



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **144124** (13) **U**
(51) МПК (2020.01)
A61K 31/00
A61P 31/00

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
УКРАЇНИ

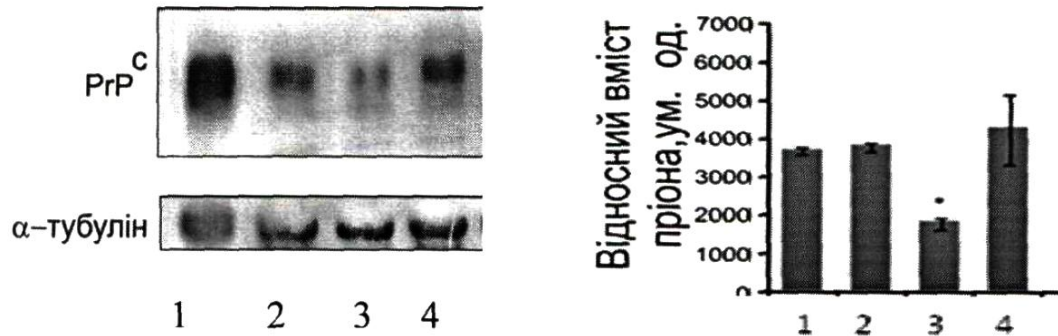
(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2019 12126	(72) Винахідник(и):
(22) Дата подання заявки: 21.12.2019	(73) Власник(и):
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 11.09.2020	ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТВАРИН НААН УКРАЇНИ, вул. В. Стуса, 38, м. Львів, 79034 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.09.2020, Бюл.№ 17	

(54) СПОСІБ ЗНИЖЕННЯ ВМІСТУ КЛІТИННОГО ПРІОНУ В ОРГАНІЗМІ ТВАРИН

(57) Реферат:

Спосіб зниження вмісту клітинного пріону в організмі тварин включає зниження вмісту клітинного пріону для профілактики трансмісивних спонгіформних енцефалопатій. Додатково для керованого інгібування біосинтезу клітинного пріону використовується комплекс антисенсолігодезоксинуклеотидів з полімерною сполукою.



Фіг. 1

UA 144124 U

Корисна модель належить до біології, біохімії, молекулярної біології, зокрема до способів зниження вмісту клітинного (фізіологічного) пріону, який здатний перетворюватись у патологічний пріон і спричиняти нейродегенерацію та загибель ураженого організму.

Відомі матеріали, що зв'язують пріонний протеїн, та способи використання матеріалів для виявлення або видалення пріонного білка зі зразка, такого як біологічна рідина або зразок навколишнього середовища. [Пат. CA2521438C Канада, (2005) Prion protein binding materials and methods of use Пріон зв'язувальні матеріали і методи використання [Текст] / Burton, Steven J; Carbonell, Ruben G.; Gurgel, Patrick V.; Hammond, David J.; Prometic Biosciences, LTD.; Shen, Honglue; The American National Red Cross; Wiltshire-Lyerly; заявник та патентовласник Canadian Intellectual Property Office; — 2004/010315; заявл. 02.04.2004, опубл. 21.10. 2004]. Зв'язувальні матеріали здатні взаємодіяти з однією або декількома формами пріонного білка: включаючи клітинний (фізіологічний) пріонний білок (PrP^c), інфекційний пріонний білок (PrP^{Sc}), рекомбінантний пріонний білок (PrP^r) і стійкий до протеїнази пріонний білок (PrP^{res}). Пріони різних видів живих організмів, включаючи людей і хом'яків, зв'язуються цими зв'язувальними матеріалами. Проте цей метод не створений для використання в організмах *in vivo*, лише *in vitro*.

Також відомі способи зниження рівня пріонів у пріон-інфікованих клітинах чи організмі за дії опромінення пріон-інфікованих клітин, тканин та органів сполукою AR-12 (C₂₆H₁₉F₃N₄O and 2-amino-N-(4-(5-(phenanthren-2-yl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl)phenyl)acetamide) та її аналогом AR-14 для зниження рівня пріонів до 90 %. [Пат. 9974771 A61K 31/415 Канада, (2017); Compositions and methods for reducing prion levels Композиції і методи для зниження рівнів пріону. [Текст] / Hermann M. Schaetzel (Calgary), Basant Abdulrahman (Calgary), Sabine Gilch (Calgary), Alexander Zukiwski (Clarksburg, MD), Stefan Proniuk (Austin, TX); заявник та патентовласник Ohio State Innovation Foundation (Columbus, OH), Uti Limited Partnership (Канада) — 20170326108; заявл. 28.02. 2017, опубл. 22.05. 2018]. AR-12 ефективний у зниженні рівня пріонів у клітинах, інфікованих пріонами. AR-14 може знизити рівень пріонів в інфікованих клітинах, тканинах або органах до 50 % за наномольних рівнів (менше 1 мкМ) і короткочасних методах лікування (три доби) та знизити вміст пріону на 90 % за тривалого лікування концентрацією 2 мкМ (20 діб).

