



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.12.20

(21) Номер заявки
202291831

(22) Дата подачи заявки
2020.12.21

(51) Int. Cl. **A61K 31/198** (2006.01)
A61K 31/194 (2006.01)
A61K 31/704 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
A61P 39/00 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

(54) ПРИМЕНЕНИЕ КОМПОЗИЦИЙ, СОДЕРЖАЩИХ АМИНОКИСЛОТЫ, ДЛЯ ПРЕДОТВРАЩЕНИЯ И ЛЕЧЕНИЯ КАРДИОТОКСИЧНОСТИ, ИНДУЦИРОВАННОЙ ХИМИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИМИ АГЕНТАМИ

(31) 10202000000442

(32) 2020.01.13

(33) IT

(43) 2022.09.22

(86) PCT/IB2020/062291

(87) WO 2021/144639 2021.07.22

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ПРОФЕССЬОНАЛЬ ДЪЕТЕТИКС
С.П.А. (IT)**

(72) Изобретатель:
Джорджетти Паоло Лука Мария (IT)

(74) Представитель:
**Харин А.В., Буре Н.Н., Стойко Г.В.,
Галухина Д.В., Алексеев В.В. (RU)**

(56) WO-A1-2012147901
WO-A1-2019021135
DAMIANI ROBERTO MARQUES ET AL.: "Pathways of cardiac toxicity: comparison between chemotherapeutic drugs doxorubicin and mitoxantrone", ARCHIVES OF TOXICOLOGY, SPRINGER, DE, vol. 90, no. 9, 25 June 2016

(2016-06-25), pages 2063-2076, XP036606963, ISSN: 0340-5761, DOI: 10.1007/S00204-016-1759-Y [retrieved on 2016-06-25] the whole document

CHOWDHURY S. ABDULLAH ET AL.: "Doxorubicin-induced cardiomyopathy associated with inhibition of autophagic degradation process and defects in mitochondrial respiration", SCIENTIFIC REPORTS, vol. 9, no. 1, 14 February 2019 (2019-02-14), XP055728288, DOI: 10.1038/s41598-018-37862-3, the whole document

ANOUEK E. HIENSCH ET AL.: "Doxorubicin-induced skeletal muscle atrophy: Elucidating the underlying molecular pathways", ACTA PHYSIOLOGICA, vol. 229, no. 2, 10 October 2019 (2019-10-10), XP055728325, GB, ISSN: 1748-1708, DOI: 10.1111/apha.13400, the whole document

LAURA A.A. GILLIAM ET AL.: "The anticancer agent doxorubicin disrupts mitochondrial energy metabolism and redox balance in skeletal muscle", FREE RADICAL BIOLOGY AND MEDICINE, vol. 65, 7 September 2013 (2013-09-07), pages 988-996, XP055728564, US, ISSN: 0891-5849, DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.08.191, the whole document

US-A1-2016038565

(57) В изобретении предложено применение композиции для предотвращения и/или лечения кардиотоксичности, индуцированной по меньшей мере одним химиотерапевтическим агентом, у субъекта, проходящего химиотерапию, причем композиция содержит активный агент, причем указанный активный агент содержит аминокислоты - лейцин, изолейцин, валин, треонин, лизин, и лимонную кислоту, янтарную кислоту, яблочную кислоту. Также предложено применение комбинированного препарата, содержащего указанную композицию и по меньшей мере один химиотерапевтический агент для предотвращения и/или лечения кардиотоксичности, индуцированной указанным по меньшей мере одним химиотерапевтическим агентом, у субъекта, страдающего от рака, где применение композиции и по меньшей мере одного химиотерапевтического агента является одновременным, раздельным, последовательным. Указанный химиотерапевтический агент может быть выбран из группы, состоящей из антрациклинов, ингибиторов HER2/ErbB2 (рецептор 2 эпидермального фактора роста), ингибиторов тирозинкиназы, ингибиторов фактора роста эндотелия сосудов, ингибиторов иммунных контрольных точек. Изобретение обеспечивает эффективное лечение кардиотоксичности, индуцированной химиотерапевтическими агентами, у пациентов с раком.

Область техники

Настоящее описание в целом относится к применению композиций, содержащих аминокислоты, для предотвращения и лечения побочных эффектов химиотерапии.

Предшествующий уровень техники

Рак молочной железы является наиболее распространенным неопластическим заболеванием среди женщин во всем мире. В 2012 году было диагностировано приблизительно 1,67 млн новых случаев данной опухоли. В 2018 году новые случаи рака молочной железы были диагностированы почти у 2,1 млн (11,6%) женщин, и около 627000 (6,6%) женщин умерли от данного типа рака. Данный прогноз свидетельствует о том, что некоторые виды рака молочной железы по-прежнему являются неизлечимыми заболеваниями, приводящими к высокой смертности среди женщин.

Антрациклины, такие как доксорубин (DOX), широко используются и являются высокоэффективными противораковыми химиотерапевтическими агентами. К сожалению, введение DOX приводит к дозозависимым побочным эффектам на неопластическую ткань, включая развитие кардиомиопатии, в дополнение к одышке, непереносимости физических нагрузок, гепатотоксичности и нефропатии. Помимо антрациклинов, более новые методы лечения, включая направленные на человеческий эпидермальный фактор роста (HER) 2 (ингибиторы HER2/ErbB2), несколько ингибиторов тирозинкиназы, ингибиторы фактора роста эндотелия сосудов и ингибиторы иммунных контрольных точек, продемонстрировали сильную кардиоваскулярную токсичность. Для пациентов с HER2-положительным раком молочной железы лечение трастузумабом также было связано с кардиомиопатией, что характеризовалось потерей фракции выброса левого желудочка после лечения. Пациенты с раком, у которых развивается кардиомиопатия, связанная с терапией рака, имеют значительно худшую выживаемость по сравнению с пациентами без кардиотоксичности. Данные токсические эффекты представляют собой ограничивающий фактор в терапии нескольких поддающихся лечению новообразований иного рода, и группа пожилого населения со сниженным сердечным резервом может быть еще более восприимчивым к таким эффектам. Таким образом, риск кардиотоксичности является одним из наибольших ограничивающих факторов клинического применения данных препаратов, приводящих как к острым, так и к хроническим сердечно-сосудистым явлениям. Например, острая сердечная токсичность от DOX может развиваться в течение минут-суток после введения и обычно характеризуется артериальной гипотензией, аритмией и, самое главное, левожелудочковой недостаточностью. Хотя молекулярные механизмы данных побочных эффектов полностью не изучены, а также потому, что DOX влияет на многие различные внутриклеточные процессы, все больше данных свидетельствуют о том, что основным медиатором повреждения сердца посредством DOX является окислительный стресс, с повышенным переокислением липидов, зависимым от активных форм кислорода (ROS) и снижением уровней антиоксидантов и сульфгидрильных групп. Повышенный окислительный стресс сопровождается развитием кардиомиопатии и сердечной недостаточности. Митохондриальная дисфункция может быть вовлечена в побочные эффекты, вызванные DOX и в целом другими химиотерапевтическими агентами, поскольку высокая выработка ROS вызывает митохондриальные нарушения с уменьшением синтеза АТФ (аденозинтрифосфорная кислота) и апоптоз кардиоцитов.

Тем не менее, кардиомиопатия и сердечная недостаточность, вызванные химиотерапевтическими агентами, отличаются как с точки зрения патологической анатомии, так и с патологической физиологии по сравнению с сердечной недостаточностью, вызванной сердечно-сосудистыми причинами. Это причина, по которой, как правило, кардиомиопатия, вызванная химиотерапией, и сердечная недостаточность не поддаются лечению традиционными способами терапии.

Кроме того, дополнительные ключевые проблемы, связанные с определением эффективного лечения кардиотоксичности, вызванной химиотерапией, заключаются в доказательствах того, что потенциально подходящие подходы к лечению кардиомиопатии или сердечной недостаточности могут не подходить для конкретной группы пациентов, т.е. пациентов, страдающих от рака. Раковые клетки имеют метаболические профили, отличные от профилей клеток здоровых субъектов, и появляются противоречивые данные о роли митохондриальной активности в пролиферации раковых клеток. Терапевтические подходы, способные восстановить функции митохондрий, могут приводить к увеличению пролиферации раковых клеток и, таким образом, к снижению противоопухолевого эффекта, оказываемого химиотерапевтическими агентами.

Краткое описание изобретения

Целью настоящего описания является получение новых композиций на основе аминокислот, в особенности эффективных для противодействия кардиотоксичности, индуцированной химиотерапевтическими агентами, у субъекта, страдающего от рака и проходящего химиотерапию.

В соответствии с настоящим описанием указанная выше цель достигается благодаря объекту изобретения, конкретно упомянутому в последующей формуле изобретения, которая понимается как составляющая неотъемлемая часть настоящего изобретения.

В варианте осуществления настоящего описания предложено применение композиции для предотвращения и/или лечения кардиотоксичности, индуцированной по меньшей мере одним химиотерапевтическим агентом, у субъекта, проходящего химиотерапию, причем композиция содержит активный агент, причем указанный активный агент содержит аминокислоты - лейцин, изолейцин, валин, треонин, лизин, и лимонную кислоту, янтарную кислоту, яблочную кислоту.

По меньшей мере один химиотерапевтический агент может быть выбран из группы, состоящей из антрациклинов, ингибиторов HER2/ErbB2, ингибиторов тирозинкиназы, ингибиторов фактора роста эндотелия сосудов, ингибиторов иммунных контрольных точек. Антрациклины предпочтительно выбраны из группы, состоящей из доксорубина, эпирубина, даунорубина, идарубина, пиксантрона, сабрубина, валрубина.

В одном или более вариантах осуществления активный агент композиции дополнительно содержит одну или более аминокислот, выбранных из группы, состоящей из гистидина, фенилаланина, метионина, триптофана, цистеина и тирозина.

Краткое описание графических материалов

Далее изобретение будет описано только в качестве примера со ссылкой на прилагаемые чертежи, где:

фиг. 1 представляет собой схему, демонстрирующую лечение кардиоцитов HL-1 (линия клеток сердечной мышцы);

фиг. 2 представляет собой схему, демонстрирующую лечение мышей *in vivo*;

фиг. 3 показывает, что специфические аминокислотные композиции предотвращают митохондриальную дисфункцию в кардиомиоцитах HL-1, подвергающихся краткосрочному и интенсивному воздействию DOX; (A) экспрессия маркера биогенеза митохондрий: уровни мРНК (матричная РНК) коактиватора 1α рецептора- γ , активируемого пролифератором пероксисом (PGC1- α), ядерного респираторного фактора-1 (NRF1), транскрипционного фактора А митохондрий (Tfam), цитохромы-с (cyt c) и субъединицы IV цитохромы-с-оксидазы (COX IV) измеряли с помощью количественной RT-PCR (полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией). Относительные значения экспрессии для необработанных (CTRL) клеток принимали как 1,0 (n=5 экспериментов). (B) Уровни белка COX IV и cyt c были измерены с помощью иммуноблоттинга. Относительные значения измеряли денситометрическим анализом относительно уровней GAPDH (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа); значения для необработанных (CTRL) клеток принимали равными 1,0 (n=5 экспериментов). (C) Активность цитратсинтазы. Значения были нормализованы по содержанию белка (n=3 эксперимента). *p<0,05, **p<0,01 и ***p<0,001 по сравнению с необработанными клетками; †p<0,01 по сравнению с клетками, обработанными DOX; §p<0,01 по сравнению с клетками, обработанными ВСААем (смесь, обогащенная аминокислотами с разветвленными боковыми цепями). Все данные представлены в виде среднего значения \pm SD (стандартное отклонение);

фиг. 4 показывает, что промежуточные соединения ТСА (трикарбоновые кислоты) не препятствуют DOX-индуцированному восстановлению генов биогенеза митохондрий в кардиомиоцитах HL-1. (A-C) Уровни мРНК коактиватора 1α рецептора- γ , активируемого пролифератором пероксисом (PGC1- α) (A), ядерного респираторного фактора-1 (NRF1) (B) и фактора А транскрипции (Tfam) (C) измеряли с помощью количественной RT-PCR. Относительные значения экспрессии для необработанных (CTRL) клеток принимали как 1,0 (n=3 эксперимента). С, лимонная кислота; S, янтарная кислота, М, яблочная кислота. *p<0,05 по сравнению с необработанными клетками. Все данные представлены в виде среднего значения \pm SD;

фиг. 5 показывает, что добавка $\alpha 5$ предотвращает DOX-индуцированный окислительный стресс в кардиомиоцитах HL-1. (A) высвобождение митохондриальной H_2O_2 , (B) соотношение базальной/общей аконитазы и (C) активность супероксиддисмутазы (SOD) в клетках HL-1 (n=3 эксперимента). (D) уровни мРНК супероксиддисмутазы 1 (SOD1) и глутатионпероксидазы 1 (GPX1) измеряли с помощью количественной RT-PCR. Относительные значения экспрессии для необработанных (CTRL) клеток принимали как 1,0 (n=5 экспериментов). (E) Общее окислительное повреждение ДНК (дизоксирибонуклеиновая кислота), измеренное как продукция 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозина (8-OHdG) в необработанных (CTRL) клетках и клетках, обработанных DOX (n=3 эксперимента). *p<0,05, **p<0,01 и ***p<0,001 по сравнению с необработанными клетками; †p<0,01 по сравнению с клетками, обработанными DOX. Все данные представлены в виде среднего значения \pm SD;

