



УКРАЇНА

(19) UA (11) 84276 (13) C2

(51) МПК (2006)

A61K 9/10

A61K 31/74

A61K 31/496

A61K 47/30

A61P 31/06 (2008.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ЛІКАРСЬКИЙ ЗАСІБ ПРОТИ ТУБЕРКУЛЬОЗУ

1

2

(21) a200502820

(22) 27.08.2003

(24) 10.10.2008

(86) PCT/JP2003/010871, 27.08.2003

(31) 2002-247871

(32) 27.08.2002

(33) JP

(46) 10.10.2008, Бюл.№ 19, 2008 р.

(72) ТЕРАДА ХІРОШІ, МАКІНО КІМІКО, СОМА
ГЕН-ИЧИРО

(73) ТЕРАДА ХІРОШІ

(56) WO 00 28369 A, 25.05.2000

O'HARA P. ET AL.: 'Respirable PLGA microspheres
containing rifampicin for the treatment of tuberculosis:
manufacture and characterization' PHARM. RES. vol.
17, no. 6, 2000, pages 955 - 961SHARMA R. ET AL.: 'Inhalable microparticles
containing drug combinations to target alveolar
macrophages for treatment of pulmonary tuberculosis'
PHARM. RES. vol. 18, no. 10, 2001, pages 1405 -
1410BARROW E.L. ET AL.: 'Use of microsphere
technology for targeted delivery of rifampin to
mycobacterium tuberculosis-infected macrophages'
ANTIMICROBIAL AGENTS ANDCHEMOTHERAPY vol. 42, no. 10, 1998, pages 2682-
2689(57) 1. Лікарський засіб проти туберкульозу, що
складається з PLGA (співполімер полімолочної та
полігліколевої кислот) і містить протитуберкульоз-
ний засіб, який **відрізняється** тим, що молекуляр-
на вага зазначеного PLGA знаходиться у межах
від 5000 до 20000.2. Лікарський засіб за п.1, який **відрізняється** тим,
що зазначений протитуберкульозний засіб є рифам-
пацином.3. Лікарський засіб за п.1 або 2, який **відрізняєть-
ся** тим, що додатково містить принаймні одне з
PVA (полівініловий спирт), PEG (поліетиленглі-
коль), PEO (поліетиленоксид), цукор, протеїн, пеп-
тид, фосфоліпід або холестерол.4. Лікарський засіб за п.1 або 2, який **відрізняєть-
ся** тим, що додатково містить принаймні одне з
PVA (полівініловий спирт), PEG (поліетиленглі-
коль), PEO (поліетиленоксид), цукор, протеїн, пеп-
тид, фосфоліпід або холестерол, та є дрібнодис-
персною композицією, у якій діаметри найбільших
часток є від 1 до 6 мкм.5. Лікарський засіб за будь-яким з пунктів 1-4, який
відрізняється тим, що він вироблений способом
мембранного емульгування.

Даний винахід відноситься до лікарських засо-
бів для нормалізації макрофагів з дисфункцією
шляхом використання фагоцитної здатності мак-
рофагів, або ефективно для різноманітних інфек-
ційних патогенів. Лікарський засіб за даним вина-
ходом спрямований на всі субстанції, що
призначаються на терапевтичній і/або діагностич-
ній основі, а також на їх сполучення, а його склад є
медичною сумішшю медикаменту (включаючи в
деяких випадках носій медикаменту) і носій меди-
каменту.

I. Макрофаг

По-перше, розглядається макрофаг, який віді-
грає центральну роль в дії лікарського засобу за
винаходом.

Морфологія та функції макрофага описані в
деталях, наприклад, в ["Seime i o sasaeru
Macrophage (Макрофаг, підтримуючий життя)" ав-
тора Kiyosi Takahashi (Kiyoshi Takahashi) (Bunkodo,
2001)], а передумови, які мають відношення до
винаходу, є наступними. Макрофаг - це клітина,
яка конфігурує систему однопорожнього фагоциту
(MPS). Моноцит в крові створюється з кровотвор-
ної стоволової клітини в кістковому мозку, ділиться/
диференціюється в кістковому мозку, попадає в
кров, і потім осаджується в різних тканинах для

(13) C2

(11) 84276

(19) UA

диференціації моноцитарної клітини, відомої під різними назвами. Ця клітина зветься гістіоцитом в з'єднувальних тканинах, клітиною Купера в печінці, альвеолярним макрофагом в легенях, макрофагом в лімфовузлах і селезінці, грудним макрофагом/перитонеальним макрофагом в порожнинах тіла, остеокластом в кістках, клітиною Лангерганса в шкірі, мікрогліальною клітиною в нервових тканинах, мікрогліальною клітиною в мозку, і клітини А-типу в синовіальній оболонці, і має властивості конкретної тканини.

1. Загальні характеристики

(1) Це одноподібна клітина з діаметром близько 15-20µm, має багато цитоплазми, легко прилипає до скляної або пластикової поверхні. Вона рухається разом з псевдоподією і має сильний фагоцитоз до чужорідних субстанцій.

(2) Це клітина імунного захисту організму.

(3) Вона має властивості до знищення чужорідних субстанцій та імунологічну компетентність.

(4) Вона надає інформацію про антиген Т-лімфоциту для встановлення імунітету.

(5) Вона активується інтерфероном, щоб стати ефектором в клітинно-опосередкованому імунітеті.

(6) Вона більш стійка до рентгенівських променів, чим лімфоцит.

2. Фізіологічне значення макрофага

(1) Здатність до фагоцитозу.

Фагоцитоз - це одна з найбільш відомих функцій макрофага. Ця функція, ймовірно, одна з самих основних функцій, виниклих в процесі еволюції з моменту зародження життя, коли організм були ще одноклітинними. Таким чином, однією з властивостей макрофага є те, що його існування має універсальний характер через усі види. Відомо, що ця риса забезпечує одну з найбільших переваг при дослідженні функцій макрофага. Тобто, якщо ліки для лікування ссавців будуть розроблені/досліджені, то макрофаги не від ссавців можуть бути функціонально корисні як матеріал для досліджень. Це має місце завдяки тому аспекту, що макрофаг є філогенетично стабільна клітина.

(2) Функція імунного захисту

Другою важливою особливістю функцій макрофагу є його імунозахисна дія. Ця дія вважається неспецифічним імунним захистом, але недавні дослідження продемонстрували, що імунозахисна дія макрофага є також специфічною. Спочатку термін "неспецифічність" був словом, маючим відношення до антигенної специфічності та імунологічної пам'яті, характерних для Т-клітини, і в теперішній час іще не підтверджено, що макрофаг має антигенну специфічність або імунологічну пам'ять в точному сенсі цього слова. Хоча, було б не зовсім правильним вважати імунозахисну дію макрофага неспецифічною. Однак, наприклад, реакція макрофагів є якісно різною в залежності від типів патогенів, і частина цих якісно різних реакцій відповідає різниці в рецепторах на поверхні клітини макрофага, яка розпізнає патогени. Таким чином, з точки зору клітинної реакції на дію чужорідної субстанції (довкілля), можна сказати, що дія макрофагів є специфічною. В теперішній час, стало розповсюджено розглядати імунозахисну дію на основі макрофагів, як природну імунну систему і імуноза-

хисну дію, засновану на Т-клітинах як набуту імунну систему. Крім того, враховуючи філогенетичну універсальність, ясно, що природна імунна система є також філогенетично високо стабільною імунозахисною системою.

(3) Природна імунна система

Природна імунна система, основана на макрофагах, відіграє центральну роль в імунозахисній системі, що складається з системи розпізнавання і знищення чужорідної речовини не тільки в видах, які не мають набутої імунної системи, але й в видах, які мають набуту імунну систему. Навіть в організмах, що містять набуту імунну систему, функціонування природної імунної системи перекриває собою розпізнавання і знищення чужорідних речовин майже в усіх випадках, а у випадках, де цього недостатньо, вступає в дію набута імунна система. Навіть в цьому випадку, подача антигенів макрофагом є істотною для конкретного розпізнавання сторонньої речовини, і при видаленні сторонніх речовин, ті клітини, які відіграють центральну роль в системі знищення, є макрофагами, і подібними їм клітинами, які являються клітинами, які складають природну імунну систему.

(4) Знищення чужорідних речовин

З іншого боку, ендogenous чужорідні речовини видаляються цитотоксичними Т-клітинами, характерними для набутої імунної системи (наприклад, знищення клітин, інфікованих вірусом), але інші Т-клітини з антигенною презентацією макрофагів, є необхідними для розповсюдження і розвитку цих цитотоксичних Т-клітин. Тобто, для того, щоб набута імунна система працювала корисно, природна імунна система повинна працювати повністю і нормально до кінця.

(5) Функціональна недостатність

Отже, функціональна недостатність фагоцитозу або антигенної презентації макрофагів може, в основному, стати потенційною причиною імунодефіциту. Конкретно кажучи, наступні явища відомі як функціональна недостатність і захворювання, що мають відношення до аспектів, вказаних вище в п.1.1 (Загальні характеристики макрофагів). Тобто:

1) Недолік адгезії лейкоцитів, синдром Хедіака-Хігасі і тому подібне відомі, як ненормальність функції фагоцитів і як ненормальність фагоцитозу чужорідних речовин. В обох випадках, спостерігається ненормальність фагоцитозної функції, а в останньому випадку, транспортування лізосомального ензиму в фагоцитозну порожнину є ненормальним, таким чином, дезинфекційна здатність знижується і фагоцитозна здатність значно покращується.

2) Хронічний слизисто-шкірний кандидоз також вважається захворюванням, що полягає в ненормальності імунного захисту. Міграційна здатність макрофагів у пацієнта з таким захворюванням падає, що приводить до падіння дезинфекційної здатності кандиди.

3) Синдром Віскотта-Олдріса також розглядається, як захворювання, що полягає в ненормальній здатності до знищення чужорідних речовин. Макрофаги пацієнта проявляють ускладнену імунологічну ненормальність, таку як міграційну не-

нормальність і ураження антигенно-залежної цитотоксичної дії.

4) Антигеновий дефіцит класу II головного комплексу тканинної сумісності (MHS), при якому виникає гострий імунodefіцит, незалежно від нормальних Т та В клітин, розглядається як дисфункція презентаційної здатності антигенної інформації.

5) Дефіцит рецепторів інтерферону, коли дитина з недостатністю рецепторів інтерферону не може захиститися від туберкульозної інфекції, яка може стати фатальною, розглядається, як дисфункція в тому сенсі, що макрофаг активується інтерфероном, щоб стати ефектором клітинно-опосередкованого імунітету.

Крім того, ссавець з дефіцитом набутої імунної системи може існувати і жити, але тварина з дефіцитом макрофага не може існувати. І далі, демонструється, що фізіологічно активні речовини, сукупно названі цитокінами, які виконують міжклітинну передачу сигналів і відіграють важливу роль в імунзахисній системі, що ґрунтується на розпізнаванні і видаленні чужорідної речовини. Макрофаги виробляють і виділяють велику кількість різноманітних цитокінів. Таким чином, функції макрофагу важливі для індивідуального гомеостазису, також стосовно розпізнавання і знищення чужорідної речовини.

