

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202293296** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2023.08.28**

(51) Int. Cl. *A61K 31/135* (2006.01)  
*A61K 31/58* (2006.01)  
*A61P 11/00* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2022.11.16**

---

(54) **СПОСОБ ПОВЫШЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНЬЮ ЛЕГКИХ К ГЛЮКОКОРТИКОИДАМ**

---

(96) **2022/EA/0059 (BY) 2022.11.16**

(72) Изобретатель:

(71) Заявитель:  
**КАДУШКИН АЛЕКСЕЙ  
ГЕННАДЬЕВИЧ (BY)**

**Кадушкин Алексей Геннадьевич,  
Таганович Анатолий Дмитриевич  
(BY)**

---

(57) Изобретение относится к области медицины и фармации, а именно к способу повышения чувствительности моноклеарных клеток крови пациентов с хронической обструктивной болезнью легких к глюкокортикоидам, включающему комбинированное использование глюкокортикоида будесонида в концентрации 10 нМ с трициклическим антидепрессантом нортриптилином в концентрации 10 мкМ.

**A1**

**202293296**

**202293296**

**A1**

## **СПОСОБ ПОВЫШЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНЬЮ ЛЕГКИХ К ГЛЮКОКОРТИКОИДАМ**

Изобретение относится к области медицины и фармации, а именно к способу повышения чувствительности мононуклеарных клеток крови пациентов с хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) к глюкокортикоидам, заключающемуся в инкубации мононуклеарных клеток периферической крови с глюкокортикоидом будесонидом совместно с лекарственным средством нортриптилин.

Настоящее изобретение предусматривает повышение чувствительности мононуклеарных клеток крови пациентов с ХОБЛ к глюкокортикоидам, что достигается путем сочетанного использования глюкокортикоида будесонида в концентрации 10 нМ с трициклическим антидепрессантом нортриптилином в концентрации 10 мкМ. Добавление к культуре клеток крови одновременно двух лекарственных средств позволяет снизить продукцию провоспалительных цитокинов в мононуклеарных клетках периферической крови и миграцию лимфоцитов крови к хемокинам CCL5 и CXCL10, изменить экспрессию молекул, вовлеченных в развитие стероидорезистентности (глюкокортикоидного рецептора  $\beta$ , фактора, ингибирующего миграцию макрофагов (ФИММ), гистон деацетилазы 2, фосфорилированной p38 митоген-активируемой протеинкиназы), в лимфоцитах крови пациентов с ХОБЛ.

Известно лекарственное средство теофиллин, неселективный ингибитор фосфодиэстеразы, метилксантин, обладающее бронходилатирующим (при концентрации препарата в крови 10-20 мг/л) и противовоспалительным (при плазменной концентрации от 1 до 5 мг/л) действием [1]. Описан способ повышения чувствительности клеток крови пациентов с ХОБЛ к глюкокортикоидам при их совместной инкубации с теофиллином в низких концентрациях [2-4].

Указанный способ является аналогом по отношению к заявляемому.

Общим признаком для заявляемого способа и аналога является способность обоих лекарственных средств (теофиллина и нортриптилина) изменять чувствительность клеток к кортикостероидам за счет повышения экспрессии фермента гистон деацетилазы 2.

Однако данный способ обладает следующими недостатками.

Лекарственное вещество теофиллин проявляет противовоспалительные свойства и способность модулировать чувствительность клеток к кортикостероидам только при низкой концентрации. Кроме того, теофиллин имеет узкий терапевтический диапазон, при его применении часто развиваются побочные эффекты, в том числе тогда, когда его уровень в плазме крови пациента с ХОБЛ находится в пределах терапевтического диапазона. Побочные эффекты, связанные с применением пациентами с ХОБЛ теофиллина, включают головную боль, тошноту, рвоту, диарею, беспокойство, нервозность, бессонницу и желудочно-кишечные расстройства. Менее распространены, но более опасны для здоровья – повышенный риск развития сердечных аритмий и судорог [5].

Известен способ преодоления резистентности к кортикостероидам, заключающийся в использовании макролида/фторкетонида солитромицина [6].

Общим признаком для заявляемого способа и аналога является способность обоих лекарственных средств (солитромицина и нортриптилина) восстанавливать чувствительность мононуклеарных клеток крови пациента с ХОБЛ к кортикостероидам, оцененную по продукции интерлейкина 8 (ИЛ-8).

Однако данный способ обладает следующими недостатками.

В ходе клинических испытаний солитромицина для лечения внебольничной бактериальной пневмонии обнаружено более частое бессимптомное повышение уровня аланиновой трансаминазы (АЛТ) и аспарагиновой трансаминазы (АСТ) в 3 и в 5 раз выше верхнего предела нормы у пациентов, принимавших солитромицин, по сравнению с теми, кто принимал моксифлоксацин. Почти треть пациентов, получавших солитромицин внутривенно, испытывали реакции в месте инфузии. Такие результаты не позволили Управлению по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (The United States Food and Drug Administration), одобрить использование солитромицина, заключив, что риск гепатотоксичности этого препарата в результате проведенных испытаний не был адекватно оценен [7]. Клиническое испытание 2-ой фазы, направленное на изучение противовоспалительных эффектов солитромицина при ХОБЛ, было прекращено, не достигнув заявленных целей. У всех 6 пациентов, участвовавших в исследовании и принимавших солитромицин, развились побочные эффекты, в том числе у одного из них – серьезные побочные эффекты [8].

Известен способ повышения чувствительности клеток крови пациентов с ХОБЛ к глюкокортикоидам, включающий применение рофлумиласта, ингибитора фосфодиэстеразы 4 [9, 10].