фиг. 6 показывает, что композиция $\alpha 5$ предотвращает DOX-индуцированную гибель клеток HL-1. Цитотоксичность кардиомиоцитов HL-1 измеряли с помощью анализа МТТ. Клетки обрабатывали 1% $\alpha 5$ в течение 48 ч и 1 мкМ DOX в течение 16 ч. *p<0,05 по сравнению с необработанными клетками; †p<0,05 по сравнению с клетками, обработанными DOX. Все данные представлены в виде среднего значения \pm SD;

фиг. 7 показывает, что композиция $\alpha 5$ предотвращает митохондриальную дисфункцию в левом желудочке мышей, получавших DOX. (A и F) Экспрессия маркера биогенеза митохондрий. (A) уровни мРНК PGC1- α , NRF1, Tfam, cyt c, COX IV и (F) SOD1, супероксиддисмутазы 2 (SOD2), каталазы (Cat) и GPX1 измеряли с помощью количественной RT-PCR. Относительные значения экспрессии для мышей, получавших носитель (Veh), принимали равными 1,0 (n=5 экспериментов). (B) Количество митохондриальной ДНК (мтДНК) измеряли с помощью количественной RT-PCR. Относительные единицы были выражены по сравнению с единицами для мышей, получавших Veh, которые были принимали равными 1,0 (n=5 экспериментов). (C) Уровни белка COX IV и cyt c определяли с помощью иммуноблоттинга. Отно-

сительные значения измеряли с помощью денситометрического анализа относительно уровней глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH); значения для мышей, получавших Veh, принимали равными 1,0 (n=5 экспериментов). (D) Активность цитратсинтазы. Значения были нормализованы по содержанию белка (n=3 эксперимента). (E) Базальная норма потребления кислорода. Митохондрии выделяли из левого желудочка мышей, получавших или не получавших DOX и $\alpha 5$. Показатели потребления кислорода были нормализованы по количеству митохондриального белка (n=3 эксперимента). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ и *** $p < 0,001$ по сравнению с мышами, получавшими Veh; † $p < 0,05$ и †† $p < 0,01$ по сравнению с мышами, получавшими DOX. Все данные представлены в виде среднего значения \pm SD;

фиг. 8 показывает, что различные сигнальные пути вовлечены в защитные эффекты добавления $\alpha 5$ у мышей, получавших DOX. (A, E и F) экспрессия гена. (A) Уровни мРНК эндотелиальной синтазы оксида азота (eNOS), (E) сестрина-2 и (F) Krüppel-подобного фактора 15 (KLF15) анализировали с помощью количественной RT-PCR. Относительные значения экспрессии для мышей, получавших носитель (Veh), принимали равными 1,0 (n=5 экспериментов). (B, C, D и G) Уровни белка. (B) Уровни фосфо-eNOS, (C) фосфо-S6 (рибосомальный белок S6), (D) фосфо-mTOR (мишень рапамицина у млекопитающих) и (G) фосфо-BCKDH (дегидрогеназный комплекс разветвлённых α -кетокислот) белка были измерены с помощью иммуноблоттинга. Относительные значения были денситометрически проанализированы и представлены в виде соотношений к общим уровням eNOS, S6, mTOR и BCKDH, соответственно. Значения для мышей, получавших Veh, принимали как 1,0 (n=5 экспериментов). * $p < 0,05$ и ** $p < 0,01$ по сравнению с мышами, получавшими Veh; † $p < 0,05$ по сравнению с мышами, получавшими DOX. Все данные представлены в виде среднего значения \pm SD;

фиг. 9 показывает, что различные сигнальные пути вовлечены в защитные эффекты добавления $\alpha 5$ в кардиомиоцитах HL-1, обработанных DOX. (A, D и F) экспрессия гена. Уровни мРНК (A) eNOS, (D) Sestrin2, (F) KLF15 анализировали с помощью количественной RT-PCR. Относительные значения экспрессии для необработанных (CTRL) клеток принимали как 1,0 (n=5 экспериментов). (B, C, E-H) Уровни белка. (B) Уровни фосфо-eNOS, (C) фосфо-S6, (E) фосфо-Akt (протеинкиназа B), (F) KLF15, (G) PGC-1 α и COXIV, и (H) фосфо-S6 и фосфо-BCKDH белка были измерены с помощью иммуноблоттинга. Относительные значения были денситометрически проанализированы и представлены в виде соотношений к общим уровням eNOS, S6, Akt и BCKDH, соответственно; KLF15, PGC-1 α и COXIV были нормализованы по GAPDH. Значения для необработанных клеток HL-1 принимали как 1,0 (n=5 экспериментов). (G) Уровни белка PGC1- α и COX IV измеряли с помощью иммуноблоттинга в клетках HL-1, трансфицированных либо специфической миРНК (малая интерферирующая РНК) KLF15, либо нецелевой миРНК, и обрабатывали DOX или $\alpha 5$ по отдельности или в комбинации. Значения для необработанных клеток HL-1 принимали как 1,0 (n=5 экспериментов). (H) фосфорилирование S6 и BCKDH измеряли с помощью иммуноблоттинга в клетках HL-1, как в (H). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ и *** $p < 0,001$ по сравнению с необработанными клетками; † $p < 0,05$ по сравнению с клетками, обработанными DOX. Все данные представлены в виде среднего значения \pm SD;

фиг. 10 показывает специфическое сайленсинг Klf15, eNOS и Raptor (регуляторный ассоциированный белок mTOR) в кардиомиоцитах HL-1. (A-C) Уровни мРНК Klf15, eNOS и Raptor измеряли с помощью количественной RT-PCR, а уровни белка KLF15, eNOS и Raptor измеряли с помощью иммуноблоттинга. Относительные значения экспрессии для необработанных (CTRL) клеток принимали как 1,0 (n=5 экспериментов). * $p < 0,05$ по сравнению с необработанными клетками. Все данные представлены в виде среднего значения \pm SD;

фиг. 11 показывает специфический сайленсинг eNOS и Raptor в кардиомиоцитах HL-1. (A) Уровни белка PGC1- α и COX IV измеряли с помощью иммуноблоттинга в клетках HL-1, трансфицированных либо специфической миРНК eNOS, либо нецелевой миРНК, и обрабатывали DOX или $\alpha 5$ отдельно или в комбинации. (B) Уровни белка PGC1- α и COX IV измеряли с помощью иммуноблоттинга в клетках HL-1, трансфицированных либо специфической миРНК Raptor, либо нецелевой миРНК, и обрабатывали DOX или $\alpha 5$ отдельно или в комбинации. Значения для необработанных (CTRL) клеток принимали как 1,0 (n=3 эксперимента). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ и *** $p < 0,001$ по сравнению с необработанными клетками; † $p < 0,05$ по сравнению с клетками, обработанными DOX. Все данные представлены в виде среднего значения \pm SD;

фиг. 12 показывает предложенную модель протективного действия $\alpha 5$ на митохондриальное повреждение, индуцированное доксорубицином (DOX) в кардиомиоцитах. Символ "плюс" (+) и "минус" (-) указывает на стимуляцию или ингибирование, индуцированные DOX и, потенциально, сайтами-мишенями $\alpha 5$. DOX снижает биогенез митохондрий и функции 1) связывания с топоизомеразой II β (TOP2B), которая образует комплексы с промоторами Ppargc1a и Ppargc1b и блокирует транскрипцию митохондриальных генов, включая гены защиты против ROS, 2) снижения экспрессии eNOS и активности mTORC1, которые являются важными регуляторами митохондриальной физиологии, 3) ограничения экспрессии гена KLF15 и предположительно окисления BCAA, с накоплением α -кетокислоты и BCAA, которые являются токсичными при высоких уровнях, за пределами сниженных промежуточных продук-

тов цикла TCA и выработки митохондриальной энергии. Митохондриальное накопление DOX сопровождается повышением ROS;

фиг. 13 относится к пролиферации клеток рака молочной железы MCF7. Антипролиферативный эффект DOX оставался неизменным в клетках MCF7 в присутствии смеси аминокислот. (А) Анализ кинесой фосфатазы: клетки (5000-20000/лунка в 96-луночных планшетах) обрабатывали 1% α 5 в течение 48 ч и 1 мкМ DOX в течение 16 ч. (В) Анализ пролиферации: клетки (50000/лунка в 12-луночных планшетах) обрабатывали, как в (А), и использовали анализ исключения трипанового синего. $n=3$ эксперимента. * $p<0,05$ и ** $p<0,01$ по сравнению с необработанными клетками. Все данные представлены в виде среднего значения \pm SD.

Подробное описание предпочтительных вариантов осуществления

В нижеследующем описании приведены многочисленные конкретные детали, чтобы обеспечить полное понимание вариантов осуществления. Варианты осуществления могут быть реализованы без одной или более конкретных деталей или с другими способами, компонентами, материалами и т.д. В других случаях хорошо известные структуры, материалы или операции не показаны или не описаны подробно, чтобы не затруднить понимание аспектов изобретения.

Используемая в настоящем документе ссылка на "один вариант осуществления" или "вариант осуществления" означает, что конкретный элемент, признак, структура или характеристика, описанные в связи с вариантом осуществления, включены по меньшей мере в один вариант осуществления. Таким образом, употребление выражения "в соответствии с одним вариантом осуществления" или "в соответствии с вариантом осуществления" в различных местах настоящего описания не обязательно всегда относится к одному и тому же варианту осуществления. Кроме того, отдельные признаки, структуры или характеристики могут быть объединены любым подходящим образом в одном или более вариантах осуществления. Заголовки, представленные здесь, предназначены только для удобства и не интерпретируют объем или значение вариантов осуществления.

Целью настоящего описания является получение новых композиций на основе аминокислот, в особенности эффективных для противодействия кардиотоксичности, индуцированной химиотерапевтическими агентами, у субъекта, проходящего химиотерапию. Композиция способна предотвращать и лечить митохондриальную дисфункцию, специфически индуцированную химиотерапевтическими агентами в кардиоцитах. Кардиотоксичность, индуцированная химиотерапевтическими агентами, может включать кардиомиопатию или сердечную недостаточность.

В настоящем описании предложено применение композиции для предотвращения и/или лечения кардиотоксичности, индуцированной по меньшей мере одним химиотерапевтическим агентом, у субъекта, страдающего от рака и проходящего химиотерапию, причем композиция содержит активный агент, причем указанный активный агент содержит аминокислоты - лейцин, изолейцин, валин, треонин, лизин, и лимонную кислоту, янтарную кислоту, яблочную кислоту.

Химиотерапевтические агенты, также называемые противоопухолевыми агентами, используются для прямого или косвенного ингибирования пролиферации быстрорастущих клеток, оказывая противоопухолевый эффект. Композиция, раскрытая в данном документе, эффективна для предотвращения и/или лечения кардиотоксичности, индуцированной антрациклинами, ингибиторами HER2/ErbB2, ингибиторами тирозинкиназы, ингибиторами фактора роста эндотелия сосудов, ингибиторами иммунных контрольных точек. Антрациклины могут быть выбраны из группы, состоящей из доксорубицина, эпирубицина, даунорубицина, идарубицина, пиксантрона, сабарубицина, валрубицина.

В настоящем описании дополнительно предложено применение комбинированных препаратов, содержащих композицию, причем композиция содержит активный агент, содержащий аминокислоты - лейцин, изолейцин, валин, треонин, лизин, и лимонную кислоту, янтарную кислоту, яблочную кислоту; и по меньшей мере один химиотерапевтический агент для предотвращения и/или лечения кардиотоксичности, индуцированной указанным по меньшей мере одним химиотерапевтическим агентом, у субъекта, страдающего от рака, где применение композиции и по меньшей мере одного химиотерапевтического агента является одновременным, раздельным, последовательным.

Было показано, что хроническая (3 месяца) пищевая добавка со смесью, обогащенная аминокислотами с разветвленными цепями (BCAAем), способствовала биогенезу митохондрий в сердечных и скелетных мышцах мышц среднего возраста. Также было показано, что композиция, содержащая аминокислоты с разветвленной цепью - лейцин, изолейцин, валин, в комбинации с треонином, лизином и лимонной кислотой, янтарной кислотой, яблочной кислотой, эффективна для улучшения функции митохондрий, как описано в документе WO 2019/021135 A1. Тем не менее, было также показано, что увеличение усилий по предотвращению и лечению кардиотоксичности, специфически индуцированной химиотерапевтическими агентами, включая введение потенциально эффективных лекарственных препаратов, было предложено безрезультатно [1].

Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что раскрытая в данном документе композиция может быть преимущественно использована для лечения кардиотоксичности, индуцированной химиотерапевтическими агентами, у субъектов, проходящих химиотерапию. В частности, испытания,

проведенные *in vitro* и *in vivo*, показывают, что i) кардиоциты, обработанные доксорубицином в качестве химиотерапевтического агента, не являются устойчивыми к обработке композицией, раскрытой в данном документе, при восстановлении митохондриальной функциональности и ii) что композиция способна противодействовать кардиотоксичности, индуцированной химиотерапевтическим агентом.