(6) Анатомічні властивості

Анатомічні властивості макрофага є різними в залежності від тканинно-специфічних макрофагів які розміщені в різних тканинах і мають властиві якості. Це очевидно, коли розглядається слизова тканина, яка є точкою контакту між індивідумом і навколишнім середовищем. Специфічні макрофаги розміщені на підслизових шарах дихального органу, травного органу і сечостатевого органу, відповідно. Ці тканинно-специфічні макрофаги біологічно відносяться до тканинно-специфічного внутрішнього і зовнішнього середовища. Це означає, що макрофаги відіграють важливу роль для гомеостазу організму додатково до розпізнавання і знищення чужорідних субстанцій. В фізіологічному значенні тканинно-специфічних макрофагів існує багато невідомих аспектів. Поміркувавши, розглядаючи існування істотних тканинно-специфічних макрофагів з нової точки зору, їх відношення до різних патологій зараз може бути прийняте до уваги.

(7) Відношення до патології

Так як ми думаємо про фізіологічну значимість того, що макрофаги відіграють центральну роль в імунній системі, чітко пропонується, що дисфункція тканинно-специфічного макрофагу зв'язана з індукцією тканинно-специфічних патологій. Вдійсності, дисфункція макрофагів причетна до деяких форм багатьох складно виліковних захворювань, таких як хвороба Crohn, яка є одним з запальних кишкових захворювань, подальші аутоімунні захворювання, такі як ревматоїдні, та вікові захворювання, такі як остеопороз. В хронічних інфекціях кислотоустійких бактерій, таких як бактерії туберкульозу, в додаток до проблеми кислотоустійких бактерій самих по собі, можливо вважати, що дисфункція альвеолярних макрофагів присутня в середовищі

патології. Зважаючи на це, можна сказати, що створення ліків, які підвищать фагоцитозну здатність макрофага як цільової клітини і в результаті підвищать концентрацію ліків в макрофазі, є важливою і значною причиною для проведення нової терапії складно виліковних захворювань, включаючи інфекційні захворювання, такі як туберкульоз, проти якого зараз немає ефективної терапії.

II. Дисфункція макрофагів і захворювань

(1) Макрофаги як переносники інфекційних патогенів

Згідно ВОЗ, туберкульоз, СНІД, малярія і тому подібні є хронічними складно виліковними захворюваннями, які мають вважатися найбільш важливими у світовому масштабі. Наприклад, описано, що щорічно 800 або більше мільйонів пацієнтів захворюють на туберкульоз і 300 мільйонів помирають. Є важливим завданням розробити ліки (медикамент/сполуку), ефективні по відношенню до цих захворювань, і суспільне значення цього є максимально високим.

З іншого боку, що стосується захисту від інфекцій і знищення патогену, одна з клітин, яка відіграє найважливішу роль *in vivo*, це макрофаг. Фактично, макрофаги розповсюджуються по всіх органах. Ці макрофаги є різні морфологічно і функції залежать від органів, де існують макрофаги, але вони є загальними для всіх аспектів, які вони виконують по захисту/видаленню інфекції патогену.

З іншого боку, в процесі еволюції інфекційний патоген набуває різних засобів для запобігання атак від макрофагів. Більш того, інфекційні патогени часто ховаються в макрофагах, щоб зробити макрофаг хазяїном. Ясна річ, що патоген, якому вдалося паразитувати в макрофазі, таким чином викликає хронічне або повторне інфекційне захворювання, і звичайно призводить до фатальних наслідків. Тобто, в цьому разі, макрофаг, який зазвичай має завершувати захист/знищення інфекції патогенна, навпаки служить як переносник інфекційного патогену.

(2) Патогени в макрофагах

Типовий приклад вищенаведеного може спостерігатись в туберкульозі. Тобто, патоген (*Mycobacterium tuberculosis* або *Mycobacterium bovis*) фагоцитують макрофаг в альвеолах легенів, які є шляхом інфекції на ранній стадії, і є стабільно присутнім в фагосомних формуваннях в той час. Тобто, патоген може жити, роблячи "сховищем" той макрофаг, який мав спочатку засвоювати його. На додаток, багато збуджувачих захворювання патогенів, таких як *Mycobacterium leprae*, який викликає патоген лепри, *Mycobacterium avium*, який викликає патоген атипового мікобактеріозу, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis* або *Chlamydia psittaci*, які є збуджувачими патогени хламідіозу складно виліковних форм, і радикальна терапія яких ще не винайдена, і розповсюдження яких остерігаються, є звичайними в тому аспекті, що макрофаги стають переносниками інфекційних патогенів.

Багато зусиль було прикладено для запобігання проти бактерій туберкульозу, вірусу СНІД і тому подібних. Але, як тільки встановлена інфекція,

ефективної терапії немає. Навіть якщо присутній компонент, який має пряму дезінфекційну дію проти інфекційного патогену, взагалі не легко зробити концентрацію в макрофазі з патогеном, який є достатнім, щоб ліквідувати специфічний патоген (ліквідація за винаходом означає, що всі або частина патогенів ліквідовані повністю) простим застосуванням відповідних ліків.

Відповідно, навіть якщо позаклітинні патогени можуть бути ліквідовані застосуванням ефективних ліків, макрофаги як переносники патогенів є все ще живі як джерело патогенів і продовжують постачати патогени. Вищезазначене є причиною того, чому зараз немає радикальної медичної терапії проти патогенів, які паразитують в макрофазі. Цей винахід стосується саме цього предмету. Навпаки, якщо це є можливим знищити інфікований патогеном макрофаг як переносник патогену або знищити патогени в макрофагах, інфікованих патогенами, можна радикально вилікувати багато вищезазначених хронічних захворювань. Тому, об'єктом винаходу є створення ліків проти захворювань, причиною яких є дисфункція макрофага або макрофаг, як носій.

В результаті інтенсивних досліджень винахідники дійшли до дивовижної нової ідеї, де є об'єкт по видаленню інфікованого патогеном макрофагу як носія патогену, видаленню патогену в інфікованому патогеном макрофазі і діє на макрофаг, функція якого стала порушеною завдяки захворюванню, і завершує винахід.

Ліки за винаходом відрізняються включенням фагоцитозної активності макрофагу і знищенням патогену в макрофазі.

Також, ліки за винаходом відрізняються пробудженням фагоцитозної активності макрофагів і ведуть макрофаги до смерті клітин.

Також ліки за винаходом відрізняються пробудженням фагоцитозної активності макрофагу і діють на макрофаги в стані дисфункції.

Також, бажано, щоб ліки за винаходом були проти любых мікобактеріозів, СНІДу, хламідіозів або токсоплазмозів. Це дозволяє ефективно лікувати захворювання, при яких макрофаги вміщують патогени.

Також, бажано, щоб ліки за винаходом були проти хвороби Крона, ревматизмів, раку або синдрому імунodefіциту. Це дозволяє ефективно лікувати захворювання, при яких макрофаги знаходяться в стані дисфункції. В синдром імунodefіциту включається СНІД. Також, бажано, щоб вищезазначені макрофаги були такими, які присутні в слизових тканинах. Це дозволяє ефективно лікувати захворювання в таких місцях, як респіраторні органи, органи травлення і сечостатевої органи, де патогени викликають первинну інфекцію.

Також, бажано, щоб вищезазначені макрофаги були такими, які розміщені в перитонеальній порожнині, великому сальнику, молочних плямах, альвеолах легенів, легеневій стромі, печінці, зоні ворітної вени, селезінці, кістковому мозку, тимусі, травному тракту, піднебінних мигдаликах, надниркових, гіпофізі, шитовидній стромі, островці Лангерганса, паратироїдній залозі, шишковидній залозі,

зі, яєчках, яєчниках, яйцєводах, уретрі, плаценті, шкірі, мозкових оболонках, речовині мозку і хоріо-дальній судинній оболонці, або що вищезазначені макрофаги є аналогічними клітинами мікроглії, клітинами передвісників мікроглії, клітинами глії, клітинами передвісників клітин глії, клітинами передвісників вищезазначених макрофагів резидентів, аналогічних клітин вищезазначених макрофагів резидентів, або клітинами передвісників вищезазначених макрофагів резидентів. Це дозволяє ефективно лікувати захворювання в різних органах і тканинах тіла. Також ліки за винаходом характеризуються вмістом PLGA [полі (молочно кислотний/гліколе-кислотний) співполімер] і реагують на туберкульоз. Також, бажано містити ріфампіцин. Це дозволяє лікам знищити бактерії туберкульозу. Також бажано містити PLGA з молекулярною масою від 1500 до 150000. Це дозволяє забезпечити сполуку з мікрочастинами, які є такими, що біологічно розпадаються і фагоцитують в макрофагах.

Також бажано містити PLGA з молекулярною масою від 1500 до 75000. Це дозволяє забезпечити сполуку з мікрочастинами, які фагоцитують в макрофагах і м'яко пропускають медикамент в макрофаги.

Також бажано в подальшому містити принаймні один з PVA (полівініловий спирт), PEG (поліетиленгліколь), PEO (поліетиленоксид), цукор, протеїн, пептид, фосфоліпід або холестерол. Це дозволяє забезпечити сполуку з мікрочастинами, яка активно фагоцитують в залежності від типу макрофагів.

Також в подальшому бажано містити принаймні один з PVA, PEG, PEO, цукру, протеїну, пептиду, фосфоліпиду, або холестеролу і зробити сполуку з мікрочастками з діаметром найбільшої частки від 1 до 6µm. Це дозволяє ефективно скористатись перевагами фагоцитозної функції макрофага включатись в макрофаги. Також бажано допомогти фагоцитній активності фагоцитозуванням. Також бажано мати PLGA з молекулярною масою 5000-20000 і бути для туберкульозу. Також бажано бути створеним методом мембранної емульсифікації. Також бажано містити ліпополісахариди агломерації Pantoea проти СНІДу. Також бажано містити ліпополісахариди агломерації Pantoea і мати цитотоксичний ефект на клітини раку легенів.

Цей опис містить зміст, наведений в описі і/або креслення Японської заявки на [патент №2002-247871], яка є основою пріоритету цієї заявки.

Фіг.1 - вид, що показує порівняння концентрації лікарського засобу в макрофазі в ліках за винаходом з умовними ліками.

Фіг.2 - вид, що показує розподіл діаметру часток сполуки з мікрочастинами, втілений у винаході.

Фіг.3 - вид, що показує порівняння, наскільки різною є кількість клітин, включених в NR 8383 клітини при застосуванні ріфампіцину за винаходом і з застосуванням його, беручи умовно використаний розчин.

Фіг.4 - вид (№1), що показує ріфампіциноутримуючу здатність REP-PLGA мікрочасток, тобто, що кількість вивільненого ріфампіцину є різною в за-

лежності від складу PLGA мікрочасток. Експериментальні значення мають недостовірність 5%.

Фіг.5 - вид, що показує ріфампіциноутримуючу здатність REP-PLGA мікрочасток, тобто, що кількість вивільненого ріфампіцину є різною в залежності від складу мікрочасток PLGA. Експериментальні значення мають недостовірність 5%.

Фіг.6 - вид, що показує, що бактерії туберкульозу в макрофагах можуть бути знищені фагоцитозом REP-PLGA часток макрофага, який фагоцитують бактерії туберкульозу. Життєздатність оцінюється наступним розміщенням: 1-5% або менше, 2-5-25%, 3-25-50%, 4-50-75%, і 5-75% і більше. Кількість застосованого ріфампіцину є 100µg/mL в одиничному застосуванні (показано RPP на малюнку) або 5µg/mL (оцінювальне значення) при застосуванні REP-PLGA (REP-PLGA на малюнку).

Фіг.7 - вид, що показує, що цитотоксична дія альвеолярних макрофагів NR8383 в дисфункційній формі співкультури клітин Sato раку легенів на клітинах Sato раку легенів посилюється активацією фагоцитозної здатності NR8383, використовуючи ліпополісахариди. Відкриті квадрати показують цитотоксичну дію NR83843 без застосування ліпополісахаридів до клітин Sato раку легенів, повні квадрати показують цитотоксичну дію NR8383 з застосуванням полісахариду (1µg/mL) на клітини Sato раку легенів (спільно розведені протягом 4 годин). Цитотоксична дія (5) оцінювалась підрахуванням суми виділеної лактату дегідрогенази в середній оболонці стінки кровоносної судини.