Найближчим по суті до заявленої корисної моделі є спосіб зниження вмісту клітинного пріону на основі використання пентосан полісульфату [Пат. 32547 Україна, МПК А61Р 31/00. Застосування пентосан полісульфату (sp-54) як інгібітора експресії фізіологічного пріон-протеїну *in vitro* / Влізло В. В., Стадник В. В., Майор Х. Я.; заявник та патентовласник ІБТ НААН — №u200712191 заявл. 05.11.2007, опубл. 26.05.2008, Бюл. № 10.], за допомогою якого знижує рівень фізіологічного пріон-протеїну в органах і тканинах лабораторних тварин (щурів лінії Vistar). Пентосан полісульфату (sp-54) знижує рівень фізіологічного пріону від 29 % у селезінці і до 89 % у головному мозку після внутрішньом'язового введення впродовж тижня. Недоліком способу є те, що він має системну дію на організм в цілому. Технічний результат досягається за тиждень.

За допомогою заявленого способу можна керовано впливати на вміст клітинного пріону у пріон-реплікувальних органах. Технічний результат досягається через дві доби.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб, який би дозволяв знизити вміст клітинного пріону для попередження перетворення його у патологічну форму з метою запобігання розвитку нейродегенерації. Спосіб є безпечним для організму, оскільки не спричиняє запальних, алергічних реакцій та летальних випадків. Використання способу є точним та дозволяє керовано впливати на біосинтез клітинного пріону на рівні трансляції, не впливаючи на синтез інших протеїнів організму.

При проведенні заявником патентно-інформаційного пошуку знайдено технічні рішення [Пат. 32547 Україна, МПК А61Р 31/00. Застосування пентосан полісульфату (sp-54) як інгібітора експресії фізіологічного пріон-протеїну *in vitro* / Влізло В. В., Стадник В. В., Майор Х. Я.; заявник та патентовласник ІБТ НААН — №u200712191 заявл. 05.11.2007, опубл. 26.05.2008, Бюл. № 10.], в яких є ряд суттєвих ознак, спільних із заявленим: факт зниження вмісту клітинного пріону. Однак, суттєвих ознак не достатньо для одержання технічного результату заявленого рішення.

У джерелах патентної і науково-технічної інформації не знайдено відомостей про спосіб зниження вмісту клітинного пріону за допомогою антисенсолігодезоксинуклеотидів (асОДН) у комплексі з полімерною сполукою.

Корисна модель може бути використана у молекулярній лабораторії, закладах ветеринарної і гуманної медицини.

Для реалізації заявленої корисної моделі необхідно:

1. Приготувати комплекси асОДН та полімерної сполуки. 6,6 мг полімерної сполуки розчинити в 0,01М НСІ, встановити рН розчину 7,4 0,01М NaOH, довести об'єм до 10 мл дистильованою водою. 0,5 мл приготованого розчину полімерної сполуки (низькомолекулярний водорозчинний гомополімер диметиламіноетилметакрилат (поліДМАЕМ)) змішати із 0,5 мл розчину асОДН (Alpha DNA, Канада) з концентрацією 10 мкмоль/мл. Інкубувати суміш 30 хв за кімнатної температури та стерилізувати.

2. Приготований комплекс ввести внутрішньовенно у хвостову вену щурам.

3. Визначити вміст клітинного пріону через 48 год. після ін'єкції. Для цього використати метод вестерн-блот аналізу [Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині: довідник / В. В. Влізла, Р. С Федорук, І. Б. Ратич та ін.; за ред. В. В. Влізла. — Львів: Сподом, 2012. — 764 с].

Приклади конкретного виконання

Для тестування ефективності використання способу зниження вмісту клітинного пріону в організмі тварин було проведено дослідження на лабораторних щурах *Rattus norvegicus var. alba*, лінії Wistar. Статевозрілим щурам, масою 250-300 г, внутрішньовенно вводили комплекс полімерної сполуки і асОДН. Доза асОДН становила 1 мкмоль/кг маси тварини. Через 48 год. та після ін'єкції тварин декапітували і відбирали тканини головного мозку, селезінки і тонкого кишечника для досліджень.

Вміст клітинного пріону у головному мозку лабораторних щурів за дії комплексів асОДНф із полімерною сполукою показано на фіг. 1, де: 1 — контроль, 2 — асОДН, 3 — асОДН+полімер, 4 — полімер.

Встановлено, що у головному мозку вміст пріону залишається на рівні $48,0 \pm 5,2$ % впродовж 48 год. Ми не спостерігали зниження вмісту пріону за дії окремих асОДНф та полімерної сполуки (фіг.1).

Вміст пріону визначено відповідно до вмісту α -тубуліну. * — $p < 0,05$ (вміст пріону за дії комплексу асОДН та полімера порівнювали з його вмістом у тварин контрольної групи).

Вміст клітинного пріону у селезінці лабораторних щурів за дії комплексів асОДНф та полімерної сполуки показано на фіг. 2, де: 1 — контроль, 2 — асОДН, 3 — асОДН+полімер, 4 — полімер.

У селезінці на 48 год. виявлено зменшення вмісту клітинного пріону на $82,4 \pm 9,5$ % ($p < 0,05$) за дії комплексів асОДН із полімером (фіг. 2).