Кроме того, как показано в следующих разделах, композицию можно безопасно вводить также конкретной группе субъектов, т.е. субъектам, проходящим химиотерапию, таким образом, страдающим от опухолевых патологий. Неожиданный аспект этих данных вытекает из рассмотрения того, что, как раскрыто в предыдущем разделе, раковые клетки имеют метаболические профили, отличные от профилей клеток здоровых субъектов, и противоречивые данные сосредоточены на роли митохондриальной активности в пролиферации раковых клеток. Например, было показано, что делеция митохондриальной ДНК раковых клеток снижает их рост и туморогенность; на основании этих наблюдений восстановление функций митохондрий может, наоборот, привести к увеличению пролиферации опухолевых клеток, а также определить снижение противоопухолевого эффекта, оказываемого химиотерапевтическими агентами.

Композиция, раскрытая в данном документе, напротив: i) эффективна в восстановлении функций митохондрий в кардиоцитах, обработанных доксорубицином, ii) не способствует пролиферации опухолевых клеток, iii) не изменяет противоопухолевые эффекты, оказываемые доксорубицином, iv) очень неожиданно способна усиливать антипролиферативный эффект доксорубицина.

Как раскрыто ниже, была протестирована композиция, содержащая незаменимые аминокислоты и промежуточные соединения цикла трикарбоновых кислот - названная композиция $\alpha 5$, и исследован ее эффект в кардиомиоцитах HL-1 и мышцах, получавших DOX. По сравнению с композицией, содержащей незаменимые аминокислоты с разветвленной цепью, называемой BCAAem композицией, без трикарбоновой кислоты, добавление композиции $\alpha 5$ было значительно более эффективным в стимулировании защитных эффектов на DOX-индуцированную митохондриальную дисфункцию. Результаты были продлены *in vivo* у молодых мышей, подвергшихся краткосрочному и интенсивному лечению DOX. Результаты показали следующие данные: i) возникновение митохондриальной дисфункции после краткосрочного и интенсивного введения DOX, ii) выраженная защитная способность краткосрочной добавки с композицией $\alpha 5$. Таким образом, композиция может быть использована для предотвращения и/или лечения кардиотоксичности, индуцированной химиотерапевтическим агентом, таким образом, также предотвращая кардиомиопатию и/или сердечную недостаточность, которые могут возникнуть в результате такой индуцированной кардиотоксичности.

Композиция, описанная в данном документе, содержит активный агент, указанный активный агент содержит лимонную кислоту, янтарную кислоту и яблочную кислоту в комбинации с лейцином, изолейцином, валином, треонином, лизином, и массовое соотношение между общим количеством лимонной кислоты, янтарной кислоты и яблочной кислоты и общим количеством аминокислот - лейцина, изолейцина, валина, треонина, лизина, может быть от 0,05 до 0,3, предпочтительно от 0,1 до 0,25.

В одном или более вариантах осуществления композиция может состоять из лейцина, изолейцина, валина, треонина, лизина, лимонной кислоты, янтарной кислоты и яблочной кислоты и необязательно витамина B1 и/или витамина B6.

В одном или более вариантах осуществления изобретения активный агент может дополнительно содержать одну или более аминокислот, выбранных из группы, состоящей из гистидина, фенилаланина, метионина, триптофана, цистеина и тирозина.

В одном или более вариантах осуществления композиция может содержать активный агент, состоящий из лейцина, изолейцина, валина, треонина, лизина, гистидина, фенилаланина, метионина, триптофана, цистеина и необязательно тирозина, а также лимонной кислоты, янтарной кислоты и яблочной кислоты, причем указанные аминокислоты являются единственными аминокислотами, содержащимися в композиции.

В одном или более вариантах осуществления композиция может не содержать любых других активных агентов, таких как любой химиотерапевтический агент, то есть любой агент, который прямо или косвенно ингибирует пролиферацию быстрорастущих клеток, оказывая противоопухолевый эффект.

В одном или более вариантах осуществления изобретения композиция может состоять из лейцина, изолейцина, валина, треонина, лизина, гистидина, фенилаланина, метионина, триптофана, цистеина, тирозина, лимонной кислоты, янтарной кислоты и яблочной кислоты и необязательно витамина B1 и/или витамина B6.

Композиция может содержать аминокислоты - изолейцин, лейцин и валин, в количестве от 35 до 65 мас.%, предпочтительно от 42 до 56 мас.% относительно массы активного агента.

Массовое соотношение между лейцином и лимонной кислотой составляет от 5 до 1, предпочтительно от 2,50 до 3,50.

В одном или более вариантах осуществления массовое или молярное количество лимонной кислоты выше массового или молярного количества каждой из яблочной кислоты и янтарной кислоты. Предпочтительно массовое или молярное количество лимонной кислоты выше, чем общее массовое или моляр-

ное количество яблочной и янтарной кислоты. В дополнительном варианте осуществления массовое соотношение между лимонной кислотой и суммой яблочной и янтарной кислоты составляет от 1,0 до 4,0, предпочтительно от 1,5 до 2,5. В предпочтительном варианте осуществления массовое соотношение лимонная кислота:яблочная кислота:янтарная кислота составляет от 10:1:1 до 2:1,5:1,5, предпочтительно от 7:1:1 до 1,5:1:1, более предпочтительно от 5:1:1 до 3:1:1. В предпочтительном варианте осуществления массовое соотношение лимонная кислота:яблочная кислота:янтарная кислота составляет 4:1:1.

Предпочтительное молярное соотношение изолейцин:лейцин находится в диапазоне 0,2-0,7, предпочтительно в диапазоне 0,30-0,60 и/или предпочтительное массовое соотношение валин:лейцин находится в диапазоне 0,2-0,70, предпочтительно в диапазоне 0,30-0,65.

Молярное соотношение треонин:лейцин может находиться в диапазоне 0,10-0,90, предпочтительно в диапазоне 0,20-0,70, и/или массовое соотношение лизин:лейцин находится в диапазоне 0,20-1,00, предпочтительно в диапазоне 0,40-0,90.

В предпочтительном варианте осуществления соотношение между общим молярным количеством лимонной кислоты, яблочной кислоты, янтарной кислоты и общим молярным количеством метионина, фенилаланина, гистидина и триптофана составляет более 1,35.

В одном или более вариантах осуществления массовое соотношение между суммой лимонной кислоты, яблочной кислоты, янтарной кислоты и суммой аминокислот с разветвленной цепью - лейцина, изолейцина, валина, составляет от 0,1 до 0,4, предпочтительно от 0,15 до 0,35.

В дополнительном варианте осуществления общее массовое количество аминокислот с разветвленной цепью - лейцина, изолейцина, валина, треонина и лизина выше, чем общее массовое количество трех кислот: лимонной кислоты, яблочной кислоты, янтарной кислоты. Предпочтительно, массовое количество отдельных кислот (лимонной кислоты, янтарной кислоты или яблочной кислоты) меньше, чем массовое количество каждой из отдельных аминокислот (лейцина, изолейцина, валина, треонина и лизина).

В дополнительном варианте осуществления общее молярное количество лизина и треонина выше, чем общее молярное количество трех кислот: лимонной кислоты, янтарной кислоты, яблочной кислоты. Предпочтительно соотношение между общим молярным количеством трех кислот: лимонной кислоты, янтарной кислоты, яблочной кислоты и общим молярным количеством лизина и треонина составляет от 0,1 до 0,7, предпочтительно от 0,15 до 0,55.

В одном или более вариантах осуществления композиция, раскрытая в настоящем документе, дополнительно содержит витамины, предпочтительно выбранные из группы витаминов В, такие как витамин В₁ и/или витамин В₆. Кроме того, композиция может дополнительно содержать углеводы и/или ароматизаторы.

В одном или более вариантах осуществления композиция может представлять собой фармацевтическую композицию, дополнительно содержащую фармацевтически приемлемый носитель. Композиция также может содержать фармацевтически приемлемые эксципиенты, такие как, например, белки, витамины, углеводы, природные и искусственные подсластители и/или ароматизаторы вещества. В предпочтительном варианте осуществления фармацевтически приемлемые эксципиенты могут быть выбраны из сывороточных белков, мальтодекстринов, фруктозы, казеината кальция, рыбьего жира, лимонной кислоты или их солей, сукралозы, сложных эфиров сахарозы, витамина D₃, витаминов группы В.

В одном или более вариантах осуществления активный агент композиции может дополнительно содержать по меньшей мере один химиотерапевтический агент. Химиотерапевтический агент может быть выбран из группы, состоящей из антрациклинов, ингибиторов HER2/ErbB2, ингибиторов тирозинкиназы, ингибиторов фактора роста эндотелия сосудов, ингибиторов иммунных контрольных точек. Антрациклины могут быть выбраны из группы, состоящей из доксорубина, эпирубина, даунорубина, идарубина, пиксантрона, сабарубина, валрубина.

Кроме того, в частности, при получении композиций согласно настоящему изобретению и, в частности, активного агента следует избегать аминокислоты - аргинина. Кроме того, дополнительные аминокислоты, специально исключенные из описанной в данном документе композиции, представляют собой серин, пролин, аланин. Такие аминокислоты могут быть контрпродуктивными или даже вредными в некоторых концентрациях или стехиометрических соотношениях в композиции.

Аминокислоты, раскрытые в настоящем описании, могут быть заменены соответствующими фармацевтически приемлемыми производными, а именно солями.

В одном или более вариантах осуществления композиции, описанные в данном документе, могут быть использованы для предотвращения и/или лечения кардиомиопатии и/или сердечной недостаточности, индуцированной химиотерапевтическими агентами, у субъекта, проходящего химиотерапию.

Для перорального применения композиции согласно описанию могут быть в форме таблеток, капсул, гранул, геля, желеобразующего порошка, порошка.

Дополнительные описания, в отношении количеств и соотношений между различными аминокислотами, предусмотренными композициями, содержатся в прилагаемой формуле изобретения, которая составляет неотъемлемую часть технического замысла, представленного в данном документе в отношении изобретения.

Примеры

В табл. 1 показаны две различные композиции на основе аминокислот, протестированные на клетках HL-1, как описано ниже. Две композиции представляют собой композицию "BCAAем", как также раскрыто в документе EP 2196203 B1, и композицию "α5", содержащую активный агент, содержащий аминокислоты и лимонную кислоту, янтарную кислоту и яблочную кислоту.

Таблица 1

Композиция (мас.%)	BCAAем	α5
L-лейцин	30,01	31,0885
L-лизин-гидрохлорид	19,58	16,9030
L-изолейцин	15,00	10,3628
L-валин	15,00	10,3628
L-треонин	8,40	7,2540
L-цистеин	3,60	3,1089
L-гистидин	3,60	3,1089
L-фенилаланин	2,40	2,0726
L-метионин	1,20	1,0363
L-тирозин	0,72	0,6218
L-триптофан	0,48	2,0726
Лимонная кислота	-	8,001
Янтарная кислота	-	2,00
Яблочная кислота	-	2,00
Витамин B1 (тиамина гидрохлорид)	-	0,004
Витамин B6 (пиридоксина гидрохлорид)	-	0,0038

Композиции, приведенные в табл. 1 выше, могут быть получены сначала путем просеивания всех компонентов с помощью 0,8 сита. Для получения предварительной смеси каждый ингредиент (в количестве менее 10 мас.% относительно общего количества) помещали в полиэтиленовый пакет вместе с частью L-лизин-гидрохлорида с получением около 10 мас.% относительно общей композиции. Затем пакет встряхивали вручную в течение 5 мин. Затем предварительную смесь загружали в смеситель (Planetaria) вместе с остальными ингредиентами и перемешивали в течение 15 мин при 120 об/мин с получением однородного конечного состава.

Способы.

Клеточные культуры и обработка.

Правила Хельсинкской декларации были соблюдены. Кардиомиоциты HL-1 получали из W.C. Clauscomb (Millipore кат. № SCC065) и высевали в сосуды, покрытые фибронектином/желатином, выращивали до 70-80% слияния в среде Clauscomb (Sigma-Aldrich) с добавлением 100 мкМ норэпинефрина (из 10 мМ исходного раствора норэпинефрина [Sigma-Aldrich], растворенного в 30 мМ L-аскорбиновой кислоты [Sigma-Aldrich]), 2 мМ L-глутамин, 100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS, Sigma-Aldrich) [2,3]. Линию клеток рака молочной железы человека MCF-7 (ATCC®HTB-22™), также доступную от P. Limonta (Фармакологические и биомолекулярные науки, Миланский университет, Милан, Италия), культивировали при pH 7,4 DMEM (среда Игла, модифицированная по способу Дульбекко), содержащей стрептомицин (100 Ед/мл), пенициллин (200 мг/мл) и гентамицин (50 мг/мл), и добавляли 10% FBS. Оба типа клеток обрабатывали 1% BCAAем или α5 в течение 48 ч и 1 мкМ DOX в течение 16 ч (фиг. 1). Подробные процентные доли композиции смесей приведены в табл. 1.

