

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **034592**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.02.25

(21) Номер заявки
201890789

(22) Дата подачи заявки
2016.06.20

(51) Int. Cl. *A61K 45/06* (2006.01)
A61K 31/352 (2006.01)
A61K 31/573 (2006.01)
A61P 11/02 (2006.01)

(54) ПРИМЕНЕНИЕ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩЕЙ ЦИНЕОЛ В КАЧЕСТВЕ АКТИВНОГО ВЕЩЕСТВА, ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ И/ИЛИ ЛЕЧЕНИЯ ПОЛИПОВ НОСА (POLYPOSIS NASI ET SINUUM)

(31) 10 2015 013 667.4; 10 2015 013 921.5; 10 2015 119 541.0

(32) 2015.10.23; 2015.10.26; 2015.11.12

(33) DE

(43) 2018.09.28

(86) PCT/EP2016/064161

(87) WO 2017/067677 2017.04.27

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**МАРИЯ КЛЕМЕНТИНЕ
МАРТИН КЛОСТЕРФРАЗ
ФЕРТРИБСГЕЗЕЛЛЬШАФТ МБХ
(DE)**

(72) Изобретатель:
**Ункауф Маркус, Волленберг Барбара,
Прис Ральф (DE)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) TRIPTI MISHRA ET AL.: "Composition and in vitro cytotoxic activities of essential oil of Hedychium spicatum from different geographical regions of western Himalaya by principal components analysis", NATURAL PRODUCT RESEARCH, vol. 30, no. 10, 21 July 2015 (2015-07-21), pages 1224-1227, XP055296775, GB ISSN: 1478-6419, DOI: 10.1080/14786419.2015.1049176 figure 1

Tripti Mishra ET AL.: "SUPPLEMENTARY MATERIAL Composition and in vitro cytotoxic activities of essential oil of Hedychium spicatum from different geographical region of Western Himalaya by principal component analysis", 21 July 2015 (2015-07-21), pages 1-10, XP055296780, Retrieved from the Internet: URL: http://www.tandfonline.com/doi/suppl/10.1080/14786419.2015.1049176/suppl_file/gnpl_a_1049176_sm3874.pdf [retrieved on 2016-08-22] table S1 figure S3

PAR STJARNE ET AL.: "A Randomized Controlled Trial of Mometasone Furoate Nasal Spray for the Treatment of Nasal Polyposis", ARCHIVES OF OTOLARYNGOLOGY HEAD AND NECK SURGERY., vol. 132, no. 2, February 2006 (2006-02), page 179, XP055297649, US ISSN: 0886-4470, DOI: 10.1001/archotol.132.2.179 the whole document

(57) Изобретение относится к применению фармацевтической композиции, содержащей цинеол в качестве активного вещества, для получения лекарственного средства для профилактики и/или лечения полипов носа (Polyposis nasi et sinuum).

B1**034592****034592****B1**

Настоящее изобретение относится к практической области лечения или терапии полипов носа (согласно медицинской терминологии и синонимично обозначаемых также как *Polyposis nasi et sinuum* или укороченно только как *Polyposis nasi*).

Настоящее изобретение предпочтительно относится к применению фармацевтической композиции для профилактики и/или лечения полипов носа (*Polyposis nasi et sinuum*).

При этом настоящее изобретение относится к применению лекарственного средства, содержащего цинеол, в частности 1,8-цинеол, для профилактики и/или лечения полипов носа (*Polyposis nasi et sinuum*).

Наконец, настоящее изобретение относится к применению фармацевтической композиции, содержащей цинеол, в частности 1,8-цинеола, для регуляции сигнального пути Wnt, в частности пути сигнальной трансдукции "Wnt/бета-катенин", для профилактики и/или лечения полипов носа (*Polyposis nasi et sinuum*), или к применению цинеола, в частности 1,8-цинеола, для профилактики и/или лечения связанных с сигнальным путем Wnt, в частности с путем сигнальной трансдукции "Wnt/бета-катенин", и/или таким образом индуцируемых и/или стимулируемых заболеваний, в частности полипов носа (*Polyposis nasi et sinuum*).

Полипы носа представляют собой, в частности, мягкие, в общем случае доброкачественные (*benigna*) разрастания слизистой оболочки носа, которые, как правило, вдаются в полости носа. Они вырастают, так сказать, из слизистой оболочки носа, с которой они связаны своего рода ножкой. Многие полипы носа имеют размер только несколько миллиметров и не мешают или почти не мешают, тогда как другие полипы могут вырастать до расширенных образований, которые затем могут занимать даже носовые пространства. Так как это ограничивает дыхание через нос, то заболевание может быть очень обременительным и чрезвычайно ухудшать качество жизни. Кроме того, полипы носа могут вести - помимо помехи дыханию через нос - также к потере обоняния и другим заболеваниям околоносовых пазух, как указано далее.

Следовательно, пациенты с полипами носа большей частью характеризуются ограниченным дыханием через нос: эти пациенты не получают через нос достаточно воздуха и вследствие этого более часто дышат через рот. Поэтому эти пациенты чаще храпят и часто страдают расстройствами сна, так что в целом их работоспособность является ограниченной. Кроме того, воздух, вдыхаемый через рот, не фильтруется, что повышает общую опасность инфицирования. Пациенты часто испытывают чувство так называемого постоянно заложенного носа, что может вести также к гнусавому голосу. Кроме того, эти пациенты часто страдают возвратными воспалениями околоносовых пазух (*Sinusitis*) и тупыми головными болями. К тому же может ограничиваться их обоняние и вследствие этого также вкусовое ощущение, что, в свою очередь, приводит к потере качества жизни. Полипы носа у детей могут, кроме того, вызывать также воспаление среднего уха (*Otitis media*).

Таким образом, полипы носа с патофизиологической точки зрения в общем случае представляют собой бледно-серого цвета выпячивания на ножке хронически воспаленной и отечной слизистой оболочки в полости носа, которые преобладающим образом происходят из области решетчатой кости, среднего носового хода и средней носовой раковины, т.е. доброкачественные разрастания, которые происходят из устойчиво воспаленной слизистой оболочки носа. Эти выпячивания состоят в общем случае из слизистой оболочки, которая происходит, в частности, из клеток решетчатой кости или из гайморовых пазух. В микроскопическом отношении можно наблюдать включения жидкостей и аутологичные воспаленные клетки. В качестве первичной локализации удалось идентифицировать слизистую оболочку средней носовой раковины, а также среднего носового хода, причем еще не ясно, почему нижняя носовая раковина в общем случае не проявляет склонности к образованию полипов.

Полипы носа гистологически вследствие отека и/или фиброза отличаются уменьшенной васкуляризацией, а также уменьшенным числом желез и нервных окончаний при частом наличии поврежденного эпителия. При гистологической обработке полипов носа может осуществляться грубое разделение на эозинофильные полипы, которые приблизительно соответствуют от 65 до 90% случаев клинического материала, и нейтрофильные полипы. Повышенная тканевая эозинофилия лежит в основе повышенной трансэндотелиальной миграции и ингибирования запрограммированной смерти клеток в эозинофилах.

Клинически воспаление с доминированием эозинофилов, обозначаемое *Polyposis nasi et sinuum*, в числе случаев до 25% сопровождается непереносимостью ацетилсалициловой кислоты. В числе случаев до 40% *Polyposis nasi et sinuum* ассоциируется с бронхиальной астмой. Если эти факторы выступают совместно, то говорят о синдроме Замтера или Видаля. Также описаны уверенные связи между эозинофильной формой *Polyposis nasi et sinuum* и синдромом Черга-Штраус, то есть эозинофильной формой иммуноваскулита.

Точный механизм возникновения полипов носа еще не известен: полип носа растет преимущественно в околоносовых пазухах, выходя в главную полость носа. В основном полипы носа образуются в гайморовой пазухе (*Sinus maxillaris*) или в клетках решетчатой кости (*Cellulae ethmoidales*). Они выходят из выводных протоков и в большинстве случаев находятся в среднем носовом ходе под средней носовой раковиной.

Полипы носа широко распространены. Однако точные причины их возникновения еще не ясны. В настоящее время известно, что существует несколько базовых заболеваний, в случае которых у пациен-

тов чаще развиваются полипы носа (например, у пациентов с бронхиальной астмой, у которых в числе случаев до 40% наблюдаются также полипы носа, или у пациентов с аллергической реакцией к ацетилсалициловой кислоте, у которых в числе случаев около 25% развиваются полипы носа).

Другим фактором риска образования полипов носа представляется также общая склонность (предрасположение) слизистой оболочки к воспалению. Кроме того, к другим факторам риска возникновения полипов носа относятся указанные ранее аллергия на анальгетики, бронхиальная астма, бронхит, синдром Картагенера и муковисцидоз (кистозный фиброз).

Касательно дальнейших подробностей картины заболевания полипами носа (*Polyposis nasi et sinuum*) можно, например, сослаться также на издание "Pschyrembel, Medizinisches Wörterbuch, 257. Auflage, 1993, Verlag Walter de Gruyter", ключевое слово "Nasendpolypen" (полипы носа) и "Polyposis nasi", а также на издание "Roche Lexikon Medizin, 3. Auflage, 1993, Urban & Schwarzenberg Verlag", ключевое слово "Nasendpolyp" (полип носа) и "Polyposis" (полипоз).

Лечение полипов носа (*Polyposis nasi et sinuum*), в частности длительное лечение, на основе традиционных способов лечения часто оказывается трудным и мало эффективным, в частности, вследствие высокой частоты рецидивов, и для пациентов связано большей частью с нежелательными побочными действиями и проблемами.

В зависимости от силы жалоб на полипы носа осуществляют консервативное, предпочтительно медикаментозное лечение или оперативное лечение полипов носа.

Так как полипы носа растут медленно, то пациенты часто привыкают к симптомам и обращаются за врачебной помощью, как правило, только в относительно поздний момент. При этом острые жалобы могут смягчаться традиционными лекарственными формами.

Так, например, оперативное удаление полипов носа часто может быстро облегчать острые жалобы; тем не менее приблизительно у 75% пациентов, излеченных таким образом, в первые годы после удаления снова образуются полипы носа. Поэтому на предшествующем уровне техники после операции по удалению полипов носа предусмотрено продолжительное применение кортикостероидов топически (например, в виде кортизонсодержащих назальных спреев) или системно (что сопровождается множеством нежелательных побочных действий) для предотвращения нового появления полипов в носу (что часто, однако, не достигается).

В случаях слабо выраженных заболеваний можно, напротив, сначала лечить консервативно топически и/или системно введением кортикостероидов или глюкокортикоидов. Кортикостероиды и глюкокортикоиды препятствуют воспалению и смягчают таким образом воспалительные реакции, к которым относится также набухание слизистой оболочки носа. При такой кортикостероидной терапии кортикостероиды применяют, как правило, в течение нескольких месяцев. Часто симптомы улучшаются уже после применения в течение нескольких недель.

В частности, полипы носа, сопровождаемые эозинофилией, отличаются тяжелой воспалительной реакцией, которая отличается цитокинами (такими как IL-5) и хемокинами (такими как эотаксин и RANTES). Кортикостероиды, как правило, особенно эффективно действуют в случае воспаления, ассоциированного с эозинофилией, почему параметр "эозинофилия" часто воспринимается в качестве индикатора для применения этого лекарственного средства. Так удалось подтвердить, что стероиды индуцируют апоптоз этих воспаленных клеток, причем сила супримирующего действия на продуцирование IL-5 из Т-клеток может быть решающим параметром. Симптоматическое лечение полипов носа удалось осуществить уже благодаря исследованиям с первыми топически применяемыми кортикостероидами. В последние годы клинические наблюдения все в большей степени поддерживаются объективными параметрами (риноманометрия, ринометрия, пиковая скорость вдоха через нос PNIF, магнитно-резонансная томография). Частоту рецидивов или время появления рецидивов после операции в некоторых исследованиях удалось также улучшить или изменить в надлежащую сторону, причем исследования по длительности не превосходили года. Принятое в исследовании дозирование топически применяемых стероидов часто превышает дозирование, рекомендованное в случае аллергического ринита.

Однако хирургическое лечение (например, инфундибулотомия) преимущественно необходимо для того, чтобы активно воздействовать на затруднение дыхания через нос и потерю обоняния. Операции такого рода осуществляются, в частности, эндоназально и предпочтительно с минимальным вмешательством и могут обеспечивать степень излечения приблизительно до 50% и снижение жалоб приблизительно до 90% случаев. Наряду с удалением полипов носа обычно дополнительно расширяются также выводные протоки околоносовых пазух, так что они лучше вентилируются и должны воспалиться с меньшей легкостью. Так как полипы носа и хронические полипозные заболевания придаточных полостей проявляют склонность к рецидивам, часто по ходу болезни требуется осуществление нескольких операций. Такого рода операции с минимальным вмешательством в придаточные полости относятся к вмешательствам в ЛОР-область, предъявляющим повышенные требования, и для пациентов связаны с многократностью многодневных пребываний в больнице и с интенсивным дополнительным лечением, в которое, в частности, входит назначение топически применяемых кортикостероидов в течение нескольких месяцев в порядке осуществления профилактики рецидивов. При многомесячной послеоперационной стероидной терапии может проявляться также улучшенное заживление ран после хирургического лече-

ния; при этом контролируемые исследования заживления ран после операций на синусе не осуществляются.

Касательно дальнейших подробностей лечения полипов носа (*Polypsis nasi et sinuum*) можно, например, сослаться также на соответствующие директивы "Риносинусит" и "Диагноз и лечение синусита и *Polypsis nasi*" общества "Немецкое общество оториноларингологии и хирургии головы и шеи".

Концепции лечения предшествующего уровня техники основываются на оперативных способах удаления полипов носа и/или на концепциях консервативного лечения, основанных на кортикостероидах, причем эти способы предшествующего уровня техники связаны со значительными проблемами и побочными действиями, касающимися пациентов. В частности, в случае концепций лечения предшествующего уровня техники часто не может эффективным образом предотвращаться рецидивирование полипов носа, в частности также после послеоперационного состояния, так что пациенты должны подвергаться несколько раз оперативным вмешательствам по поводу рецидивирующих полипов носа. Кроме того, концепции консервативного лечения на основе кортикостероидов являются нежелательными, в частности, в случае послеоперационных состояний, особенно при лечении детей, в частности детей раннего возраста, вследствие значимого профиля побочных действий этих активных веществ.

