



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **72028** (13) **U**
(51) МПК (2012.01)
A61K 48/00
C12M 1/00
C12P 1/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2011 13718**
(22) Дата подання заявки: **21.11.2011**
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: **10.08.2012**
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **10.08.2012, Бюл.№ 15**

(72) Винахідник(и):
Старосила Дар'я Борисівна (UA),
Драгущенко Олена Олегівна (UA),
Перепелюк Марина Миколаївна (UA),
Міня Ігор Осипович (UA),
Куклін Андрій Володимирович (UA),
Слончак Андрій Миколайович (UA),
Полежаєва Тетяна Анатоліївна (UA),
Оболенська Марія Юріївна (UA),
Рибалко Світлана Леонтіївна (UA)

(73) Власник(и):
Старосила Дар'я Борисівна,
вул. Шовковична, 48, кв. 14, м. Київ-04,
01004 (UA),
Драгущенко Олена Олегівна,
вул. Ломоносова, 55/613, м. Київ, 03022
(UA),
Перепелюк Марина Миколаївна,
вул. Ломоносова, 55/813, м. Київ, 03022
(UA),
Міня Ігор Осипович,
вул. Ломоносова, 53/153, м. Київ, 03022
(UA),
Куклін Андрій Володимирович,
вул. Ломоносова, 51/412, м. Київ, 03022
(UA),
Слончак Андрій Миколайович,
вул. Касіяна, 10/28, м. Київ, 03022 (UA),
Полежаєва Тетяна Анатоліївна,
вул. Ломоносова, 57/813, м. Київ, 03022
(UA),
Оболенська Марія Юріївна,
вул. Гоголя, 23, 15, м. Київ, 01035 (UA),
Рибалко Світлана Леонтіївна,
вул. Круглоуніверситетська, 14, кв.19, м.
Київ-24, 01024 (UA)

(74) Представник:
Рибалко Світлана Леонтіївна, реєстр. №0

(54) СПОСІБ КЛАСИФІКАЦІЇ ІНДУКТОРІВ ІНТЕРФЕРОНУ ЗА КІЛЬКІСНИМИ ПОКАЗНИКАМИ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНІВ ІНТЕРФЕРОНУ**(57) Реферат:**

Спосіб класифікації індукторів інтерферону за кількісними показниками експресії генів інтерферону методом зворотної транскрипції - полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), причому розраховується співвідношення кількісних показників експресії генів інтерферону, протейнінази,

UA 72028 U

РНКази L, і 2-5-олігосинтетази під впливом препаратів, які вже використовуються в медичній практиці або знаходяться на стадії доклінічних досліджень.

Корисна модель належить до молекулярної біології, вірусології і медицини, зокрема, стосується класифікації індукторів інтерферону (ІФН) природного і хімічного походження за їх здатністю активувати гени-мішені ІФН і можливості кількісної оцінки їх активуючої дії.

Інтерферони належать до родин білків і глікопротеїнів невеликої молекулярної маси від 15 до 27 кДа, які продукуються клітинами, головним чином, у відповідь на вірусну інфекцію, але також у відповідь на синтетичні та природні індуктори [1].

За своїми структурними та функціональними властивостями інтерферони розділяють на дві групи. До ІФН I типу належать ІФН альфа, бета, омега та тау. До ІФН II типу - ІФН гамма. Всі ІФН I типу мають багато спільного в нуклеотидних послідовностях генів і амінокислотних послідовностях білків [2].

В природних умовах численні віруси індують синтез переважно ІФН альфа, а мікроорганізми - переважно ІФН гамма [3]. Серед природних і синтетичних індукторів інтерферону і його мішеней чільне місце посідають сам інтерферон і дволанцюгові РНК PolyI:PolyC.