Указанный способ является прототипом по отношению к заявляемому.

Общим признаком для заявляемого способа и прототипа является способность обоих лекарственных средств (нортриптилина и рофлумиласта) потенцировать действие глюкокортикоидов, приводя к снижению продукции ИЛ-8 в клетках периферической крови, а также их способность подавлять экспрессию фактора транскрипции NF-κB, глюкокортикоидного рецептора β, ФИММ и повышать экспрессию фермента гистон деацетилазы 2 [11].

Однако данный способ обладает следующими недостатками.

Недостатком прототипа является большое количество побочных эффектов, развивающихся при применении рофлумиласта у пациентов с ХОБЛ. Наиболее частыми побочными эффектами являются диарея, тошнота, снижение аппетита, потеря веса, боль в животе, нарушение сна и головная боль. Использование рофлумиласта также может приводить к развитию бессонницы и депрессии [5].

Задачей настоящего изобретения является повышение чувствительности мононуклеарных клеток периферической крови пациентов с ХОБЛ к глюкокортикоидам путем одновременного применения глюкокортикоидов и трициклического антидепрессанта нортриптилина.

Поставленная задача достигается следующим образом.

При инкубации клеток цельной крови или мононуклеарных клеток периферической крови пациента с ХОБЛ в присутствии глюкокортикоида будесонида (10 нМ) одновременно с трициклическим антидепрессантом нортриптилином (10 мкМ) наступает потенцирование противовоспалительных эффектов глюкокортикоидов:

снижается секреция провоспалительных цитокинов в мононуклеарных клетках крови, подавляется миграция лимфоцитов к хемокинам CCL5 и CXCL10, изменяется экспрессия молекулярных маркеров стероидорезистентности.

Заявителем были проведены исследования:

1) по определению концентрации провоспалительных цитокинов (ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-8, ИЛ-13, ИЛ-17А, ИЛ-33, тимического стромального лимфопоэтина (ТСП), ФИММ) в супернатантах, собранных после инкубации мононуклеарных клеток крови пациентов с ХОБЛ с лекарственными средствами будесонидом (10 нМ), нортриптилином (10 мкМ) и стимулятором клеток фитогемагглютинином (ФГА);

2) по определению процента лимфоцитарных субпопуляций периферической крови, продуцирующих цитокины (ИЛ-4, ИЛ-8, фактор некроза опухоли  $\alpha$  (ФНО $\alpha$ ), интерферон  $\gamma$ ), у пациентов с ХОБЛ после инкубации клеток с нортриптилином (10 мкМ), будесонидом (10 нМ) и их стимуляции форбол-миристан-ацетатом (ФМА) и иономицином;

3) по определению процента лимфоцитов, мигрировавших к хемокину CCL5 (10 нМ) или CXCL10 (10 нМ), после инкубации клеток крови с нортриптилином (10 мкМ), будесонидом (10 нМ) или их комбинацией;

4) по определению экспрессии молекулярных маркеров стероидорезистентности (глюкокортикоидного рецептора  $\beta$ , гистон деацетилазы 2, фосфорилированной р38 митоген-активируемой протеинкиназы, ацетилованного гистона H4) и фосфорилированной формы р65 NF- $\kappa$ B в субпопуляциях лимфоцитов крови после инкубации периферической крови пациентов с ХОБЛ с нортриптилином (10 мкМ), будесонидом (10 нМ) и их стимуляции ФМА и иономицином.

Оценку эффективности способа повышения чувствительности мононуклеарных клеток крови пациентов с ХОБЛ к глюкокортикоидам осуществляют путем сравнения показателя (процента клеток, экспрессирующих провоспалительный цитокин или молекулярный маркер стероидорезистентности; средней интенсивности флуоресценции молекулярного маркера стероидорезистентности; процента клеток, мигрировавших к хемокину; концентрации провоспалительного цитокина в супернатанте), полученного после инкубации клеток с комбинацией будесонида (10 нМ) и нортриптилина (10 мкМ), с результатами измерения соответствующего показателя, полученного после инкубации клеток с одним будесонидом (10 нМ).

Подавление продукции провоспалительных цитокинов мононуклеарными клетками периферической крови пациентов с ХОБЛ под влиянием глюкокортикоида будесонида в концентрации 10 нМ, нортриптилина в концентрации 10 мкМ и их комбинации представлено в таблице 1.

Таблица 1.

Цитокин	Контроль	ФГА 10 мкг/мл	ФГА 10 мкг/мл + Буд 10 нМ	ФГА 10 мкг/мл + Нт 10 мкМ	ФГА 10 мкг/мл + Буд 10 нМ + Нт 10 мкМ
ИЛ-4, пг/мл	1,37 ± 0,09	7,18 ± 1,22*	1,69 ± 0,10 <sup>#</sup>	2,15 ± 0,26 <sup>#</sup>	1,31 ± 0,07 <sup>#♦§</sup>
ИЛ-5, пг/мл	31,62 ± 3,72	42,30 ± 1,77*	35,80 ± 1,98 <sup>#</sup>	27,76 ± 1,43 <sup>#♦</sup>	20,65 ± 1,61 <sup>#♦§</sup>