Вміст пріону визначено відповідно до вмісту α -тубуліну. * — $p < 0,05$ (вміст пріону за дії комплексу асОДН та полімера порівнювали з його вмістом у тварин контрольної групи).

Вміст клітинного пріону у тонкому кишечнику лабораторних щурів за дії комплексів асОДН із полімерною сполукою показано на фіг. 3, де: 1 - контроль, 2 - асОДН, 3 - асОДН+полімер, 4 - полімер.

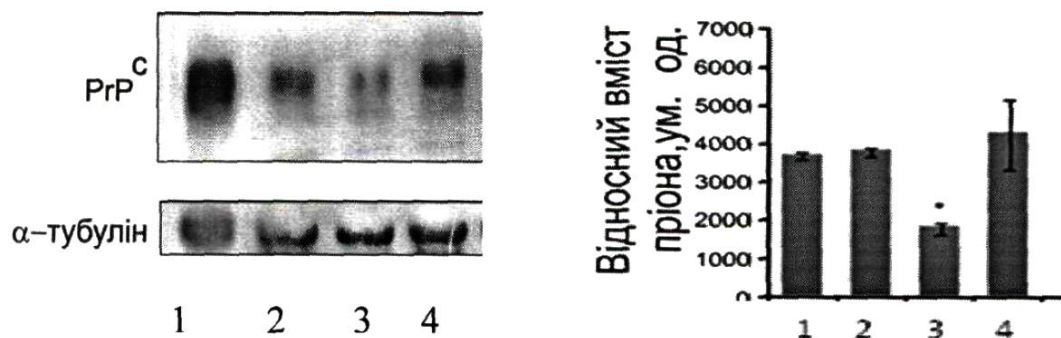
Аналогічно до селезінки, у тонкому кишечнику відзначається найнижчий вміст PrP^C у тварин, яким вводили комплекси асОДН із полімерним носієм (фіг. 3).

Вміст пріону визначено відповідно до вмісту α -тубуліну. * - $p < 0,05$ (вміст пріону за дії комплексу асОДН та полімера порівнювали з його вмістом у контрольній групі тварин).

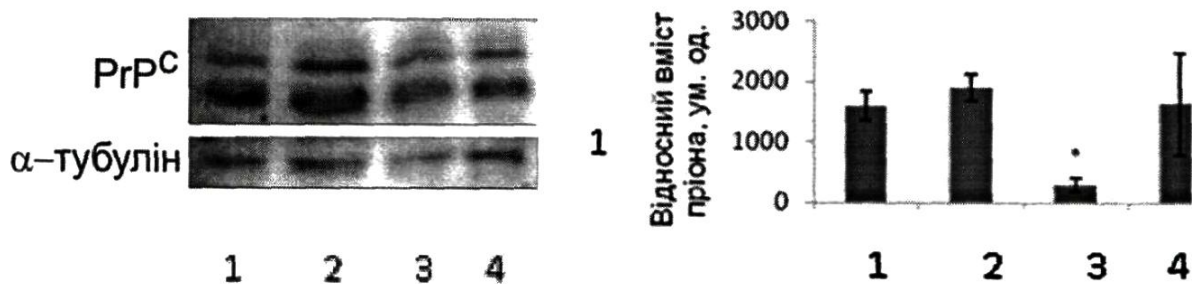
Отже, згідно з даними вестерн-блот аналізу вміст пріону знижується у пріон-реплікувальних органах щурів за дії комплексу асОДН та полімеру через 48 год.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

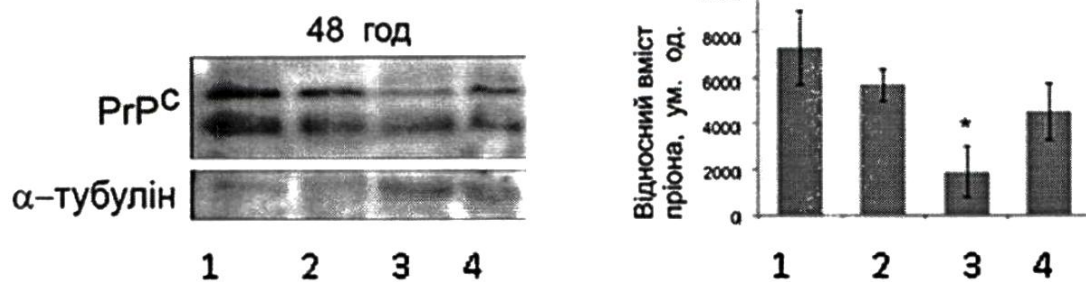
Спосіб зниження вмісту клітинного пріону в організмі тварин, який включає зниження вмісту клітинного пріону для профілактики трансмісивних спонгіформних енцефалопатій, який **відрізняється** тим, що додатково для керованого інгібування біосинтезу клітинного пріону використовують комплекс антисенсолігодезоксинуклеотидів з полімерною сполукою.



Фіг. 1



Фіг. 2



Фіг. 3

Комп'ютерна верстка В. Юкін

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

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