Поэтому проблема, лежащая в основе настоящего изобретения, состоит в разработке концепции лечения нового типа для профилактики и/или лечения полипов носа (*Polypsis nasi et sinuum*), причем описанные ранее недостатки предшествующего уровня техники должны быть, по меньшей мере, в значительной степени устранены или, по меньшей мере, ослаблены.

В частности, такая концепция лечения по сравнению с традиционными способами лечения должна быть связана с меньшим числом побочных действий и/или проблем, касающихся пациентов, и/или обеспечивать, по меньшей мере, сравнимую и предпочтительно даже улучшенную эффективность.

Для решения ранее указанной проблемы в настоящем изобретении предложено применение фармацевтической композиции, содержащей цинеол в качестве активного вещества, для получения лекарственного средства для профилактики и/или лечения полипов носа (*Polypsis nasi et sinuum*).

При этом в случае последующих вариантов осуществления само собой подразумевается, что варианты исполнения, варианты осуществления, преимущества и прочие особенности, которые далее с целью избежания повторов изложены только в отношении одного аспекта настоящего изобретения, соответственно имеют силу также в отношении остальных аспектов изобретения без необходимости упоминать об этом особо.

В случае любых указанных далее данных в относительных процентах или в процентах по массе, в частности в случае количественных данных, следует обращать внимание на то, что они по настоящему изобретению специалистами в данной области техники выбираются так, что их сумма с учетом всех компонентов или ингредиентов, в частности, указанных далее, всегда составляет или равна 100 или 100 мас.%; это обстоятельство подразумевается специалистами само собой.

В остальном действует положение, что специалисты в данной области техники - в зависимости от применения или конкретного случая - могут отклоняться от приведенных далее в качестве примеров данных по массе, количеству и интервалам, не выходя за пределы патентной охраны настоящего изобретения.

Кроме того, действует положение, что все указанные далее значения или параметрические данные или тому подобные характеристики принципиально могут быть найдены или определены нормализованными или стандартизованными или конкретно указанными способами определения или в ином случае способами определения или измерения, традиционно применяемыми специалистами в данной области техники.

Настоящее изобретение далее подробно поясняется с учетом приведенных предпосылок.

Таким образом, объект настоящего изобретения представляет собой применение фармацевтической композиции, содержащей цинеол в качестве активного вещества, для получения лекарственного средства для профилактики и/или лечения полипов носа (*Polypsis nasi et sinuum*), причем композиция в качестве активного вещества, предпочтительно в качестве фармацевтически активного вещества, содержит цинеол, предпочтительно 1,8-цинеол.

Настоящее изобретение и концепция лечения по настоящему изобретению для лечения полипов носа связаны со множеством преимуществ и особенностей, которые - неограничительным образом, не претендующим на полноту - указаны далее.

В рамках настоящего изобретения может быть впервые разработана концепция лечения нового типа для профилактики и/или лечения полипов носа (*Polypsis nasi et sinuum*), в случае которой описанные ранее недостатки предшествующего уровня техники могут быть, по меньшей мере, в значительной степени устранены или, по меньшей мере, ослаблены. В частности, концепция лечения по настоящему изобретению по сравнению с традиционными способами лечения связана с меньшим числом побочных действий и/или проблем, касающихся пациентов, причем в рамках настоящего изобретения обеспечена, по меньшей мере, сравнимая и предпочтительно даже улучшенная эффективность по сравнению с концепцией лечения предшествующего уровня техники.

Заявителем неожиданно было найдено, что в случае активного вещества в виде цинеола, в частно-

сти 1,8-цинеола, при лечении полипов носа можно достигать почти сравнимых результатов, как и при применении глюкокортикоидов, причем цинеол в качестве природного активного вещества не вызывает серьезные побочные действия, связанные с кортикостероидами. При этом цинеол может быть использован в качестве единственного лечебного средства или же при лечении серьезных случаев также в комбинации с кортикостероидами, причем благодаря совместному или комбинированному применению с цинеолом их действие даже усиливается и их доза может быть значительно уменьшена (при этом при той же самой эффективности).

Как представлено далее, в частности, может быть значительно уменьшена частота рецидивов при лечении послеоперационных состояний.

При этом также следует принять во внимание, что активное вещество в виде цинеола в рамках настоящего изобретения можно вводить топически (например, интраназально и/или системно (например, перорально)). Как при топическом, при котором цинеол в общем случае наносят непосредственно на слизистые оболочки носа, так и при системном применении (например, перорально) применение приобретает противовоспалительный, кортикостероидоподобный профиль действия цинеола.

Заявителем также неожиданно было найдено, что согласно концепции по настоящему изобретению можно эффективным образом лечить, в частности, рецидивирующие формы полипов носа, которые в случае традиционной концепции лечения до настоящего времени не могли быть или не всегда удовлетворительно могли быть излечены.

В последующем также указано, что согласно концепции лечения по настоящему изобретению можно прямо лечить также формы полипов носа, связанные с сигналом Wnt, в частности с путем сигнальной трансдукции "Wnt/бета-катенин", в частности рецидивирующие формы, которые согласно традиционной концепции лечения предшествующего уровня техники до настоящего времени не могли быть эффективным образом удовлетворительно излечены.

Поэтому, в целом, в настоящем изобретении представлена эффективная и приемлемая для гибкого применения концепция лечения, которая основана на природном активном веществе (а именно на цинеоле и предпочтительно на 1,8-цинеоле), с которым не связаны существенные нежелательные побочные действия. В частности, концепция лечения по настоящему изобретению может также эффективным и гибким образом комбинироваться с традиционными концепциями лечения; так, например, концепция лечения по настоящему изобретению может быть использована после хирургического удаления полипов носа для предотвращения появления рецидивов или же концепция лечения по настоящему изобретению может комбинироваться с традиционными системно и/или топически применяемыми кортикостероидами, в частности, при условии, что их действие усиливается и их доза уменьшается (и, следовательно, уменьшается также профиль побочного действия этих кортикостероидов).

Что касается применяемого в рамках настоящего изобретения природного активного вещества в виде цинеола, в частности 1,8-цинеола, то в связи с этим необходимо привести следующие сведения.

1,8-Цинеол принадлежит к бициклическим эпоксимонотерпенам, более точно называемым лимонен-оксидом. 1,8-Цинеол с химической брутто-формулой $C_{10}H_{18}O$ синонимично обозначают как эвкалиптол, лимонен-1,8-оксид, 1,8-эпокси-п-ментан или 1,3,3-триметил-2-оксабицикло[2.2.2]октан. Он представляет собой бесцветную жидкость с пряным, камфороподобным запахом, с температурой плавления $+1,5^{\circ}C$, с температурой кипения от 176 до $177^{\circ}C$, нерастворимую в воде, но смешивающуюся с большинством органических растворителей. Естественно, 1,8-цинеол выступает в качестве главной составляющей части эвкалиптового масла (эвкалиптовое масло содержит до 85 мас.% 1,8-цинеола), а также в случае других растений, таких как, например, мята, шалфей, тимьян, базилик и чайный куст. Кроме того, 1,8-цинеол содержится, например, в масле бледно-древесной мелалеуки, можжевельном, перечном, конопляном масле, масле капутового дерева, шалфейном масле, миртовом масле и в других эфирных маслах. Технический 1,8-цинеол, чистота которого в общем случае составляет 99,6-99,8%, в общем случае получают фракционной перегонкой эвкалиптового масла. 1,8-Цинеол на предшествующем уровне техники применяют, в частности, в качестве отхаркивающего средства при воспалениях бронхов и других заболеваниях дыхательных путей преимущественно в ветеринарии, но, кроме того, также в качестве ароматизатора в парфюмерной промышленности. Кроме того, 1,8-цинеол используют в стоматологии при ревизии пломб корневого канала.

В фармакологическом отношении 1,8-цинеол в верхних и нижних дыхательных путях, в частности в легких и околоносовых пазухах, оказывает муколитическое и бактерицидное действие. Кроме того, он ингибирует некоторые нейромедиаторы, которые являются, например, ответственными за сужение бронхов (при хронических обструктивных заболеваниях легких и бронхиальной астме введением чистого 1,8-цинеола может быть улучшена функция легких). Вследствие своего кортикостероидоподобного действия цинеол может применяться в качестве замещающего средства в дополнение или в порядке дополнительной лекарственной терапии с кортикостероидами. 1,8-цинеол - как указано далее - принципиально может применяться как топически, например (интра)назально и/или путем ингаляции, так и системно, в частности перорально (например, в виде капсул).

В качестве активного вещества 1,8-цинеол обладает как муколитическим, так и противовоспалительным действием. При системном применении 1,8-цинеол легко резорбируется и попадает через кро-

вяное русло в органы дыхания, где оказывает действие. Таким образом, 1,8-цинеол может, например, разжижать в дыхательных путях секреты, выделяемые при воспалении, а также вязкую слизь и противодействовать воспалительным процессам в дыхательных путях. В области верхних дыхательных путей уменьшается помеха дыханию через нос при насморке и обнублияция сознания.

Касательно дальнейших подробностей о 1,8-цинеоле как об активном веществе можно, например, сослаться на издание "Rompp Chemielexikon, Georg Thieme Verlag, Stuttgart/New York, 10. Auflage, Band 1, 1996", с. 752, ключевое слово: "Cineol" (цинеол), а также на указанные там литературные источники.

Заявителем в рамках его многолетних научных исследований неожиданно было найдено другое заболевание, которое активным веществом на природной основе в виде цинеола, в частности 1,8-цинеола, эффективно и без побочных действий может излечено, а именно полипы носа (Polyposis nasi et sinuum), в частности также формы полипов носа, склонные к появлению рецидивов.

В частности, в рамках настоящего изобретения композиция по настоящему изобретению и/или цинеол могут быть использованы для профилактики и/или лечения рецидивирующих форм полипов носа (Polyposis nasi et sinuum). Формы заболеваний такого рода не поддаются лечению традиционными способами лечения в удовлетворительной степени.

Согласно предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения композицию по настоящему изобретению и/или цинеол применяют для профилактики и/или лечения связанных с сигнальным путем Wnt, в частности с путем сигнальной трансдукции "Wnt/бета-катенин", форм полипов носа (Polyposis nasi et sinuum), предпочтительно для профилактики и/или лечения индуцируемых и/или стимулируемых сигнальным путем Wnt, в частности путем сигнальной трансдукции "Wnt/бета-катенин", форм полипов носа (Polyposis nasi et sinuum).

Такого рода формы или состояния полипов носа до настоящего времени в случае традиционных концепций лечения не могли быть или не всегда могли быть удовлетворительно обработаны или излечены.

Так называемый сигнальный путь Wnt, в частности путь сигнальной трансдукции "Wnt/бета-катенин", является одним из многих путей сигнальной трансдукции, посредством которого клетки могут реагировать на внешние сигналы. Этот сигнальный путь назван по своему лиганду "Wnt", то есть по сигнальному белку, который в качестве локального медиатора исполняет важную функцию при развитии различных животных клеток.

Собственно аббревиатура "Wnt" исторически основана и состоит из компонент "Wg", с одной стороны, и "Int-1", с другой стороны. Элемент аббревиатуры "W" происходит от сокращения "Wg", который, в свою очередь, происходит от английского слова "wingless" (бескрылая), и означает фактор роста семейства Wnt, который был открыт первым (когда ген Wg мутирует, то возникает бескрылый вариант дрозофилы *Drosophila melanogaster*). Элемент аббревиатуры "nt" происходит от названия гена "ген Int", который при его активации в случае мыши стимулирует и запускает развитие рака молочной железы. В целом идентифицированы 19 различных генов Wnt.

К сигнальной трансдукции сигнального пути Wnt причастно множество белков. Он является существенным для нормального развития эмбриона (эмбриогенеза) и обнаруживается также при некоторых формах рака. Согласно современному состоянию знаний сигнальный белок Wnt связывается с рецептором "Frizzled" (совместно с корецептором "LRP" [low-density lipoprotein receptor-related protein (белок, родственник рецептору липопротеина низкой плотности)]), который активирует белок "Dishevelled" (DVL), который, в свою очередь, ингибирующим образом действует на белковый комплекс (в который входит GSK-3 [протеинкиназа], белок-супрессор опухоли APC и белок аксин-1), который, как правило, расщепляет бета-катенин. Так как деградация бета-катенина ингибируется, то он собирается в цитоплазме и в клеточном ядре. В клеточном ядре бета-катенин с TCF/LEF образует белковый комплекс и активирует таким образом специфические целевые гены. Ген APC представляет собой ген-супрессор опухоли, который сначала был найден мутированным при некоторых видах рака кишки, однако этот ген может мутировать также при других видах рака; ген APC кодирует белок APC, который в сигнальном пути Wnt является причастным к деградации бета-катенина.

Сигнальный путь Wnt имеет значение во многих процессах в рамках развития эмбриона (эмбриогенеза), таких как, например, образование оси тела и закладка органов. Во взрослых клетках в противоположность этому он преимущественно является неактивным, а в опухолевых клетках он может снова находиться в активированном состоянии.

В клетках, в которых сигнальный путь Wnt не активен, бета-катенин находится связанным в комплекс, который ведет к тому, что бета-катенин постоянно разлагается; таким образом, бета-катенин ограничен в возможности активировать транскрипцию некоторых генов. Этот комплекс, который обозначают также как деструкционный комплекс, состоит из различных белков, причем к важнейшим белкам относятся аксин, GSK-3-протеинкиназа и белок-супрессор опухоли APC. Когда бета-катенин находится в этом комплексе, то он может связан с белком бета-TrCP и убиквитинирован; убиквитинирование ведет к тому, что бета-катенин разлагается в протеасоме. Однако когда "Wnt" связан со своим рецептором "Frizzled" и корецептором "LRP", то активируется белок "DVL", который ингибирует деструкционный комплекс; бета-катенин высвобождается и больше не может быть разложен, а аккумулируется и попадает

также в клеточное ядро, где он совместно с другими белками связывается с фактором транскрипции, который таким образом активируется, что, в свою очередь, проявляется в транскрипции различных генов (например, циклина D1 и MYC).