ИЛ-8, пг/мл	37452 ± 10404	129941 ± 8186*	55039 ± 10312 <sup>#</sup>	122485 ± 11371* <sup>◆</sup>	38961 ± 8898 <sup>#◆§</sup>
ИЛ-13, пг/мл	3,23 ± 0,59	79,74 ± 6,26*	59,75 ± 3,07* <sup>#</sup>	59,75 ± 3,09* <sup>#</sup>	40,89 ± 4,55* <sup>#◆§</sup>
ИЛ-17А, пг/мл	17,19 ± 0,97	23,01 ± 1,36*	23,48 ± 1,25*	15,40 ± 1,17 <sup>#◆</sup>	18,27 ± 1,12 <sup>#◆§</sup>
ИЛ-33, пг/мл	52,34 ± 5,16	75,10 ± 4,63*	62,11 ± 5,83	58,89 ± 5,45 <sup>#</sup>	44,47 ± 4,57 <sup>#§</sup>
ТСЛП, пг/мл	29,06 ± 4,58	82,79 ± 5,97*	74,28 ± 5,87*	64,31 ± 6,07* <sup>#</sup>	44,86 ± 5,24 <sup>#◆§</sup>
ФИММ, нг/мл	1,30 ± 0,13	1,62 ± 0,16	1,40 ± 0,18	1,37 ± 0,18 <sup>#</sup>	1,06 ± 0,14 <sup>#§</sup>

Примечание: мононуклеарные клетки крови выделяли из периферической крови пациентов с хронической обструктивной болезнью легких и инкубировали с будесонидом (Буд, 10 нМ), нортриптилином (Нт, 10 мкМ) или их комбинацией в течение 1 часа, после чего стимулировали фитогемагглютинином (ФГА, 10 мкг/мл). По истечении 24 часов супернатанты собирали и в них определяли концентрацию интерлейкина 4 (ИЛ-4), ИЛ-5, ИЛ-8, ИЛ-13, ИЛ-17А, ИЛ-33, тимического стромального лимфопоэтина (ТСЛП), фактора, ингибирующего миграцию макрофагов (ФИММ), методом иммуноферментного анализа. Результаты представлены в виде среднего ± стандартная ошибка среднего; n=6. Оценка данных проведена методом однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим определением теста Тьюки: \*p < 0,05 по сравнению с контролем (клетками крови, инкубация которых проходила в отсутствие ФГА и лекарственных средств); #p < 0,05 по сравнению с ФГА 10 мкг/мл; ◆P < 0,05 по сравнению с ФГА 10 мкг/мл + Буд 10 нМ; §p < 0,05 по сравнению с ФГА 10 мкг/мл + Нт 10 мкМ.

Снижение процентного содержания субпопуляций лимфоцитов крови, продуцирующих провоспалительные цитокины, под влиянием глюкокортикоида будесонида в концентрации 10 нМ, нортриптилина в концентрации 10 мкМ и их комбинации представлено в таблице 2.

Таблица 2.

Субпопуляция лимфоцитов крови	ФМА 50 нг/мл + Ион 1 мкг/мл	ФМА 50 нг/мл + Ион 1 мкг/мл + Буд 10 нМ	ФМА 50 нг/мл + Ион 1 мкг/мл + Нт 10 мкМ	ФМА 50 нг/мл + Ион 1 мкг/мл + Буд 10 нМ + Нт 10 мкМ
% клеток, продуцирующих ИЛ-4				
Т-хелперы	3,4 ± 0,4	2,3 ± 0,2*	2,7 ± 0,4*	1,5 ± 0,2* <sup>◆§</sup>
Цитотоксические Т-лимфоциты	4,4 ± 0,6	3,1 ± 0,5*	3,2 ± 0,5*	2,1 ± 0,3* <sup>◆§</sup>
НК-клетки	3,7 ± 0,2	2,9 ± 0,2*	2,7 ± 0,2*	2,0 ± 0,2* <sup>◆§</sup>
НКТ-подобные клетки	5,0 ± 0,4	3,8 ± 0,4*	3,3 ± 0,2*	2,3 ± 0,2* <sup>◆§</sup>

% клеток, продуцирующих ИЛ-8				
Т-хелперы	1,9 ± 0,2	1,4 ± 0,2*	1,2 ± 0,2*	0,9 ± 0,1*♦
Цитотоксические Т-лимфоциты	1,8 ± 0,2	1,3 ± 0,2*	1,1 ± 0,2*	0,8 ± 0,1*♦
НК-клетки	2,4 ± 0,1	1,6 ± 0,1*	1,5 ± 0,1*	1,0 ± 0,1*♦§
НКТ-подобные клетки	2,1 ± 0,3	1,4 ± 0,2*	1,3 ± 0,1*	0,9 ± 0,1*♦§
% клеток, продуцирующих интерферон γ				
Т-хелперы	25,7 ± 3,4	24,5 ± 3,4	23,1 ± 3,6*	21,4 ± 3,5*♦
Цитотоксические Т-лимфоциты	75,4 ± 5,7	72,1 ± 5,7*	73,6 ± 5,8	67,9 ± 5,3*♦§
НК-клетки	40,5 ± 5,0	33,8 ± 4,1*	34,1 ± 4,1*	26,8 ± 3,3*♦§
НКТ-подобные клетки	76,2 ± 5,8	74,5 ± 6,2	74,0 ± 5,8*	71,1 ± 6,2*♦§
% клеток, продуцирующих ФНОα				
Т-хелперы	61,4 ± 3,6	50,8 ± 4,5*	56,9 ± 4,8	47,8 ± 5,4*§
Цитотоксические Т-лимфоциты	77,4 ± 6,7	69,9 ± 6,5	72,9 ± 7,5*	64,4 ± 6,9*♦
НК-клетки	69,9 ± 6,7	59,3 ± 6,2*	66,1 ± 7,3	51,7 ± 5,8*♦§
НКТ-подобные клетки	75,5 ± 3,7	67,4 ± 3,3*	71,3 ± 3,8*	62,0 ± 2,8*♦§