Молекули інтерферону I і II типу активують експресію генів-мішеней опосередковано, вони взаємодіють з відповідними рецепторами на поверхні клітини подібно до білкових гормонів, факторів росту та інших медіаторів міжклітинної взаємодії. Після зв'язування з рецепторами ініціюється ланцюг складної внутрішньоклітинної передачі сигналу, яка розпочинається від внутрішньоклітинної частини рецептора і закінчується в ядрі активацією/інактивацією транскрипції генів - мішеней інтерферону. Транскрипція відповідних генів та синтез білкових продуктів призводить до спрацювання ефекторних внутрішньоклітинних механізмів, що є специфічними для дії інтерферону. В кінцевому рахунку спостерігаються численні ефекти дії інтерферону як на клітинному рівні, так і на рівні організму в цілому, що в разі вірусної інфекції призводить до інгібування реплікації вірусу. Такий ефект відбувається через здатність інтерферону активувати гени-мішені, серед яких ген 2-5-олігоаденілатсинтетази (2-5 ОАС) та РНКазу L, яка розщеплює РНК переважно вірусного походження, ген еукаріотичного фактору ініціації трансляції 2α (eIF2α), який гальмує трансляцію мРНК і, відповідно, утворення білків.

В теперішній час існує декілька характеристик індукторів інтерферону - інтерфероніндукуюча активність *in vitro* та *in vivo*, тип індукovanого інтерферону і динаміка його індукції. Але така характеристика індукторів не дає ніякого уявлення щодо механізму дії цих індукторів, їх здатності активувати/інгібувати експресію генів, які є мішенями ендogenous інтерферону.

Найближчим до використаної моделі можна вважати спосіб визначення цитокинового статусу людини на генетичному рівні [4], який полягає в тому, що оцінюють на транскрипційному рівні активність генів інтерферону, інтерферонзалежних та проліферативних цитокінів. Використання даного способу в клінічних дослідженнях дає необхідну інформацію про існуючі взаємозв'язки в зоні ІФН-залежних та цитокинових реакцій клітин в нормі та при різних патологічних станах.

Суть корисної моделі полягає у визначенні активності індукторів інтерферону методом зворотної транскрипції - полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) і класифікації індукторів інтерферону за співвідношенням кількісних показників експресії генів інтерферону, протеїнкінази, РНКазу L і 2-5-олігоаденілатсинтетази.

Задача вирішується шляхом кількісного визначення експресії генів системи інтерферону - протеїнкінази R (ПКР), 2'-5'-олігоаденілатсинтетази 1α (2'-5'-ОАС) та РНКазу L методом ПЛР під впливом препаратів, які вже використовуються в медичній практиці і які ще знаходяться на стадії доклінічних досліджень. В дослідженні використовуються відомі молекулярно-біологічні методи визначення вмісту мРНК ІФНу в тотальній РНК, які мають високу специфічність, чутливість та наочність.

Приклад 1

Як модель для випробування були використані щури, яким вводили препарати природного і хімічного походження і визначали вміст мРНК, які кодують інтерферон альфа, протеїнкіназу R, РНКазу L і 2'-5'-олігоаденілатсинтетазу, в тотальній РНК із печінки [5]. Спосіб дозволяє визначити кількісний вміст мРНК ІФН-регульованих генів, що експресуються в печінці щура під впливом різних індукторів. Дію індукторів природного і хімічного походження порівнювали з дією інтерферону альфа і класичного ендogenous індуктора - дволанцюгової PolyI:PolyC. Зразки брали у інтактних тварин, а також через 24 год. після введення внутрішньочеревно по 0,5 мл препаратів у концентраціях, які вказані в табл. 1.