В этой связи заявителем совершенно неожиданным образом было найдено, что соответствующие формы или варианты проявления рассматриваемого в настоящем изобретении заболевания (т.е. полипов носа [Polypsis nasi et sinuum]) связаны с обсуждаемым сигнальным путем Wnt, в частности с путем сигнальной трансдукции "Wnt/бета-катенин", а именно, в частности, в той степени, что соответствующие формы заболевания (т.е. полипы носа) связаны с активацией рассматриваемого сигнального пути и таким образом индуцируются, и, в частности, в той степени, что заболевание в его течении ускоряется и стимулируется вредным для пациентов способом.

При этом, в частности, заявителем совершенно неожиданно было найдено, что применяемый в рамках настоящего изобретения в качестве активного вещества цинеол, в частности 1,8-цинеол, в состоянии влиять на сигнальный путь Wnt, в частности на путь сигнальной трансдукции "Wnt/бета-катенин", и, в частности, на ингибирование, что происходит с уменьшенной пролиферацией клеток, связанных с рассматриваемыми в настоящем изобретении формами заболевания (т.е. с полипами носа), и, таким образом, обеспечивает благоприятный прогноз течения заболевания у пациентов. Другими словами, в рамках настоящего изобретения впервые и совершенно неожиданным образом было найдено, что цинеол, в частности 1,8-цинеол, действует в качестве ингибитора и супрессора сигнального пути Wnt, в частности пути сигнальной трансдукции "Wnt/бета-катенин", что ведет к соответствующей фармакологической эффективности в отношении рассматриваемого в настоящем изобретении заболевания (т.е. полипов носа).

В этой связи исследования, проведенные заявителем, показали, что цинеол, в частности 1,8-цинеол, ведет к ингибированию сигнального пути "Wnt/бета-катенин", причем, в частности, - без намерения ограничения этой теорией - в присутствии цинеола происходит уменьшение содержания активного бета-катенина, который представляет собой центральный транскрипционный белок-активатор рассматриваемого сигнального пути. В этой связи - также без намерения ограничения этой теорией - цинеол или 1,8-цинеол ведет к низкому уровню или содержанию фосфорилированной GSK-3-протеинкиназы, что ведет к усиленной активности GSK-3 и таким образом к усиленной деградации бета-катенина, сопровождающейся ингибированием и инактивацией рассматриваемого сигнального пути "Wnt/бета-катенин".

В случае GSK-3 речь идет о конститутивно активной протеинкиназе, которая, в частности, ингибируется вследствие фосфорилирования по серину-9 (GSK-3-альфа) или по серину-21 (GSK-3-бета). Уменьшение фосфорилирования GSK-3 в рамках сигнального каскада, являющегося основополагающим для сигнального пути "Wnt/бета-катенин", ведет, таким образом, к активации GSK-3 в качестве конститутивно активной протеинкиназы, что, в свою очередь, ведет к усиленному фосфорилированию и, следовательно, к инактивации и деградации бета-катенина. Впоследствии индуцированная или вызванная цинеолом инактивация сигнального пути "Wnt/бета-катенин" касательно подлежащего лечению заболевания (т.е. полипов носа) приводит к уменьшенной пролиферации клеток и, таким образом, к супрессии и излечению или ослаблению рассматриваемого в настоящем изобретении заболевания (т.е. полипов носа). В этом отношении можно сослаться также на приведенные далее пояснения.

Кроме того, применение цинеола по настоящему изобретению в случае рассматриваемого в настоящем изобретении заболевания (т.е. полипов носа) ведет - также без намерения ограничения этой теорией - к уменьшенной эндолизосомальной локализации GSK-3, что поддерживает ее пониженное ингибирование вследствие обработки цинеолом и, в свою очередь, ведет к дальнейшей инактивации бета-катенина.

Таким образом, цинеол, применяемый по настоящему изобретению, ведет применительно к рассматриваемому пути "Wnt/бета-катенин", так сказать, к двойному способу ингибирования рассматриваемого каскада, сопровождаемого ранее указанной эффективностью касательно подлежащего лечению заболевания (полипов носа).

Заявителем совершенно неожиданно также было найдено, что в случае рассматриваемого в настоящем изобретении заболевания (т.е. полипов носа) - также без намерения ограничения этой теорией - применение цинеола ведет к уменьшению активности и уменьшению экспрессии по меньшей мере одного гена, в частности, связанного с сигнальным путем "Wnt/бета-катенин", предпочтительно гена Wnt (синонимично обозначаемого также как ген WNT). В этой связи цинеол действует, в частности, в качестве регулятора, предпочтительно ингибитора и/или супрессора, рассматриваемых генов или генетических продуктов, в частности белков, в частности по меньшей мере одного гена Wnt и/или белка Wnt (синонимично обозначаемого также как WNT-белок). В общем случае регуляция, в частности ингибирование и/или супрессия, может осуществляться на уровне генов, транскрипции, трансляции и/или белка. В этой связи заявителем совершенно неожиданно было найдено, что пониженная активность сигнального пути "Wnt/бета-катенин" ведет, в частности, к уменьшенному прогрессированию клеток в случае рассматриваемого в настоящем изобретении заболевания (т.е. полипов носа).

Таким образом, в порядке обобщения согласно настоящему изобретению впервые было найдено, что цинеол, в частности 1,8-цинеол, может ингибировать активность пути "Wnt/бета-катенин" с фарма-

кологической активностью в отношении рассматриваемого в настоящем изобретении заболевания (полипов носа). Таким образом, согласно настоящему изобретению впервые был показан новый фармакологический механизм действия цинеола как природного активного вещества. Найденный механизм действия цинеола с наблюдаемой эффективностью в отношении рассматриваемого в настоящем изобретении заболевания (т.е. полипов носа) убедительным образом подтверждается исследованиями и изысканиями, осуществленными заявителем, что в дальнейшем подробно показано в рамках примеров осуществления.

Согласно другому предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения композицию по настоящему изобретению и/или цинеол применяют для профилактики и/или лечения связанных с сигнальным путем Wnt, в частности с путем сигнальной трансдукции "Wnt/бета-катенин", рецидивирующих форм полипов носа (Polypsis nasi et sinuum), предпочтительно для профилактики и/или лечения индуцируемых и/или стимулируемых сигнальным путем Wnt, в частности путем сигнальной трансдукции "Wnt/бета-катенин", рецидивирующих форм полипов носа (Polypsis nasi et sinuum).

При этом, как указано далее, применение цинеола, в частности 1,8-цинеола, в рамках концепции лечения по настоящему изобретению эффективным образом уменьшает или минимизирует возникновение рецидивов.

Согласно еще одному особенному варианту осуществления настоящего изобретения композиция по настоящему изобретению и/или цинеол применяют для профилактики и/или лечения послеоперационных состояний.

В частности, в этой связи композиция по настоящему изобретению или цинеол могут быть использованы в качестве замещающего средства или для дополнительной лекарственной терапии с кортикостероидами, причем благодаря применению цинеола появление рецидивов может быть эффективно предотвращено или, по меньшей мере, минимизировано.

В частности, композиция по настоящему изобретению и/или цинеол могут быть использованы для профилактики и/или лечения полипов носа (Polypsis nasi et sinuum), предпочтительно в случае рецидивирующих форм, после предшествовавшего хирургического удаления полипов носа.

Согласно еще одному особенному варианту осуществления настоящего изобретения композиция по настоящему изобретению и/или цинеол могут быть использованы для уменьшения риска или вероятности появления рецидивов, в частности, в случае послеоперационных состояний и/или состояний после предшествовавшего хирургического удаления полипов носа.

В частности, композиция по настоящему изобретению и/или цинеол могут быть использованы для профилактики рецидивов, в частности в случае послеоперационных состояний и/или состояний после предшествовавшего хирургического удаления полипов носа.

По настоящему изобретению предпочтительным является вариант, когда композиция по настоящему изобретению содержит цинеол в виде чистого вещества, которое предпочтительно не содержит других терпенов, преимущественно с чистотой по меньшей мере 95 мас.%, в частности по меньшей мере 96 мас.%, предпочтительно по меньшей мере 97 мас.%, более предпочтительно по меньшей мере 98 мас.%, значительно более предпочтительно по меньшей мере 99 мас.% и еще более предпочтительно по меньшей мере 99,5% в расчете на цинеол. Таким образом, можно эффективно предотвращать и исключать нежелательные побочные действия вследствие возможного наличия других ингредиентов, в частности примесей.

Другими словами, по настоящему изобретению предпочтительным является вариант, когда в составе композиции по настоящему изобретению цинеол находится и/или применяется в виде чистого вещества или когда цинеол свободен от других терпенов и/или не содержит других терпенов.

Таким образом, в рамках настоящего изобретения предпочтительным является вариант, когда применяемый цинеол имеет чистоту по меньшей мере 95 мас.%, в частности по меньшей мере 96 мас.%, предпочтительно по меньшей мере 97 мас.%, более предпочтительно по меньшей мере 98 мас.%, еще более предпочтительно по меньшей мере 99 мас.% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 99,5 мас.% в расчете на цинеол.

Согласно особенно предпочтительному варианту осуществления композиция по настоящему изобретению содержит цинеол в виде 1,8-цинеола или цинеол находится в виде 1,8-цинеола.

Согласно предпочтительному варианту осуществления цинеол может находиться в форме с липосомальной оболочкой и/или липосомальной упаковкой. Благодаря этому достигается особая эффективность и особым способом защищается цинеол.

Предпочтительным является вариант, когда композиция по настоящему изобретению содержит цинеол в качестве единственного активного вещества, в частности в качестве единственного фармацевтически активного вещества, и/или когда цинеол применяют в качестве единственного активного вещества, в частности в качестве единственного фармацевтически активного вещества. Таким образом, можно избежать нежелательные побочные действия и взаимодействия.

Согласно еще одному особенному варианту осуществления настоящего изобретения может быть предусмотрено, что композиция по настоящему изобретению не содержит нестероидных ингибиторов воспаления (NSAID) и/или свободна от нестероидных ингибиторов воспаления (NSAID) и/или цинеол применяют и/или вводят без нестероидных ингибиторов воспаления (NSAID) и/или в их отсутствие. Та-

ким образом можно избегать нежелательные побочные действия NSAID и непредсказуемые взаимодействия с цинеолом.

В рамках настоящего изобретения композиция по настоящему изобретению содержит цинеол в эффективных, предпочтительно в фармацевтически эффективных количествах.

Количество цинеола в композиции по настоящему изобретению, в частности, в зависимости от лекарственной формы (например, для применения топически или системно) и тяжести и своеобразия подлежащего лечению заболевания может изменяться в широких пределах. По настоящему изобретению предпочтительно может быть предусмотрено, что композиция по настоящему изобретению содержит цинеол в расчете на композицию в относительном количестве в интервале от 0,0001 до 80 мас.%, в частности от 0,001 до 75 мас.%, преимущественно от 0,005 до 70 мас.%, предпочтительно от 0,01 до 60 мас.%, более предпочтительно от 0,05 до 55 мас.% и особенно предпочтительно от 0,1 до 50 мас.%. Таким образом, обеспечивается хорошая эффективность, с одной стороны, и хорошая переносимость, с другой стороны. Тем не менее, может быть предусмотрено отклонение от указанных значений без выхода за пределы патентной охраны настоящего изобретения; такое отклонение в каждом конкретном случае осуществляется по усмотрению специалистов в данной области техники.

По настоящему изобретению предпочтительно может быть предусмотрено, что композиция по настоящему изобретению содержит цинеол в расчете на композицию в относительном количестве по меньшей мере 0,0001 мас.%, в частности по меньшей мере 0,001 мас.%, преимущественно по меньшей мере 0,005 мас.%, предпочтительно по меньшей мере 0,01 мас.%, более предпочтительно по меньшей мере 0,05 мас.% и особенно предпочтительно по меньшей мере 0,1 мас.%.

Кроме того, по настоящему изобретению предпочтительно может быть предусмотрено, что композиция по настоящему изобретению содержит цинеол в расчете на композицию в относительном количестве не более 80 мас.%, преимущественно не более 75 мас.%, предпочтительно не более 70 мас.%, более предпочтительно не более 60 мас.%, особенно предпочтительно не более 55 мас.% и наиболее предпочтительно не более 50 мас.%.

Обычно предусматривают, что композиция по настоящему изобретению содержит цинеол совместно по меньшей мере с одним физиологически приемлемым носителем (эксципиентом) или цинеол применяют совместно по меньшей мере с одним физиологически приемлемым носителем (эксципиентом). При этом принципиально можно применять любые физиологически приемлемые носители (эксципиенты). В частности, предпочтительным является вариант, когда применяемый носитель (эксципиент) может смешиваться с 1,8-цинеолом и/или растворяться в нем и/или носитель (эксципиент) при 20°C и атмосферном давлении находится в жидком или твердом агрегатном состоянии. Примеры носителей (эксципиентов), которые могут смешиваться с 1,8-цинеолом и/или растворяться в нем и, в частности, при 20°C и атмосферном давлении являются жидкими, представляют собой, например, соединения из группы жирных масел, предпочтительно триглицериды, более предпочтительно триглицериды с цепями средней длины (Medium Chain Triglycerides, MCT) и особенно предпочтительно триглицериды с остатками жирных кислот C₆-C₁₂.

В рамках настоящего изобретения может быть предусмотрено, что композицию по настоящему изобретению применяют топически или системно и композицию по настоящему изобретению адаптируют для топического или системного применения.

Другими словами это означает, что в рамках настоящего изобретения цинеол применяют топически или системно и цинеол адаптируют для топического или системного применения.

Как уже было указано раньше, композиция по настоящему изобретению и цинеол в рамках лечения по настоящему изобретению принципиально может применяться топически (например, интраназально и/или путем ингаляции) и/или топически (например, системно) и при этом в зависимости от индивидуального лечения и применяемых для лечения форм, тяжести заболевания, особенностей пациентов и т.п.