Для исследования фосфо-белков клетки HL-1 обрабатывали 1% α5 в течение 2 ч и 1 мкМ DOX (Doxo-HCl (доксорубин гидрохлорид) от Sigma-Aldrich D15D15) в течение последних 60 мин. В экспериментах по нокдауну Klf15, eNOS и Raptor клетки HL-1 трансфицировали 50-100 нМ Klf15, eNOS и Raptor SMART-пулом (SMARTpool) миРНК (Dharmacon; Лафайет, Колорадо) или нецелевой миРНК siGENOME с использованием трансфекционного реагента Dharmafect 1. Через 24 ч трансфекции клетки обрабатывали 1% α5 в течение 24 ч и 1 мкМ DOX в течение 16 ч. Эффективность трансфекции определяли с помощью нецелевой миРНК, не содержащей siGLO-RISC, и захвата миРНК флуоресцентным детектором (поглощение/эмиссия 557/570). Затем белки экстрагировали для вестерн-блоттинга.

Животные и лечение.

Используемый экспериментальный протокол был одобрен Институциональным этическим комитетом Миланского университета (№ 16/09) и соответствовал Национальным рекомендациям по защите жи-

вотных. Сорок самцов мышей C57BL6/J (в возрасте 9 недель) содержали отдельно в чистых полипропиленовых клетках и разделяли на четыре группы (фиг. 2): 1) контрольная группа (CTRL, n=10 мышей), получавшая стандартную диету (4,3% ккал жира, 18,8% ккал белка, 76,9% ккал углевода; Laboratorig Dottori Riccioni) и получавшая одну внутривбрюшинную инъекцию физиологического раствора (носитель); 2) группа $\alpha 5$ (n=10 мышей), получавшая стандартную диету и добавку $\alpha 5$ (1,5 мг/г массы тела/день в питьевой воде), получавшая одну внутривбрюшинную инъекцию физиологического раствора (носитель). Композицию $\alpha 5$ растворяли в питьевой воде, после расчета среднего суточного объема питья за 2 недели до начала лечения и хранения при 4°C перед ежедневным введением; 3) группа DOX (n=10 мышей), получавшая стандартную диету и внутривбрюшинную инъекцию DOX (Doxo-HCl от Sigma-Aldrich) в дозе 20 мг/кг, доза, которая была показана кардиотоксической [4-6]; и 4) группа DOX плюс $\alpha 5$ (n=10 мышей), получавшая стандартную диету и внутривбрюшинную инъекцию DOX в дозе 20 мг/кг с добавлением $\alpha 5$ (1,5 мг/г массы тела/день в питьевой воде). $\alpha 5$ добавляли в течение 10 дней, с циклом 12 ч света/12 ч темноты при 22°C в тихом помещении с контролем температуры и влажности; однократное введение DOX проводили на третий день до окончания лечения $\alpha 5$ (фиг. 2). Объем питья, потребление пищи и массу тела проверяли два раза в неделю. В конце периода лечения мышей умерщвляли путем смещения шейных позвонков, и сердца быстро удаляли и сразу применяли (для анализа потребления кислорода) или замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C (для измерения мтДНК, мРНК и уровня белка, в дополнение к анализу активности цитратсинтазы).

Количественный анализ RT-PCR.

Количественные RT-PCR проводили, как описано ранее [3-7], с помощью iQ SybrGreenI SuperMix (Bio-Rad; Segrate, Италия) на системе обнаружения PCR в реальном времени iCycler iQ (Bio-Rad). Вкратце, РНК выделяли из левого желудочка с использованием RNeasy Tissue Mini Kit (Qiagen) или из клеток HL-1 с использованием RNeasy Mini Kit (Qiagen). КДНК (комплементарная ДНК) синтезировали с использованием iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories). Праймеры были спроектированы с использованием программного обеспечения Beacon Designer 2.6 от Premier Biosoft International и показаны в табл. 2.

Таблица 2

Ген			SEQ ID.	Продукт PCR (п.о. (пар оснований))	T _a (°C)
Cat	CACTGACGAGATGGCACA CTTTG TGGAGAACCGAACGGCAA TAGG	Смысловый праймер (5'-3') Антисмысловый праймер (5'-3')	№ 1 № 2	173	60
COX IV	TGGGACTATGACAAGAAT GAGTGG TTAGCATGGACCATTGGAT ACGG	Смысловый праймер (5'-3') Антисмысловый праймер (5'-3')	№ 3 № 4	113	60
cyt c	ATAGGGGCATGTCACCTC AAAC GTGGTTAGCCATGACCTGA AAG	Смысловый праймер (5'-3') Антисмысловый праймер (5'-3')	№ 5 № 6	172	60
eNOS	AGCGGCTGGTACATGAGT TC	Смысловый праймер (5'-3')	№ 7 № 8	116	60

	GATGAGGTTGCCTGGTGT CC	Антисмысловой праймер (5'-3')			
GPX1	TCTGGGACCTCGTGGACTG CACTTCGCACTTCTCAAAC AATG	Смысловой праймер (5'-3') Антисмысловой праймер (5'-3')	№ 9 № 10	156	60
KLF1 5	ACACCAAGAGCAGCCACC TC TGAGATCGCCGGTGCCTTG A	Смысловой праймер (5'-3') Антисмысловой праймер (5'-3')	№ 11 № 12	130	60
мтДНК К	СCACTTCATCTTACCATT A ATCTGCATCTGAGTTAAT C	Смысловой праймер (5'-3') Антисмысловой праймер (5'-3')	№ 13 № 14	106	54
NRF1	ACAGATAGTCTGTCTGGG GAAA TGGTACATGCTCACAGGG ATCT	Смысловой праймер (5'-3') Антисмысловой праймер (5'-3')	№ 15 № 16	99	60
PGC- 1α	ACTATGAATCAAGCCACT ACAGAC TTCATCCCTCTTGAGCCTT TCG	Смысловой праймер (5'-3') Антисмысловой праймер (5'-3')	№ 17 № 18	148	60
SESN 2 (сестр ин 2)	GCCCCTGAGAAGCTCCGC AA GAGTTCGGCCAGGGACCA GC	Смысловой праймер (5'-3') Антисмысловой праймер (5'-3')	№ 19 № 20	129	60
SOD1	GGCTTCTCGTCTTGCTCTC AACTGGTTCACCGCTTGC	Смысловой праймер (5'-3') Антисмысловой праймер (5'-3')	№ 21 № 22	153	60
SOD2	GCCTCCAGACCTGCCTTA C GTGGTACTTCTCCTCGGTG GCG	Смысловой праймер (5'-3') Антисмысловой праймер (5'-3')	№ 23 № 24	131	60
ТВР (ТАТ А- связи вающ ий белок)	ACCCTTACCAATGACTCC TATG TGA CTGCAGCAAATCGCTT GG	Смысловой праймер (5'-3') Антисмысловой праймер (5'-3')	№ 25 № 26	186	60
Tfam	AAGACCTCGTTCAGCATAT AACATT TTTTCCAAGCCTCATTTAC AAGC	Смысловой праймер (5'-3') Антисмысловой праймер (5'-3')	№ 27 № 28	104	60
18S	CTGCCCTATCAACTTTCGA TGGTAG CCGTTTCTCAGGCTCCCTC TC	Смысловой праймер (5'-3') Антисмысловой праймер (5'-3')	№ 29 № 30	100	60

T_a температура отжига (°C); Cat, каталаза; COX IV, субъединица IV цитохромы-с-оксидазы; сyt c, цитохрома-с; eNOS, эндотелиальная синтаза оксида азота; GPX1, глутатионпероксидаза 1; KLF15, K μ rrel-подобный фактор 15; мтДНК, митохондриальная ДНК; NRF1, ядерный респираторный фактор 1; PGC-1α, коактиватор 1α рецептор-α, активируемого пролифератором пероксисом; SESN2, сестрин 2;

SOD1, супероксиддисмутаза 1; SOD2, супероксиддисмутаза 2; TBP, ТАТА-связывающий белок; Tfam, транскрипционный фактор А митохондрий; 18S, 18S рибосомальная РНК.

Учетный номер: NM_009804.2; учетный номер: COX IV: NM_009941; учетный номер: Cyt c: NM_007808; учетный номер: eNOS: NM_008713.4; учетный номер: GPX1: NM_008160.6; учетный номер: KFL15: NM_023184.4; митохондрия Mus musculus (мышь домовая), полный геном: NC_005089.1; учетный номер: NRF1: AF098077; PGC-1 α : AF049330; учетный номер: SESN2: NM_144907.1; учетный номер: SOD1: NM_011434; учетный номер: SOD2: NM_013671; учетный номер: TBP: NM_013684.3; учетный номер: Tfam: NM_009360.4; учетный номер: X03205.

Номер цикла, при котором различные транскрипты были обнаруживаемыми (пороговый цикл, CT), сравнивали с TBP, называемым Δ CT. Относительный уровень гена экспрессировали как 2-(Δ CT), в котором Δ CT равен Δ CT мышей, получавших DOX-, α 5- или DOX плюс α 5 (или обработанных клеток HL-1), минус Δ CT контрольных мышей (или необработанных клеток HL-1).

Вестерн-блоттинг.

Белковые экстракты получали из левого желудочка с реагентом для экстракции белка млекопитающих T-PER (Pierce, ThermoScientific, Рокфорд, США) или из клеток HL-1 в реагенте для экстракции белка млекопитающих M-PER (Pierce, ThermoScientific, Рокфорд, США), как указано производителем, в присутствии 1 mM NaVO₄, 10 mM NaF и смесь ингибиторов протеазы (Sigma-Aldrich, Милан, Италия). Содержание белка определяли с помощью измерения белка анализом бицинониновой кислоты (BCA, Pierce, Euroclone, Милан, Италия), и 50 мкг экстракта белка разделяли с помощью SDS-PAGE (электрофорез белков в полиакриламидном геле) в восстанавливающих условиях. Разделенные белки затем электрофоретически переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad Laboratories, Сеграте, Италия) [3-8]. Представляющие интерес белки были обнаружены со специфическими антителами: анти-COX IV (Cell Signaling Technology кат. № 4844, Euroclone, Милан, Италия), анти-cyt c (Cell Signaling Technology кат. № 4280), анти-PGC-1 α (Cell Signaling Technology кат. № 2178), анти-фосфо-AKT (Ser473) (Cell Signaling Technology кат. № 4060), анти-AKT (Cell Signaling Technology кат. № 4685), анти-фосфо-eNOS (Ser1177) (Cell Signaling Technology кат. № 9571), анти-eNOS (Cell Signaling Technology кат. № 9572), анти-фосфо-S6 (Ser235/236) (фосфо-S6, Cell Signaling Technology кат. № 4858), анти-S6 (Cell Signaling Technology кат. № 2217), анти-фосфо-mTOR (Ser2481) (Cell Signaling Technology кат. № 2974), анти-mTOR (Cell Signaling Technology кат. № 2972), анти-фосфо-BDKDH (Ser293) (Abcam кат. № 200577), анти-BDKDH (Abcam кат. № 138460), и анти-GAPDH (1:1000, Cell Signaling Technology кат. № 2118) при 1:1000 разведении каждый. После визуализации фосфо-eNOS, фосфо-AKT, фосфо-mTOR, фосфо-S6 и анти-фосфо-BCKDH, фильтры удаляли с помощью буфера для зачистки вестерн-блоттинга Restore™ (Euroclone, Милан, Италия) и дополнительно использовали для визуализации общего eNOS, общего AKT, общего mTOR, общего S6 или общего BCKDH. Иммуноокрашивание проводили с использованием конъюгированного с пероксидазой хрена анти-кроличьего или анти-мышинного иммуноглобулина в течение 1 ч при комнатной температуре. Белок детектировали с использованием субстрата SuperSignal (Pierce, Euroclone, Милан, Италия) и количественно определяли с помощью денситометрии с помощью программного обеспечения для анализа изображений ImageJ.

Митохондриальная ДНК.

Для анализа мтДНК общую ДНК экстрагировали с помощью набора QIAamp DNA Extraction Kit (Qiagen). мтДНК амплифицировали с использованием праймеров, специфичных для мтДНК, и нормализовали к гену 18S (табл. 2) [9]. Содержание мтДНК определяли с помощью qRT-PCR (количественная RT-PCR) путем измерения порогового соотношения циклов (Δ CT) гена мтДНК по сравнению с ядерным кодируемым геном (18S) в левом желудочке мышей, получавших DOX-, α 5- или DOX плюс α 5, в дополнение к контрольным мышам, не получавшим лечение [10,11].

Активность цитратсинтазы.

Активность измеряли спектрофотометрически при 412 нм при 30°C в экстрактах левого желудочка [12,13]. Ткань добавляли в буфер, содержащем 0,1 mM 5,5-дитио-бис-(2-нитробензойной) кислоты, 0,5 mM оксалоацетата, 50 мкМ EDTA (этилендиаминтетрауксусная кислота), 0,31 mM ацетил-КоА (ацетил-коэнзим А), 5 mM триэтаноламина гидрохлорида и 0,1 М Трис-HCl (pH 8,1). Активность цитратсинтазы выражали как нмоль цитрата, продуцируемого в минуту на мг белка. Данные были нормализованы по общему содержанию белка, которое было определено с помощью анализа бицинониновой кислоты, как указано выше.

Потребление кислорода.