Найкращий приклад застосування винаходу

Нижче детально описані прийнятні способи застосування винаходу з посиланнями на супутні креслення. Але технічний обсяг винаходу не обмежений цими прикладами застосування.

Одна з функцій, яку містять всі макрофаги і специфічна для макрофагів - це фагоцитоз. Фагоцитоз - це функція, при якій тверда частка розміром 1µm або більше активно об'єднується з клітиною макрофага.

З іншого боку, якщо тверда частка штучно активно фагоцитують, можливо акумулювати тверду частку в макрофазі в концентрації, яка звичайно не може бути виконана. Така тверда частка може бути, як правило, надана як частка, але активно фагоцитуюча, необхідно оптимізувати діаметр частки, властивості поверхні частки (заряд, гнучка структура, і т.п.), корисні для фагоцитозу. Наприклад, можливо підготувати частку, яка легко фагоцитують з макрофагом, застосовуючи матеріали, де як субстрат, змішані полілактат і поліетиленгліколь.

Таким чином, якщо медикамент, який діє на інфекційні патогени або інфіковані патогенним макрофаги, змішують щоб приготувати частки, разом з фагоцитозом частки, медикамент також активно об'єднується з макрофагом.

Суттєва частина винаходу є в тому аспекті, що захворювання завдяки дисфункції макрофагу (І.2.(5), (7), ІІ.(1), мікобактеріоз, СНІД, хламідіоз, токсоплазмоз, рак і тому подібні) лікуються наданням переваги фагоцитозній функції, яку мають макрофаги. Таким чином, вищезазначений об'єкт

вдосконалюється засобом підготування сполуки в якій діючий на них медикамент містить мікрочастки (носії медикамента), які можуть фагоцитувати в макрофаги.

Типово, для сполуки, яка є медичною сумішшю носіїв медикаменту і самого медикаменту, необхідно розробити, щоб запобігти фагоцитозу макрофагів. Але, винахід має новизну в аспекті активного надання переваги фагоцитозній активності макрофага, оснований на ідеї, яка повністю перевертає традиційні переконання.

Як було вище зазначено, одна з функцій макрофага по захисту носія - це фагоцитоз. Фагоцитоз - це невід'ємна функція, яка типово спостерігається у макрофагів, і є можливим об'єднати частки з таким розміром, який не може бути об'єднаним з клітинами, іншими, ніж макрофаги. Патологічні мікроорганізми, такі як бактерії, фагоцитують в макрофагах і розкладаються в макрофагах. Тому одним з біологічних значень фагоцитозної функції макрофагів є здатність ослабляти патологічні мікроорганізми. Крім того, макрофаги активні при фагоцитозі і в деяких випадках стають здатними протистояти патологічним мікроорганізмам. Цей феномен відомий як активація макрофагу при фагоцитозі, і це дозволяє макрофагам руйнувати навіть клітини раку. Тому, якщо макрофаги можуть бути активовані при фагоцитозі, щоб посилити фагоцитозну активність, стає можливим видалити патологічні мікроорганізми більш інтенсивно. Для того, щоб частки фагоцитували, очевидно необхідно мати наступні властивості (фагоцитозна властивість).

Це є:

- частки діаметром від 1 до 6µm. Такі частки вважаються дрібними частками.

- поверхня частки зволожена речовиною макрофагів (рідке тіло навколо макрофагів *in vivo*), але частка не розчинюється одразу і присутня як частка деякий період часу.

- Частка є твердою при температурному режимі від 20 до 45°C.

Питома вага частки є більшою, ніж у речовини макрофага (рідкого тіла навколо макрофагів *in vivo*).

Частка має шар поверхні, через який проникають вода та іони.

З іншого боку, розглядаючи те, що частки поступаються *in vivo*, поверхня часток потребує мати макромолекулярний шар з високою тканинною сумісністю. Необхідно утримувати частку до тих пір, поки вона не буде об'єднана з макрофагом в той час, як метаболізується розкладанням на нетоксичні для тіла компоненти *in vivo* (здатність до розщеплення *in vivo*) після об'єднання з макрофагом або коли вона не була об'єднана. Як макромолекула, яка виконує дві вищезазначені умови і може легко бути змодельована в частку, кандидатом є полі (лакто кислота/гліколева кислота) співполімер (в подальшому називаємо PLGA) або полі акриловова кислота (в подальшому називаємо PL). PL є більш гідрофобною і потребує більше часу для розкладання, чим PLGA. З іншого боку, PLGA змінює рівень розщеплення в залежності від коефіцієнту мономеру. Чим більше молекулярна маса,

тим більший час потрібен на розщеплення. Коли молекулярна маса PLGA є 1000 або менше, є можливість того, що вона стане рідкою при температурі від 20 до 45°C. Тому молекулярна маса PLGA, яка є твердою при температурі від 20 до 45°C, бажана 1500 або більше.

Крім того, для випуску медикаменту, який містить частки PLGA з часток, в разі, коли PLGA з молекулярною масою близько 20000, медикамент випускається в майже нульовому призначенні. Тобто, виділена кількість завжди утримується постійною. Але, в разі коли частки PLGA з молекулярною масою від близько 44000 або 75000, утримується пульсуючий тип, де медикамент утримується після постійного періоду часу, скоріше, чим спостерігається нульовий порядок виділення. Більше того, період часу, коли спостерігається пульсуючий тип виділення медикаменту, затримується в сполуці PLGA з меншою молекулярною масою. Тобто структура випуску медикаменту з частками PLGA залежить від молекулярної маси PLGA. Додатково, прогнозується, що рівень розпаду PLGA стосовно випуску медикаменту не тільки затримується з підвищенням молекулярної маси PLGA, але також рівень є вищим *in vivo*, такий як в макрофазі, чим *in vitro*, і таким чином з'ясовується, що можливо ефективно використовувати це при діапазоні молекулярних мас до 150000.

З вищевказаної точки зору, виходить, що сполука дрібних часток з частками діаметром від 1 до 6 μm зроблена з PLGA з молекулярною масою від 1500 до 150000 і рівнем мономеру молочної кислоти/гліколевої кислоти 50:50-75:25 (прийнятний діапазон) і сполука з дрібними частками з частками діаметром від 1 до 6 μm зроблена з PLGA з молекулярною масою від 5000 до 75000 і рівнем мономеру молочної кислоти/гліколевої кислоти 50:50-75:25 (зручний діапазон) легко фагоцитують в макрофагах і є оптимальними для об'єктів, що випускається медикамент з утримуванням постійної стійкості сполуки дрібних часток, яка внутрішньо містить медикамент в макрофагах.

Приготування нових ліків, які дозволяють специфічне знищення макрофагів, що містять інфекційні патогени.

Активним наданням переваг специфічній діяльності макрофагів, які містять різні інфекційні патогени, включаючи бактерії туберкульозу, для того, щоб видалити патогени в макрофагах, або макрофаги самі по собі утримуючі патогени, ефективні наступні ліки.

(1) Ліки, які побуджують фагоцитозну активність макрофагів.

(2) Ліки, маючі пряму дію по видаленню інфекційних патогенів в макрофагах.

(3) Ліки, які діють на макрофаги.

Лікам за п.(1), бажано мати природу, здатну фагоцитувати вибірково в макрофагах, які утримують/не утримують інфекційні патогени. Звичайно, відомо, що існують субстанції, які активують фагоцитну активність макрофагів (предмет, відомий зі статті). Спроби розробити ліки, які діють на патогени в макрофагах активним наданням переваги цій властивості, іще зовсім не виконані (новий предмет). В типах (2) і (3), значаться не тільки різні

медикаменти, які діють безпосередньо на патогени, але також гени самі по собі, такі як DNA або RNA, виконуючі дію по модифікуванню фізіологічних функцій макрофагів, які утримують/не утримують патогени, можуть бути використані як медикаменти. Спроби розробити ліки, діючі по видаленню інфекційних патогенів, і поєднуючи (1), (2) і (3) ще зовсім не вдалися, і ліки за винаходом є новим типом ліків, ефективним для лікування інфекційних патогенів (нова речовина).

Наприклад, в Antimicrobial Agents and Chemoterapy [Vol 42? No/10: 2682-2689, 1998], розкривається антитуберкульозна дія часток, що містять ріфампіцин в PLGA. Але, в цьому звіті, зовсім не описаний процес фагоцитозної дії часток PLGA. Крім того, оскільки частки PLGA містять ріфампіцин, ефективність ліків як протитуберкульозних, не підвищується в порівнянні з самим ріфампіцином, це очевидно має різні характеристики з частками за винаходом. Крім того, як показано на Фіг.4 і Фіг.5, молекулярна маса PLGA є важливою для контролю виділення ріфампіцину. Але в вищевказаному звіті молекулярна маса PLGA, що використовується при приготуванні PLGA, не описана. Вважається, що можливо із-за використання PLGA з різною молекулярною масою, чим у часток за винаходом, це не призвело до надання функцій антитуберкульозних ліків. Коли готуються частки PLGA, що мають антитуберкульозну активність, використовуючи ті, які є правильними по відношенню до молекулярної маси PLGA, мають бути оціненими співвідношення мономеру і діаметр підготовлених часток, об'єднання часток засобом фагоцитозу макрофагів і антитуберкульозна активність макрофагів. Беручи вищевказані аспекти разом, в вищеповисаних частках PLGA, спостерігається деяка спільність даних, так як співвідношення мономерів PLGA і діаметр часток випадають в "зручний діапазон" винаходу, але коректні характеристики часток не описані і антитуберкульозна активність ліків не спостерігається. Тому складно знайти відомий приклад, який заперечує новизні і винахідницькому рівню винаходу.

