічувати активність
20 NF-kB. До цієї групи препаратів належать кортикостероїди, імунодепресанти та ін. Є дані, що деякі нестероїдні препарати, такі як аспірин, повністю пригнічують 1-kB-кіназний комплекс (IKK-β), а сульфосалазін здатний блокувати транспорт NF-kB в ядро за рахунок пригнічення деградації I-kB (Sheri M.F., Cleaveland J.S., Grosmaire L.S. A D-amino acid peptide inhibitor of NF-kB nuclear localization is efficacious in models of inflammatory disease // J. Immunol. - 2000. - Vol. 2.
25 - P. 1004 - 1012.; Транскрипційний фактор NF-kB як мета для подолання радіорезистентності пухлини / І.А. Громакова, П.П. Сорочан, Н.Е. Прохач // Укр. радіологічний журнал. - 2011. - Т. 19. - С. 85 - 89.; Yamamoto Y., Gaynor R.B. Therapeutic potential of inhibition of the NF-kB pathway in the treatment of inflammation and cancer // J. Clin. Invest. - 2001. - Vol.107. - P.135 - 142.).

Найбільш близьким до способу, що заявляється, є спосіб використання похідних фумарової
30 кислоти як інгібітор NF-kB (Пат. 2282440 Российская Федерация, МПК А61К 31/194, А61К 31/225, А61Р 43/00. Приемопередающее устройство / Джоши Р.К., Штребель Х.П., Петцельбауер П.; заявитель и патентообладатель Фумафарм АГ. - №2003124751/15; заявл. 08.01.2002; опубл. 27.08.2006, Бюл. №18).

Для здійснення цього способу використовували одно або декілька незаміщених або
35 заміщених діалкілових ефірів фумарової кислоти та моноалкілових ефірів фумарової кислоти як специфічного інгібітора транскрипції NF-kB-залежного гену. Похідні фумарової кислоти застосовували в фармацевтичній композиції для лікування NF-kB-опосередкованих захворювань.

Загальними ознаками способу, що заявляється, і найближчого аналога є:

40 1. застосування фармацевтичних препаратів як модуляторів NF-kB;
2. пригнічення активності NF-kB;
3. дослідження експресії NF-kB методом проточної цитофлюориметрії. Недоліками відомого способу є:

1. широкий спектр дій ефірів фумарової кислоти - складової частини фармацевтичних
45 композицій, що виключає специфічність їх дії на експресію NF-kB;
2. відсутність можливості доведення залучення ППАР-γ в регулюванні активності NF-kB;
3. недосконалість оцінки NF-kB, що обумовлено застосуванням культур клітин;
4. відсутність диференційованого аналізу експресії NF-kB в окремих субпопуляціях клітин.

В основу корисної моделі поставлена задача створити такий спосіб модуляції
50 внутрішньоклітинної експресії ядерного фактору кВ, шляхом удосконалення відомого, який дозволяє пригнічувати активність NF-kB, використовуючи агоніст ППАР-γ рецепторів піоглітазон, доводить залучення ППАР-γ в регулюванні активності NF-kB мононуклеарів периферійної крові, забезпечує диференційований аналіз експресії даного фактору серед CD64⁺ клітин поруч з оцінкою процесів апоптозу цих клітин методом проточної цитофлюориметрії.

55 Поставлена задача вирішується шляхом створення способу модуляції внутрішньоклітинної експресії ядерного фактору кВ, що включає застосування фармацевтичних засобів з метою модуляції NF-kB, який відрізняється тим, що як фармацевтичний засіб використовується агоніст ППАР-γ рецепторів піоглітазон.

60 Запропонований спосіб дозволяє пригнічувати внутрішньоклітинну експресію ядерного фактору кВ через активацію ППАР-γ та надає можливість вивчити участь ППАР-γ рецепторів в

регуляції активності NF- κ B, який відіграє одну з провідних ролей в реалізації запалення, онкогенезу, тощо.

Заявлений спосіб виконується наступним чином:

Модуляція внутрішньоклітинної експресії ядерного фактору κ B здійснюється *in vitro* з попереднім виділенням мононуклеарів периферійної крові (МНПК) людини та подальшою оцінкою експресії NF- κ B цитофлюориметричним методом. Цитофлюориметричний аналіз здійснюють з використанням моноклональних антитіл (мкАТ) до субоддиниці p65 молекули NF- κ B (BD Biosciences Pharmingen, США).

Дію агоніста ППАР- γ визначали шляхом застосування гідрохлориду піоглітазону (PIO) в концентраціях 10, 30 та 100 μ M, який попередньо був розчинений в диметилсульфоксиді (DMSO). Для дослідження використовували суспензію МНПК, яку отримували з периферійної крові в асептичних умовах за стандартною методикою [Лимфоциты: методы: Пер. с англ. / Под ред. Дж. Клауса. - М.: Мир, 1990. - 395 с.] шляхом центрифугування на градієнті густини фікол-верографіну (густина 1,077 г/мл) із наступним відмиванням стерильним фосфатно-сольовим буфером (ФСБ) та подальшим ресуспендуванням до концентрації $2 \cdot 10^6$ клітин в 1 мл в середовищі RPMI-1640 з глютаміном (Sigma, США) з 10% інактивованою телячою сироваткою ("Bio Mark Inc", Львів Україна), 100 мкг/мл гентаміцину сульфату (ГНЦЛС, Україна) при 37°C в присутності PIO, або DMSO, або ФСБ в контрольних групах. Суспензії свіжовиділених МНПК та через 18 год. інкубації двічі відмивали для подальшого визначення внутрішньоклітинної експресії ядерного фактору κ B. Для визначення експресії NF- κ B CD64⁺ клітинами суспензію МНПК попередньо інкубували в присутності мкАТ до поверхневих антигенів CD64.