Примечание: Клетки периферической крови пациентов с хронической обструктивной болезнью легких инкубировали с будесонидом (Буд, 10 нМ), нортриптилином (Нт, 10 мкМ) или их комбинацией в течение 1 часа, после чего стимулировали форбол-миристан-ацетатом (ФМА, 50 нг/мл) и иономицином (Ион, 1 мкг/мл). Внутриклеточную продукцию интерлейкина 4 (ИЛ-4), ИЛ-8, интерферона γ и фактора некроза опухоли α (ФНОα) субпопуляциями лимфоцитов крови определяли методом проточной цитометрии. Результаты представлены в виде среднего ± стандартная ошибка среднего; n=6. Оценка данных проведена методом однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим определением теста Тьюки: \*p < 0,05 по сравнению с ФМА 50 нг/мл + Ион 1 мкг/мл; ♦P < 0,05 по сравнению с ФМА 50 нг/мл + Ион 1 мкг/мл + Буд 10 нМ; §p < 0,05 по сравнению с ФМА 50 нг/мл + Ион 1 мкг/мл + Нт 10 мкМ.

Влияние будесонида (10 нМ), нортриптилина (10 мкМ) и их комбинации на миграцию лимфоцитов к хемокинам CCL5 (10 нМ) и CXCL10 (10 нМ) представлено в таблице 3.

Таблица 3.

Субпопуляция лимфоцитов крови	Контроль	Буд 10 нМ	Нт 10 мкМ	Буд 10 нМ + Нт 10 мкМ
% клеток, мигрировавших к CCL5				
Т-хелперы	100,0 ± 0,0	81,6 ± 7,0	38,4 ± 6,6*♦	35,4 ± 6,1*♦
Цитотоксические Т-лимфоциты	100,0 ± 0,0	76,6 ± 5,8*	34,4 ± 3,7*♦	27,4 ± 3,5*♦§
НК-клетки	100,0 ± 0,0	70,3 ± 5,9*	21,5 ± 1,5*♦	12,1 ± 1,0*♦§

В-лимфоциты	100,0 ± 0,0	67,4 ± 5,9*	37,5 ± 4,2*♦	25,7 ± 4,3*♦
% клеток, мигрировавших к CXCL10				
Т-хелперы	100,0 ± 0,0	96,9 ± 10,4	35,7 ± 4,2*♦	35,2 ± 5,7*♦
Цитотоксические Т-лимфоциты	100,0 ± 0,0	87,3 ± 8,7	24,5 ± 6,0*♦	24,2 ± 5,0*♦
NK-клетки	100,0 ± 0,0	81,8 ± 4,5*	20,4 ± 1,4*♦	13,3 ± 1,6*♦§
В-лимфоциты	100,0 ± 0,0	76,1 ± 6,0*	26,2 ± 5,6*♦	17,9 ± 3,0*♦

Примечание: Мононуклеарные клетки периферической крови пациентов с хронической обструктивной болезнью легких (n=8) инкубировали с будесонидом (Буд, 10 нМ), нортриптилином (Нт, 10 мкМ) или их комбинацией в течение 1 часа, после чего переносили в миграционные планшеты, содержащие хемокины CCL5 (10 нМ) или CXCL10 (10 нМ). Спустя 2 часа клетки, мигрировавшие в нижние камеры планшета, собирали, окрашивали моноклональными антителами к CD-маркерам лимфоцитов и подсчитывали на проточном цитометре. Результаты представлены в виде среднего ± стандартная ошибка среднего. Оценку данных проводили методом однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим определением теста Тьюки: \*p < 0,05 по сравнению с контролем (клетками крови, инкубация которых проходила в отсутствии лекарственных средств); ♦P < 0,05 по сравнению с Буд 10 нМ; §p < 0,05 по сравнению с Нт 10 мкМ.

Влияние лекарственных средств на экспрессию молекулярных маркеров стероидорезистентности в субпопуляциях лимфоцитов крови пациентов с ХОБЛ представлено в таблице 4.

Таблица 4.

Субпопуляция клеток крови	ФМА + Ион	ФМА + Ион + Буд 10 нМ	ФМА + Ион + Нт 10 мкМ	ФМА + Ион + Буд 10 нМ + Нт 10 мкМ
Средняя интенсивность флуоресценции ГРβ				
Т-хелперы	3,22 ± 0,19	2,92 ± 0,17	2,76 ± 0,19*♦	2,60 ± 0,16*♦
Цитотоксические Т-лимфоциты	3,38 ± 0,20	3,13 ± 0,18	2,91 ± 0,19*♦	2,78 ± 0,18*♦
NK-клетки	3,56 ± 0,25	3,43 ± 2,24	3,17 ± 0,23*♦	2,99 ± 0,19*♦
NKT-подобные клетки	3,34 ± 0,18	3,13 ± 0,18	2,94 ± 0,20*♦	2,78 ± 0,19*♦
Средняя интенсивность флуоресценции ф-p38 МАПК				
Т-хелперы	3,71 ± 0,39	3,59 ± 0,43	3,33 ± 0,36*	3,23 ± 0,31*
Цитотоксические Т-лимфоциты	3,90 ± 0,34	3,76 ± 0,36	3,64 ± 0,31*	3,54 ± 0,35*♦
NK-клетки	2,56 ± 0,23	2,50 ± 0,26	2,37 ± 0,24*	2,24 ± 0,22*♦
NKT-подобные клетки	3,97 ± 0,35	3,82 ± 0,37	3,72 ± 0,34*	3,61 ± 0,36*♦
Средняя интенсивность флуоресценции ф-p65 NF-κB				
Т-хелперы	3,24 ± 0,39	3,06 ± 0,34	2,60 ± 0,30*♦	2,50 ± 0,26*♦
Цитотоксические Т-лимфоциты	3,29 ± 0,42	3,16 ± 0,40	2,90 ± 0,38*♦	2,79 ± 0,38*♦§