Расход кислорода измеряли, как описано [14,15]. Митохондрии были выделены из левого желудочка контрольной и обработанной мышей. Образцы анализировали при 37°C в газонепроницаемом сосуде, оснащенном кислородным электродом типа Clark (Rank Brothers Ltd.), подключенным к регистратору данных. Кислородный электрод был откалиброван, исходя из того, что концентрация кислорода в инкубационной среде составляет 200 мкмоль/л при 37°C.

Окислительный стресс митохондрий.

Для исследования митохондриального окислительного стресса митохондрии были выделены с ис-

пользованием набора для выделения митохондрий Qproteome (Qiagen). Высвобождение митохондриями H_2O_2 измеряли в присутствии пероксидазы хрена (HRP), используя набор Amplex Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay kit (Molecular Probes). Флуорометрические измерения проводили с использованием универсального микропланшетного анализатора Fusion Universal Microplate Analyzer (Packard/PerkinElmer) с фильтром возбуждения при 550 нм и эмиссионным фильтром при 590 нм. Продукция H_2O_2 , рассчитанное по стандартной кривой, выражали в нмоль/мин/мг белка, как описано [9]. Кроме того, измеряли митохондриальную аконитазу и активность SOD, как описано ранее [16]. Вкратце, за образованием NADPH (никотинамидадениндинуклеотидфосфат) отслеживали спектрофотометрически (340 нм) при 25°C (для активности аконитазы), в то время как активность SOD измеряли с помощью набора для анализа супероксиддисмутазы (Calbiochem). Одну единицу активности SOD определяли как количество фермента, необходимого для проявления 50% дисмутации супероксидного радикала. Наконец, окислительное повреждение ДНК измеряли как дополнительный маркер окислительного стресса. Использовали высокочувствительный набор для ELISA иммуноферментный анализ) 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозина (8-OHdG) Check (JalCA, Хамацу, Япония) [17]. Измерения проводили в соответствии с протоколом производителя. Общую ДНК экстрагировали с использованием набора QIampDNAMini Kit (Qiagen) и расщепляли нуклеазой P1 и щелочной фосфатазой (Sigma). Качество и количество ДНК были подтверждены спектрофотометрическим анализом NanoDrop ND-1000. Поглощение продукта реакции ELISA определяли спектрофотометрически с использованием 450 нм в качестве первичной волны.

Анализ жизнеспособности.

Жизнеспособность клеток HL-1 оценивали с помощью реагента МТТ [3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид] (Sigma, Милан, Италия). HL-1 высевали в 96-луночные культуральные планшеты с плотностью 20000 клеток/лунку (100 мкл). Фиолетовые кристаллы формазана растворяли в 5% SDS (додецилсульфат натрия)/0,1 М HCl (100 мкл/лунку), а поглощение регистрировали на микропланшетном ридере (ELx800, BioTek Instruments, VT, США) при длине волны 570 нм. Каждое испытание повторяли не менее четырех раз в четырех повторностях.

Анализ кислой фосфатазы.

Для количественной оценки роста клеток MCF7 использовали анализ кислой фосфатазы, как описано [30]. Вкратце, клетки MCF7 помещали в 96-луночные планшеты с плотностью от 5000 до 20000 клеток на лунку и обрабатывали 1% $\alpha 5$ (в течение 48 ч) и 1 мкМ DOX (в течение 16 ч). Культуральную среду удаляли и каждую лунку промывали один раз фосфатно-солевым буфером (PBS, pH 7,2) и добавляли 100 мкл буфера, содержащего 0,1 М ацетата натрия (pH 5,0), 0,1% Titon X-100 и 5 мМ п-нитрофенилфосфатазы (pNPP). Затем планшеты помещали в инкубатор при 37°C на 2 ч. Реакцию останавливали добавлением 10 мкл 1 Н NaOH и оценивали развитие цвета при 405 нм. Неферментативный гидролиз pNPP измеряли в лунках без клеток.

Статистический анализ и представление данных.

Статистический анализ проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа с последующим тестом Стьюдента-Ньюмана-Кеулса или t-критерием Стьюдента. Данные представлены в виде средних значений \pm стандартные отклонения (SD), если не указано иное. Статистически значимая разница была принята при $p < 0,05$.

Результаты.

Специфическая композиция на основе аминокислот предотвращает митохондриальную дисфункцию в кардиомиоцитах HL-1, подвергающихся краткосрочному и интенсивному воздействию DOX.

Для защиты кардиомиоцитов от токсичности DOX была скорректирована нарушенная митохондриальная функция и окислительный стресс в клетках HL-1, подвергшихся воздействию химиотерапевтического средства. Оценивали оптимальную комбинацию соответствующих метаболических веществ-предшественников, способных максимально повышать окислительный метаболизм в кардиомиоцитах HL-1. В частности, было протестировано влияние двух композиций на основе аминокислот (табл. 1) на дифференцировку клеток HL-1. Для этого скрининга дифференцирующиеся кардиомиоциты обрабатывали в течение 48 ч 1) композицией, содержащей аминокислоты с разветвленной цепью (т.е. BCAAem) или 2) композицией по настоящему изобретению "α5", которая также содержит трикарбоновые кислоты, с DOX или без DOX (фиг. 1). В то время как $\alpha 5$ (1% мас./об.) повышал уровни мРНК маркеров митохондриального биогенеза в клетках HL-1, включая PGC-1 α , NRF1, Tfam, *cyt c* и COX IV по сравнению с базовыми значениями, только экспрессия PGC-1 α была увеличена BCAAem (фиг. 3A). И наоборот, экспрессия этих генов была снижена, когда кардиомиоциты подвергали воздействию 1 мкМ DOX в течение 16 ч (фиг. 3A). Примечательно, что добавление $\alpha 5$ предотвращало эту токсичность DOX с полным восстановлением экспрессии гена (фиг. 3A). За исключением *cyt c* и COX IV, BCAAem не смог обратить эффект DOX со статистической значимостью (фиг. 3A). Следовательно, композицию $\alpha 5$ использовали далее. Примечательно, что на фиг. 4 показано, что промежуточные соединения TCA - лимонная кислота, янтарная кислота и яблочная кислота, дополненные по отдельности или все вместе в одинаковых концентрациях в $\alpha 5$, не смогли предотвратить DOX-индуцированное снижение митохондриального биогенеза, а также изменить экспрессию митохондриального гена при добавлении по отдельности. Защитная

способность добавки $\alpha 5$ по отношению к состоянию митохондрий также была очевидна на уровне белка (например, COX IV и, с тенденцией, *cyt c*) (фиг. 3B). Кроме того, снижение активности цитратсинтазы, стимулируемое экспозицией DOX, которая является индексом уменьшенной митохондриальной массы и функции, было полностью нейтрализовано добавлением $\alpha 5$, что повышало активность фермента также при добавлении по отдельности к клеткам HL-1 (фиг. 3C). Эти здоровые эффекты $\alpha 5$ на DOX-индуцированное митохондриальное повреждение были дополнительно подтверждены снижением окислительного стресса. По сравнению с необработанными клетками, высвобождение H_2O_2 (индекс продукции супероксидных анионов митохондриями) заметно увеличивалось при обработке DOX; добавление $\alpha 5$ предотвращало этот эффект (фиг. 5A). $\alpha 5$ снижало высвобождение H_2O_2 также при добавлении отдельно. Соответственно, измерения продукции ROS митохондриями (оцениваемой по соотношению базальной/общей активности аконитазы) и способности к элиминации супероксидов посредством активности SOD продемонстрировали, что добавка $\alpha 5$ предотвращала окислительный стресс, индуцированный DOX, с положительными эффектами также при добавлении отдельно (фиг. 5B и C). Поскольку окислительный стресс провоцирует систему защиты против ROS, была исследована экспрессия ферментов против ROS. В частности, экспрессия генов глутатионпероксидазы 1 (GPX1) и супероксиддисмутазы 1 (SOD1) была повышена в DOX-обработанных клетках по сравнению с необработанными клетками HL-1 (фиг. 5D), последовательно с увеличением продукции ROS.

Это было подтверждено более высоким количеством 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозина (8-OHdG), маркера окислительного повреждения ДНК, в клетках, подвергшихся воздействию DOX (фиг. 5E). Добавка $\alpha 5$ в клетках, обработанных DOX, была способна противодействовать продукции ROS, о чем свидетельствует снижение экспрессии генов SOD1 и GPX1 (фиг. 5D) и восстановление продукции 8-OHdG до количества, наблюдаемого в необработанных клетках (фиг. 5E). На фиг. 5D также показано, что $\alpha 5$ более эффективна, чем BCAAем в защите против ROS. Вместе эти результаты подтверждают представление о том, что смесь $\alpha 5$ может предотвращать повреждение митохондрий, вызванное краткосрочным и интенсивным воздействием DOX в кардиомиоцитах HL-1. Примечательно, что это может оказать существенное влияние на выживаемость клеток. DOX-индуцированную гибель клеток HL-1 на самом деле предотвращали с помощью смеси $\alpha 5$ при добавлении совместно (фиг. 6). Никакого эффекта не наблюдалось на выживаемость клеток, когда клетки HL-1 подвергали воздействию только $\alpha 5$ (фиг. 6).

Композиция $\alpha 5$ предотвращает митохондриальную дисфункцию в сердце мышей, получавших лечение DOX.

Для подтверждения результатов *in vitro* проводили краткосрочное и интенсивное лечение DOX *in vivo*, как описано [6]. На третий день до окончания лечения $\alpha 5$, которое проводили в течение 10 дней, выполняли однократную внутривенную инъекцию 20 мг/кг DOX (фиг. 2). В табл. 3 показано, что лечение DOX значительно уменьшало массу тела и массу сердца по сравнению с контрольной группой, и это может зависеть от его выраженного анорексигенного эффекта. $\alpha 5$ не мог изменить массу тела, массу сердца и потребление пищи как при добавлении только DOX, так и при добавлении с DOX (табл. 3). Напротив, хотя потребление воды у мышей, получавших DOX, оставалось неизменным по сравнению с контрольными животными, $\alpha 5$ увеличивал потребление воды либо при добавлении отдельно, либо при добавлении с DOX.

Таблица 3

	CTRL	$\alpha 5$	DOX	DOX + $\alpha 5$
Вес тела (г)	24,84±1,3	24,46±2	20,75±0,82*	20,46±1,04*
Масса сердца (г)	0,12±0,01	0,11±0,02	0,085±0,02*	0,09±0,02*
Потребление пищи (г)	5,2±0,41	5,34±0,7	3,73±0,6*	3,59±0,47*
Потребление воды (г)	6,1±0,7	8,24±0,88*	6,13±1,0	7,07±1,3

Измерения проводили у 10 мышей на группу. Значения представляют собой среднее \pm D.S. * $p < 0,05$ по сравнению с контрольными животными (т.е. мышами, которым вводили физиологический раствор).

Уровни мРНК генов биогенеза митохондрий были снижены в левом желудочке мышей, получавших DOX, по сравнению с контрольной группой (фиг. 7A). Помимо повышения уровней мРНК PGC-1 α , *cyt c* и COX IV при добавлении отдельно, смесь $\alpha 5$ была способна значительно предотвращать DOX-индуцированное снижение PGC-1 α , Tfam и *cyt c* (фиг. 7A). Масса и функция митохондрий, измеренные как количество митохондриальной ДНК (мтДНК), респираторные белки (в частности, COX IV) и актив-

ность цитратсинтазы были ниже у мышей, получавших DOX, чем у мышей, получавших физиологический раствор, и эти снижения предотвращали, когда мышей дополняли $\alpha 5$ (фиг. 7, B-D). Кроме того, дыхательная функция митохондрий была исследована путем измерения скорости потребления кислорода (OCR) с помощью электрода Кларка в митохондрии, выделенной из левого желудочка различных групп лечения. На фиг. 7E показано, что инъекция DOX снижала OCR, в то время как добавление $\alpha 5$ полностью сохраняло дыхание митохондрий мышей, получавших DOX. Смесь аминокислот увеличивала OCR также при добавлении отдельно (фиг. 7E). Наконец, результаты, представленные на фиг. 7F, подтвердили в образцах *ex vivo*, что DOX увеличивал экспрессию ферментов защиты против ROS, включая SOD1, SOD2, каталазу и GPX1, в то время как добавка $\alpha 5$ почти полностью блокировала этот эффект. Никаких изменений не наблюдалось у мышей, получавших только $\alpha 5$ (фиг. 7F). В совокупности эти результаты свидетельствуют о том, что добавка $\alpha 5$ предотвращает DOX-индуцированную митохондриальную токсичность в сердце, по меньшей мере частично, путем содействия биогенезу и функции митохондрий, а также путем снижения окислительного стресса.

Различные сигнальные пути участвуют в защитных эффектах добавок $\alpha 5$.