Крім того, в [Pharmaceutical Research (Vol.17, No.8: 955-961, 2000)], розкритий спосіб підготовки часток, що містять ріфампіцин, з використанням PLGA з молекулярною масою 82500. Цей спосіб для підготовки часток відрізняється від способу за винаходом. Ефект знищення бактерій туберкульозу частками PLGA, що містять ріфампіцин з використанням PLGA з молекулярною масою 82500 розкритий в [Pharmaceutical Research (Vol.18, No.9: 1315-1319, 2001)]. Це показує, що антитуберкульозна активність часток PLGA, що містять ріфампіцин, є гіршою, чим дія самого ріфампіцину *in vitro* і що не можна сказати, що при експериментах на тваринах був очевидний ефект від застосування ліків. Для того, щоб виявити антитуберкульозну активність часток PLGA, що містять ріфампіцин, частки повинні мати відповідну здатність до розпаду і високий рівень внутрішнього вмісту ріфампіцину. Але в вищевказаній статті, такі характеристики, від яких залежить активність, не розглянуті, і вивчена антитуберкульозна активність. Відомо, що здатність до розпаду і внутрішній рівень зни-

жені в частках з великою молекулярною масою, і таким чином, виникає, що із-за використання PLGA з високою молекулярною масою до 82500, антитуберкульозна активність не виявлена. Як у вищесказаному, проводились схожі з дослідженнями за винаходом дослідження, але намагання ліквідувати внутріклітинні паразитичні патогени засобами надання переваги фагоцитній активності макрофагу і виконання цієї дії ніколи не було виконано. Також виготовлені PLGA, що містять ріфампіцин, але не було проведено потрібних досліджень для підготування способу і матеріалів для надання можливості створити об'єкт винаходу. Додатково, в [Pharmaceutical Research (Vol.18, No.10: 1405-1410, 2001)], є опис того, що припускалось, що частки PLGA, що містять ріфампіцин, об'єднані з макрофагами. Але, також в цьому випадку, частки не активно об'єднуються з макрофагами, або не вироблено сполуки, пробуджуючої активацію, і фактично, не вивчено фагоцитного рівня часток PLGA, що містять ріфампіцин. В зв'язку з цим, в цьому звіті описана концентрація ріфампіцину в макрофагах *in vitro* з використанням часток PLGA, що містять ріфампіцин тільки $0,45\mu\text{m}/10^6$ клітин. В разі використання дрібних часток PLGA, що містять ріфампіцин, не тільки активується фагоцитоз, але також концентрація ріфампіцину в макрофагах досягає $6\mu\text{m}/10^6$ клітин, які в 13 разів або більше. Виходячи з вищевказаного, якщо намагатись стимулювати фагоцитоз в макрофагах і видалити патологічні мікроорганізми в макрофагах, очевидно, що складно це виконати тільки способом включення ліків в мікросфери. Крім того, в деяких попередніх звітах, не вивчено, чи видаляють частки PLGA, що містять ріфампіцин, внутріклітинні бактерії туберкульозу з використанням альвеолярних макрофагів, які є цільовими клітинами бактерій туберкульозу. Очевидно, що зважаючи на вищевказане "Macrophage Which Supports Life", макрофаги є високо тканинно-специфічними, і тому це відомий факт, що результати, отримані з використанням макрофагів, присутніх в крові, не можуть застосовуватись до тканинно-специфічних макрофагів, наприклад, альвеолярних макрофагів. Тобто, як новизна винаходу, само собою розуміється новизна цієї концепції. Приклади, які підтримують цю концепцію, містять ті аспекти, що використовуються альвеолярні макрофаги і збуджується фагоцитна активність клітин, і висока концентрація медикаментів звичайно акумулюється в альвеолярних макрофагах, і продукуються і забезпечуються частки PLGA що містять ріфампіцин, коли знищення бактерій туберкульозу з альвеолярних макрофагів за допомогою сполуки є очевидно більш успішним, чим за допомогою самого ріфампіцину.

З іншого боку, широко відомо, що утворення неспецифічних антибактеріальних субстанцій, наприклад, пероксиду водню і радикалу кисню з макрофагів покращується фагоцитозом часток в макрофагах. Наприклад, в [European Journal of Pharmaceutical Sciences (Vol.15, pp.197-207, 2000)], розкрито, що виробництво пероксиду гідрогену з культивованих макрофагів, властивості яких мають слідство з моноцитами крові, покращується

фагоцитуючими частками PLGA. Але не описано, що фагоцитоз PLGA макрофагами підвищує фагоцитну активність. Крім того, оскільки активація макрофагів є суттєво різною, підвищення утворення пероксиду водню фагоцитозом не прямо пов'язується з підвищенням фагоцитозу.

Коли виконується запропонований спосіб лікування інфекційного захворювання, є ефективною сполука, в якій медикамент типу (2) або (3) міститься в ліках типу (1). Тобто, для того, щоб ліки типу (2) або (3) ефективно діяли в макрофагах, ліки типу (1) допомагають фагоцитній активності макрофагів покращити функцію, переносячу ліки типу (2) або (3) в макрофаги. Тобто, як показано на Фіг.1, ліки за винаходом легко фагоцитозують макрофагами, допомагають фагоцитній активності фагоцитозуванням, і таким чином концентрація ліків в макрофагах стає значно вищою в порівнянні з випадком застосування ліків самих. Тобто в порівнянні з медикаментами, проникаючими в макрофаги в звичайному розчині ліків з однієї сторони, з іншого боку внутрішньо включені в ліки малі частки за винаходом активно проникають в макрофаги, щоб підвищити концентрацію ліків в макрофагах. В зв'язку з цим, "допомога фагоцитній активності макрофагів", описана в формулі означає, що концентрація ліків в макрофагах стає значно вищою в порівнянні з випадком застосування ліків самих, тому що ліки покращують фагоцитну активність макрофагів.

Характерний приклад застосування: Туберкульоз

Туберкульоз взятий як приклад, що показує ефективність ліків, представлених у винаході. Бактерії туберкульозу вторгаються в дихальні шляхи до легеневих альвеол краплинно, і фагоцитують з альвеолярними макрофагами. Типово, фагоцитуючі патогени призначені для розкладання атакою протеази в клітинах. Але бактерії туберкульозу уникають атаки протеази і живуть в макрофагах. Ці бактерії туберкульозу в макрофагах мігрують з макрофагів, і уперто постачають туберкульозні бактерії в тіло хазяїна. В теперішній час, як анти-туберкульозні ліки, використовуються такі медикаменти як ізоніазид, ріфампіцин, сульфат стрептоміцину і етамбутол. Всі медикаменти є ефективними проти бактерій туберкульозу зовні макрофагу, але не проявляють ефект на бактерії туберкульозу в альвеолярних макрофагах. Це в більшій мірі стосується того, що концентрація медикаменту, істотна, щоб видалити туберкульозні мікроби, не досягається в альвеолярних макрофагах.

Таким чином, якщо отримують концентрацію медикаменту достатню для знищення бактерії туберкульозу в альвеолярних макрофагах, використовуючи переваги фагоцитозу альвеолярних макрофагів, також можливо знищити бактерії туберкульозу в альвеолярних макрофагах. В цьому разі, фагоцитоз використовується для того, щоб вибірково підвищувати концентрацію медикамента в макрофагах.

А. Ліки, які підвищують фагоцитозну здатність макрофагів

Використовуючи PLGA як зразок, описано спосіб для виробництва ліків, які підвищують

фагоцитозну активність макрофагів і її ефект.

1. Підвищення фагоцитозної здатності макрофагів сполукою з дрібними частками PLGA (в цій частині, дрібні частки PLGA самі по собі є медичними інгредієнтами).

1. Спосіб підготовки дрібних часток PLGA

(a) Матеріали

(1) PLGA [полі (лакто-кислотний/гліколево-кислотний) співполімер] співвідношення мономеру: 72:25, молекулярна маса: 20000 [Wako Pure Chemical Industries Ltd., PLGA-7520].

(2) PVA (полівініловий спирт) рівень полімеризації: 500

(b) Підготовка сполуки з дрібними частками PLGA

(1) 500мг PLGA розчиняють в 1,5мL метиленхлориду.

(2) PVA розчиняють в воді до 0,3% (w/v).

(3) Коли 8мL водного розчину PVA (2) додають до розчину (1) і розмішують протягом 3 хвилин, і створюють водно-масляну емульсію (типу o/w).

(4) (3) додають в 200мL водного розчину PVA (2), і розмішують при кімнатній температурі при 520об./хв. 3 години.

(5) Сполуку з дрібними частками осаджують центрифугуванням (3000об./хв., 15 хвилин), розділюють, в подальшому двічі промивають з додаванням 10мL дистильованої води, використовуючи центрифугу.

(6) Висушують при зниженому тиску в сушильній шафі 24 години.

(7) Розподіл діаметру часток під дією сполуки дрібних часток показаний на Фіг.2. Як це видно з цієї фігури, підготовлена сполука дрібних часток досягає піку при діаметрі близько 2μm і мають розподіл від 1 до 10μm. Ця частка є твердою при температурі навколишнього середовища. Вихід, розрахований з PLGA (500мг), використаного для приготування, і чиста маса відновленої сполуки близько 90%.

(8) Інші приклади

Характеристики (молекулярна маса і склад) додатково створених дрібних часток PLGA шляхом вилучення показані нижче.

1. PLGA-5005 (PLGA, молекулярна маса: 5000; молочна кислота/гліколева кислота: 50:50).

2. PLGA-5010 (PLGA, молекулярна маса: 10000; молочна кислота/гліколева кислота: 50:50).

3. PLGA-5020 (PLGA, молекулярна маса: 20000; молочна кислота/гліколева кислота: 50:50).

4. PLGA-7505 (PLGA, молекулярна маса: 5000; молочна кислота/гліколева кислота: 75:25).

5. PLGA-7510 (PLGA, молекулярна маса: 10000; молочна кислота/гліколева кислота: 75:25).

Спосіб приготування сполуки дрібних часток PLGA є такий самий, як і в 1. (b) (1)-(6) за виключенням роду PLGA.

Середній діаметр часток отриманої в результаті сполуки з дрібними частками був приблизно 2μm, навіть коли використовувалась будь-яка PLGA. Вихід, розрахований з PLGA (500мг), яка використовувалась для підготування і чиста маса відновленої сполуки близько 90%.

2. Підвищення ефекту від фагоцитозу сполуки з дрібними частками PLGA на фагоцитоз альвеолярних макрофагів

(1) Клітини альвеолярних макрофагів (клітини NR8383) підготовлені до 1×10^6 клітин/мL в субстраті (Ham F-12K, 15% сироватки ембріонів телят), додані в 24-луночну тарілку і туди також додають 0.04, 0.4 або 4μg сполуки з дрібними частками PLGA-7520, які після цього обробляються в газовому інкубаторі двоокису вуглецю (37°C).

(2) Через одну годину після обробки, субстрат видаляють, додають 0.1мL соляного розчину, що містить 0.25% буферного розчину трипсину/фосфату (в подальшому PBS), лишають при кімнатній температурі на 5 хвилин, потім видаляють плаваюче на поверхні середовище обробки, і промивають.

(3) Туди ж додають 0.1мL субстрату, змішують з 0.1мL 80% Перколу (Фармація), щоб підготувати 40% розчин Перколу. Це суміщають на 0.1мL 70% Перколу, поміщеного в 1.5мL пробірку, і відцентрифугують (8000об./хв., 10 хвилин).

(4) Після центрифугування збирають клітини, присутні на поверхні, після промивання клітин PBS додають 1мL засобу. Частки латексу полістиролу (FITC-PSLP) з діаметром часток 2.0μm помічають додаванням 1×10^7 флуоресцентним ізородановим ефіром (FITC), і розчин обробляють протягом 1 години. Мічення флуоресцентним FITC робиться для кращого виконання кількісного аналізу.

(5) Після обробки, виконується центрифугування (700об./хв., 5 хвилин), після того додається 1мL PBS до макрофагів в шар осаду, і двічі повторюють центрифугування.

(6) Після видалення PBS 0.1мL 10% формаліну/PBS додають до клітин, держать 5 хвилин, після чого додають 1мL дистильованої води, видаляють вплившє на поверхню, знову додають 1мL дистильованої води. Після видалення вплившєго на поверхню додають 0.1мL дистильованої води, щоб розчинити клітини, і беруть 0.02мL суспензії, розподіляють на предметному склі і висушують.

(7) Під флуоресцентним мікроскопом фотографують різні видимі області і вимірюють кількість клітин NR8383, які об'єднані FITC-PSLP на 100 клітин.

(8) Зміни фагоцитуючої кількості FITC-PSLP в макрофагах сполукою дрібних часток PLGA відбуваються як показано в таблиці 1. Додавання невеликої кількості сполуки дрібних часток PLGA не надає значного впливу на здатність макрофагів до фагоцитозу, але є очевидним, що додавання 0.4(μg/мL) помітно активує здатність до фагоцитозу.