НК-клетки	1,78 ± 0,20	1,73 ± 0,19	1,58 ± 0,17*	1,57 ± 0,21*♦
НКТ-подобные клетки	3,32 ± 0,43	3,20 ± 0,41	2,93 ± 0,40*♦	2,81 ± 0,41*♦
% клеток, экспрессирующих ГДА2				
Т-хелперы	63,9 ± 5,9	70,2 ± 7,8	72,5 ± 7,0*	77,2 ± 6,2*
Цитотоксические Т-лимфоциты	67,8 ± 4,5	76,5 ± 5,7	77,9 ± 5,5*	81,6 ± 5,1*§
НК-клетки	54,9 ± 2,4	67,4 ± 6,4	66,6 ± 5,6	76,7 ± 5,1*♦§
НКТ-подобные клетки	70,2 ± 4,4	77,7 ± 5,6	79,7 ± 5,2	83,0 ± 4,9*§
% клеток, экспрессирующих ацетилированный гистон H4				
Т-хелперы	24,3 ± 3,7	20,6 ± 3,4	17,6 ± 2,9*♦	14,2 ± 2,0*
Цитотоксические Т-лимфоциты	34,6 ± 7,5	32,1 ± 8,0	26,6 ± 6,5	23,3 ± 6,1*
НК-клетки	35,1 ± 3,6	29,7 ± 4,2	25,9 ± 3,6*♦	18,9 ± 4,2*♦§
НКТ-подобные клетки	38,7 ± 6,4	35,6 ± 6,9	31,5 ± 6,3*♦	26,7 ± 5,3*

Примечание: Клетки периферической крови пациентов с хронической обструктивной болезнью легких инкубировали с будесонидом (Буд, 10 нМ), нортриптилином (Нт, 10 мкМ) или их комбинацией в течение 1 часа, после чего стимулировали форбол-миристат-ацетатом (ФМА, 50 нг/мл либо 250 нг/мл) и иономицином (Ион, 1 мкг/мл). Экспрессию глюкокортикоидного рецептора β (ГРβ), фосфорилированной формы р38 митоген-активируемой протеинкиназы (ф-р38 МАПК), фосфорилированной формы р65 NF-κВ (ф-р65 NF-κВ), гистон деацетилазы 2 (ГДА2) и ацетилированного гистона H4 в субпопуляциях лимфоцитов крови определяли методом проточной цитометрии. Результаты представлены в виде среднего ± стандартная ошибка среднего; n=6. Статистическую оценку полученных данных проводили методом однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим определением теста Тьюки: \*p < 0,05 по сравнению с ФМА + Ион; ♦P < 0,05 по сравнению с ФМА + Ион + Буд 10 нМ; §p < 0,05 по сравнению с ФМА + Ион + Нт 10 мкМ.

#### Пример заявляемого способа 1

Венозную кровь у пациентов с ХОБЛ забирают утром натощак в пробирку, содержащую гепарин натрия в концентрации 10 ЕД/мл в качестве антикоагулянта, и доставляют в лабораторию для дальнейшего анализа. Мононуклеарные клетки крови выделяют из периферической крови пациентов с ХОБЛ путем центрифугирования на градиенте плотности 1,077. Клетки ресуспенсируют в концентрации 10<sup>6</sup>/мл в культуральной среде RPMI 1640, обогащенной 10% фетальной телячьей сывороткой (ФТС), 2 мМ глутамин, 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина.

2×10<sup>5</sup> Мононуклеарных клеток периферической крови помещают в лунки 96-луночного планшета и культивируют в присутствии или отсутствии будесонида (10 нМ) и нортриптилина (10 мкМ) в течение 1-часа. В последующем клетки активируют путем добавления ФГА (10 мкг/мл). По истечении суток супернатанты собирают и хранят при температуре -20<sup>0</sup>С. В них определяют концентрацию ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-8, ИЛ-13, ИЛ-17А, ИЛ-33, ТСЛП, ФИММ методом иммуноферментного анализа.