Были проанализированы сигнальные пути в левом желудочке мышей, получавших DOX и $\alpha 5$. На фиг. 8A и B показано, что DOX-инъекция снижает экспрессию eNOS, но только частично активность eNOS [т.е. отношение (Ser1177) фосфо-eNOS к общему количеству eNOS]. Примечательно, что добавление $\alpha 5$ полностью нейтрализовало эти эффекты. При добавлении отдельно композиция $\alpha 5$ была способна повышать экспрессию eNOS (фиг. 8A). Учитывая, что в свою очередь известно, что продукция eNOS-зависимого оксида азота (NO) регулирует сигнальный путь комплекса 1 mTOR (mTORC1), и что активность mTORC1 является необходимой и достаточной для фосфорилирования (Ser1177)-eNOS в различных типах клеток, измеряли фосфорилирование S6 в качестве маркера активации mTORC1 ниже по потоку. Лечение DOX снижало (Ser235/236) соотношение фосфо-S6 к общему S6 в левом желудочке по сравнению с инъекцией физиологического раствора, в то время как добавка $\alpha 5$ по меньшей мере частично предотвращала этот эффект (фиг. 8C). Никаких существенных изменений не наблюдалось в смеси $\alpha 5$ при добавлении отдельно. Различные физиологические стимулы модулируют передачу сигналов mTORC1 путем сайт-специфического фосфорилирования mTOR. Данные, раскрытые в данном документе, демонстрируют функциональную роль фосфорилирования Ser2481 mTOR в DOX и действии $\alpha 5$, в котором DOX снижал и $\alpha 5$ восстанавливал это снижение селективного фосфорилирования mTOR в сердце (фиг. 8D). Фосфорилирование mTOR также увеличивалось, когда $\alpha 5$ добавляли отдельно. Вместе результаты показали, что как eNOS, так и mTORC1 могут играть роль в эффектах лечения DOX и $\alpha 5$.

Подчеркивая эту гипотезу, сестрин 2 недавно был предложен в качестве сенсора лейцина для пути mTORC1, поскольку высокие уровни сестрина 2 ингибируют активность mTORC1, когда внутриклеточные концентрации лейцина низки. И наоборот, низкие уровни сестрина 2 или высокие внутриклеточные концентрации лейцина, вытесняющие сестрин 2 из mTORC1 ингибитора GATOR2, способствуют активации mTORC1. Учитывая, что композиция $\alpha 5$ содержит большое количество лейцина, измеряли экспрессию сестрина 2. Лечение DOX заметно увеличивало мРНК сестрина 2 в левом желудочке (фиг. 8E). Примечательно, что $\alpha 5$ полностью предотвращал этот DOX-индуцированный эффект, хотя не мог изменить экспрессию сестрина 2 при добавлении отдельно (фиг. 8E).

Аналогичным образом, Krüppel-подобный фактор 15 (KLF15) недавно появился в качестве критического транскрипционного регулятора метаболизма аминокислот, в частности, катаболизма ВСАА (т.е. окисления ВСАА с образованием ацетил-КоА и сукцинил-КоА, двух промежуточных продуктов ТСА), особенно в сердце, а также в качестве индуктора экспрессии eNOS в эндотелиальных клетках. Таким образом, экспрессию KLF15 анализировали в левом желудочке различных групп лечения. Уровни мРНК Klf15 были значительно снижены при обработке DOX, и это снижение было полностью предотвращено добавлением $\alpha 5$ (фиг. 8F). Никаких существенных изменений не наблюдалось, когда $\alpha 5$ добавляли отдельно (фиг. 8F). Учитывая экспрессию или активность митохондриальных катаболических ферментов ВСАА, таких как дегидрогеназный комплекс разветвленных α -кетокислот (BCKDH), в сердечной ткани снижается у мышей с нулевым Klf15 и сердечной недостаточностью, транскрипт белка BCKDH исследовали в дополнение к фосфорилированию BCKDH у животных, получавших DOX. При фосфорилировании на самом деле BCKDH неактивен, в то время как при дефосфорилировании он, наоборот, активен. Примечательно, что фосфорилирование (Ser293)-BCKDH было неизменным у мышей, получавших DOX, по сравнению с мышами, получавшими физиологический раствор, в то время как добавка $\alpha 5$ заметно снижала его в присутствии DOX, с тенденцией ингибирующего эффекта также при добавлении отдельно (фиг. 8G). Вместе эти результаты показали, что *in vivo* защита митохондриального гомеостаза в сердечной ткани путем добавления $\alpha 5$ может быть связана с сигнальной осью KLF15/eNOS/mTORC1, что влечет за собой катаболизм ВСАА.

Также оценивали влияние KLF15, eNOS и mTORC1 на митохондриальный гомеостаз в клетках HL-1, подвергшихся воздействию DOX и $\alpha 5$. Во-первых, хотя экспрессия гена eNOS была лишь незначительно снижена при воздействии 1 мкМ DOX, фосфорилирование (Ser1177)-eNOS было заметно снижено

(фиг. 9, А и В). $\alpha 5$ (1% мас./об.) полностью нейтрализовал оба DOX ингибирующих эффекта, значительно повышая экспрессию eNOS также при добавлении отдельно (фиг. 9, А и В). Во-вторых, фосфорилирование (Ser235/236)-S6 было заметно снижено посредством DOX, и это снижение было полностью нейтрализовано $\alpha 5$ (фиг. 9С). И наоборот, смесь аминокислот была неэффективной при добавлении отдельно. В соответствии с его ролью в качестве регулятора mTORC1, экспрессия сестрина 2 была заметно увеличена посредством DOX, и это увеличение было полностью нейтрализовано добавлением $\alpha 5$ (фиг. 9D). Композиция аминокислот была неэффективной при добавлении отдельно. В-третьих, на основе модулирующей роли Akt, также известной как протеинкиназа В (PKB), как в отношении активации eNOS, так и mTORC1, также изучали фосфорилирование (Ser 473)-Akt в клетках HL-1, обработанных DOX и $\alpha 5$. DOX заметно снижал фосфорилирование Akt, в то время как $\alpha 5$ предотвращал этот эффект (фиг. 5E). Поскольку недавно было обнаружено, что сигнальный путь Akt/PKB опосредует влияние ВСАА на экспрессию KLF15, была исследована роль этого регулятора транскрипции в защитном воздействии добавки $\alpha 5$ на опосредованное DOX повреждение митохондрий. Примечательно, что экспрессия KLF15 была снижена как на уровнях мРНК, так и на уровнях белка, когда клетки HL-1 подвергались воздействию DOX, и $\alpha 5$ полностью нейтрализовал этот эффект (фиг. 9F). Только небольшое, не статистически значимое увеличение экспрессии KLF15 наблюдалось в кардиомиоцитах HL-1, подвергавшихся воздействию только $\alpha 5$ (фиг. 9F).

Затем клетки HL-1 трансфицировали либо специфической миРНК Klf15, либо нецелевой миРНК. Эффективность сайленсинга измеряли как на уровнях мРНК, так и на уровнях белка (фиг. 10). Воздействие DOX значительно уменьшало как белок PGC-1 α , так и белок COX IV в клетках, трансфицированных миРНК Klf15 или не подвергшиеся другой обработке (фиг. 9G). И наоборот, нокдаун Klf15 заметно снижал уровни PGC1- α и COX IV как таковые и устранял способность добавки $\alpha 5$ сохранять уровни белка при введении с DOX (фиг. 9G). Более того, нокдаун Klf15 заметно снижал способность $\alpha 5$ стимулировать экспрессию PGC1- α и COX IV, когда $\alpha 5$ добавляли отдельно (фиг. 9G). Следует отметить, что нокдаун Klf15 значительно ухудшил способность $\alpha 5$ восстанавливать фосфорилирование DOX-восстановленного (Ser235/236)-S6 (фиг. 9H). Наконец, в то время как (Ser293)-BCKDH фосфорилирование не отличалось между DOX-обработанными и необработанными контрольными кардиомиоцитами HL-1, p-BCKDH полностью исчезал, когда клетки подвергались воздействию $\alpha 5$, с или без DOX (фиг. 9H). Нокдаун Klf15 частично предотвращал ингибирующее действие $\alpha 5$ на (Ser293)-BCKDH фосфорилирование как в DOX-обработанных, так и необработанных клетках, в то время как DOX не мог изменить фосфорилирование при добавлении отдельно (фиг. 9H). Аналогичным образом, сайленсинг eNOS и Raptor - одного из каркасных белков mTORC1 (регулятор-ассоциированный белок mTOR) - со специфическими миРНК снижает уровни PGC1- α и COX IV как таковые и отменяет способность добавки $\alpha 5$ сохранять сниженные уровни белка при введении с DOX (фиг. 11, А и В). Как нокдаун eNOS, так и нокдаун Raptor не изменяли экспрессию PGC1- α и COX IV при добавлении $\alpha 5$ отдельно (фиг. 11, А и В). Эффективность специфического сайленсинга оценивали с помощью RT-PCR и вестерн-блоттинга; около 70% и 60% подавления eNOS и mTORC1 были получены с помощью eNOS и миРНК Raptor, соответственно (фиг. 10, В и С). В целом, эти результаты свидетельствуют о том, что защитные эффекты смеси $\alpha 5$ на DOX-опосредованную митохондриальную дисфункцию в кардиомиоцитах могут быть связаны с сигнальной осью KLF15/eNOS/mTORC1 и катаболизмом ВСАА.

Антипролиферативный эффект DOX оставался неизменным в клетках рака молочной железы MCF7 в присутствии композиции $\alpha 5$.

Воздействие композиции $\alpha 5$ на линию клеток рака молочной железы MCF7 не способствовало пролиферации клеток MCF7, что оценивали с помощью двух различных анализов (фиг. 13А и 13В). Аналогичным образом, на антипролиферативный эффект DOX в клетках MCF7 полностью не влияло присутствие аминокислот (фиг. 13А и 13В). Примечательно, что эффект DOX усиливается при введении вместе с композицией $\alpha 5$.

Как описано в разделе выше, хотя антрациклин DOX (торговое название - адриамицин) является высокоэффективным и часто используемым противоопухолевым препаратом с момента его выпуска в производство в 1960-х годах, он вызывает дозозависимую кардиотоксичность, которая может привести к тяжелой сердечной недостаточности. Если сердце было повреждено посредством DOX, вариантов лечения мало. Как правило, DOX-индуцированная кардиомиопатия и сердечная недостаточность являются устойчивыми к традиционным способам терапии [1]. Нарастивание усилий по прогнозированию того, какие пациенты будут подвержены кардиотоксичности посредством DOX, включая анализ специфических для пациента кардиомиоцитов, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека, и соответствующему предотвращению этого риска, включая лекарственные препараты, такие как железохелатирующие агенты, ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента, β -блокаторы, антиоксиданты и продукты природного происхождения или пищевые добавки, были предложены безрезультатно. Была протестирована эффективность композиции $\alpha 5$ и композиции ВСААем в предотвращении DOX-индуцированного повреждения митохондрий в культивированных кардиомиоцитах HL-1. $\alpha 5$

была статистически более эффективной, чем ВСААем, для противодействия DOX-индуцированному дефициту маркеров биогенеза митохондрий. Пищевая добавка $\alpha 5$ активирует сигнальную ось KLF15/Akt/eNOS/mTORC1 (фиг. 12). Эти результаты также не исключают роль mTORC2, сигнального пути, который, по-видимому, необходим для нормального развития сердца и для поддержания постнатальной структуры и функции сердца, особенно для адаптации к стрессовым условиям. Тем не менее, mTORC2 до сих пор не подразумевался при кардиотоксичности DOX. Более того, настоящие данные по KLF15 и сестрин 2 также ставят под сомнение релевантность передачи сигналов mTORC2 в этой экспериментальной модели. Одним из наиболее значимых результатов, показанных в настоящей заявке, является массовое подавление белков PGC-1 α и COX-IV, которые являются маркерами биогенеза митохондрий, индуцированное сайленсингом KLF15 в кардиомиоцитах HL-1. Семейство Kruppel-подобных факторов (KLF) регуляторов транскрипции, содержащих цинковые пальцы Cys2/His2 контролирует многие аспекты кардиомиоцитарной и митохондриальной структуры и функции. Важно отметить, что KLF15 регулирует транскрипцию Wnt/ β -катенина и контролирует предопределение клеток-предшественников сердца в постнатальном периоде, что предполагает роль в развитии сердца.

Настоящая заявка демонстрирует, что кардиомиоциты с сайленсингом Klf15-, eNOS и Raptor не отвечали на $\alpha 5$, который не мог стимулировать биогенез митохондрий как таковой и защищать от повреждения митохондрий при добавлении DOX. Более того, после 72-часовой обработки DOX экспрессия гена Klf15 в сердечной ткани была снижена.

Добавление $\alpha 5$ предотвращает митохондриальную дисфункцию, индуцированную краткосрочным и интенсивным воздействием DOX, стимулируя 1) митохондриальный биогенез, 2) защитную систему против ROS и 3) окисление ВСАА, с вероятной продукцией промежуточных продуктов ТСА, по-видимому, mTORC1-зависимым образом (фиг. 12).

Нокдаун Klf15 фактически заметно снижал активность mTORC1 в клетках HL-1 и нарушал способность смеси $\alpha 5$ восстанавливать нарушенное DOX фосфорилирование S6. Аналогичным образом, сайленсинг Klf15 частично предотвращал $\alpha 5$ -индуцированную активацию катаболизма ВСАА, измеряемую как фосфорилирование BCKDH, как в кардиомиоцитах, обработанных DOX, так и в необработанных кардиомиоцитах. Это говорит о том, что в сердечных клетках защитный эффект $\alpha 5$ опосредуется, по меньшей мере частично, активацией mTORC1, которая зависит от экспрессии KLF15 и, таким образом, от окисления ВСАА. Более того, в кардиоцитах и тканях $\alpha 5$ восстанавливается до контрольных уровней сестрин 2, который высоко экспрессируется после обработки DOX. Сестрины представляют собой семейство стресс-индуцируемых белков (сестрин 1-3), и различные данные указывают на то, что сестрин 2 является сенсором лейцина для пути mTORC1. Нормально связанный с GATOR2, который, таким образом, ингибируется в нестрессовых условиях, сестрин 2 вытесняется из GATOR2, когда лейцин присутствует в микромолярных внутриклеточных концентрациях, активируя mTORC1. Композиция $\alpha 5$ способствовала экспрессии и активности eNOS как в DOX-обработанных, так и необработанных кардиоцитах и ткани. Вероятно, эти эффекты были опосредованы фосфорилированием (Ser473)-Akt.