Таблиця 1

Підвищуючий ефект сполуки дрібних часток PLGA на здатність макрофагів до фагоцитозу

Кількість сполуки дрібних часток PLGA (μg/мL)	Рівень поглинання FITC-PSLP (%)
0	11.6
0.004	8.8
0.04	12.3
0.4	20.2

II. Покращення фагоцитозної здатності макрофагів ліпополісахаридом.

1. Спосіб підготування ліпополісахариду

(a) Матеріал

(1) Агломерація *Pantoea*, яка належить до грам-негативних бактерій, genus *Pantoea*.

(b) Підготування полісахариду

(1) Агломерація *Pantoea* додається до 7 літрів поживного субстрату для вирощування мікроорганізмів (10г/л триптон, 5г/л екстракту дріжджів, 10г/л NaCl, 1г/л глюкози, pH7.5), обробляють перемішуванням при 35°C протягом 24 годин, і збирають близько 70г вологих бактерій.

(2) 70г бактерій розчинюють в 500мл дистильованої води, додають 500мл 90% нагрітого фенолу, розмішують при 65-70°C протягом 20 хвилин, охолоджують, і потім збирають осадовий шар. Зібраний осадовий шар підвертають діалізу протягом ночі щоб видалити фенол, і внутрішній розчин діалізу ультрафільтрують, щоб сконцентрувати до молекулярної маси 200000 закривання мембран під азотом до двох атмосфер.

(3) Отриману заморожену/висушену сировину ліпополісахариду розчинюють в дистильованій воді, піддають аніонообмінній хроматографії (постачає Pharmacia, Q-Sepharose Fast Flow), зразок розчину пропускають через колонку з використанням буферу, що містить 10мМ три-НСІ (pH7.5) і 10мМ NaCl, і елюють активну фракцію *Limulus* з 200 до 400мМ NaCl/1-мм. Три-НСІ (pH7.5). Засобом ультрафільтрації цей елюований розчин, обезсолений, концентрований і заморожений/висушений при вищезазначених умовах, можливо отримати близько 300мг очищених ліпополісахаридів від близько 70г вологих бактерій.

2. Покращуючий ефект ліпосахаридів на фагоцитоз альвеолярних макрофагів.

(1) Клітини альвеолярних макрофагів (NR8383) підготовлюють до 1×10^6 клітин/мл в речовині (Ham F-12K, 15% сироватка ембріонів телят), і додають в 24-лункову тарілку. Туди ж додають ліпополісахарид, щоб отримати 1μг/мл, і культуру обробляють в газовому інкубаторі двоокис вуглецю (37°C).

(2) Після обробки культури протягом 1 години, клітини переміщують в 1.5мл пробірку і субстрат видаляється центрифугуванням (2000об./хв., 5 хвилин). Потім додається 0.1мл 0.25% трипсину/PBS, пробірка лишається при кімнатній температурі на 5 хвилин, потім впливши на поверхню культура видаляється центрифугуванням (2000об./хв., 5 хвилин), і виконується промивання з PBS.

(3) Крім того, додають 0.1мл речовини, змішують з 0.1мл 60% Перколу, щоб приготувати 30% розчин Перколу, який центрифугують (8000об./хв., 10 хвилин).

(4) Після центрифугування збирають клітини, присутні на поверхні рідини, і двічі промивають з PBS. Потім додають 1мл речовини, додають FITC-PSLP з діаметром часток 2.0μм при 1×10^7 , яку потім витримують протягом 1 години.

(5) Після вирощування видаляють те, що піднялося на поверхню, додають 0.1мл 0.25% трипсину/PBS, суміш лишають при кімнатній температу-

рі на 5 хвилин. Потім додають 1мл субстрату і виконують центрифугування (700об./хв., 5 хвилин).

(6) До макрофагів додають 1мл PBS в шар осадження, виконується центрифугування (700об./хв., 5 хвилин), видаляється те, що виплило на поверхню. Знову додається 1мл PBS, виконується центрифугування (700об./хв., 5 хвилин) і видаляється те, що виплило на поверхню.

(7) Після видалення того, що виплило на поверхню до клітин додається 0.1мл 10% формалін/PBS, залишається на 5 хвилин, потім додається 1мл дистильованої води, видаляється те, що виплило на поверхню, знову додається 1мл дистильованої води, і видаляється те, що виплило на поверхню.

(8) Після видалення того, що виплило на поверхню додається 0,1мл дистильованої води, щоб суспензувати клітини, беруть 0.02мл суспензії, розподіляють на поверхні скла, і висушують.

(9) Під флуоресцентним мікроскопом фотографують різні видимі області і вимірюють кількість клітин NR8383, які об'єднані FITC-PSLP на 500 клітин.

(10) Збільшення фагоцитуєної кількості макрофагів FITC-PSLP ліпосахаридами показано на таблиці 2. Очевидно, що фагоцитозна здатність макрофагів активується полісахаридами.

Таблиця 2

Активізація фагоцитозної здатності макрофагів ліпополісахаридами

Додаткова кількість ліпополісахаридів (μг/мл)	Рівень поглинання FITC-PSLP (%)
0	31
1.0	51

В. Ліки, які діють на патогени в макрофагах

Ефективна міграція ріфампіцину (антитуберкульозні ліки) в макрофаги засобом фагоцитозу формацій дрібних часток REF-PLGA.

1. Підготування формацій дрібних часток PLGA з внутрішньо включеним ріфампіцином.

(a) Матеріали

(1) PLGA [полі (лакто-кислотний/гліколево-кислотний) співполімер] співвідношення мономеру: 72:25 або 50:50, молекулярна маса: 5000, 10000, або 20000 Wako Pure Chemical Industries Ltd., PLGA-5005, 5010, 5020, 7505, 7510, 7520.

(2) Ріфампіцин

(3) PVA (полівініловий спирт) рівень полімеризації: 500.

(b) Підготування формації дрібних часток REFR-PLGA

(1) PLGA (500мг) і ріфампіцин (0, 50, 100 або 200мг) розчинюють в 1.5мл метилену хлориду.

(2) PVA розчинюють у воді до 0.3% (w/v).

(3) Коли 8мл водного розчину PVA (2) додають до розчину (1) і розмішують 3 хвилини, і формують емульсію типу о/в.

(4) В 200мл водного розчину PVA (2) додають в (3), і розмішують при кімнатній температурі при 520об./хв. 3 години.

(5) Сполука дрібних часток осаджується центрифугуванням (3000об./хв., 15 хвилин), розді-

ляється, і в подальшому двічі промиваються додаванням 10мл дистильованої води, використовуючи центрифугу.

(6) Висушують при зниженому тиску в сушильній шафі 24 години.

(7) Вироблені дрібні частки PLGA (молекулярна маса і склад) шляхом вилучення показані нижче.

1. REF-PLGA 5005 (PLGA, молекулярна маса: 5000; молочна кислота/гліколева кислота: 50:50).

2. REF-PLGA 5010 (PLGA, молекулярна маса: 10000; молочна кислота/гліколева кислота: 50:50).

3. REF-PLGA 5020 (PLGA, молекулярна маса: 20000; молочна кислота/гліколева кислота: 50:50).

4. REF-PLGA 7505 (PLGA, молекулярна маса: 5000; молочна кислота/гліколева кислота: 75:25).

5. REF-PLGA 7510 (PLGA, молекулярна маса: 10000; молочна кислота/гліколева кислота: 75:25).

6. REF-PLGA 7520 (PLGA, молекулярна маса: 20000; молочна кислота/гліколева кислота: 75:25).

Розподіл розміру часток і характеристики всіх отриманих дрібних часток сполуки були такі самі, як у сполуки дрібних часток з однією PLGA (A. I. 1. (b) (7)).

(8) 4мг сполуки дрібних часток, де міститься 0, 50, 100 або 200мг ріфампіцину, розчинюється в 1мл метилену хлориду, потім спектрофотометром вимірюється абсорбція при 475nm.

(9) Кількість ріфампіцину, отриманого з сполуки дрібних часток RFP-PLGA (дрібні частки PLGA-7520 зроблені з PLGA з молекулярною масою 20000 і молочною кислотою/гліколевою кислотою 75/25) показана в таблиці 3. Як видно з результату, вияснено, що ріфампіцин рецептований вірно.

Таблиця 3

Кількість ріфампіцину, внутрішньо включеного в сполуку дрібних часток RFP-PLGA

Ріфампіцин (мг)	Кількість PLGA (мг)	Внутрішньо включений ріфампіцин (%)
0	500	-
50	500	83
100	500	82
200	500	89

2. Інший спосіб приготування сполуки дрібних часток RFP-PLGA (спосіб мембранної емульсифікації, відомий зі статті)

Використовуючи спосіб мембранної емульсифікації підготовлена сполука дрібних часток RFP-PLGA 7510.

Спосіб мембранної емульсифікації - це спосіб емульсифікації, де одна (фаза дисперсії) з двох видів рідин, які не змішані разом, стискається до дисперсії в іншу рідину (постійна фаза) через пористу скляну мембрану. Використовуючи цей спосіб, можливо отримати емульсію з однаковими діаметрами часток.

(a) Матеріали

(1) PLGA [полі (лакто-кислотний/гліколево-кислотний) співполімер] співвідношення мономеру: 72:25 або 50:50, молекулярна маса: 10000Wako Pure Chemical Industries Ltd., PLGA 7510.

(2) Ріфампіцин

(3) PVA (полівініловий спирт) рівень полімеризації: 500.

(b) Підготування формації дрібних часток REFR-PLGA

(1) PLGA (500мг) і 100 ріфампіцину розчинюють в 10мл метиленхлориду.

(2) PVA розчинюють у воді до 0.3% (w/v).

(3) Коли розчин (1) диспергують (розчинюють) у 100мл водного розчину PVA (2) через SPG мембрану (Ise Chemicals Corporatio, розмір пори: 0.49µm), і формують водно-масляну емульсію (типу o/w).

(4) В 200мл водного розчину PVA (2) додають (3), і розмішують при кімнатній температурі при 520об./хв. 3 години.

(5) Сполука дрібних часток осаджується центрифугуванням (3000об./хв., 15 хвилин), розділяється, і в подальшому двічі промивається додаванням 10мл дистильованої води, використовуючи центрифугу.

(6) Висушують при зниженому тиску в сушильній шафі 24 години.

(7) Сумарний діаметр часток виробленої сполуки дрібних часток є 1,98дм. Вихід PLGA обраховували з PLGA (500мг) використаного для підготування і внутрішня маса отриманої сполуки була близько 90%. Вихід ріфампіцину - близько 75%. Частки є твердими при температурі навколишнього середовища.

3. Інші приклади способу мембранної емульсифікації

Дрібні частки RFP-PLGA (молекулярна маса і склад), інші, ніж сполука дрібних часток RFP-PLGA 7510, шляхом вилучення показані нижче.

1. RFP-PLGA 5005 (PLGA, молекулярна маса: 5000; молочна кислота/гліколева кислота: 50:50).

2. RFP-PLGA 5010 (PLGA, молекулярна маса: 10000; молочна кислота/гліколева кислота: 50:50).

3. RFP-PLGA 5020 (PLGA, молекулярна маса: 20000; молочна кислота/гліколева кислота: 50:50).

4. RFP-PLGA 7505 (PLGA, молекулярна маса: 5000; молочна кислота/гліколева кислота: 75:25).

5. RFP-PLGA 7520 (PLGA, молекулярна маса: 20000; молочна кислота/гліколева кислота: 75:25).

Спосіб підготування цієї сполуки дрібних часток RFP-PLGA є таким самим, як і вищеописаний спосіб мембранної емульсифікації, за виключенням видів PLGA. Середні діаметри часток отриманої сполуки дрібних часток є 2.20µm в PLGA 5005, 2.66µm в PLGA 5010, 2.29µm в PLGA 5020, 2.00µm в PLGA 7505, і 1.85µm в PLGA 7520. Всі виходи PLGA розраховуються з PLGA (500мг), використаної для підготування і внутрішня маса отриманої сполуки є близько 90%. Вихід ріфампіцину був близько 87% в PLGA 5005, близько 78% в PLGA 5010, близько 67% в PLGA 5020, близько 91% в PLGA 7505, і близько 58% в PLGA 7520.