### Пример заявляемого способа 2

Венозную кровь у обследуемых пациентов забирают утром натощак в объеме 7 мл в пробирку, содержащую гепарин натрия в концентрации 10 ЕД/мл в качестве антикоагулянта, и немедленно доставляют в лабораторию. В стерильных пробирках смешивают 7 мл крови с аналогичным объемом культуральной среды RPMI 1640, содержащей 10% ФТС, и инкубируют с будесонидом (10 нМ), нортриптилином (10 мкМ) или их комбинацией в увлажненной 5% CO<sub>2</sub>/95% воздушной среде при 37°C в течение 1 ч. Клеточные культуры затем стимулируют с добавлением ФМА (50 нг/мл) и иономицина (1 мкг/мл) в присутствии брефельдина А (10 мкг/мл) и далее инкубируют в увлажненной 5% CO<sub>2</sub>/95% воздушной среде при 37°C. После стимуляции в течение 6 ч в пробирки вносят 100 мкл 20 мМ раствора этилендиаминтетраацетата динатрия дигидрата в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) для прекращения активации клеток и удаления адгезированных клеток. Далее клетки отмывают и добавляют коктейль моноклональных антител, конъюгированных с флуорохромами, к поверхностным антигенам (CD45, CD3, CD4, CD8), после чего клетки инкубируют в течение 15 минут в темноте при комнатной температуре. Эритроциты лизируют путем добавления лизирующего раствора. Спустя 15 минут пробирки центрифугируют при 500g в течение 5 минут, клетки отмывают с использованием ФСБ, содержащего 1% ФТС. После фиксации лейкоцитов клетки пермеабелизируют с использованием пермеабелизирующего реагента и добавляют конъюгированные с флуорохромами моноклональные антитела к ИЛ-4, ИЛ-8, интерферону  $\gamma$ , ФНО $\alpha$  или гистон деацетилазе 2 на 15 минут в темноте при комнатной температуре. Затем вносят 3 мл отмывочного буфера и пробирки центрифугируют при 500g в течение 5 минут. После удаления супернатанта в пробирки помещают 500 мкл 1% раствора параформальдегида в ФСБ и клетки анализируют не позднее 12 часов на проточном цитометре. Образцы анализируют путем гейтирования лимфоцитов с использованием антител к CD45 и сигнала от бокового светорассеивания.

Т-хелперы идентифицируют как CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> клетки, цитотоксические Т-лимфоциты – как CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> события, NK-клетки – как CD45<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> клетки, НКТ-подобные клетки – как CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> события. И далее определяют процентное содержание клеток, экспрессирующих ИЛ-4, ИЛ-8, интерферон  $\gamma$ , ФНО $\alpha$ , гистон деацетилазу 2.

### Пример заявляемого способа 3

Венозную кровь у пациентов забирают утром натощак в объеме 15 мл в пробирку, содержащую гепарин натрия в концентрации 10 ЕД/мл в качестве антикоагулянта. Мононуклеарные клетки крови выделяют из периферической крови путем центрифугирования на градиенте плотности 1,077. Клетки ресуспендируют в концентрации  $1 \times 10^6$ /мл в культуральной среде RPMI 1640, обогащенной 1% ФТС.

В стерильные пробирки помещают 1 мл клеточной суспензии и инкубируют с будесонидом (10 нМ), нортриптилином (10 мкМ) или их комбинацией в увлажненной 5% CO<sub>2</sub>/95% воздушной среде при 37°C. Спустя 1 час 100 мкл клеточной суспензии (100 000 клеток) переносят в верхние камеры (съёмные вставки) 24-луночного миграционного планшета, имеющие поры диаметром 5 мкм. В нижние камеры миграционного планшета помещают 600 мкл миграционного буфера, состоящего из культуральной среды RPMI 1640, обогащенной 1% ФТС и хемокинами CCL5 (10 нМ)

или CXCL10 (10 нМ). В качестве нестимулированного контроля используют миграционный буфер, не содержащий хемокины. Далее планшеты инкубируют при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>/ 95% атмосферного воздуха. По окончании 2 часов клетки, мигрировавшие в нижнюю камеру, собирают, отмывают при помощи ФСБ (условия центрифугирования: 500g, 5 минут, комнатная температура) и ресуспендируют в ФСБ. Добавляют коктейль конъюгированных с флуорохромами моноклональных антител, состоящий из CD3 / CD19 / CD4 / CD56 / CD8 / CD45, после чего клетки инкубируют в темноте в течение 20 минут при температуре 4°C. Далее клетки отмывают при помощи 3 мл ФСБ, содержащего 0,2% бычий сывороточный альбумин, и фиксируют путем внесения в пробирки 300 мкл 1% раствора параформальдегида. Используя проточный цитометр, настроенный на среднюю скорость потока клеток, подсчитывают их количество в течение 100 секунд.

Образцы анализируют, идентифицируя Т-хелперы как CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, цитотоксические Т-лимфоциты – CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, В-лимфоциты – CD45<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>, НК-клетки – CD45<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>.

#### Пример заявляемого способа 4

Венозную кровь у пациентов с ХОБЛ забирают утром натощак в пробирку, содержащую гепарин натрия в концентрации 10 ЕД/мл в качестве антикоагулянта, и доставляют в лабораторию для дальнейшего анализа. Клетки цельной крови инкубируют с будесонидом (10 нМ) и нортриптилином (10 мкМ) в увлажненной 5% CO<sub>2</sub>/95% воздушной среде при 37°C в течение 1 часа, после чего в пробирки добавляют конъюгированные с флуорохромами моноклональные антитела к поверхностным антигенам CD3, CD4, CD8, CD56, CD45 и клетки культивируют в темноте в течение 15 минут при комнатной температуре. Далее клеточные культуры стимулируют путем добавления ФМА (250 нг/мл) и иономицина (1 мкг/мл) в течение 15 минут при температуре 37°C. С целью лизиса эритроцитов и фиксации лейкоцитов 200 мкл крови смешивают с 4 мл подогретого до 37°C лизирующего/фиксирующего буфера для фосфорилированных белков. Затем пробирки инкубируют в водяной бане при 37°C в течение 10 минут и центрифугируют при 500×g в течение 5 минут. Лейкоциты однократно отмывают с помощью отмывочного буфера, пермеабилзируют с использованием охлажденного до -20°C 1 мл пермеабилзирующего буфера для фосфорилированных белков в течение 30 минут на льду. После двукратной промывки с ФСБ, содержащим 0,2% бычий сывороточный альбумин, клетки окрашивают с использованием конъюгированных с флуорохромами антител к фосфорилированной р38 митоген-активируемой протеинкиназе (pT180/pY182) и фосфорилированному фактору транскрипции р65 NF-κB (pS529) в течение 1 часа в темноте при комнатной температуре. В качестве контроля применяют изотипические антитела. После окончательной отмывки клетки ресуспендируют в 500 мкл охлажденного до 4°C ФСБ, содержащего 0,2% бычий сывороточный альбумин, и анализируют на проточном цитометре.