Таким образом, по настоящему изобретению предусмотрено, что композицию по настоящему изобретению и/или цинеол применяют топически, предпочтительно интраназально или путем ингаляции, и/или композицию по настоящему изобретению и/или цинеол адаптируют для топического, предпочтительно интраназального или ингаляционного применения.

В случае топического применения композиция по настоящему изобретению и/или цинеол могут применяться в виде интраназально вводимой лекарственной формы. Это означает, что композиция по настоящему изобретению и/или цинеол могут быть приготовлены в интраназально вводимой лекарственной форме. Например, композиция по настоящему изобретению может применяться в виде назальных спреев, назальных капель, назальных гелей, назальных мазей, назальных промывок, назальных кремов, ингалятов или тому подобного и предпочтительно в виде назальных спреев. Это означает, что композиция по настоящему изобретению и/или цинеол могут быть приготовлены в виде назальных спреев, назальных капель, назальных гелей, назальных мазей, назальных промывок, назальных кремов, ингалятов или тому подобного и предпочтительно в виде назальных спреев.

Согласно другому варианту настоящего изобретения - как было указано ранее - композиция и/или цинеол могут также применяться системно, в частности перорально или парентерально (например, внутривенно, внутриапериартериально, внутримышечно, подкожно и т.п., например, в виде парентеральной лекар-

ственной формы, такой как формы для инъекции, инфузии и т.п.) и предпочтительно перорально. Таким образом, композиция по настоящему изобретению и/или цинеол могут быть в этом случае адаптированы для системного, в частности для перорального или парентерального и предпочтительно для перорального применения.

При этом композиция по настоящему изобретению и/или цинеол предпочтительно могут применяться в виде перорально вводимой лекарственной формы, т.е. композиция по настоящему изобретению и/или цинеол могут быть в этом случае приготовлены в виде перорально вводимой лекарственной формы.

В этом варианте осуществления композиция по настоящему изобретению и/или цинеол могут применяться предпочтительно в виде желудочно-резистентной, но растворимой в тонком кишечнике системно применяемой лекарственной формы, предпочтительно в виде капсул, драже, пилюль, таблеток или тому подобного, т.е. композиция по настоящему изобретению и/или цинеол могут быть в этом варианте осуществления приготовлены в виде желудочно-резистентной, но растворимой в тонком кишечнике системно применяемой лекарственной формы, предпочтительно в виде капсул, драже, пилюль, таблеток или тому подобного. При этом в этом варианте осуществления композиция по настоящему изобретению и/или цинеол могут быть приготовлены, в частности, также в форме для инъекции, инфузии или тому подобного.

В частности, в зависимости от типа применения (т.е. системно и/или топически) и тяжести и особенностей подлежащего лечению заболевания, а также от других терапевтических факторов и условий суточная доза применяемого цинеола может изменяться в широких пределах. В частности, цинеол может применяться с суточной дозой в интервале от 0,1 до 5000 мг/день, в частности в интервале от 1 до 3000 мг/день, преимущественно в интервале от 5 до 2500 мг/день, предпочтительно в интервале от 10 до 2000 мг/день и особенно предпочтительно в интервале от 50 до 1500 мг/день. Это означает, что композиция по настоящему изобретению и/или цинеол могут быть адаптированы для применения с суточной дозой в интервале от 0,1 до 5000 мг/день, в частности в интервале от 1 до 3000 мг/день, преимущественно в интервале от 5 до 2500 мг/день, предпочтительно в интервале от 10 до 2000 мг/день и особенно предпочтительно в интервале от 50 до 1500 мг/день. Тем не менее, принципиально может быть предусмотрено отклонение от указанных значений без выхода за пределы патентной охраны настоящего изобретения. Такое отклонение в каждом конкретном случае осуществляется по усмотрению специалистов в данной области техники.

При системном применении применяемое количество цинеола может также изменяться в широких пределах. Предпочтительно может быть предусмотрено, что цинеол применяют системно с суточной дозой в интервале от 10 до 5000 мг/день, в частности в интервале от 50 до 3000 мг/день, преимущественно в интервале от 100 до 2500 мг/день, предпочтительно в интервале от 150 до 2000 мг/день и особенно предпочтительно в интервале от 200 до 1500 мг/день и/или композиция по настоящему изобретению и/или цинеол могут быть адаптированы для применения с суточной дозой в интервале от 10 до 5000 мг/день, в частности в интервале от 50 до 3000 мг/день, преимущественно в интервале от 100 до 2500 мг/день, предпочтительно в интервале от 150 до 2000 мг/день и особенно предпочтительно в интервале от 200 до 1500 мг/день. Однако принципиально может быть предусмотрено отклонение от указанных значений без выхода за пределы патентной охраны настоящего изобретения (что осуществляется по усмотрению специалистов в данной области техники в каждом конкретном случае).

При топическом применении применяемые дозы цинеола также могут изменяться в широких пределах. В частности, при топическом применении может быть предусмотрено, что цинеол применяют топически с суточной дозой в интервале от 0,1 до 2000 мг/день, в частности в интервале от 0,5 до 1500 мг/день, преимущественно в интервале от 1 до 1000 мг/день, предпочтительно в интервале от 2 до 1500 мг/день и особенно предпочтительно в интервале от 5 до 1000 мг/день и композиция и/или цинеол могут быть адаптированы для применения с суточной дозой в интервале от 0,1 до 2000 мг/день, в частности в интервале от 0,5 до 1500 мг/день, преимущественно в интервале от 1 до 1000 мг/день, предпочтительно в интервале от 2 до 1500 мг/день и особенно предпочтительно в интервале от 5 до 1000 мг/день. Однако принципиально может быть предусмотрено отклонение от указанных значений без выхода за пределы патентной охраны настоящего изобретения (что осуществляется по усмотрению специалистов в данной области техники в каждом конкретном случае).

Обычно композиция по настоящему изобретению может содержать также по меньшей мере один другой ингредиент, в частности другой ингредиент, в частности по меньшей мере одно вспомогательное вещество и/или добавку. Это означает, что по настоящему изобретению цинеол применяют по меньшей мере с одним другим ингредиентом, в частности по меньшей мере с одним вспомогательным веществом и/или добавкой. В этой связи по меньшей мере один другой ингредиент, в частности вспомогательное вещество и/или добавка, могут быть предпочтительно выбраны из группы, которую составляют вспомогательные вещества, улучшающие переработку, стабилизаторы, эмульгаторы, антиоксиданты, влагоудерживающие средства, загустители, дезинфицирующие средства, регуляторы pH, вещества, буферизирующие значение pH, консерванты, антисептические средства, красители, ароматизаторы, природные душистые вещества, отдушки, разбавители, вяжущие вещества, смачиватели, витамины, олигоэлементы,

минеральные вещества, микроэлементы и/или эфирные масла, а также их комбинации.

Согласно предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения композиция по настоящему изобретению и/или цинеол могут быть использованы в качестве дополнения, предпочтительно в комбинации, с кортикостероидами, предпочтительно с системно или топически применяемыми кортикостероидами. Это означает, в случае этих вариантов осуществления композиция по настоящему изобретению и/или цинеол могут применяться в качестве дополнительного лечебного средства (вспомогательного лечебного средства), предпочтительно в качестве комбинированного лечебного средства, с кортикостероидами, в частности с системно или топически применяемыми кортикостероидами.

Таким образом, в рамках настоящего изобретения может быть предусмотрено, что композиция по настоящему изобретению и/или цинеол, в частности, в порядке дополнительного лечения или в комбинации с кортикостероидами могут применяться для уменьшения потребности в кортикостероидах или их замены при профилактике и/или лечении полипов носа (Polyposis nasi et sinuum).

В частности, в рамках настоящего изобретения может быть предусмотрено, что композиция по настоящему изобретению и/или цинеол, в частности, в порядке дополнительного лечения или в комбинации с кортикостероидами могут применяться для усиления действия и/или снижения дозы кортикостероидов при профилактике и/или лечении полипов носа (Polyposis nasi et sinuum).

Как было показано ранее, в рамках дополнительного лечения с кортикостероидами их действие может повышено, а их доза уменьшена. Следовательно, в случае дополнительного лечения с кортикостероидами может быть предусмотрено, в частности, что композицию по настоящему изобретению и/или цинеол, в частности, в порядке дополнительного лечения или в комбинации с кортикостероидами применяют для уменьшения или предотвращения побочных действий кортикостероидов при профилактике и/или лечении полипов носа (Polyposis nasi et sinuum).

Согласно другому предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения может быть предусмотрено также, что композицию по настоящему изобретению и/или цинеол не применяют в качестве дополнения, в частности в комбинации, с нестероидными ингибиторами воспаления (NSAID) и/или композицию и/или цинеол не применяют в качестве дополнительного лечебного средства (вспомогательного лечебного средства), в частности в качестве комбинированного лечебного средства, с нестероидными ингибиторами воспаления (NSAID). Таким образом, нежелательные побочные действия NSAID эффективным образом предотвращаются (тем более что их применение в рамках концепции лечения по настоящему изобретению не является необходимым).

Термин "лекарственное средство" (синонимы "фармацевтическое средство", "лекарство", "лечебное средство" и тому подобное), употребляемый в рамках настоящего изобретения, следует понимать очень широко, при этом он охватывает не только лекарственные или фармацевтические средства как таковые (т.е. в смысле средств лекарственного назначения), а прежде всего также так называемые препараты медицинского назначения и, кроме того, также гомеопатические средства и пищевые добавки. Другими словами, содержащая цинеол композиция по настоящему изобретению может, таким образом, согласно настоящему изобретению находиться в виде лекарственного средства (фармацевтического средства), препарата медицинского назначения, гомеопатического средства, пищевой добавки или тому подобного.

Касательно дальнейших подробностей этого аспекта настоящего изобретения можно сослаться на предыдущие пояснения в случае других аспектов настоящего изобретения, которые соответственно имеют силу в отношении этого аспекта настоящего изобретения.

Касательно дальнейших подробностей этого аспекта настоящего изобретения можно сослаться на предыдущие пояснения в случае других аспектов настоящего изобретения, которые соответственно имеют силу в отношении этого аспекта настоящего изобретения.

Таким образом, согласно концепции лечения по настоящему изобретению можно осуществлять терапию очень специфических и особых болезненных состояний, которые в случае традиционных лекарственных форм не поддаются простому лечению и, по меньшей мере, не таким специфическим и селективным способом действия.

Касательно дальнейших подробностей этого аспекта настоящего изобретения можно сослаться на предыдущие пояснения в случае других аспектов настоящего изобретения, которые соответственно имеют силу в отношении этого аспекта настоящего изобретения.

Другие предпочтительные свойства, аспекты и отличительные признаки настоящего изобретения следуют из приведенного далее описания и показанных на фигурах примеров осуществления, подробно описанных далее. Показано:

на фиг. 1 - гематоксилин-эозиновое (HE) окрашивание полипов носа и здоровой слизистой оболочки носа (в случае этого способа окрашивания базофильные структуры окрашиваются в сине-лиловый цвет, а эозинофильные структуры окрашиваются в светло-розовый цвет, тогда как гидрофобные структуры, такие как мембраны аппарата Гольджи, остаются неокрашенными и светлыми);

на фиг. 2 - дозозависимое уменьшение прогрессирования клеток благодаря 1,8-цинеолу (для того чтобы определить, ведет ли обработка 1,8-цинеолом к ингибированию клеточной жизнеспособности полипов носа, были проведены испытания с МТТ; сильно уменьшенную пролиферацию клеток полипов носа можно было наблюдать в качестве реакции на инкубацию с 100 мкМ 1,8-цинеола в течение 144 ч

(фиг. 2А, в случае двух разных участников испытаний I и II); неожиданным образом на культивированные клетки эпителия слизистой оболочки носа не повлияла обработка 1,8-цинеолом, что следует из контекстно-зависимого специфического механизма действия 1,8-цинеола (фиг. 2В));

на фиг. 3 - экспрессия активного бета-катенина в ответ на цинеол (для исследования действия 24-часовой обработки с 100 мкМ 1,8-цинеола на уровень экспрессии белка активного бета-катенина в трех разных пробах тканей полипов носа (А, В, С) были осуществлены анализы общих белков способом вестерн-блоттинга; GAPDH применяли в качестве контрольной нагрузки);

на фиг. 4А - экспрессия активного бета-катенина и Р-GSK-3 (серин-9/-21) в качестве реакции на цинеол (для исследования действия 24-часовой обработки с 100 мкМ 1,8-цинеола на уровень экспрессии белка активного бета-катенина, фосфо-GSK-3 (серин-9/-21) и фосфо-GSK-3 (тирозин-279/-216) в четырех разных пробах полипов носа (D, E, F, G) были осуществлены анализы общих белков способом вестерн-блоттинга; GAPDH применяли в качестве контрольной нагрузки);

на фиг. 4В/С - субклеточная локализация Р-GSK-3 (серин-9/-21) в качестве реакции на цинеол (для исследования пониженной эндолизосомальной локализации фосфо-GSK-3 (серин-9/-21) в качестве реакции на 100 мкМ 1,8-цинеола при сравнении с контрольной средой осуществляли иммуногистохимические исследования; клеточные ядра окрашивали с DAPI);

на фиг. 5 - экспрессия белков Akt и Р-Akt (серин-473) в качестве реакции на 1,8-цинеол (для демонстрации действия 100 мкМ 1,8-цинеола на уровень экспрессии белков Akt и Р-Akt (треонин-308) в четырех разных пробах тканей полипов носа (H, I, J, K) были осуществлены анализы общих белков способом вестерн-блоттинга; GAPDH применяли в качестве контрольной нагрузки);

на фиг. 6 - модель ингибирования пути "Wnt/бета-катенин" в качестве реакции на 1,8-цинеол (в рамках этой работы заявителем впервые было показано, что 1,8-цинеол действует в качестве ингибитора активности пути "Wnt/бета-катенин" и способствует сильному понижению прогрессирования клеток полипов носа; данные, полученные заявителем, показывают, что 1,8-цинеол влияет на ингибирующее фосфорилирование и эндолизосомальную локализацию GSK3-бета, в случае которой речь идет о центральном регуляторе активности бета-катенина).