4. Вивільнення ріфампіцину з дрібних часток RFP-PLGA

(1) Відповідні дрібні частки RFP-PLGA (50мг), підготовлені способом мембранної емульсифікації, були дисперсовані в 5мл фосфатного буферу при pH7.4 (іонна потужність: 0.154M) утримані при 37°C (температура).

(2) Через довгий період часу те, що виплило на поверхню, було зібрано центрифугуванням, і до залишившихся дрібних часток було додано 5мл фосфатного буферу при pH7.4 (іонна потужність: 0.154 M).

(3) Була вимірена концентрація елюйованого впливового на поверхню при довжині хвилі 475nm.

(4) Співвідношення рифампіцину, виділеного з відповідних дрібних часток RFP/PLGA на поверхню, показано на Фіг.4 і Фіг.5. З даних цього експерименту, було показано, що співвідношення виділеного з PLGA рифампіцину з молекулярними масами 5000 і 10000, тобто PLGA 5005, PLGA 5010, PLGA 7505 і PLGA 7510 було швидким. З цих результатів, показано, що сполука PLGA, в якій молекулярна маса є 5000-10000 і рівень молочної кислоти до гліколевої кислоти є 50:50 або 75:25 і є відмінним при міграції ліків в макрофаги засобом фагоцитозу.

5. Вибіркове збільшення мікклітинної концентрації рифампіцину при фагоцитозі сполуки дрібних часток RFP-PLGA (PLGA-7520)

(1) Приготовлена сполука дрібних часток RFP-PLGA знову диспергується в PBS, виконується центрифугування (400об./хв., 5 хвилин), щоб видалити великі частки, і сполука дрібних часток (близько 30% вагою) підготовлюється до розмірів 1-3µm під мікроскопом і використовується для наступного експерименту.

(2) Вирощені клітини NR8383 5×10^5 клітин/0.9мл в поживній середі помішують в 24-лункову тарілку, також додають 0.12мг/0.1мл кожної сполуки дрібних часток RFP-PLGA, і вирощують протягом 12 годин.

(3) Після вирощування субстрат видаляють, додають 0.1мл 0.25% трипсину/PBS, потім залишають при кімнатній температурі на 5 хвилин, потім видаляють вплившу на поверхню культуру і виконують промивання.

(4) Туди ж додають 0.1мл поживного субстрату, і змішують з 0.1мл 80% розчином Перколу. Це додається до 0.1мл 70% Перколу, поміщеного в 1.5мл пробірку, центрифугується (8000об./хв., 10 хвилин).

(5) Після центрифугування клітини, присутні на поверхні, збирають, промивають з PBS, і потім видобувається рифампіцин, об'єднаний в клітини, з метилен хлоридом.

(6) Кількість рифампіцину визначається з абсорбувати при 475nm.

(7) Як контроль, готується диметилсульфоксидний розчин рифампіцину (DMSO) в такій самій кількості, що містить 0.12мг сполуки дрібних часток RFP-PLGA, де додається до 24-лункову тарілку, в яку додано 1мл поживного субстрату, також туди додаються клітини NR83 83.

(8) Клітини вирощуються протягом 12 годин, потім клітини (5×10^5 клітин) збирають, і рифампіцин в клітинах виділяється з метилен хлоридом.

(9) Кількість поглинання рифампіцину макрофагами показана на Фіг.3. Показано, що рифампіцин приблизно 19 разів об'єднується в додаткову кількість 40(µg/ 5×10^5 клітин/well/мл) рифампіцину в разі присутності сполуки дрібних часток RFP-PLGA

в порівнянні з умовним субстратом, що містить рифампіцин.

C. Медикамент (A+B), який посилює фагоцитозну здатність макрофагів і діє на патогени в макрофагах.

Покращуюча дія на фагоцитозну активність макрофагів фагоцитуючою сполукою дрібних часток RFP-PLGA.

1. Підготування сполуки дрібних часток RFP-PLGA

(a) Матеріали

(1) PLGA [полі (лакто-кислотний/гліколево-кислотний) співполімер] співвідношення мономеру: 72:25 або 50:50, молекулярна маса: 5000, 10000 або 20000, Wako Pure Chemical Industries Ltd., PLGA 5005, 5010, 5020, 7505, 7510, 7520.

(2) Рифампіцин

(3) PVA (полівініловий спирт) рівень полімеризації: 500.

(b) Підготування сполуки дрібних часток REFR-PLGA

(1) PLGA (500мг) і 100 рифампіцину розчинюють в 1.5мл метилену хлориду.

(2) PVA розчинюють у воді до 0.3% (w/v).

(3) Коли 8мл водного розчину PVA (2) додають до розчину (1) і розмішують 3 хвилини, формується водно-масляна емульсія (типу o/w).

(4) В 200мл водного розчину PVA (2) додають (3), і розмішують при кімнатній температурі при 520об./хв. 3 години.

(5) Сполука дрібних часток осаджується центрифугуванням (3000об./хв., 15 хвилин), розділяється, і в подальшому двічі промивається додаванням 10мл дистильованої води, використовуючи центрифугу.

(6) Висушують при зниженому тиску в сушильній шафі 24 години.

(7) Розподіл розміру часток і характеристики отриманої сполуки дрібних часток були такі ж самі, як і у сполуки дрібних часток самої PLGA (A.I.1.(a) (7)).

(8) Сполука дрібних часток знову диспергується в PBS, виконується центрифугування (400об./хв., 5 хвилин), щоб видалити великі частки сполуки дрібних часток, і сполука дрібних часток, підготовлена в розмірах близько 1-3µm, використовується для наступних експериментів.

2. Покращення фагоцитозної активності макрофагів фагоцитозом сполуки дрібних часток RFP-PLGA (PLGA-7520)

(1) Клітини альвеолярних макрофагів (NR8383) підготовлюють до 1×10^6 клітин/мл в поживній середі (Ham F-12K, 15% сироватка ембріонів телят), додають в 24-лункову тарілку, туди ж додають 0.012, 0.12 або 1.2µг сполуки дрібних часток PLGA, які потім вирощують в газовому інкубаторі двоокис вуглецю (37°C).

(2) Через 1 годину після обробки культури, клітини переміщують в 1.5мл пробірку і поживне середовище видаляється, додається 0.1мл 0.25% трипсину/PBS, суміш залишається на 5 хвилин при кімнатній температурі, потім вплившу на поверхню культура видаляється, і виконується промивання.

(3) Крім того, додають 0.1мл поживного субстрату, додають 0.1мл 90% Перколу, щоб приготувати 45% розчин Перколу, і виконують центрифугування (8000об./хв., 10 хвилин).

(4) Після центрифугування збирають клітини, присутні на поверхні рідини, і двічі промивають з PBS. Потім додають 1мл того ж поживного субстрату, який використовувалось в (1), додають FITC-PSLP з діаметром часток 2.0μм при 1×10^7 , яку потім витримують протягом 1 години.

(5) Після вирощування видаляють те, що піднялося на поверхню, додають 0.1мл 0.25% трипсин/PBS, суміш лишають при кімнатній температурі на 5 хвилин. Потім додають 1мл речовини і виконують центрифугування (700об./хв., 5 хвилин).

(6) До макрофагів додають 1мл PBS в шар осадження, виконується центрифугування (700об./хв., 5 хвилин), видаляється те, що виплило на поверхню. Знову додається 1мл PBS, виконується центрифугація (700об./хв., 5 хвилин) і видаляється те, що виплило на поверхню.

(7) Після видалення того, що виплило на поверхню до клітин додається 0.1мл 10% формалін/PBS, залишається на 5 хвилин, потім додається 1мл дистильованої води, виконується центрифугування (700об./хв., 5 хвилин), знову додається 1мл дистильованої води, видаляється те, що виплило на поверхню. Туди ж додається 1мл дистильованої води, щоб суспендувати клітини, беруть 0.02мл суспензії, розподіляють на поверхні скла, і висушують.

(8) Під флуоресцентним мікроскопом фотографують різні видимі області і вимірюють кількість макрофагів (клітин NR8383), які об'єднані FITC-PSLP на 500 клітин.

(9) Збільшення кількості FITC-PSLP, фагоцитуючої в макрофагах, завдяки фагоцитозу сполуки дрібних часток RFP-PLGA показано на таблиці 4. Очевидно, що фагоцитозна здатність макрофагів активується сполукою дрібних часток RFP-PLGA.

Таблиця 4

Покращуючий ефект на фагоцитоз FITC-PSLP клітинами NR 8383, які фагоцитують сполуку дрібних часток RFP-PLGA

Кількість сполуки дрібних часток RFP-PLGA (μг/мл)	Рівень поглинання FITC-PSLP (%)
0	31
0.012	45
0.12	47
1.2	52

З вищепоказаних результатів, (1) продемонстровано, що сполука дрібних часток PLGA і ліпополісахариди активують фагоцитозну здатність макрофагів. Також продемонстровано (2), що міграція ріфампіцину в макрофаги помітно підвищується, будучи внутрішньо включеною в сполуку дрібних часток PLGA, і (3), що фагоцитоз на здатність макрофагів активується навіть коли ріфампіцин містить сполуку дрібних часток PLGA. Тому, сполука дрібних часток PLGA активує фагоцитозну здатність макрофагів, результуючу в підвищенні концентрації ріфампіцину в макрофагах, і тому робить

можливим досягати того, що об'єкт винаходу ефективно діє проти патогенів, що містяться в макрофагах. Вищеназвані результати показують один приклад новизни ліків, в якому ліки, діючі на патогени в макрофагах, ефективно об'єднуються з макрофагами "стимулюванням фагоцитозної активності макрофагів", що є базовою концепцією винаходу.

3. Дія по знищенню бактерій туберкульозу в макрофагах фагоцитозом сполуки дрібних часток RFP-PLGA

(а) Спосіб вимірювання життєздатності бактерій туберкульозу (BCG) в макрофагах

(1) Висушена вакцина BCG розчинюється в соляному розчині (12мг/мл), розміщується, потім поживне середовище (3-4μл) переміщується в колбу для культур T-25, потім туди ж додається 40μл суспензії BCG, і вирощується в сухому інкубаторі при 37°C.

(2) В експерименті, бактеріальний розчин і скляні кульки були поміщені в співвідношенні 1:4 до пробірки, яку розмішують вихровим міксером протягом 1 хвилини. Потім бактерії диспергують руйнуванням ультразвуком протягом 5 хвилин, використовуючи ультразвуковий міксер.

(3) Клітини NR8383 з концентрацією 1×10^6 клітин/мл були поміщені в 6-чарункову чашку Петрі (загальним об'ємом 5мл). Туберкульозні збуджувачі (BCG) в кількості 10 на клітину (кратність інфікування (MOI)=10) були додані до субстрату з клітинною культурою.

(4) Після інфікування при 37°C в газовому інкубаторі з двоокисом вуглецю протягом 4 годин, було виконано центрифугування при 2000об./хвил. протягом 5 хвилин (SCTI 5B), а потім була видалена надосадова рідина. Використовуючи субстрат без сироватки, аналогічним чином центрифугування було повторено двічі для видалення бактерій з клітин.

(5) Клітини NR8383 при концентрації 1×10^6 клітин/мл були висіяні в 24-лункову чашку Петрі.