Примечательно, что, хотя роль композиций на основе аминокислот в нутритивной поддержке онкологических пациентов до настоящего времени была четко определенной, настоящая заявка показывает, что воздействие на линию клеток рака молочной железы MCF7 композиции $\alpha 5$ не способствовало пролиферации клеток MCF7, что оценивалось с помощью двух различных анализов (фиг. 13А и 13В). Аналогичным образом, на антипролиферативный эффект DOX в клетках MCF7 полностью не влияло присутствие аминокислот (фиг. 13А и 13В). Примечательно, что скорость пролиферации снижается при введении композиции $\alpha 5$.

В целом, результаты, представленные в настоящем документе, показали: 1) краткосрочное и интенсивное лечение DOX индуцирует митохондриальную дисфункцию как в сердечной ткани, так и в кардиомиоцитах, 2) композиция $\alpha 5$ заметно предотвращает такое нарушение, 3) сигнальные пути eNOS и mTORC1 имеют решающее значение для действия данного протектора, 4) KLF15, специфический фактор транскрипции, особенно важный для развития сердца и циркадной регуляции, играет важную роль в контроле этой сигнальной оси, 5) антипролиферативный эффект DOX в клетках MCF7 полностью не зависит от присутствия аминокислот.

Эти результаты подчеркивают эффективность композиции $\alpha 5$ в предотвращении и лечении кардиотоксичности, индуцированной химиотерапевтическими агентами, такими как, например, доксорубин, у субъектов, проходящих химиотерапию.

Источники

1. Singal, P.K.; Iliskovic, N. Doxorubicin-induced cardiomyopathy. *N. Engl. J. Med.* 1998, 339, 900–5.
2. Claycomb, W.C.; Lanson, N.A.; Stallworth, B.S.; Egeland, D.B.; Delcarpio, J.B.; Bahinski, A.; Izzo, N.J. HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1998, 95, 2979–84.
3. Vettor, R.; Valerio, A.; Ragni, M.; Trevelin, E.; Granzotto, M.; Olivieri, M.; Tedesco, L.; Ruocco, C.; Fossati, A.; Fabris, R.; и др. Exercise training boosts eNOS-dependent mitochondrial biogenesis in mouse heart: role in adaptation of glucose metabolism. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2014, 306, E519-28.
4. Gao, J.; Chen, T.; Zhao, D.; Zheng, J.; Liu, Z. Ginkgolide B Exerts Cardioprotective Properties against Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity by Regulating Reactive Oxygen Species, Akt and Calcium Signaling Pathways In Vitro and In Vivo. *PLoS One* 2016, 11, e0168219.
5. Palanivel, R.; Eguchi, M.; Shuralyova, I.; Coe, I.; Sweeney, G. Distinct effects of short- and long-term leptin treatment on glucose and fatty acid uptake and metabolism in HL-1 cardiomyocytes. *Metabolism.* 2006, 55, 1067–75.
6. Abdullah, C.S.; Alam, S.; Aishwarya, R.; Miriyala, S.; Bhuiyan, M.A.N.; Panchatcharam, M.; Pattillo, C.B.; Orr, A.W.; Sadoshima, J.; Hill, J.A.; и др. Doxorubicin-induced cardiomyopathy associated with inhibition of autophagic degradation process and defects in mitochondrial respiration. *Sci. Rep.* 2019, 9, 2002.
7. Tedesco, L.; Valerio, A.; Cervino, C.; Cardile, A.; Pagano, C.; Vettor, R.; Pasquali, R.; Carruba, M.O.; Marsicano, G.; Lutz, B.; и др. Cannabinoid type 1 receptor blockade promotes mitochondrial biogenesis through endothelial nitric oxide synthase expression in white adipocytes. *Diabetes* 2008, 57, 2028–36.
8. Frontini, A.; Bertolotti, P.; Tonello, C.; Valerio, A.; Nisoli, E.; Cinti, S.; Giordano, A. Leptin-dependent STAT3 phosphorylation in postnatal mouse hypothalamus. *Brain Res.* 2008, 1215, 105–115
9. D’Antona, G.; Ragni, M.; Cardile, A.; Tedesco, L.; Dossena, M.; Bruttini, F.; Caliaro, F.; Corsetti, G.; Bottinelli, R.; Carruba, M.O.; и др. Branched-Chain Amino Acid Supplementation Promotes Survival and Supports Cardiac and Skeletal Muscle Mitochondrial Biogenesis in Middle-Aged Mice. *Cell Metab.* 2010, 12, 362–372.
10. Flamment, M.; Gueguen, N.; Wetterwald, C.; Simard, G.; Malthiery, Y.; Ducluzeau, P.-H. Effects of the cannabinoid CB1 antagonist rimonabant on hepatic mitochondrial function in rats fed a high-fat diet. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2009, 297, E1162-70.
11. Sparks, L.M.; Xie, H.; Koza, R.A.; Mynatt, R.; Hulver, M.W.; Bray, G.A.; Smith, S.R. A high-fat diet coordinately downregulates genes required for mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle. *Diabetes* 2005, 54, 1926–33
12. López-Lluch, G.; Hunt, N.; Jones, B.; Zhu, M.; Jamieson, H.; Hilmer, S.; Cascajo, M. V.; Allard, J.; Ingram, D.K.; Navas, P.; и др. Calorie restriction induces mitochondrial biogenesis and bioenergetic efficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2006, 103, 1768–1773.
13. Tedesco, L.; Corsetti, G.; Ruocco, C.; Ragni, M.; Rossi, F.; Carruba, M.O.; Valerio, A.; Nisoli, E. A specific amino acid formula prevents alcoholic liver disease in rodents. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2018, 314, G566–G582
14. Nisoli, E. Mitochondrial Biogenesis in Mammals: The Role of Endogenous Nitric Oxide. *Science* (80-.). 2003, 299, 896–899.

15. Valerio, A.; Cardile, A.; Cozzi, V.; Bracale, R.; Tedesco, L.; Pisconti, A.; Palomba, L.; Cantoni, O.; Clementi, E.; Moncada, S.; и др. TNF-alpha downregulates eNOS expression and mitochondrial biogenesis in fat and muscle of obese rodents. *J. Clin. Invest.* 2006, 116, 2791–8.

16. Lionetti, L.; Mollica, M.P.; Crescenzo, R.; D'Andrea, E.; Ferraro, M.; Bianco, F.; Liverini, G.; Iossa, S. Skeletal muscle subsarcolemmal mitochondrial dysfunction in high-fat fed rats exhibiting impaired glucose homeostasis. *Int. J. Obes.* 2007, 31, 1596–1604.

17. Pervin, S.; Singh, R.; Hernandez, E.; Wu, G.; Chaudhuri, G. Nitric oxide in physiologic concentrations targets the translational machinery to increase the proliferation of human breast cancer cells: involvement of mammalian target of rapamycin/eIF4E pathway. *Cancer Res.* 2007, 67, 289–99.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение композиции для предотвращения и/или лечения кардиотоксичности, индуцированной по меньшей мере одним химиотерапевтическим агентом, у субъекта, проходящего химиотерапию, причем композиция содержит активный агент, причем указанный активный агент содержит аминокислоты - лейцин, изолейцин, валин, треонин, лизин, и лимонную кислоту, янтарную кислоту, яблочную кислоту.

2. Применение по п.1, где указанный химиотерапевтический агент выбран из группы, состоящей из антрациклинов, ингибиторов HER2/ErbB2 (рецептор 2 эпидермального фактора роста), ингибиторов тирозинкиназы, ингибиторов фактора роста эндотелия сосудов, ингибиторов иммунных контрольных точек, причем указанные антрациклины предпочтительно выбраны из группы, состоящей из доксорубицина, эпирубицина, даунорубицина, идарубицина, пиксантрона, сабарубицина, валрубицина.

3. Применение по п.1 или 2, где массовое соотношение между общим количеством лимонной кислоты, яблочной кислоты, янтарной кислоты и общим количеством аминокислот с разветвленной цепью - лейцина, изолейцина, валина, лизина и треонина составляет от 0,05 до 0,3, предпочтительно от 0,1 до 0,25.

4. Применение по любому из пп.1-3, где массовое соотношение между общим количеством лимонной кислоты, яблочной кислоты, янтарной кислоты и общим количеством аминокислот с разветвленной цепью - лейцина, изолейцина, валина составляет от 0,1 до 0,4, предпочтительно от 0,15 до 0,35.

5. Применение по любому из пп.1-4, где массовое соотношение между лимонной кислотой и общим количеством яблочной кислоты и янтарной кислоты составляет от 1,0 до 4,0, предпочтительно от 1,5 до 2,5.

6. Применение по любому из пп.1-5, где массовое соотношение лимонная кислота:яблочная кислота:янтарная кислота составляет от 10:1:1 до 2:1,5:1,5, предпочтительно от 7:1:1 до 1,5:1:1, более предпочтительно от 5:1:1 до 3:1:1.

7. Применение по любому из пп.1-6, где указанный активный агент дополнительно содержит по меньшей мере одну аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из гистидина, фенилаланина, метионина, триптофана, тирозина, цистеина.

8. Применение по любому из пп.1-7, где указанный активный агент дополнительно содержит гистидин, фенилаланин, метионин, триптофан, цистеин и необязательно тирозин.

9. Применение по п.7 или 8, где соотношение между общим молярным количеством лимонной кислоты, яблочной кислоты, янтарной кислоты и общим молярным количеством метионина, фенилаланина, гистидина и триптофана составляет более 1,35.

10. Применение по любому из пп.1-9, где соотношение между общим молярным количеством трех кислот: лимонной кислоты, янтарной кислоты, яблочной кислоты и общим молярным количеством лизина и треонина составляет от 0,10 до 0,70, предпочтительно от 0,15 до 0,55.

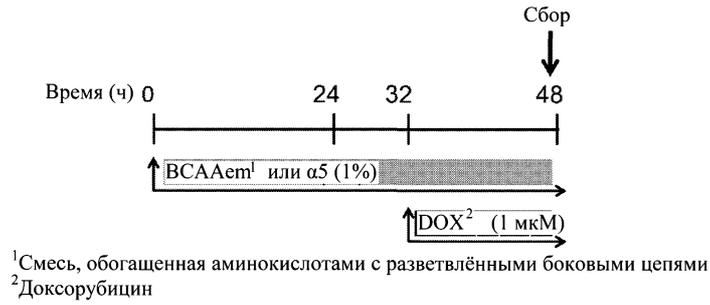
11. Применение по любому из пп.1-10, где массовое или молярное количество лимонной кислоты выше, чем общее массовое или молярное количество яблочной и янтарной кислот.

12. Применение по любому из пп.1-11, где массовое соотношение между лейцином и лимонной кислотой составляет от 5 до 1, предпочтительно от 2,50 до 3,50.

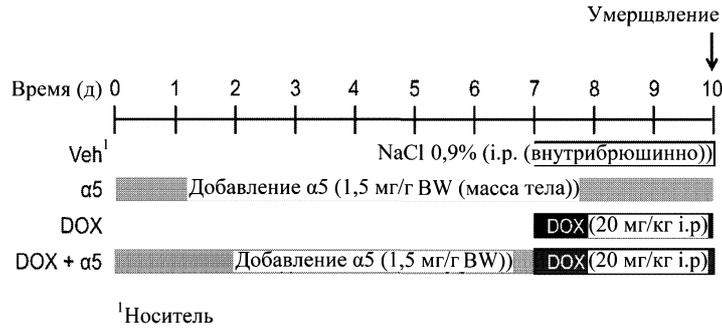
13. Применение по любому из пп.1-12, где указанная композиция не содержит аргинина.

14. Применение по любому из пп.1-13, где указанная композиция не содержит серина, пролина, аланина.