#### Пример заявляемого способа 5

Для определения экспрессии ацетилированного гистона H4 и глюкокортикоидного рецептора β в субпопуляциях лимфоцитов, клетки крови стимулируют и фиксируют, а их цитоплазматическую мембрану пермеабилзируют, аналогично примеру

заявляемого способа 2, описанному выше. В пробирки помещают неконъюгированные с флуорохромом моноклональные антитела к гистону H4 (ацетил K8) и поликлональные антитела к глюкокортикоидному рецептору  $\beta$ . Затем клетки инкубируют с антителами в темноте при комнатной температуре в течение 15 минут, отмывают и окрашивают с помощью вторичных антител IgG H&L, конъюгированных с флуорохромом, в течение 15 минут в темноте при комнатной температуре. После окончательной отмывки, клетки ресуспендируют в 1% растворе параформальдегида, и анализируют с помощью метода проточной цитометрии аналогично тому, как описано в примере заявляемого способа 2.

Использование трициклического антидепрессанта нортриптилина привело к существенному усилению чувствительности мононуклеарных клеток периферической крови пациентов с ХОБЛ к глюкокортикоидам. При иммуноферментном анализе концентрации провоспалительных цитокинов в супернатантах, полученных при культивировании мононуклеарных клеток крови пациентов с ХОБЛ с нортриптилином и будесонидом, установлено подавление (по сравнению с одним будесонидом) секреции ИЛ-4 в 1,3 раза, ИЛ-5 – в 1,7 раза, ИЛ-8 – в 1,4 раза, ИЛ-13 – в 1,5 раза, ИЛ-17A – в 1,3 раза, ТСЛП – в 1,7 раза. В отличие от будесонида, который оказался не способен изменить концентрацию ИЛ-33 и ФИММ, комбинация лекарственных средств нортриптилин/будесонид снижала концентрацию этих цитокинов в клеточных супернатантах. При использовании нортриптилина и будесонида происходит снижение (по сравнению с одним будесонидом) процентного содержания субпопуляций лимфоцитов, продуцирующих провоспалительные цитокины: ИЛ-4 (в Т-хелперах, цитотоксических Т-лимфоцитах и НК-клетках – в 1,5 раза, в НКТ-подобных клетках – в 1,7 раза), ИЛ-8 (в Т-хелперах, цитотоксических Т-лимфоцитах, НК-клетках и НКТ-подобных клетках – в 1,6 раза), интерферона  $\gamma$  (в Т-хелперах и цитотоксических Т-лимфоцитах – в 1,1 раза, в НК-клетках – в 1,3 раза, в НКТ-подобных клетках – в 1,05 раза), ФНО $\alpha$  (в цитотоксических Т-лимфоцитах, НК-клетках и НКТ-подобных клетках – в 1,1 раза). Под влиянием сочетания нортриптилина и будесонида (по сравнению с одним будесонидом) также снижается миграция лимфоцитов крови к хемокинам CCL5 (Т-хелперов – в 2,3 раза, цитотоксических Т-лимфоцитов – в 2,8 раза, НК-клеток – в 5,8 раза, В-лимфоцитов – в 2,6 раза) и CXCL10 (Т-хелперов – в 2,8 раза, цитотоксических Т-лимфоцитов – в 3,6 раза, НК-клеток – в 6,2 раза, В-лимфоцитов – в 4,3 раза).

Установлена способность комбинации нортриптилина и будесонида влиять на ключевые звенья развития стероидрезистентности при ХОБЛ. Такое сочетание лекарственных средств (по сравнению с одним будесонидом) снижало экспрессию глюкокортикоидного рецептора  $\beta$  (в Т-хелперах, цитотоксических Т-лимфоцитах, НК-клетках и НКТ-подобных клетках – в 1,1 раза), фосфорилированной формы p38 митоген-активируемой протеинкиназы (в Т-хелперах, цитотоксических Т-лимфоцитах, НК-клетках и НКТ-подобных клетках – в 1,1 раза), фосфорилированной формы p65 NF- $\kappa$ B (в Т-хелперах – в 1,2 раза, в цитотоксических Т-лимфоцитах, НК-клетках и НКТ-подобных клетках – в 1,1 раза). Более того, в отличие от будесонида, который оказался не способен модулировать экспрессию гистон деацетилазы 2 и ацетилированного гистона H4, комбинация лекарственных средств нортриптилин/будесонид изменяла экспрессию этих молекул. Приведенные результаты позволяют считать способ

повышения чувствительности мононуклеарных клеток периферической крови пациентов с ХОБЛ к глюкокортикоидам эффективным.

Таким образом, достигаемый технический результат предлагаемого изобретения заключается в повышении чувствительности мононуклеарных клеток крови пациентов с ХОБЛ к глюкокортикоидам при комбинированном использовании глюкокортикоида будесонида в концентрации 10 нМ с трициклическим антидепрессантом нортриптилином в концентрации 10 мкМ. При использовании данного способа наступает существенное (по сравнению с одним будесонидом) ингибирование продукции провоспалительных цитокинов в мононуклеарных клетках периферической крови, снижение миграции лимфоцитов крови к хемокинам CCL5 и CXCL10, изменение экспрессии молекул, вовлеченных в развитие стероидорезистентности, в лимфоцитах крови пациентов с ХОБЛ.