(6) Відповідні тонкодисперсні частки RFP-PLGA в кількості 10 на клітину були додані до субстрату культури клітин NR8383.

(7) Після фагоцитування при 37°C в газовому інкубаторі з двоокисом вуглецю протягом 4 годин, частки, виділені з клітин, були видалені, використовуючи 25% трипсин.

(8) Додають 80% Перкол, щоб отримати 40% Перколклітинний розчин, потім додають 70% Перколу, щоб отримати градієнт концентрації. Після центрифугування (SORVALL Biofuge Fresco) при 10000об./хвил. протягом 5 хвилин, збирають клітини на поверхні між 40% і 70% Перколом, щоб відділити клітини від RFP-PLGA.

(9) Використовуючи PBS, також двічі повторюють центрифугування, щоб видалити Перкол.

(10) Вимірюють відношення живих і мертвих бактерій, використовуючи спосіб фарбування шліфа з флуоресцином діацетатом (FDA)/етіліум бромід (EB). FDA розчинюють в ацетоні при концентрації 5мг/мл, і 20μл цього розчину розводять з 1мл PBS. EB розчинюють в PBS з концентрацією 20μг/мл, і 50μл цього розчину розводять з 1мл

PBS. Рівні частки розведених FDA і EB змішують і використовують для офарбовування. Цей змішаний розчин (1μл) помішують на предметне скло, 1μл бактеріального розчину помішують туди ж, потім лишають при кімнатній температурі на 2 хвилини і обстежують під флуоресцентним мікроскопом. В живих бактеріях, FDA розкладається під впливом кислоти бактеріального походження і флуоресцює зеленим кольором. З іншого боку, в мертвих бактеріях немає кислотної активності, тому офарбовування FDA не спостерігається, і бактерії, пофарбовані EB, флуоресциують помаранчевим кольором.

(b) Знищуючий вплив інкорпорованої в макрофаги тонкодисперсної сполуки RFP-PLGA за рахунок фагоцитозу на збуджувачі туберкульозу

(1) Для того, щоб визначити знищуючий ефект тонкодисперсної сполуки RFP-PLGA на збуджувачі туберкульозу в макрофагах, тонкодисперсна сполука RFP-PLGA була застосована до макрофагів (макрофагів, інфікованих туберкульозними бактеріями), які раніше фагоцитували збуджувачі туберкульозу, і тонкодисперсні частки фагоцитували з макрофагами.

(2) Результати визначення, як знищуючий вплив RFP-PLGA, яка мігрувала в макрофаги за рахунок фагоцитозу, діє проти збуджувачів туберкульозу, показаний на Фіг.6. Очевидно, що внутріклітинна концентрація ріфампіцину є значно вищою в порції тонкодисперсної сполуки RFP-PLGA, що містить ріфампіцин в приблизно одну двадцяту (MOI=10, приблизна кількість ріфампіцину 5μмг, і хоча ріфампіцин в тонко дисперсній сполуці співвідноситься як одна двадцята від кількості в разі застосування одного ріфампіцину), чим в порції одного ріфампіцину (100μг/мл). Застосування тонкодисперсної сполуки RFP-PLGA до альвеолярних макрофагів, інфікованих вірусом туберкульозу, знищує бактерії туберкульозу в клітинах в 20 і більше разів ефективніше, порівняно з застосуванням ріфампіцину самого. Тобто, при застосуванні ліків засобом фагоцитозу часток, коефіцієнт лікування був покращений в 20 або більше разів в порівнянні з антитуберкульозною дією ліків самих по собі.

Приготування ліків, які стимулюють фагоцитозну активність макрофагів і діють на макрофаги і стані дисфункції

Відомо, що типово багато макрофагів проникають в ракові тканини. Це ґрунтується на тому факті, що, так як ракові клітини є інеродними субстанціями для живої людини, макрофаги акумулюються з ціллю видалення ракових клітин. Якщо макрофаги працюють нормально, ракові клітини руйнуються і ліквідуються. Але, якщо макрофаги функціонують ненормально, ракові клітини не можуть руйнуватись, ростуть і в результаті формується пухлина. Як вже описувалось, при активації макрофагів, стає також можливим поруйнувати ракові клітини. Тому стимулюючи фагоцитозну активність макрофагів, можливо домогтись того, що макрофаги з дисфункцією набули цитотоксичного ефекту проти ракових клітин, і ефективно лікувати рак. З іншого боку, як показано на таблиці 2, фагоцитоз альвеолярних макрофагів був по-

кращений до 166% завдяки застосуванню ліпополісахариду (1μг/мл), і альвеолярні макрофаги були активовані ліпополісахаридом. Таким чином, виникає, що альвеолярні макрофаги, чия фагоцитозна здатність активована ліпополісахаридом, домагаються цитотоксичного ефекту проти клітин раку легенів. Тому тут показаний приклад цитотоксичної дії на клітини раку легенів альвеолярними макрофагами, активованими ліпополісахаридами.

Приклад специфічного застосування: Рак легенів

Цитотоксична дія на клітини раку легенів засобом активації альвеолярних макрофагів показана як приклад застосування.

1. Активация альвеолярних макрофагів ліпополісахаридом і співкультурою альвеолярних макрофагів з клітинами раку легенів Sato.

(1) Клітини NR8383 з концентрацією 1×10^6 клітин/мл помішують в чашку Петрі з 24 чарунками (загальним об'ємом 1.5мл). Для контролю додають 5% сироватки ембріонів телят, розчину 150μг F-12K і 150μл 10μмг ліпополісахариду.

(2) Клітини лишають в інкубаторі двоокису вуглецю при 37°C на 24 години.

(3) Клітини раку легенів Sato підготовлюють при концентрації 1×10^5 клітин/мл, і по 50μл на чарунку додають в чашку Петрі з 96 чарунками.

(4) Клітини NR8383, оброблені за пунктом (1), підготовлюють до концентрації 5×10^5 , 1×10^5 , 5×10^4 і 1×10^4 клітин/мл, і по 50μл на чарунку додають в чашку Петрі з 96 чарунками (загальний об'єм 100μл).

(5) Клітини лишають в інкубаторі двоокису вуглецю при 37°C на 4 години.

2. Цитотоксична дія макрофагів, співкультивованих з клітинами раку легенів Sato, на клітини раку легенів

(1) Цитотоксична дія макрофагів, активованих ліпополісахаридом, описаних в 1, і співкультивованих з клітинами раку легенів Sato, на клітини раку легенів, оцінювалась з суми лактату дегідрогенази, виділеного з клітини в субстрат. Тому чашка Петрі центрифугувалась при 1000об./хвил. протягом 5 хвилин, і 50μл над осадовою рідиною було перенесено до іншої чашки Петрі з 96 чарунками.

(2) Потім 50μл розчину субстрату додають до комплексу (CytoTox 96 нерадіоактивний цитотоксичний аналіз, Promega, cat.G1780) для вимірювання кількості лактату дегідрогенази. Для точного контролю, додатково до комплексу використовують розчин ферменту лактату дегідрогенази (розчин 5000 разів, 50μл).

(3) Чашку захищають від світла алюмінієвою фольгою і лишають при кімнатній температурі на 30 хвилин.

(4) Реакцію зупиняють додаванням 50μл зупиняючої рідини.

(5) За допомогою вимірювача електролітичного осаду (Model 550, Bio-Rad) вимірюють абсорбцію при 495nm.

(6) Вираховують цитотоксичність (5) для кожної абсорбції.

(7) Цитотоксичний ефект NR8383 на клітини раку легенів Sato показаний на Фіг.7.

Показано, що фагоцитоз NR8383, оброблених ліпополісахаридом, полегшується, в порівнянні з NR8383 без обробки ліпополісахаридами і тому цитотоксичний ефект на рак легенів Sato покращується в залежності від співвідношення клітин.

Виробництво лікарського засобу, який стимулює фагоцитозну активність макрофагів і веде утримуючі патогени макрофаги до загибелі клітин.

Лікарський засіб за цим способом характеризується тим, що макрофаги, які утримують патогени, призводяться до загибелі клітин стимулюванням фагоцитозної активності макрофагів.

Як показано в таблиці 2, ліпосахарид, добре відомий як активатор макрофагу, симулює фагоцитозну активність макрофагів. Також, інтерферон- γ , який є типовим цитокином факторів, активуючих макрофаг, стимулює фагоцитозну активність. Тобто, стимулювання фагоцитозної активності макрофагів є одним із індикаторів активації макрофагу. Можна стверджувати, що стимулювання фагоцитозної активності фагоцитозом є стимулюванням активності макрофагу, який є збудником фагоцитозу стимуляцією, яка є фагоцитозом. Також відомо, що зміна структури мембрани стимулюється в макрофазі і фактор некрозу мембранно-зв'язаних пухлин (TNF) стимулюється в макрофазі. Тому, разом з активацією макрофагу стимуляцією, яка є фагоцитозом, стимулюється мембранні зв'язки TNF. СНІД виникає із-за деструкції Т-клітин інфекцією, коли вірус СНІДу приводить до імунодефіциту. Вірус СНІДу інфікує не тільки Т-клітини, але також і макрофаги. Ця інфекція виникає завдяки адгезії вірусу до CD4 протеїну, звичайно виражаємому на Т і макрофагах клітинних мембран. Макрофаг, інфікований вірусом СНІДу, не приводить до загибелі клітини, але постійно виробляє вірус СНІДу, і носієм інфекційного патогену, як це детально описано в II.(2).

Тому, якщо макрофаги, інфіковані вірусом СНІДу, можуть бути призведеними до загибелі клітин, виконується знищення носія інфекційного патогену. Як один приклад, що може реалізувати цю можливість, показано, що мембранні зв'язки TNF можуть діяти на клітини макрофагів, інфіковані вірусом СНІДу (HIV), щоб конкретно вести клітини до загибелі.

Приклад застосування: Стимулювання загибелі клітин, інфікованих HIV, клітинами з мембранними зв'язками TNF.

Як приклад, коли TNF стимулює загибель клітин в клітинах, інфікованих патогенами, показана дія TNF на клітини MOLT-4, інфіковані HIV.

1. Виробництво мембранно-зв'язаних TNF клітин

(1) Для того, щоб стабільно виділяти мембранно-зв'язаний TNF, згідно попередньому звіту [Journal of Virology, том.63, стор.2504-2509, 1989], було зроблено виділення плазмиду (pMT 2 β G/Hu-proTNF) для мишачих і людських мембранно зв'язаних TNF.

(2) Потім цей плазмід був змішаний з плазмідом для вибору трансформантів, в які інкорпорований стійкий до неоміцину ген в співвідношенні 10:1, і введені в клітини фібробластів (клітини NIH3T3), взяті від мишачих ембріонів.

(3) Вищевказані трансформовані клітини NIH3T3 були культивовані в присутності 800 цг/мл неоміцину, який є маркером вибору, в інкубаторі з двоокисом вуглецю при температурі 37°C близько 2 тижнів.

(4) Після культивування був набутий клон TNF, інкорпорований в клітину.

(5) Підтвердилось, що набутий клон виражає мембранні зв'язки TNF ензимним імуноаналізом.

2. Приготування клітин MOLT-4, інфікованих HIV

(1) Для клітин, інфікованих HIV, клітини MOLT-4 були інфіковані в поживному субстраті (RPMI 1640, з додаванням 10% сироватки ембріонів телят, пеніциліну (100U/мл), стрептоміцину (100 μ г/мл) в інкубаторі з двоокисом вуглецю при 37°C, згідно попередньому звіту [Journal of Virology, том.63, стор.2504-2509, 1989], використовуючи клітини, інфіковані HIV (штам HTLV-IIIb). Коли інфекція з вірусом СНІДу закріпилася в клітинах MOLT-4, клітини MOLT-4 виражають характеристики постійного викликання вірусу СНІДу. Тому, що стосовно викликання вірусу СНІДу, клітина MOLT-4 є моделлю макрофага, інфікованого вірусом СНІДу.