Таблиця 1

Характеристика використаних препаратів

№ п/п	Назва препарату	Складові частини	Концентрація
1	Рамназин П	природний, 7,3'-диметилкверцетин, виділений з Протефлазиду	0,96 мкг/мл
2	Рамназин С	синтетичний - триметил-кверцетин і тетраметил-кверцетин	0,096 мкг/мл
3	PolyI:PolyC	Еталонний індуктор ІФНу- поліозин - поліцитидин) фірми "Calbiochem"	100 мкг/мл
4	Альтабор	Субстанція - сумарний комплекс поліфенолів суцвіт вільхи сірої і клейкої, яка містить не менш 60 % елаготанінів моно- та олігомірної природи, близько 10 % полімеру,	1 мг/мл
5	Heberon	Рекомбінантний альфа-2β інтерферон, 100 000 МО	100 мкл/мл
6	Амізон	Субстанція препарату амізон-4-(N-бензил) амінокарбоніл-1-метилпіридиній йодид	1 мг/мл
7	Мімікрин -392	вуглеводмісний біополімер з культурального середовища <i>Staphylococcus aureus</i> штам 392	25 мкг/мл
8	Трилумін	Включає в себе екстракт спеціально обробленої культури грампозитивної спороутворюючої аеробної ґрунтової бактерії <i>Bac. subtilis</i> та спеціально оброблену кров великої рогатої худоби, натрій хлорид та воду для ін'єкцій - в розведенні	розведення - 1:100
9	Протефлазид	Містить флавоноїдні глікозиди, виділені з диких злаків <i>Deschampsia caespitosa</i> L. (щучка дерниста), <i>Calamagrostis epigeios</i> L. (війник наземний), флавоноїдів в перерахунку на рутин не менш 0,32 мг/мл	3,2 мкг/мл
10	Лектин хурми	Ізольований з хурми сіалоспецифічний глікопротеїн	1 мг/мл

Тотальну РНК виділяли реагентом Тризол;

кДНК синтезували за допомогою зворотної транскриптази M-MuLV (Fermentas, Литва) та випадкових гексамерних праймерів (Амплісенс, Росія).

Специфічні фрагменти кДНК ІФН, ПКР, РНКазы L, 2-5 ОАС напрацьовано методом ПЛР із використанням специфічних праймерів (Синтол, Росія). Послідовності відповідних кДНК взято з бази даних NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Праймери та умови ампліфікації специфічних фрагментів підібрано в програмі Vector NTI suite, а їхню специфічність перевіряли у програмі Blastn.

Для кількісної полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі (кПЛР-РЧ) використовували спеціальний набір реактивів з флуоресцентним барвником SYBR Green I та пасивним референтним барвником ROX (Синтол, Росія).

Визначення кількості специфічної мРНК ІФНу у тотальній РНК проводили за калібрувальною кривою, для побудови якої використовували розчини очищеного (для кДНК 2-5 ОАС та РНКазы L) або клонованого (для кДНК ІФН альфа та ПКР) ПЛР-продукту відомої концентрації. Після розрахунків результати кПЛР-РЧ наводили в кількості копій індивідуальних РНК в одному мкг тотальної РНК та розраховували співвідношення кількості мРНК досліджуваних генів при введенні препаратів до кількості відповідних мРНК в нормі.

Дані з кількісної експресії генів інтерферону, ПКР, РНКазы L і 2-5 ОАС надані в табл. 2 у відносних одиницях в порівнянні з вмістом мРНК, яка кодує інтерферон.

Таблиця 2

Відносний вміст індивідуальних РНК в тотальній РНК

Препарати	Співвідношення кількості копій мРНК дослід/контроль				Нормалізація даних по кількості копій ІФН мРНК *			
	ІФН	ПКР	РНКаза L	2-5 ОАС	ІФН	ПКР	РНКаза L	2-5 ОАС
Рамназин природний	3,1	7,3	14,5	1,2	1	2,35	4,7	0,38
Рамназин синтетичний	3,6	16,5	20,3	3,6	1	4,58	5,6	1
Альтабор	4,1	17,4	34,6	10,1	1	4,24	8,4	4,1
Амізон	3,7	15,5	51,1	12,3	1	4,18	13,8	3,32
Мімікрин	3,3	18,4	46,7	9,1	1	5,57	14,15	2,75
Трилумін	5,7	18,2	46,7	10,9	1	3,19	8,19	1,91
Протефлазид	3,6	22,6	24,4	11,7	1	6,27	6,7	3,25
Лектин хурми	2,8	13,8	19,1	14,1	1	4,9	6,7	5,0
PolyI:PolyC	5,0	17,0	20,2	15,2	1	3,4	4,04	3,04
Heberon	4,1	18,3	37,4	12,4	1	4,46	9,12	3,02

* Нормалізовані дані - це співвідношення кількості копій мРНК дослід/контроль для кожного з досліджуваних генів, поділене на співвідношення кількості копій ІФН мРНК дослід /контроль.