Касательно дальнейших подробностей о показанных на фигурах вариантах и примерах осуществления во избежание излишних повторов можно сослаться на приведенные ранее пояснения, а также на приведенные далее дополненные пояснения примеров осуществления, которые соответственно имеют силу в отношении представленных фигур.

Таким образом, в порядке обобщения в рамках настоящего изобретения впервые может быть выработана концепция лечения нового типа для профилактики и/или лечения полипов носа (*Polypsis nasi et sinuum*), в частности также рецидивирующих форм, в случае которой недостатки предшествующего уровня техники могут быть, по меньшей мере, в значительной степени устранены или, по меньшей мере, ослаблены, причем концепция лечения по настоящему изобретению по сравнению с традиционными способами лечения, в частности, связана с меньшим числом побочных действий и/или проблем, касающихся пациентов, причем в рамках настоящего изобретения достигается, по меньшей мере, сравнимая, предпочтительно даже улучшенная эффективность по сравнению с концепцией лечения предшествующего уровня техники. В частности, целью концепции лечения по настоящему изобретению является также устойчивая безрецидивность и, по меньшей мере, удлинение интервала до появления рецидивов, в частности, вследствие противовоспалительного и кортикостероидоподобного действия цинеола, в частности 1,8-цинеола. Также обеспечивается предотвращение или, по меньшей мере, сокращение известного в настоящее время продолжительного лечения кортикостероидами (глюкокортикоидами), в частности также в случае одновременно протекающей бронхиальной астмы.

Другие варианты осуществления, исполнения и модификаций, а также преимущества настоящего изобретения непосредственно доступны специалистам в данной области техники при чтении описания и могут быть реализованы без выхода за пределы патентной охраны настоящего изобретения.

Приведенные далее примеры осуществления служат исключительно для пояснения настоящего изобретения, не ограничивая его.

Примеры осуществления.

1. 1,8-Цинеол регулирует профиль фосфокиназы в клетках эпителия, происходящих из полипов носа и нижней носовой раковины от пациентов, болеющих хроническим риносинуситом.

Ключевые слова: 1,8-цинеол, цинеол, профиль фосфокиназы, полипы носа, хронический риносинусит, CRSwNP, хронический риносинусит с полипами носа.

Результаты новейших исследований показывают участие фосфокиназ в патогенезе хронического риносинусита с полипами носа (CRSwNP). Таким образом, состояние фосфорилирования специальных белков может способствовать образованию полипов носа. На основе этих результатов теперь получены новые знания по потенциальному регулированию на растительной основе фосфорилирования в полипах носа. В настоящее время хронический риносинусит подразделяют на хронический риносинусит с полипами носа (CRSwNP) и хронический риносинусит без полипов носа (CRSsNP), причем CRSwNP наблюдается у общего населения в доле приблизительно от 1 до 4%. Преобладает общее соглашение, что все случаи хронического риносинусита (CRS) происходят с синусоназальными воспалениями, причем

CRSwNP понимают как Th2-управляемый процесс и в отличие от этого CRSsNP понимают как Th1-управляемый процесс. Лечение CRSwNP включает комбинацию медикаментозного лечения и хирургических мер. Обычно применяют кортикостероиды (глюкокортикоиды) как в качестве первичного лечения, так и в качестве послеоперационной профилактики против рецидивов. Кортикостероиды (глюкокортикоиды) обладают противовоспалительными свойствами на основе взаимодействия "белок-белок", причем, однако, продолжительное применение усиливает побочные действия.

Варианты растительной терапии могли бы уменьшить эти побочные действия. В натуропатии эфирные масла вследствие их секретолитических свойств применяют для лечения человека, но клиническое применение вследствие раздражения дыхательных путей после ингаляции или приема является ограниченным. Основным компонент эвкалиптового масла, а именно 1,8-цинеол, применяется для лечения острого и хронического бронхита, синусита и респираторных инфекций и в общем случае хорошо переносится. В случае монотерпена 1,8-цинеола речь идет о изопреноиде с противовоспалительными свойствами, который является похожим на изопреноиды человека, такие как глюкокортикоид. Недавно заявителем были открыты новые свойства механизма действия 1,8-цинеола в клетках эпителия тканевой полипов носа у пациентов с хроническим риносинуситом. В рамках этих исследований заявителем были выделены клетки эпителия из полипов носа и ткани нижней носовой раковины у множества пациентов и инкубированы в течение 24 ч с 100 мкМ 1,8-цинеола. При этом были выделены белки, а фосфокиназы были определены с применением набора "Human Phospho-Kinase Antibody Array" (матрица антител фосфокиназы человека) от компании "R&D". В качестве интересного факта заявителем по сравнению с клетками эпителия из носовой раковины была выявлена измененная экспрессия фосфокиназ в клетках назального эпителия из ткани полипов носа. Собственно когда клетки назального эпителия из полипов носа, с одной стороны, и из нижней носовой раковины, с другой стороны, подвергаются действию одинаковых условий хронического воспаления, они по-разному отзываются на 1,8-цинеол. Эпителий слизистой оболочки носа подвергается постоянному действию факторов окружающей среды, таких как аллергены, бактерии или вирусы, и служит в качестве первой защиты, причем, однако, результаты, полученные заявителем, подтверждают основное различие между клетками назального эпителия из полипов носа, с одной стороны, и из нижней носовой раковины, с другой стороны, относительно фосфорилирования киназ в ответ на 1,8-цинеол. На этой основе были показаны новые перспективы цинеола для терапевтического применения при лечении заболеваний дыхательных путей, в частности CRSwNP, так как цинеол доказуемо представляет собой фитотерапевтическую альтернативу глюкокортикоидам.

2. 1,8-Цинеол ингибирует сигнальный путь "Wnt/бета-катенин" и клеточную пролиферацию в полипах носа.

Ключевые слова: полипы носа, хронический риносинусит, GSK-3, бета-катенин, 1,8-цинеол.

Обобщение.

Общие положения.

Полипы носа представляют собой доброкачественную неоплазию слизистой оболочки носа, которая ведет к уменьшенной дыхательной способности и пониженному обонятельному восприятию. Молекулярные механизмы, которые управляют патогенезом и образованием полипов носа, до настоящего времени не поняты в достаточной степени. Заявителем к настоящему времени было исследовано влияние 1,8-цинеола, представляющего собой монотерпеноксид, на регуляцию сигнального пути "Wnt/ β -катенин" и клеточное развитие полипов носа.

Материалы и способы.

Заявителем были исследованы пробы тканей из полипов носа и нижней носовой раковины пациентов с CRSwNP (с хроническим риносинуситом с полипами носа) и из нижних носовых раковин участников испытаний без хронического синусита (со здоровыми слизистыми оболочками) на основе иммуногистохимических способов и способов иммуноблоттинга. Проллиферация и миграция клеток были исследованы с применением анализатора "xCELLigence Real Time Cell".

Результаты.

В рамках этой работы заявителю впервые удалось показать, что 1,8-цинеол действует в качестве сильного ингибитора активности пути "Wnt/бета-катенин" и ведет к сильному уменьшению клеточного развития полипов носа. Данные, полученные заявителем, показывают, что 1,8-цинеол влияет на ингибирующее фосфорилирование GSK-3-бета, которая является ключевым регулятором активности бета-катенина.

Вывод.

Результаты, полученные заявителем, дают новые знания о регуляторной сети, ответственной за образование полипов носа, и показывают, кроме того, новый механизм активности 1,8-цинеола, который проявляется в новой лечебной композиции этого природного активного вещества.

Введение.

Полипы носа представляют собой болезненные, но доброкачественные отечные стекловидные повреждения, которые происходят из слизистой оболочки носа околоносовой пазухи и главной полости носа. Полипы носа представляют собой распространенную болезнь с общей частотой заболевания в Европе от 1 до 4%, причем между хроническим риносинуситом (CRS) с полипами носа (CRSwNP) и без

полипов носа (CRSsNP) имеются различия. Во многих исследованиях исходят из связи между CRS и разными факторами, такими как загрязнение воздуха, табакокурение или круглогодичный аллергический ринит. Также много говорят о связи CRS с бронхиальной астмой независимо от индивидуального отношения к курению.

1,8-Цинеол как монотерпеноксид, в случае которого речь идет о об активном веществе клинически разрешенного лекарственного средства (Soledum®), обычно применяют для лечения различных хронических и острых заболеваний дыхательных путей, а также в случае пациентов с хроническим риносинуситом без полипов носа. Хотя положительная ответная реакция задокументирована, но молекулярный механизм влияния на развитие и рецидивы полипов носа все еще не понят.

В рамках настоящего исследования заявителем было исследовано влияние 1,8-цинеола на регуляцию сигнального пути "Wnt/бета-катенин" с центральными регуляторными белками киназы-3 гликогенсинтазы (GSK-3) и бета-катенином. Сигнальный путь "Wnt/бета-катенин" причастен к регуляции различных клеточных функций, таких как дифференцировка, пролиферация, миграция и адгезия клеток.

Во многих исследованиях исходят из активной роли киназы-3 гликогенсинтазы (GSK-3) в случае различных болезней, таких как болезнь Альцгеймера, рак, воспаления, сердечно-сосудистые болезни или диабет. В настоящее время известны две разные изоформы GSK-3, а именно GSK-3-альфа и GSK-3-бета, которые кодируются двумя разными генами.

В отличие от других киназ ферменты являются конститутивно активными и инактивируются в ответ на клеточные сигналы. Комплекс "APC/аксин/GSK-3" вызывает координационное фосфорилирование бета-катенина, что ведет к его убиквитинированию и протеосомальной деградации посредством пути "бета-TrCP/SKP".

Заявителем в настоящее время было показано, что собственно активность GSK-3 управляется различными формами фосфорилирования. В то время как фосфорилирование серина-9 в GSK-3-альфа или серина-21 в GSK-3-бета ведет к пониженной ферментативной активности, то в качестве ответа на фосфорилирование по остаткам тирозин-279 в GSK-3-альфа и тирозин-216 в GSK-3-бета детектируют сильно возрастающую ферментативную активность.

В рамках своих исследований заявителю впервые удалось продемонстрировать, что 1,8-цинеол действует в качестве сильного ингибитора активности пути "Wnt/бета-катенин" и ведет к сильно уменьшенному прогрессированию клеток.

Таким образом, результаты, полученные заявителем, показывают новый механизм активности 1,8-цинеола и, следовательно, ведут к новым лечебным композициям этого природного активного вещества.

Материалы и способы.

Пробы тканей человека.

Заявителем были исследованы пробы тканей из полипов носа и нижней носовой раковины в качестве внутреннего контроля с CRSwNP, которые были отобраны в рамках хирургических вмешательств в околоносовые пазухи.

У всех пациентов в прошлом в течение по меньшей мере 3 месяцев со средней продолжительностью 1,5 года (+/-0,6 года) были жалобы на придаточные полости, причем курсы консервативной терапии были неудачными. Перед хирургическим вмешательством пациенты в рамках теста на коже на переносимость с применением стандартизованных экстрактов (Allergopharma Joachim Ganzer KG, Reinbek, Deutschland) были проверены на реакцию на пыльцу, клещей домашней пыли, домашних животных и плесневые грибы. Гистопатологическим исследованием были определены случаи эозинофильного CRSwNP; в исследование не были включены пациенты с нейтрофильными полипами или, в частности, с муковисцидозом. Ни один из пациентов в течение 4 недель перед хирургическим вмешательством не проходил лечение системно или топически применяемыми кортикостероидами. Кроме того, пробы из нижней носовой раковины пациентов без синусита или аллергии в прошлом, которые подвергались хирургическим вмешательствам на носовой перегородке или септоринопластике, отбирали в качестве внутреннего контроля. Исследование было разрешено медицинской комиссией по этике университета Любека и осуществлено согласно указаниям этических предписаний по медицинскому исследованию, сформулированных в декларации WMA в Хельсинки, а все пациенты дали подписанное заявление об информированном согласии.

1,8-Цинеол.

Применяли 1,8-цинеол в капсулах "Soledum®" (Klosterfrau Healthcare Group, Cassella-med GmbH & Co. KG, Koln, Deutschland).

Чистое вещество, выделенное из эвкалиптового масла, т.е. чистый 1,8-цинеол с чистотой >99% (0,6 мг/мкл или 600 мг/мл 1,8-цинеола) хранили при 4°C, тогда как основной раствор получали растворением чистого вещества в этаноле (100 мг/мл) с последующим конечным разбавлением раствором "DMEM High Glucose" (Biochrom, Berlin, Deutschland; 1 мг/мл).

Получение суспензий одиночных клеток.

Пробы полипов носа промывали в буферном растворе PBS и в стерильной бессывороточной среде "High Glucose Dulbecco's Modified Eagle Medium" (PAA, Pasching, Osterreich) лезвием скальпеля осто-

рожно измельчали на мелкие кусочки, причем среда содержала 1% L-глутамина, 1% пирувата натрия, 1% заменимой аминокислоты, 2% амфотерицина В, 2% стрептомицина и 2% пенициллина с дополнением 10% FCS и 25 мМ буферного раствора HEPES (все реагенты от компании PAA, Pasching, Osterreich). Затем пробы тканей ферментативной обработкой и промывкой коллагеназой типа II (31,5 мг/мл, GIBCO, Eggenstein, Deutschland) и гиалуронидазой (3,99 мг/мл, Sigma, Munchen, Deutschland) на первой стадии и диспазой (33,4 мг/мл, Sigma, Munchen, Deutschland) на второй стадии соответственно при встряхивании при 37°C в течение 120 мин пептизуют ферментативно. Между ферментативными обработками и стадиями промывки клетки центрифугировали. Полученные клеточные суспензии промывали в PBS (PAA, Pasching, Osterreich), содержащем 2% BSA, и фильтровали через нейлоновые фильтры для клеток с ячейками 70 и 60 мкм (Falcon, Becton Dickinson Labware, Heidelberg, Deutschland).

Испытание с МТТ.

Пролиферацию клеток определяли количественным колориметрическим испытанием клеток, основанным на 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолийбромиде (МТТ). В этом испытании определяли число жизнеспособных клеток на основе митохондриального превращения МТТ.