#### Литература

1. Barnes PJ. Theophylline. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013 Oct 15;188(8):901-906.
2. Hodge G, Jersmann H, Tran HB, Roscioli E, Holmes M, Reynolds PN, Hodge S. Lymphocyte senescence in COPD is associated with decreased histone deacetylase 2 expression by pro-inflammatory lymphocytes. *Respir Res.* 2015 Oct 24;16:130.
3. Кадушкин АГ, Таганович АД, Мовчан ЛВ, Талабаева ЭИ, Пластинина АВ, Шман ТВ. Влияние комбинации теофиллина и будесонида на выработку провоспалительных цитокинов клетками крови пациентов с хронической обструктивной болезнью легких // *Туберкулез и болезни лёгких.* 2021. Т. 99, № 10. С. 14-22.
4. M.F. Fitzgerald, H. Finch, J.C. Fox. Combination of methylxanthine compounds and steroids to treat chronic respiratory diseases: patent AU 2006212022 B2. Pub. Date 17.08.2006.
5. Janjua S, Fortescue R, Poole P. Phosphodiesterase-4 inhibitors for chronic obstructive pulmonary disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2020 May 1;5(5):CD002309.
6. Kobayashi Y, Wada H, Rossios C, Takagi D, Charron C, Barnes PJ, Ito K. A novel macrolide/fluoroketolide, solithromycin (CEM-101), reverses corticosteroid insensitivity via phosphoinositide 3-kinase pathway inhibition. *Br J Pharmacol.* 2013 Jul;169(5):1024-1034.
7. Buege MJ, Brown JE, Aitken SL. Solithromycin: A novel ketolide antibiotic. *Am J Health Syst Pharm.* 2017 Jun 15;74(12):875-887.
8. A Study to Evaluate the Anti-inflammatory Effects of Solithromycin in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02628769.* Mode of access: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02628769?term=solithromycin&draw=2&rank=1>. Date of access: 15.11.2022.
9. Milara J, Lluch J, Almudever P, Freire J, Xiaozhong Q, Cortijo J. Roflumilast N-oxide reverses corticosteroid resistance in neutrophils from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2014 Aug;134(2):314-322.
10. Freire J., Qian X., Scott C. Roflumilast compositions for the treatment of COPD: patent US20150164916A1. Pub. Date 18.06.2015.
11. Hatzelmann A, Morcillo EJ, Lungarella G, Adnot S, Sanjar S, Beume R, Schudt C, Tenor H. The preclinical pharmacology of roflumilast--a selective, oral phosphodiesterase 4 inhibitor in development for chronic obstructive pulmonary disease. *Pulm Pharmacol Ther.* 2010 Aug;23(4):235-256.

## Формула изобретения

### **СПОСОБ ПОВЫШЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНЬЮ ЛЕГКИХ К ГЛЮКОКОРТИКОИДАМ**

Способ повышения чувствительности мононуклеарных клеток крови пациентов с хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) к глюкокортикоидам, включающий способность нотриптилина (10 мкМ), используемого совместно с глюкокортикоидом будесонидом (10 нМ), усиливать подавление продукции интерлейкина 8 (ИЛ-8) в клетках крови пациентов с ХОБЛ и снижать экспрессию фактора транскрипции NF-κB, глюкокортикоидного рецептора β, фактора, ингибирующего миграцию макрофагов, а также повышать экспрессию фермента гистон деацетилазы 2, отличающийся способностью комбинации нотриптилина и глюкокортикоида будесонида ингибировать продукцию ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-13, ИЛ-17А, ИЛ-33, тимического стромального лимфопоэтина мононуклеарными клетками крови пациентов с ХОБЛ и снижать миграцию лимфоцитов крови пациентов с ХОБЛ в направлении хемокинов CCL5 и CXCL10.

**ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ**  
(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

**202293296**

**А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:**

*A61K 31/135 (2006.01)*

*A61K 31/58 (2006.01)*

*A61P 11/00 (2006.01)*

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

**Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:**

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)  
A61K 31/135, 31/58, A61P 11/00

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)  
EAPATIS, Espacenet, USPTO, elibrary.ru, Embase, PubMed, Google, Яндекс

**В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ**

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
X	KADUSHKIN A.G. et al. Nortriptyline overcomes corticosteroid resistance in nk and nkt-like cells from peripheral blood of patients with chronic obstructive pulmonary disease, RESEARCH RESULTS IN PHARMACOLOGY, 2021 72:5 (793-805), с. 59-70, 2022-04-07 (Full record), 2022-03-28 (Article in Press/In Process) DOI: 10.3897/grpharmacology.8.75467 весь документ	1
A	WO 2011097571 A1 (PRAIRIE PHARMACEUTICALS, LLC) 2011-08-11 реферат	1
A	WO 03/013547 A1 (GALEPHAR M/F) 2003-02-20 формула	1
A	КАДУШКИН А.Г. и др. Чувствительность к глюкокортикостероидам и гетерогенность ответа клеток in vitro у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких, Пульмонология. 2018; 28 (5), с. 558-566 DOI: 10.18093/0869-0189-2018-28-5-558-566 весь документ	1

последующие документы указаны в продолжении

\* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

«E» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

«O» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

"P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

«X» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

«Y» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

«&» - документ, являющийся патентом-аналогом

«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: **07/02/2023**

Уполномоченное лицо:  
Заместитель начальника Управления экспертизы  
Начальник отдела химии и медицины

  
А.В. Чебан