В результаті визначено співвідношення експресії генів ІФНу при введенні екзогенного інтерферону та стандартного індуктора інтерферону PolyI:PolyC:

5

	мРНК ІФН: ПКР:	РНКаза L: 2-5 ОАС
екзогенний інтерферон:	1,0: 4,5:	9,0: 3,0
PolyI:PolyC:	1,0: 3,5:	4,0: 3,0

Серед використаних препаратів-індукторів інтерферону повної збіжності кількісної експресії генів ІФНу з екзогенним ІФНом та стандартним індуктором ІФНу PolyI: PolyC - немає.

10 Подібності з екзогенним ІФНом із збільшенням експресії гена 2-5 ОАС притаманні для альтабору, із кількісним збільшенням мРНК РНКази L для амізону і ПКР та РНКази L - мімікрину бактерійному.

15 При порівнянні кількісної експресії генів ІФНу, індуктованих PolyI:PolyC та досліджуваних індукторів показано, що рівень експресії гена ПКР та РНКази L вище для Рамназину синтетичного, амізону, мімікрину, протефлазиду; генів ПКР, РНКази L, 2-5 ОАС - для альтабору та лектину хурми.

Рамназини природний та синтетичний відрізняються значним зменшенням експресії гена 2-5 ОАС.

20 Результати досліджень свідчать про те, що індуктори інтерферону природного та хімічного походження з однаковим рівнем біологічної активності і майже однаковим рівнем експресії ІФНу мають різні кількісні співвідношення мРНК ПКР, РНКази L, 2-5 ОАС.

25 Серед досліджених препаратів встановлені індуктори ІФНу, які стимулюють експресію генів ІФНу, ПКР, РНКази L та 2-5 ОАС відповідно до екзогенного ІФНу, що дуже важливо при заміні екзогенного ІФНу його індуктором. Препарати альтабор та лектин хурми є більш ефективні в індукції експресії генів ПКР, РНКази L, 2-5 ОАС, а препарати протефлазид, амізон, мімікрин більш ефективні в експресії генів ПКР, РНКази L, ніж стандартний індуктор інтерферону PolyI:PolyC.

Джерела інформації:

30 1. Isaacs A., Lindenmann J. Virus interference. I. The interferon // Proc. R. Soc. Lond. Biol.-1957.-147. - P. 258-267.

2. Stewart H.J., McCann S.H.E., Flint A.P.F. Structure of interferon $\alpha 2$ gene expressed in the bovine conceptus early in gestation// J. Mol. Endocrinol.-1990.-4. - P. 275-282.

3. Marcus, P.I. The interferon inducer moiety of viruses: a single molecule of dsRNA. // Tex. Rep. Biol. Med. 1981.-41. - P. 70-75.

35 4. Соколова Т.М., Урываев Л.В. Способ определения цитокинового статуса человека на генетическом уровне. Патент 2181773 от 27.04.2002.

5. Слончак А.М. Сазонова Л.Я., Губар О.С. та ін. Експресія генів, які кодують альфа-інтерферон, його рецептор, протеїнкіназу R та рибонуклеазу L в інтактній та регенеруючій печінці щурів// Наукові записки НаУКМА. Біологія та екологія.-2005. - Т. 43. - С. 25.

5

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

10

Спосіб класифікації індукторів інтерферону за кількісними показниками експресії генів інтерферону методом зворотної транскрипції - полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), який **відрізняється** тим, що розраховується співвідношення кількісних показників експресії генів інтерферону, протеїнкінази, РНКаз L, і 2-5-олігосинтеази під впливом препаратів, які вже використовуються в медичній практиці або знаходяться на стадії доклінічних досліджень.

Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

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