Апоптоз МНПК оцінювали методом проточної лазерної цитофлюориметрії з використанням анексину V-FITC та пропідіуму йодиду (PI) (виробництва Caltag, США).

Для виявлення змін постановку методик проводили, використовуючи суспензію МНПК, безпосередньо після виділення клітин, після інкубації в присутності PIO, DMSO та ФСБ.

Статистичну обробку результатів досліджень проводили, використовуючи пакет програми STATISTICA 6.0 (StatSoft, США), з розрахунком вибіркового середнього, вибіркового стандартного відхилення, вірогідності отриманих результатів Т-тестом для парнозв'язаних величин (t). Дані наведені у вигляді вибіркового середнього (M), вибіркового стандартного відхилення (STD). Критичний рівень значимості під час перевірки статистичних гіпотез в данному дослідженні приймали за 0,05.

Під час дослідження змін показників під впливом агоніста ППАР- γ -піоглітазону - були враховані зміни в контрольних пробах. Статистична обробка результатів показала, що в контрольній пробі після 18 год. інкубації в поживному середовищі та в присутності DMSO (розчинник піоглітазону) зменшилась кількість CD64⁺клітин в суспензії МНПК, при цьому в 1,5 рази збільшився рівень максимальної експресії відповідних рецепторів (Табл.). Як видно з даних, представлених в таблиці, активація ППАР- γ в найбільшій експериментальній дозі призводила до вірогідного зменшення кількості клітин, що експресували CD64⁺ та максимальних рівнів експресії цих рецепторів. Під час досліджень концентрації NF- κ B в суспензії МНПК нами показано, що під впливом DMSO відбувалося зменшення показників досліджуваних клітин в інкубаційному середовищі. При цьому на фоні дії піоглітазону, починаючи з дози 30 μ M, що відповідає середньотерапевтичній дозі, експресія даного показника прогресивно зменшувалась. Аналогічне дозозалежне зменшення концентрації NF- κ B та рівня експресії досліджуваного показника спостерігалось серед CD64⁺ клітин. Аналізуючи рівні апоптозу серед МНПК під впливом активатора ППАР- γ , що відображає кількість AnV⁺PI⁺ клітин в суспензії, відмічено дозозалежне зменшення апоптотичних клітин. При цьому максимальні вірогідні зміни спостерігались під впливом піоглітазону в дозі 100 μ M (вдвічі зменшення кількості AnV⁺PI⁺ клітин).

Отримані результати дозволяють довести, що активація ППАР- γ призводить до пригнічення експресії ядерного фактору κ B, що свідчить про залучення ППАР- γ в регуляції активності NF- κ B , перспективу вивчення модуляції NF- κ B та розробки нових можливостей терапевтичних втручань.

Спосіб модуляції внутрішньоклітинної експресії ядерного фактору κ B

Таблиця

Вплив піоглітазону на рівень експресії NF- κ B⁺ та процесів апоптозу в суспензії МНПК

	Свіжовиділені МНПК	Контроль 18год. інкубації	Контроль DMSO	Піоглітазон 10 μ M	Піоглітазон 30 μ M	Піоглітазон 100 μ M
Кількість CD64 ⁺ клітин	88,3 $\pm$ 6,3	83,5 $\pm$ 9,9	79,4 $\pm$ 10,6	79,6 $\pm$ 11,2	79,5 $\pm$ 9,6	50,7 $\pm$ 23,3*
Максимальний рівень експресії CD64 ⁺	3,7 $\pm$ 2,1	5,7 $\pm$ 1,0#	5,8 $\pm$ 2,9	5,6 $\pm$ 1,0	4,6 $\pm$ 1,3	1,6 $\pm$ 0,6*
Кількість NF- κ B ⁺ клітин	51,3 $\pm$ 37,1	71,8 $\pm$ 22,8	54,8 $\pm$ 31,4	54,9 $\pm$ 29,5	51,1 $\pm$ 35,3	33,2 $\pm$ 28,8
Максимальний рівень експресії NF- κ B ⁺	1,6 $\pm$ 0,8	2,8 $\pm$ 1,2#	2,7 $\pm$ 1,8	2,3 $\pm$ 1,2	2,1 $\pm$ 1,0	1,8 $\pm$ 1,0
Кількість CD64 ⁺ NF- κ B ⁺ клітин	58,0 $\pm$ 36,2	83,5 $\pm$ 24,3	69,0 $\pm$ 31,9	69,6 $\pm$ 32,8	64,1 $\pm$ 37,4	62,5 $\pm$ 22,0
Кількість AnV ⁺ PI ⁺ клітин	14,8 $\pm$ 2,5	3,9 $\pm$ 2,5#	6,8 $\pm$ 3,9	5,6 $\pm$ 2,9	4,5 $\pm$ 4,2	3,7 $\pm$ 2,2*

Примітка:

- вірогідність відмін в порівнянні з показниками в суспензії свіжовиділених МНПК;

* - вірогідність відмін в порівнянні з показниками контрольних проб (DMSO)

5

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

10

Спосіб модуляції внутрішньоклітинної експресії ядерного фактору κ B, що включає застосування фармацевтичних засобів для модуляції NF- κ B, який **відрізняється** тим, що як фармацевтичний засіб використовується агоніст ППАР- γ рецепторів піоглітазон.

Комп'ютерна верстка І. Скворцова

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601