В каждую лунку 96-луночного планшета помещали по 5000 клеток. После культивирования в течение 24 ч к культурам прибавляли 5-фторурацил или цисплатин с четырьмя разными концентрациями или клетки облучали тройной дозой. Через 48 ч в каждую лунку прибавляли по 10 мкл красителя МТТ (5 мг/мл). После инкубации в течение двух часов с МТТ кристаллы растворяли и осторожно встряхивали в течение 24 ч при комнатной температуре. С применением многолуночного фотометра ELISA определяли абсорбцию восстановленных продуктов формазана в контрольных и экспериментальных лунках при длинах волн 570 и 690 нм. Каждое испытание с МТТ осуществляли трехкратно.

Анализ иммунным окрашиванием.

Свежие замороженные срезы тканей фиксировали в течение 10 мин в 100%-м метаноле. После сушки в течение 10 мин срезы промывали при комнатной температуре в TBS (RT-TBS). Затем пробы тканей для ингибирования эндогенной пероксидазы в течение 15 мин инкубировали в RT-TBS с 3% H₂O₂.

После промывки в RT-TBS пробы в TBS увлажняли 0,3%-м тритоном X в течение 15 мин. Срезы с антителом "анти-фосфо-GSK-3-альфа/бета" с разбавлением 1:100 (Cell Signaling Technology Inc., Massachusetts, USA, каталожные номера 5676 и 9331) инкубировали в течение суток при 4°C.

На следующий день предметные стекла промывали в RT-TBS и затем инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре со вторичным полилинк-антителом. После промывки в RT-TBS пробы инкубировали с маркером пероксидазы (HRP) (оба реагента серии "DCS Detection line" от компании "Innovative Diagnostik-Systeme", Hamburg, Deutschland).

После промывки в RT-PBS срезы инкубировали в АЕС (прибор "DCS Chromoline" от компании "Innovative Diagnostik-Systeme", Hamburg, Deutschland). Реакцию останавливали прибавлением RT-TBS. Затем осуществляли окрашивание клеточного ядра гематоксилином Майера. Срезы вносили в водную среду "Dako Faramount Medium" (Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA). Имуноокрашенные срезы изучали под конфокальным микроскопом (Axiovert 200, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) и микрофотографировали.

Получение клеточных лизатов.

Пробы полипов носа промывали в PBS и осторожно гомогенизировали. Полученные клеточные экстракты солибилизировали лизирующим буферным раствором 16 ("Human pluripotent stem cell array" (матрица плюрипотентных стволовых клеток человека) (R&D Systems)). При этом определяли концентрации белков.

Испытание на клеточную пролиферацию.

Пролиферацию определяли в испытании с МТТ от компании "Sigma-Aldrich" ("In Vitro Toxicology Assay Kit" (набор для определения токсичности in vitro)) соответственно указаниям изготовителя.

Вестерн-блоттинг.

Лизаты тканей денатурировали нагреванием в течение 5 мин в одинарном пробном буферном растворе SDS (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland). Концентрации белков определяли в испытании Брэдфорда, при этом применяли по 30 мкг общего белка для SDS-электрофореза в полиакриламидном геле (Mini-Protean TGX®, Any kD, BioRad, Hercules, CA, USA) и затем переносили на нитроцеллюлозные мембраны. Перенос белков контролировали окрашиванием пунцовым красителем.

Сначала мембраны блокировали в TBS, содержащем 0,05% TWEEN 20 (TBS-T) и 5% BSA (BioRad, Hercules, CA, USA), в течение 1 ч при комнатной температуре и затем инкубировали в течение суток при 4°C с соответствующим первичным антителом с разбавлением 1:1000 в PBS-T с 5% BSA (анти-GSK-3-альфа/бета (Abcam plc., Cambridge, United Kingdom, каталожный номер ab62368) и анти-фосфо-GSK-3-альфа/бета (серин-9/серин-21), (Cell Signaling Technology Inc., Massachusetts, каталожный номер 9331)). После промывки в PBS-T мембраны инкубировали со специфическим вторичным козым антикроличьим антителом (BioRad, Hercules, CA, USA) с разбавлением 1:3333 в TBS-T с 5% BSA в течение часа при комнатной температуре. Белковые полосы визуализировали посредством комплекта конъюгата и подложки на основе щелочной фосфатазы (BioRad, Hercules, CA, USA).

Для определения массы нагрузки на каждый след нитроцеллюлозные мембраны инкубировали в те-

чение суток при 4°C с первичным антителом GAPDH (Cell Signaling Technology Inc., Massachusetts, каталожный номер 14C10) с разбавлением 1:1000. Затем мембраны промывали и инкубировали со вторичным антителом, связанным с видоспецифической пероксидазой хрена (HRP), с разбавлением 1:1000 в PBS-T с 5% BSA в течение трех часов при комнатной температуре. Далее мембраны промывали, и белковые полосы, как было описано ранее, визуализировали. Плотность пикселей определяли количественно и документировали посредством системы "Fusion FX7®" с применением компьютерной программы "Bio-1D Software®".

Испытание на клеточную миграцию с системой "xCELLigence".

Для исследования влияния действия цинеола на миграционную активность клеток применяли планшеты для определения миграции CIM-16 (Roche, Mannheim, Deutschland), в случае которых речь идет о 2-камерной системе, разделенной пористой мембраной, соответственно инструкции изготовителя (Roche Diagnostics). При этом клетки перемещаются из верхней камеры через мембрану и сцепляются с электронным чувствительным элементом на нижней стороне мембраны, следствием чего является увеличение сопротивления. Изменения автоматически и в непрерывном режиме записываются системой "RTCA-DP-Instrument", при этом активность клеточной миграции может контролироваться по индексу профиля клетки. Перед заполнением лунок клетками (60000 клеток на лунку) нижнюю сторону лунок верхней камеры планшета CIM-16 покрывали 30 мкл коллагена I (400 мг/мл, Sigma, Deisenhofen, Deutschland). В любом варианте обработки определения осуществляли трехкратно.

Результаты.

Цинеол ведет к сильно уменьшенному развитию полипов носа.

По сравнению со здоровой слизистой оболочкой носа полипы носа обладают другой морфологией, что удалось показать на основании иммуногистохимического окрашивания гематоксилином и эозином (HE) замороженных срезов тканей (см. фиг. 1). Этим способом окрашивания базофильные структуры окрашиваются в сине-лиловый цвет, эозинофильные структуры окрашиваются в светло-розовый цвет, тогда как гидрофобные структуры, такие как мембраны аппарата Гольджи, остаются неокрашенными и светлыми. Заявителем было исследовано влияние 100 мкМ 1,8-цинеола на клеточную активность пролиферации полипов носа, при этом был использован анализатор "xCELLigence Real Time Cell". В качестве реакции на инкубацию в 100 мкМ 1,8-цинеола через 144 ч удалось обнаружить сильно пониженную пролиферацию клеток полипов носа (см. фиг. 2А, случай с двумя разными участниками испытаний I и II). Неожданным образом на культивированные клетки из слизистой оболочки носа не повлияла обработка 1,8-цинеолом, что следует из контекстно-специфического способа действия 1,8-цинеола (см. фиг. 2В).

Пониженная активность бета-катенина в качестве ответа на обработку 1,8-цинеолом.

Для исследования влияния 1,8-цинеола на активность и регуляцию сигнального пути "Wnt/бета-катенин" заявителем сначала был проанализирован уровень экспрессии активного бета-катенина, в случае которого речь идет о центральном транскрипционном белке-активаторе этого сигнального пути. Данные, полученные заявителем, показывают сильное понижение содержания активного бета-катенина в качестве реакции на обработку 1,8-цинеолом в полипах носа по сравнению с контрольной средой. В качестве реакции на 24 ч инкубации с 100 мкМ 1,8-цинеола в анализируемых пробах тканей полипов носа почти полностью исчезли белки активного бета-катенина. Эти данные показывают сильное ингибирование сигнального пути "Wnt/бета-катенин" при обработке 1,8-цинеолом (см. фиг. 3).

Активность GSK-3 в качестве ответа на обработку 1,8-цинеолом.

На следующей стадии было осуществлено дополнительное исследование для анализа соответствующего уровня фосфорилирования бета-катенина как регулятора GSK-3. В случае GSK-3 речь идет о конститутивно активном белке, который ингибируется вследствие фосфорилирования GSK-3 по серину-9 (GSK-3-альфа) или по серину-21 (GSK-3-бета). Для исследования экспрессии и уровня фосфорилирования GSK-3-альфа/бета в присутствии и в отсутствие 100 мкМ 1,8-цинеола осуществляли анализы способом вестерн-блоттинга.

Данные, полученные заявителем, отчетливо показывают, что цинеол ведет к уменьшенному фосфорилированию GSK-3-альфа/бета по серину-9/-21, что, в свою очередь, ведет к усиленной активности GSK-3 и, таким образом, к усиленной деградации бета-катенина (см. фиг. 4А). Наряду с фосфорилированием по серину 9/-21 активность GSK-3 регулируют также на уровне ее субклеточной локализации. GSK-3 может быть перемещена для отделения от ее субстрата в эндолизосомальной везикуле, чтобы уменьшить активность киназы. Иммуногистохимические исследования, проведенные заявителем, показывают пониженную эндолизосомальную локализацию GSK-3 в качестве реакции на 100 мкМ 1,8-цинеола, что отмечается по ее пониженному ингибированию после обработки 1,8-цинеолом (см. фиг. 4В). GSK-3 вовлечена в регуляцию многих биосинтетических сигнальных путей, а многочисленные киназы могут регулировать активность GSK-3 фосфорилированием ее активирующих или ингибирующих фосфорилирование сайтов. Акт-киназа (также известная как PKB) была идентифицирована в качестве онкогена с активностью серин/треонин-киназы, при этом было показано, что *in vivo* она представляет собой негативный регулятор активности GSK3-бета. Акт-киназа вследствие фосфорилирования по серину-473 может активироваться благодаря PDK1, причем исходят из того, что PHLPP действует в качестве

ингибитора ее фосфорилирования. В порядке первого шага заявителем был проанализирован уровень экспрессии и уровень фосфорилирования по серину-473 киназы Akt в качестве реакции на 100 мкМ 1,8-цинеола. Уровень фосфорилирования киназы Akt по серину-473 во всех проанализированных экстрактах белков на основе полипов носа не был подвержен существенному влиянию, когда определяли также и индивидуальный уровень экспрессии (см. фиг. 5).

Обсуждение.

В случае полипов носа речь идет о доброкачественной пролиферативной болезни слизистой оболочки носа и средней носовой раковины. В настоящее время стандартная терапия, рекомендованная согласно международной и европейской директивам, основана на топически применяемых кортикостероидах. Однако часто ответная реакция полипов носа на стероиды является неудовлетворительной: собственно когда они применяются в порядке длительного лечения с промежуточными циклами с системно применяемыми глюкокортикоидами, то, тем не менее, часто требуется осуществление хирургических действий.

Новейшие данные, полученные заявителем, показывают, что в полипах носа по сравнению с нижней носовой раковиной пациентов с CRSwNP наблюдается значительно более высокая скорость фосфорилирования GSK-3-альфа/бета. Заявителем была обнаружена также равномерная экспрессия pGSK-3-альфа/бета во всех клетках слоя эпителия в полипах с уплотнением эпителия.

В случае GSK-3 речь идет о ферменте многостороннего действия, который вовлечен во множество клеточных сигнальных каскадов. GSK-3 последовательно подключает многочисленные пути главного сигнала, в том числе сигнальный путь фосфатидилинозитол-3'-киназы, сигнальный путь Wnt, hedgehog-сигналинг и notch-сигналинг.

Многие раздражители ведут к инактивации GSK-3, в том числе факторы роста, такие как EGF (Epidermal Growth Factor (эпидермальный фактор роста)), PDGF (Platelet-Derived Growth Factor (тромбоцитарный фактор роста)), BDNF (Brain-derived neurotrophic factor (нейротрофный фактор мозга)), IGF (Insulin-like growth factor (инсулиноподобный фактор роста)) и инсулин.

Известны взаимодействия GSK-3 с NF-kB, mTOR, TGF-бета и p38.

GSK-3 фосфорилирует множество субстратов, например гликогенсинтазу и другие метаболические ферменты, β-катенин, факторы транскрипции CBP (CREB Binding Protein (CREB-связывающий белок)), c-Myc и c-Jun и факторы иницирования трансляции eIF2 и eIF2B.

В предыдущих исследованиях заявителем была обнаружена активация GSK-3 в воспаленной слизистой оболочке носа в общем случае, а также активация GSK-3 в полипах носа.

В рамках этой работы заявителем впервые было показано, что 1,8-цинеол действует в качестве сильного ингибитора активности пути "Wnt/бета-катенин" и при этом ведет к сильному уменьшению прогрессирования клеток.

Пониженная деградация бета-катенина коррелирует с уменьшенным ингибированием GSK3-бета, причем соответствующие белки, ответственные за этот механизм, в дальнейшем выяснены не были (см. фиг. 6 в качестве модели).

В порядке обобщения можно констатировать, что результаты, полученные заявителем, указывают на новую лекарственную композицию и эффект 1,8-цинеола и ведут к новым вариантам применения при лечении этим природным активным веществом или активным веществом на природной основе.

Описание фигур.

Фиг. 1.

Гематоксилин-эозиновое (HE) окрашивание полипов носа и здоровой слизистой оболочки носа.

Этим способом окрашивания базофильные структуры окрашиваются в сине-лиловый цвет, а эозинофильные структуры окрашиваются в светло-розовый цвет, тогда как гидрофобные структуры, такие как мембраны аппарата Гольджи, остаются неокрашенными и светлыми.

Фиг. 2.

Дозозависимое уменьшение прогрессирования клеток благодаря 1,8-цинеолу.

Для того чтобы определить, ведет ли обработка 1,8-цинеолом к ингибированию клеточной жизне-способности полипов носа, были проведены испытания с МТТ. Сильно уменьшенную пролиферацию клеток полипов носа можно было наблюдать в качестве реакции на инкубацию с 100 мкМ 1,8-цинеола в течение 144 ч (фиг. 2А, случай с двумя разными участниками испытаний I и II). Неожиданным образом на культивированные клетки эпителия слизистой оболочки носа не повлияла обработка 1,8-цинеолом, что следует из контекстно-зависимого специфического механизма действия 1,8-цинеола (фиг. 2В).