(2) В умовах цієї інфекції, 90% або більше, клітин MOLT-4, інфікованих HIV, стають позитивними антитілами до HIV.

(3) Тому через інфіковані HIV клітини, HIV був введений в майже всі клітини MOLT-4, і були підготовлені клітини MOLT-4, інфіковані HIV.

3. Індукція загибелі клітин, інфікованих HIV, засобом мембранно-зв'язаних TNF-експресуючих клітин.

(1) Клітини NIH3T3, в які був введений плазмід TNF, напів-конфлюентно культивують в чашці Петрі з 24 чарунками.

(2) Потім додають певну кількість клітин MOLT-4, інфікованих HIV, і змішують/культивують в інкубаторі з двоокисом вуглецю при 37°C протягом 3 днів.

(3) Для того, щоб визначити дію вираженого мембранного зв'язку TNF на інфіковані HIV клітини, вимірюють життєздатність інфікованих HIV клітин способом виключення трипановим блакитним пофарбуванням.

(4) Як результат, спостерігають, що загибель клітин стимулювалась в 40% клітин MOLT-4, інфікованих HIV, за рахунок змішування культури з мембранно-зв'язаними TNF-експресуючими клітинами.

Як можна бачити з вищенаведеного прикладу, очевидно, що мембранні зв'язки TNF специфічно стимулюють загибель клітин в клітинах, інфікованих вірусом СНІДу (HIV). Як можна бачити з цього феномену, макрофаги, приведені до дисфункції утримуванням патогену, активуються фагоцитозуванням патогенів і тому стимульовані мембранні зв'язки TNF приводять макрофаги, інфіковані патогенами, до загибелі клітин.

Захворювання, виникаючі завдяки утримуванню патогенів в макрофагах, - це мікобактеріоз, СНІД, хламідіоз або токсоплазмоз і тому подібні. Мікобактеріоз включає в себе туберкульоз, і патоген, який викликає його - це *Mycobacterium*

tuberculosis або *Mycobacterium bovis*, леппу, і патоген, який викликає її - це *Mycobacterium leprae*, або атипичний мікобактеріоз, і патоген, який викликає його - це *Mycobacterium avium*, і тому подібні, або тому подібні. Патогени, збуджуючи хламідіоз, - це *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia psittaci* і тому подібні. Даний винахід може ефективно застосовуватись до всіх з них. Знищуючий ефект тонкодисперсних часток RFP-PLGA на збудники туберкульозу в макрофагах, показаний в цьому способі, не є завершеним, поки ріфампіцин не виділиться з дрібних часток RFP-PLGA, інкорпорованих в фагосоми індукцією фагоцитозу і можливі принаймні два проходи через міжклітинні везикулярні мембранні структури, коли ріфампіцин проходить крізь фагосомну мембрану і далі проходить крізь фагосомну мембрану фагосому, який містить збудники туберкульозу. Стратегії виживання патогенів, збуджуючих захворювання, показані вище в макрофагах різноманітні. У внутрішньому мікобактеріозі, *Legionella* і *Toxoplasma*, збуджуючі патогени живуть в макрофагах за рахунок життя в фагосомах. *Listeria* і *Chlamydia* мають такі характеристики, що збуджуючі патогени залишають фагосоми. Цей аспект міжклітинного життя збуджуючих патогенів вважається більш легким порівняно з випадком, коли збуджуючі патогени існують в фагосомах, тому що ефективність ліків може бути прискорена, коли ліки проходять крізь фагосомну мембрану один раз з точки зору подачі ліків. СНІД є подібним до *Listeria* і йому подібних в тому аспекті, що ефективність ліків може бути прискорена, якщо ліки по-

даються до присутніх в клітинах збуджуючих патогенів. Виходячи з вищесказаного, винахід забезпечує перспективні ліки від збуджуючих патогенів, описаних вище.

Медикаменти проти різних захворювань, на які ефективно може діяти об'єкт винаходу, перераховані нижче.

1) Мікобактеріоз: ріфампіцин, ізоніазид, етамбутол, піразінамід, ацитроміцин, канаміцин, сульфат стрептоміцину, енвіоміцин, етіоніамід, цикloserін, левофлоксацин, діафенілсульфон.

2) СНІД: ацидотімідін, дідеоксинозін

3) Хламідіоз: міноциклін гідрохлорид, доксициклін гідрохлорид, клатітроміцин, спарфлоксацин, рокітріміцин, левофлоксацин.

4) Токсоплазмоз: піриметамін, сульфамонеметоксін, ацетілспіраміцин.

5) Малярія: хлороквін фосфат, кінін сульфат, сульфадоксін, мефлоквін.

6) Рак: 5-флуороурацил, адриаміцин, клісплатин, етопозид, мітоміцин, вінкрістин, таксол, камптотецин, вінбластин, циклофосфамід, блеомицин.

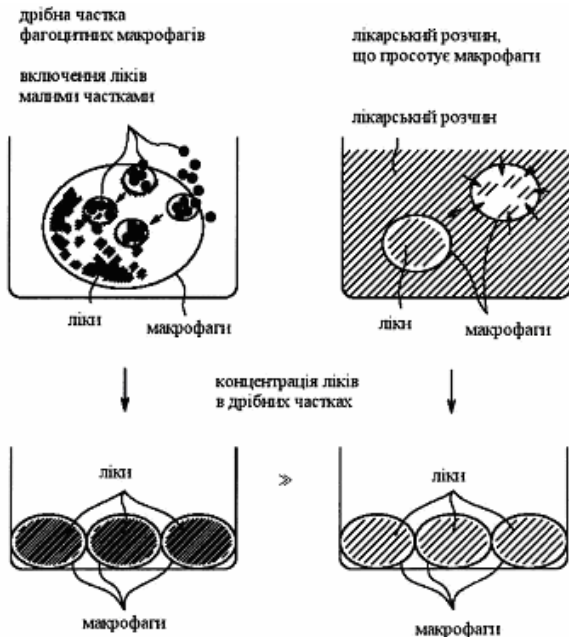
7) Захворювання Крона: салазосульфопіридин, глюкокортикоїд.

34 8) Ревматоїд: золотий тіомалат натрію, пеніциламін, буциламін, глюкокортикоїд.

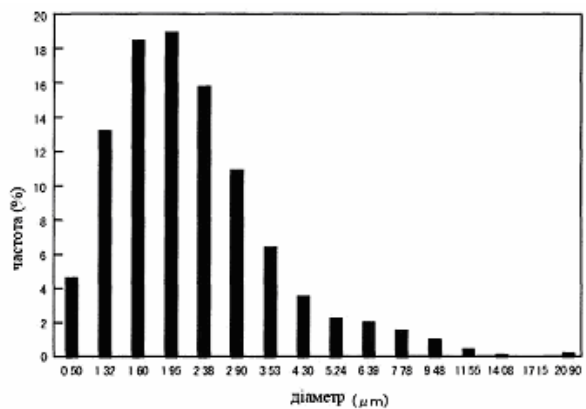
Всі публікації, патенти і заявки на патенти включені тут з посиланням на повноту.

Промислова придатність

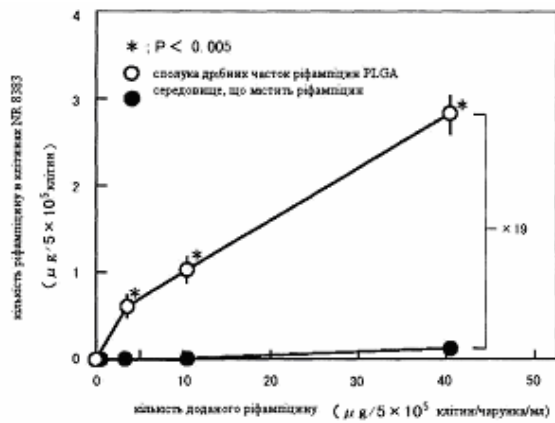
За винаходом, можливо виробити лікарський засіб, який може ефективно лікувати захворювання, викликані макрофагами з дисфункцією або макрофагами як носіями.



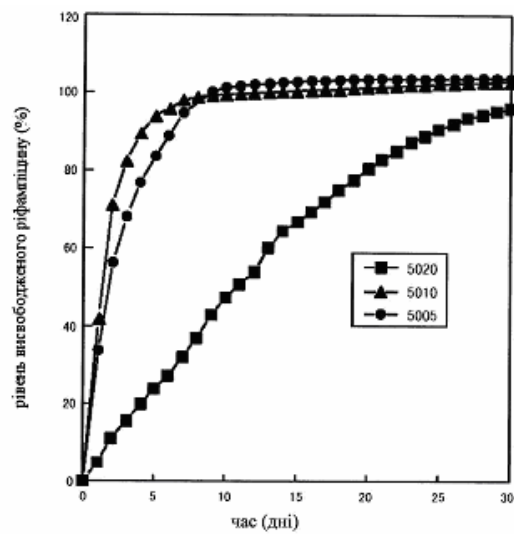
Фіг. 1



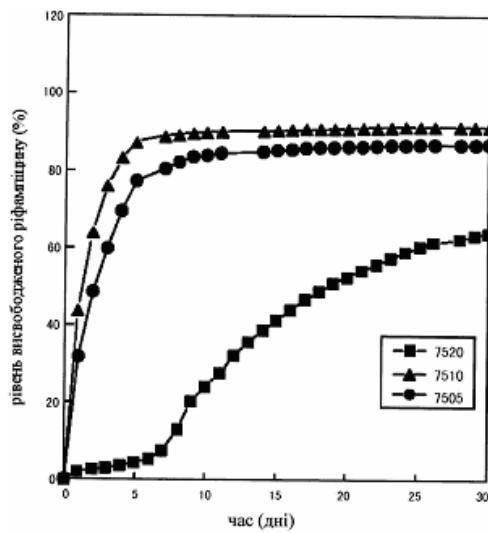
Фіг. 2



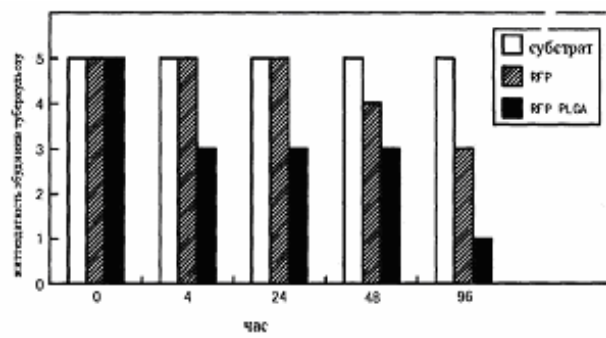
Фиг. 3



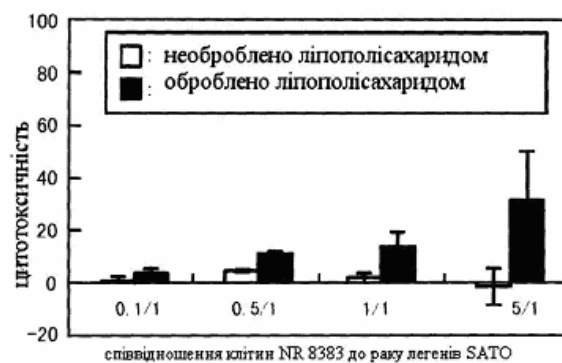
Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7