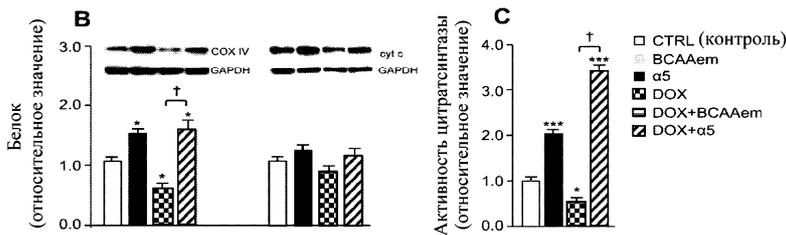
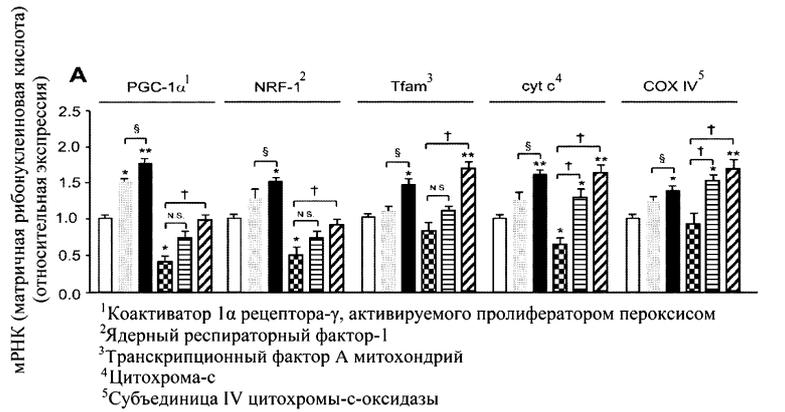
15. Применение комбинированного препарата, содержащего композицию, причем композиция содержит активный агент, содержащий аминокислоты - лейцин, изолейцин, валин, треонин, лизин, и лимонную кислоту, янтарную кислоту, яблочную кислоту; и по меньшей мере один химиотерапевтический агент для предотвращения и/или лечения кардиотоксичности, индуцированной указанным по меньшей мере одним химиотерапевтическим агентом, у субъекта, страдающего от рака, где применение композиции и по меньшей мере одного химиотерапевтического агента является одновременным, отдельным, последовательным.



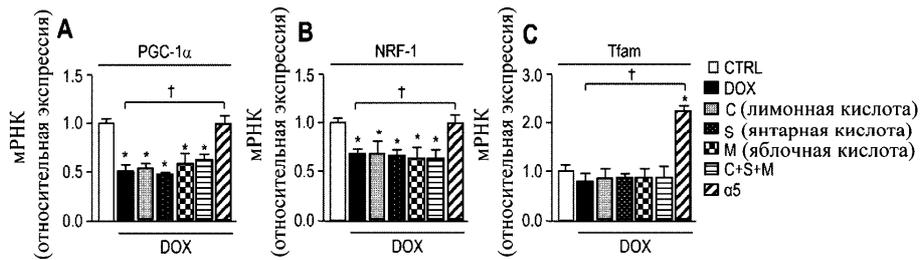
Фиг. 1



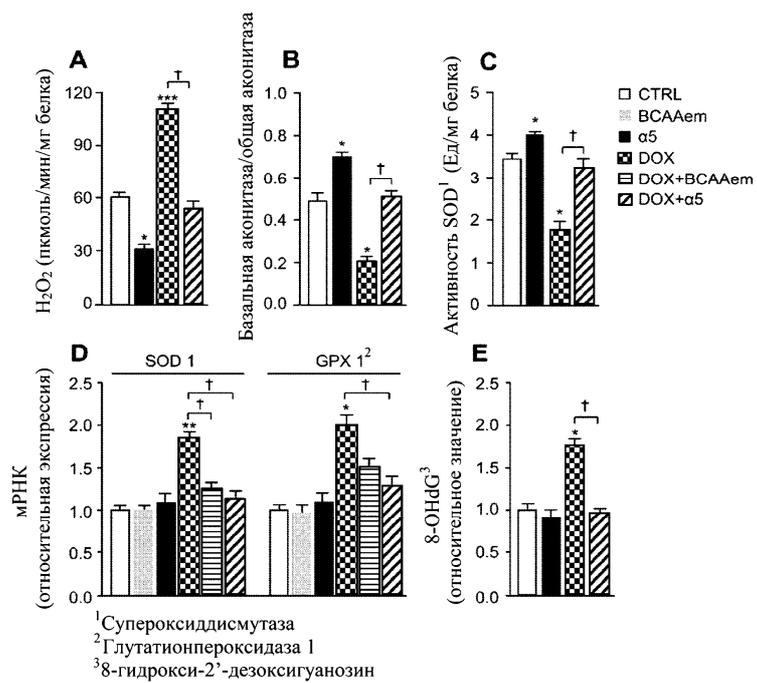
Фиг. 2



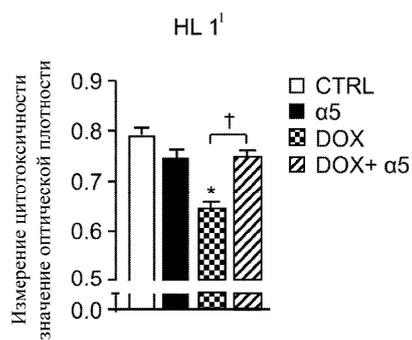
Фиг. 3



Фиг. 4

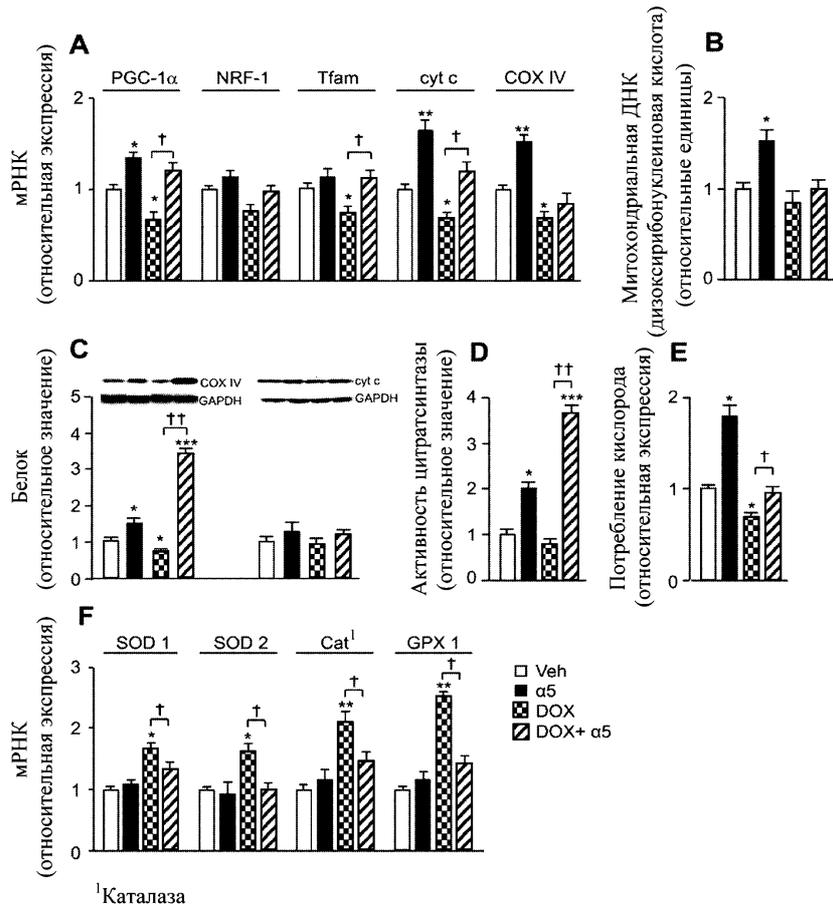


Фиг. 5

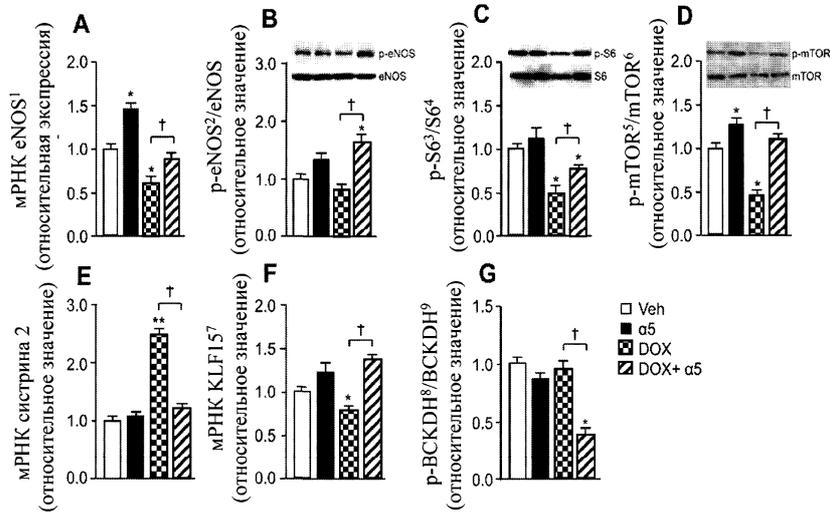


¹Линия клеток сердечной мышцы

Фиг. 6

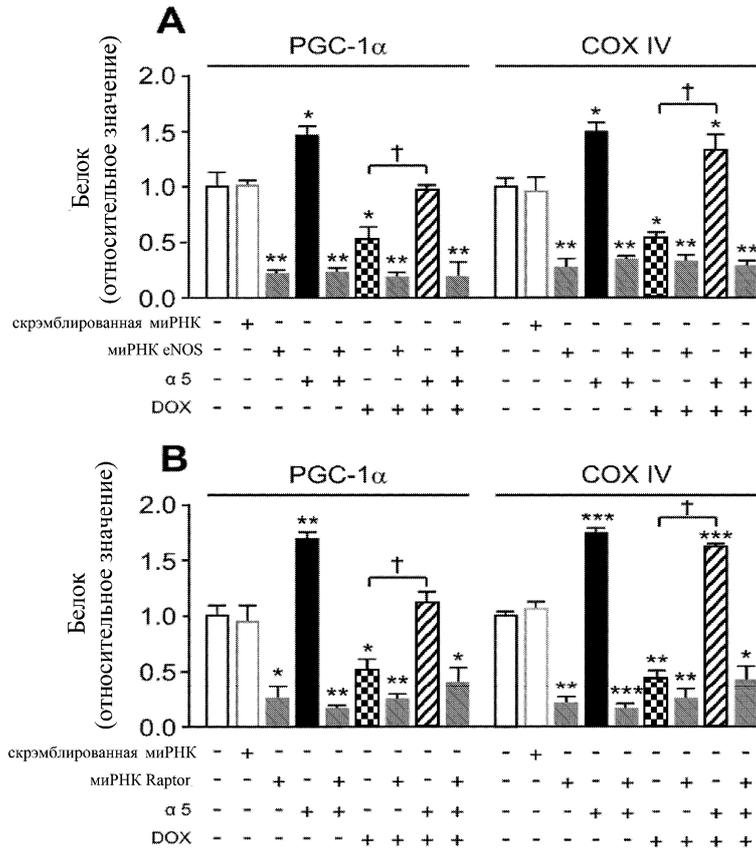


Фиг. 7

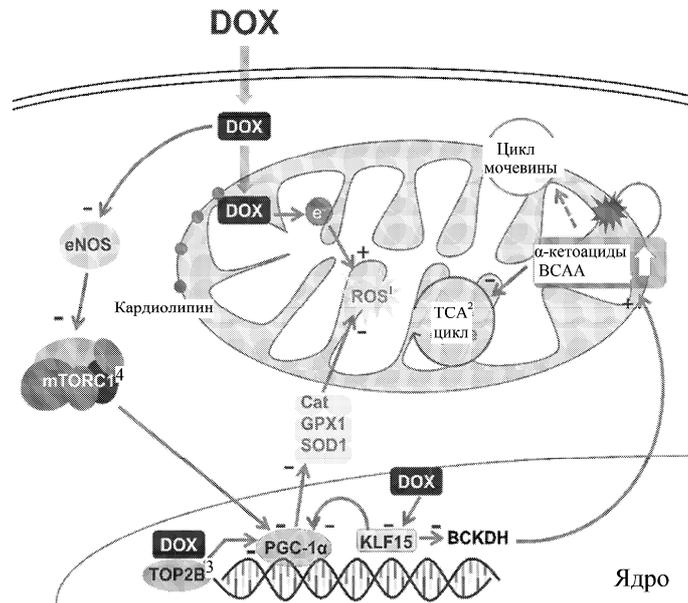


¹Эндотелиальная синтаза оксида азота ⁵Фосфо-мишень рапамицина у млекопитающих
²Фосфо-eNOS ⁶Мишень рапамицина у млекопитающих
³Фосфо-рибосомальный белок S6 ⁷Krüppel-подобный фактор 15
⁴Рибосомальный белок S6 ⁸Фосфо-дегидрогеназный комплекс разветвлённых α-кетокислот
⁹Дегидрогеназный комплекс разветвлённых α-кетокислот

Фиг. 8

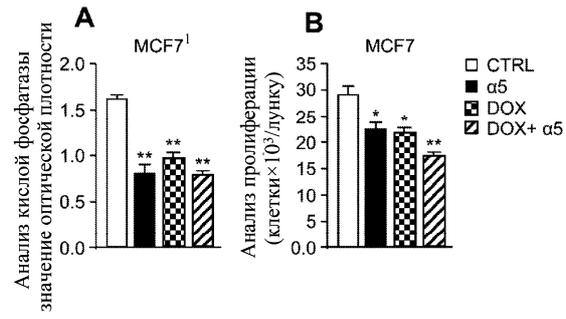


Фиг. 11



- ¹Активные формы кислорода
- ²Трикарбоновые кислоты
- ³Топоизомераза IIβ
- ⁴Комплекс I mTOR

Фиг. 12



¹Клетки рака молочной железы

Фиг. 13