Фиг. 3.

Экспрессия активного бета-катенина в ответ на цинеол.

Для исследования действия 24-часовой обработки с 100 мкМ 1,8-цинеола на уровень экспрессии белка активного бета-катенина в трех разных пробах тканей полипов носа (А, В, С) были осуществлены анализы общих белков способом вестерн-блоттинга. GAPDH применяли в качестве контрольной нагрузки.

Фиг. 4.

(А) Экспрессия активного бета-катенина и P-GSK-3 (серии-9/-21) в качестве реакции на цинеол.

Для исследования действия 24-часовой обработки с 100 мкМ 1,8-цинеол на уровень экспрессии белка активного бета-катенина, фосфо-GSK-3 (серин-9/-21) и фосфо-GSK-3 (тирозин-279/-216) в четырех разных пробах полипов носа (D, E, F, G) были осуществлены анализы общих белков способом вестерн-блоттинга. GAPDH применяли в качестве контрольной нагрузки.

(B)/(C) Субклеточная локализация P-GSK-3 (серин-9/-21) в качестве реакции на цинеол.

Для исследования пониженной эндолизосомальной локализации фосфо-GSK-3 (серин-9/-21) в качестве реакции на 100 мкМ 1,8-цинеола сравнивали с контрольной средой и осуществляли иммуногистохимические исследования. Клеточные ядра окрашивали с DAPI.

Фиг. 5.

Экспрессия Akt и P-Akt (серин-473) в качестве реакции на 1,8-цинеол.

Для демонстрации действия 100 мкМ 1,8-цинеола на уровень экспрессии белков Akt и P-Akt (треонин-308) в четырех разных пробах тканей полипов носа (H, I, J, K) были осуществлены анализы общих белков способом вестерн-блоттинга. GAPDH применяли в качестве контрольной нагрузки.

Фиг. 6.

Модель ингибирования пути "Wnt/бета-катенин" в качестве реакции на 1,8-цинеол.

В рамках этой работы заявителем впервые было показано, что 1,8-цинеол действует в качестве ингибитора активности пути "Wnt/бета-катенин" и ведет к сильному уменьшению прогрессирования клеток полипов носа. Данные, полученные заявителем, показывают, что 1,8-цинеол влияет на ингибирующее фосфорилирование и эндолизосомальную локализацию GSK3-бета, в случае которой речь идет о центральном регуляторе активности бета-катенина.

3. Клинические практические испытания по применению 1,8-цинеола у пациентов с *Polypsis nasi et sinuum*.

В рамках клинического применения 22 пациента после операции на околоносовых пазухах дополнительно к стандартной лекарственной терапии получали 1,8-цинеол (Soledum forte®) 3 раза по 1 капсуле в течение 3 месяцев. Предоперационные изображения, полученные при компьютерной томографии, оценивали по шкале Ланда-Маккея. Пациентам было предложено оценить свои жалобы посредством анкеты (SNOT20 - немецкая адаптированная версия). 21 из 22 пациентов завершил лечение так, как было предусмотрено. Один пациент сообщил о желудочно-кишечных побочных действиях и прервал лечение 1,8-цинеолом. Дополнительное исследование через 6 месяцев показало только у одного пациента начальный незначительный рецидивный полипоз. В случае первой ориентирующей оценки было отмечено заметное улучшение оценки SNOT-20 по сравнению с предоперационными результатами. Таким образом, была отмечена хорошая ответная реакция на дополнительное медикаментозное лечение 1,8-цинеолом при толерантном профиле побочного действия.

Таким образом, 1,8-цинеол представляет собой высококачественное дополнение к последующему медикаментозному лечению после хирургической операции на околоносовых пазухах.

Осуществленные к настоящему времени многообещающие клинические практические испытания будут продолжены в отношении найденных заявителем новых эффектов и возможностей лечения 1,8-цинеолом, а все пациенты, излеченные до настоящего времени 1,8-цинеолом, будут регулярно обследоваться в отношении возникновения возможных рецидивов.

Кроме того, теперь надлежит исследовать эффекты 1,8-цинеола также при аденоидной конституции, и в этой связи представляет интерес оценка возможности применения 1,8-цинеола в виде назального спрея.

4. Дальнейшие исследования: клинические и молекулярно-биологические основания для терапевтического применения цинеола, в частности 1,8-цинеола, при полипах носа (*Polypsis nasi et sinuum*).

1. Общие положения.

Polypsis nasi et sinuum представляют собой выпячивания хронически воспаленной и отечной слизистой оболочки из клеток решетчатой кости, клиновидной пазухи и гайморовой пазухи в полость носа. Они могут вести к помехам дыхания через нос, к потере обоняния и к другим заболеваниям околоносовых пазух. Слабо выраженные формы заболеваний можно лечить за счет приема глюкокортикоидов (кортизонсодержащих назальных спреев, таблеток кортизона и т.п.). Однако хирургическое лечение преимущественно необходимо для того, чтобы активно воздействовать на затруднение дыхания через нос и потерю обоняния. Операции осуществляют эндоназально (через полости носа) и под общим наркозом с минимальным вмешательством и при этом достигают степени излечения около 50% и снижения жалоб в 90% случаев. *Polypsis nasi et sinuum* и хронические полипозные заболевания придаточных полостей проявляют склонность к рецидивам. Часто по ходу болезни требуется осуществление нескольких операций. Операции с минимальным вмешательством в придаточные полости относятся к вмешательствам в ЛОР-область, предъявляющим повышенные требования, и для пациентов связаны с многократностью многодневных пребываний в больнице и с интенсивным дополнительным лечением.

В строгом смысле под ринитом понимают воспалительное изменение слизистой оболочки носа, а под синуситом понимают аналогичные изменения слизистой оболочки околоносовых пазух. Центральное место среди жалоб занимают боли, ринорея и помеха дыханию через нос. Эпидемиология, каузальный и формальный патогенез риносинусита удовлетворительно проявляются только в немногих случаях.

Классификация ринита и/или синусита может быть осуществлена по анамнезу (по частоте и продолжительности жалоб), по иммуногистохимическим и морфологическим оценкам или, в порядке опыта, по их этиологии или ассоциации с системными заболеваниями.

В случаях наиболее частых вариантов ринита зафиксирован плавный переход от ринита к синуситу. Слизистые оболочки носа и околоносовых пазух отличаются структурой и функцией в меньшей степени качественно и преимущественно количественно, они идут в область устьев придаточных полостей непосредственно друг к другу. В согласование с этой картиной обычный вирусный насморк в преобладающем числе случаев (до 87%) на компьютерной томограмме дает подтверждаемое соустье околоносовых пазух. На основании анамнеза и иных данных различают от 3 до 5 типов риносинусита.

В случае хронического риносинусита набухание слизистой оболочки с перемещением дренажных путей придаточных полостей представляет собой только один из патогенетических факторов, в другой части случаев входят во взаимодействие другие, часто в еще большей степени неизвестные факторы, такие как, например, образование полипов носа в виде доброкачественных водянистых, часто стекловидных серого цвета гиперплазии слизистых оболочек. По этой причине в литературе принято разделять полипозные и непалипозные риносинуситы. Настоящее изобретение сфокусировано на хроническом полипозном синусите с возможно большей выраженностью *Polypsis nasi et sinuum*.

Консервативное лечение.

Топически применяемые глюкокортикоиды в случае *Polypsis nasi et sinuum*.

Воспалительная реакция в полипах носа, ассоциированная с эозинофилами, в частности, эффективно ингибируется глюкокортикоидами. При этом в клиническом отношении наступает заметное улучшение симптоматики. В последние годы клинические наблюдения все в большей степени поддерживаются объективными параметрами (риноманометрия, ринометрия, пиковая скорость вдоха через нос PNIF, магнитно-резонансная томография). Частоту рецидивов и время появления рецидивов после операции в некоторых исследованиях удалось значительно улучшить или изменить в сторону улучшения, причем исследования по длительности не превосходили года. Таким образом, следует рекомендовать лечение топически применяемыми кортикостероидами в течение нескольких месяцев в случае не подвергавшихся лечению полипов носа или в качестве начала схемы лечения перед хирургической санацией, а также для профилактики рецидивов после хирургического лечения (от 6 месяцев до 1 года).

Хирургическое лечение.

Показания к вмешательству в околоносовые пазухи.

Оперативное вмешательство в случае рецидивирующего и хронического риносинусита с *Polypsis nasi et sinuum* или без него назначают тогда, когда консервативное лечение не приводит к устранению жалоб или к долговременному улучшению.

Обобщение.

В литературе до настоящего времени отсутствуют исследования, в которых было исследовано влияние действия цинеола или подобных веществ при лечении хронического полипозного синусита (с *Polypsis nasi et sinuum* или без него). К настоящему времени исследовано и стандартизовано только применение глюкокортикоидов для орального и/или топического применения. Таким образом, цель состоит в исследовании того, в какой мере похожие результаты при лечении хронического полипозного синусита (с *Polypsis nasi et sinuum* или без него) можно подтвердить. Как уже было ранее представлено, заявителем был осуществлен подход с двух сторон, а именно, с одной стороны, в клиническом аспекте, а с другой стороны, в молекулярно-биологическом аспекте.

2. Подготовительные работы по проекту исследований.

Характеристика стволовых клеток в случае *Polypsis nasi et sinuum*.

Полипы носа по сравнению со здоровой слизистой оболочкой носа показывают сильно отклоняющуюся морфологию, которая пояснена на фиг. 1 гематоксилин-эозиновым (HE) окрашиванием замороженных срезов обеих тканей (см. фиг. 1). Этим способом окрашивания базофильные структуры окрашиваются в сине-лиловый цвет, а эозинофильные структуры окрашиваются в розовый цвет, тогда как гидрофобные структуры, такие как мембраны аппарата Гольджи, остаются светлыми. Таким образом, на фиг. 1 показана различная морфология здоровой слизистой оболочки носа и в случае *Polypsis nasi et sinuum*.

Для исследования профиля экспрессии разных маркеров стволовых клеток при *Polypsis nasi et sinuum* применяли матрицу белков, которая делает возможным параллельный анализ широкого спектра разных белков стволовых клеток. Был оценен уровень экспрессии 10 разных маркеров стволовых клеток, которые, таким образом, могли быть идентифицированы при *Polypsis nasi et sinuum*. К этим белкам относятся, в частности, активаторы транскрипции SOX2, Nanog, SOX17, Pdx1 и Otx2, которые играют важную роль при регуляции клеточных процессов дифференцировки. При этом удалось идентифицировать опухолевый белок 63 (TP63), альфа-фетопrotein (AFP), хорионический бета-гонадотропин человека (HCG) и E-кадерин, которые представляют собой ключевые белки разных клеточных процессов, таких как дифференцировка, пролиферация и адгезия в плюрипотентных стволовых клетках человека.

Стволовые клетки, экспрессирующие Oct-4 А при *Polypsis nasi et sinuum*.

В число идентифицированных маркеров стволовых клеток входит также активатор транскрипции

Oct-4 при Polyposis nasi et sinuum. Предполагают, что Oct-4 представляет собой центральный регулятор эмбриональной плюрипотенции и способности самообновления.

Было показано, что существуют 2 разные изоформы Oct-4, а именно Oct-4 А и Oct-4 В, которые различаются как по размеру белков, так и по функции.

Предполагают, что только наибольшая изоформа Oct-4 А регулирует свойства стволовых клеток, в то время как функция Oct-4 В в значительной степени не выяснена.

Поэтому заявителем было применено специфическое антитело к Oct-4 А для иммуногистохимического анализа существования клеток, экспрессирующих Oct-4 А при Polyposis nasi et sinuum.

Данные четко показывают наличие клеток, экспрессирующих Oct-4 А при Polyposis nasi et sinuum, а последующие исследования способом проточной цитометрии показали наличие в среднем приблизительно 1,7% клеток, экспрессирующих Oct-4 А при Polyposis nasi et sinuum и являющихся негативными по отношению к анализируемым маркерам линии дифференцировки CD3, CD16, CD19, CD20 и CD56.

Исследования способами иммуногистохимии и проточной цитометрии показали наличие в среднем приблизительно 1,7% клеток, экспрессирующих Oct-4 А при Polyposis nasi et sinuum, которые являются негативными по отношению к анализируемым маркерам линии дифференцировки CD3, CD16, CD19, CD20 и CD56.

Ингибирующее влияние цинеола на прогрессирование в случае Polyposis nasi et sinuum.

Были осуществлены первые предварительные исследования по изучению влияния цинеола на прогрессирование в случае Polyposis nasi et sinuum. Для этого сначала были получены суспензии одиночных клеток, которые инкубировали в клеточной культуре в течение 288 ч в стандартной среде и с 1 мМ цинеола. Результаты показывают массовое снижение жизнеспособности клеток в интервале от 96 до 144 ч, обусловленное цинеолом. Это подтверждает ингибирующее влияние 1 мМ цинеола на прогрессирование в случае Polyposis nasi et sinuum.

Эти исследования к настоящему времени были осуществлены с полипами 5 разных пациентов и в каждом случае показали удивительно согласованные результаты, так что последующий анализ молекулярных механизмов, лежащих в основе действия цинеола, в частности, на характеристику стволовых клеток и, таким образом, на частоту рецидивов в случае Polyposis nasi et sinuum, считается заявителем крайне многообещающим и связанным с лечением.

3. Постановка цели.

Требуется широко охарактеризовать влияние цинеола на молекулярные механизмы и каскады сигнальной трансдукции при прогрессировании в случае Polyposis nasi et sinuum, в частности, также на характеристику стволовых клеток в случае этого заболевания.

(I) Экспериментальная часть.

Влияние цинеола на жизнеспособность клеток и пролиферацию.

Были осуществлены дальнейшие исследования для анализа влияния цинеола на жизнеспособность и пролиферацию разных постоянных клеточных линий. Для этого применяли две клеточные линии HNSCC, а также одну клеточную линию фибробластов. Эти клетки культивировали в течение 250 ч с разными концентрациями цинеола (от 1 до 10 мМ), и исследовали жизнеспособность клеток в испытании с МТТ. Было выявлено как ингибирующее влияние цинеола на прогрессирование и жизнеспособность клеток HNSCC, так и ингибирующее влияние цинеола на прогрессирование и жизнеспособность фибробластов.

При этом картина оказалась такой же, как и в предшествующих исследованиях по изучению влияния цинеола на жизнеспособность одиночных клеток в суспензиях в случае Polyposis nasi et sinuum, причем, однако, на постоянные клеточные линии можно было в значительной степени влиять в отношении их пролиферации лишь в незначительно более поздние моменты и при незначительно более высоких концентрациях цинеола. В основе этого различия дополнительно к специфическим характеристикам клеток, вероятнее всего, лежит также тот факт, что в случае проб Polyposis nasi et sinuum речь шла о первичном материале, а клетки на соответствующих стадиях испытаний подвергались более сильному стрессу.

Однако в этих исследованиях подчеркивается четко наблюдаемое действие цинеола, ингибирующее массовую пролиферацию, в концентрации от 1 до 2 мМ и заметное цитотоксическое действие при 10 мМ в случае всех исследованных видов клеток.

Для того чтобы наблюдаемые действия цинеола однозначно связать с возможной индукцией апоптоза, некрозом или остановкой клеточного цикла, разные клетки исследовали посредством проточного цитометра в присутствии цинеола с разными концентрациями и в его отсутствие.

Посредством аннексина-V и пропидиййодида (PI) осуществляют окрашивание, а затем посредством FACS (проточного цитометра) может быть получена количественная оценка, как можно четко видеть в первых предварительных исследованиях.

Анализ по схеме "аннексин-V-GFP/PI-FACS" позволяет количественно детектировать отдельные популяции. Жизнеспособные клетки являются "аннексин-V-GFP/PI"-отрицательными, а апоптотические клетки окрашиваются аннексином-V. Клетки, которые уже перешли во вторичный некроз, являются "аннексин-V-GFP/PI"-положительными.

Во время апоптоза во внешней мембране клетки накапливается фосфатидилсерин (PS), который в

норме находится только во внутреннем слое плазматической мембраны. PS представляет собой фагоцитарный сигнал опознавания, которым фагоцитарные клетки, такие как макрофаги, рекрутируются для удаления апоптотических клеток. Так называемый тотальный краситель пропидиййодид (PI) не обладает способностью проникать через мембрану и может окрашивать ДНК только в клетках с поврежденной мембраной. Поэтому PI применяют для различения живых и мертвых клеток.

Влияние цинеола на миграционную активность клеток.

Наряду с жизнеспособностью и прогрессированием клеток, а также влиянием на апоптоз и клеточный цикл заявителем было исследовано также влияние цинеола на свойства миграции клеток. Вследствие чувствительности первичных проб в случае *Polypsis nasi et sinuum* и необходимой воспроизводимости опытов заявителем в его анализах по миграции осуществлено культивирование постоянных клеточных линий злокачественных опухолей головы и шеи с разными концентрациями цинеола и исследована их миграционная активность.

Испытания были осуществлены с применением системы "X-Celligence" и показали только легкое влияние цинеола на миграционную активность клеток при концентрации 2 мМ.

Влияние цинеола на фактор транскрипции NF-kB показало, что ингаляция цинеола в модели с морскими свинками ведет к заметному уменьшению содержания провоспалительных цитокинов, причем, однако, молекулярные механизмы, лежащие в основе, как и раньше, остаются невыясненными.

Так как и в случае *Polypsis nasi et sinuum* было также постулировано, что параметры воспаления оказывают решающее влияние на прогрессирование этого заболевания, то заявителем было исследовано влияние цинеола на активность фактора транскрипции в виде ядерного фактора каппа В (NF-kB) и на активность широкого спектра разных фосфокиназ, чтобы идентифицировать молекулярные точки приложения цинеола в разных путях биосинтеза клетки в отношении "микросреды" *Polypsis nasi et sinuum*.

Фактор транскрипции NF-kB был открыт в 1986 году в лаборатории Дэвида Балтимора в качестве регулятора экспрессии гена для легкой каппа-цепи (kL) иммуноглобулина в В-лимфоцитах мыши. Между тем известно, что этот фактор транскрипции встречается повсеместно и работает в качестве центрального координатора широкого спектра различнейших клеточных функций. Многие обстоятельства указывают на то, что фактор транскрипции NF-kB также исполняет ключевую функцию в случае образования опухоли вследствие хронического воспаления. Однако функции NF-kB являются очень разнообразными и также специфическими относительно клеток. Таким образом, ингибирование NF-kB может вызывать как апоптоз, так и вести к спонтанному возникновению опухоли. Все эти комплексные пути сигнальной трансдукции требуют хорошо согласованной регуляции, так что нарушения регуляции факторов транскрипции, таких как NF-kB, в разных клеточных аспектах в значительной степени содействуют онкогенезу. Во многих клетках NF-kB активирует экспрессию множества воспалительных цитокинов, таких как, например, IL-1 и IL-6, хемокинов, таких как IL-8, иммунорегуляторных поверхностных молекул или молекул клеточной адгезии.

Исследования по изучению влияния цинеола на активность фактора транскрипции NF-kB в случае *Polypsis nasi et sinuum* четко показывают, что цинеол не оказывает на него ингибирующего влияния, а в большей степени оказывает легкое активирующее действие. При получении результатов измерений TNF-альфа (tumor necrosis factor-alpha (альфа-фактор некроза опухоли)) применяли в качестве принятого стимула активности NF-kB и, таким образом, в качестве внутреннего положительного контроля.

Профили фосфокиназы при *Polypsis nasi et sinuum*.

Уровень фосфорилирования и, таким образом, активация широкого спектра разных фосфокиназ в самых разных путях биосинтеза осуществляли с применением набора "Phosphokinase-Protein-Arrays" (матрица белков фосфокиназ). Эта матрица определяет профиль экспрессии 44 фосфорилированных фосфокиназ и позволяет, таким образом, делать выводы о регуляции разных каскадов сигнальной трансдукции.

Принцип этой матрицы белков состоит в одновременном анализе разных белков на нитроцеллюлозной мембране. На эти нитроцеллюлозные мембраны нанесены первичные антитела ("Capture Antibodies" (ловушки для антител)) к исследуемым белкам и контрольные антитела соответственно для двойных определений. После инкубации полученных клеточных лизатов из тканей *Polypsis nasi et sinuum* несвязанные белки удаляли соответствующими промывками. Затем осуществляли инкубацию со специфическим биотинилированным вторичным антителом с заключительной инкубацией с антибиотином AP (щелочной фосфатазой), вследствие чего белки, специфически связанные с мембраной, могли быть визуализованы и, таким образом, определены количественно.

Эти исследования осуществляли соответственно с тканями с *Polypsis nasi et sinuum* в прямом сравнении со "здоровой" слизистой оболочкой тех же самых пациентов. Полученные соотношения, то есть различия между здоровой и больной тканями, по результатам количественного определения представлены в таблице.

Таблица 1. Профили активности фосфокиназ

	MW	MW	Stabw	Stabw	Отношение
	Полип	Раковина	Полип	Раковина	"полип/раковина"
Fyn;Y420	3,73	2,42	0,86	0,71	1,54
Lyn;Y397	3,53	2,10	0,77	0,83	1,68
c-jun;S63	6,61	4,51	1,38	0,40	1,47
Pyk2;Y402	4,43	2,82	1,33	0,28	1,57
STAT1;Y701	5,17	6,62	1,39	3,70	0,78
STAT2;Y689	10,50	7,66	1,67	1,43	1,37
STAT3;Y705	3,73	1,80	1,00	0,85	2,08
STAT4;Y693	5,23	6,46	1,01	2,76	0,81
STAT5a/b;Y699	5,59	5,50	1,44	2,29	1,02
STAT5a;Y699	3,43	2,90	0,80	0,60	1,18
STAT5b;Y699	14,61	7,60	7,19	4,42	1,92
STAT6;Y641	7,76	6,09	2,30	2,21	1,28
TOR;S2448	4,38	3,14	1,44	1,87	1,40
CREB;S133	2,88	1,29	3,55	0,91	2,24
GSK-3 α / β ;S21/S9	11,19	3,01	5,85	1,46	3,72
β -Катенин;-	2,88	2,24	1,32	0,95	1,29
MEK1/2;	5,01	2,80	1,29	1,04	1,79
MSK1/2;S376/S360	4,75	3,61	0,88	1,11	1,31
ERK1/2;T202/Y204,					
T185/Y187	38,59	16,50	46,47	23,69	2,34
p27;T198	1,29	3,25	1,35	4,51	0,40
p27;T157	1,63	2,15	1,06	0,77	0,76
p38 α	2,38	1,93	1,58	1,17	1,23
p53;S46	5,71	5,51	0,91	1,32	1,04
p53;S392	1,44	2,00	1,14	0,98	0,72
p53;S15	9,28	6,97	1,80	2,49	1,33
Паксиллин;Y118	4,47	2,99	1,15	0,63	1,50
eNOS;S1177	6,59	3,00	4,50	2,75	2,20

У 5 пациентов с хроническим полипозным синуситом с применением матрицы белков были исследованы пробы тканей полипов и нижней носовой раковины, которые служили в качестве внутреннего контроля.

В исследованных пробах тканей полипов носа были заметно видны смещения по сравнению со здоровой слизистой оболочкой. Так, например, во всех пробах был значительно повышен уровень фосфорилирования белка STAT3;Y705. Такое же положение наблюдается в случае STAT5b;Y699 и GSK-3-альфа (см. таблицу).

Исследования образуют основу для последующих анализов по идентификации путей биосинтеза, ответственных за пролиферацию в случае Polyposis nasi et sinuum.

Так STAT3, возможно, играет центральную роль в проводящем пути JAK-STAT. Активация происходит, например, через связывание IL-6 с рецептором JAK, из чего следует фосфорилирование STAT. Они димеризуются и перемещаются в клеточное ядро, где они активируют транскрипцию самых разных целевых генов в рамках пролиферации клеток.

Исследования, проводимые заявителем, будут сфокусированы на определении функциональных характеристик этих белков в отношении прогрессирования в случае Polyposis nasi et sinuum и на принципе действия цинеола.

Профили экспрессии иРНК широкого спектра потенциальных маркеров стволовых клеток при Polyposis nasi et sinuum.

Хроническая пролиферативная природа Polyposis nasi et sinuum и высокая частота рецидивов, также после оперативной санации околоносовых пазух, позволяют обнаружить заметные параллели касательно роста опухолевых заболеваний. До настоящего времени не выяснено, из какого пула клеток рекрутируются клетки тканей назальных полипов, какие процессы сигнальной трансдукции играют роль в отношении роста полипов и по какой причине назальные полипы не вырождаются.

Возможно, стволовые клетки образуют пул клеток, способствующий хронической пролиферации назальных полипов, так как в более новых исследованиях удалось показать, что стволовые клетки играют существенную роль не только при возникновении и дифференцировки сложных организмов и в процессах обновления клеток, а также причастны к возникновению и прогрессированию пролиферативных заболеваний. Возможно, стволовые клетки могут играть роль также в патофизиологии Polyposis nasi et sinuum.

Для дальнейшей и геномно-расширенной идентификации и определения характеристик потенциальных популяций стволовых клеток в случае *Polypsis nasi et sinuum* была исследована экспрессия маркеров стволовых клеток из суспензий одиночных клеток посредством анализов ПЦР в режиме реального времени.

Кроме того, в других исследованиях ткань *Polypsis nasi et sinuum*, а также ткань нижней носовой раковины с применением микроматриц (широкого и специального геномного набора) анализировали в порядке сравнения и исследовали различия в экспрессированных образцах.

Были получены профили экспрессии иРНК потенциальных маркеров стволовых клеток при *Polypsis nasi et sinuum*. Оценка этих исследований еще не завершена, так как были собраны другие данные по дополнительным пробам тканей *Polypsis nasi et sinuum* и в настоящее время обрабатываются с применением микроматриц. В настоящее время, однако, обнаружилось, что профили экспрессии разных пациентов обладают очень индивидуальными характеристиками, но, несмотря на эти индивидуальные расхождения, выделяются некоторые значительные смещения профилей *Polypsis nasi et sinuum* и здоровой слизистой оболочки, такие как, например, факторы транскрипции Nanog и FOXC2 или маркер миграции CXCR4.

После заключительной оценки одномоментных микроматриц результаты, полученные с их применением, были проверены на уровень белка и затем исследованы в отношении влияния различных концентраций цинеола.

Исследования сигнального пути "Wnt/FZD".

Сигнальный путь "Wnt-Frizzled" играет важную роль в регулятивных процессах развития эмбриона, получения резервуара стволовых клеток саморегенерирующихся органов и активации пролиферации стволовых клеток.

Основы сигнального пути Wnt были исследованы в поздние 1980-е и в ранние 1990-е годы, при этом удалось показать, что генетические продукты бескрылой дрозофилы *Drosophila wingless* (wg) и мыши *Int1* (позже переименованный в *Wnt1*) относятся к большому эволюционно полученному семейству внеклеточных сигнальных молекул.

Белки Wnt представляют собой гликопротеиновые лиганды семейства трансмембранного рецептора Frizzled (FZD), из которых у человека в настоящее время известно 19. В зависимости от рецепторного контекста, типа клетки и стадии дифференцировки клетки лиганды Wnt могут инициировать по меньшей мере три разных внутриклеточных сигнальных каскада, которые при регуляции транскрипции выходят на различные гены. Различают сигнальные пути "канонический", "Wnt/планарная клеточная полярность" и "Wnt-Ca²⁺". В случае "канонического" сигнального каскада взаимодействие лигандов Wnt (как правило, Wnt3a) с рецепторами FZD при содействии белка "low density lipoprotein receptor-related protein" (LRP, белок, родственник рецептору липопротеина низкой плотности) ведет к ингибированию киназы-3-бета гликогенсинтазы (GSK-3-бета), вследствие чего происходит стабилизация и накопление бета-катенина в цитоплазме, его транслокация в клеточное ядро и транскрипция TCF4/LEF-зависимых генов. Если взаимодействие "Wnt3a/FZD" отсутствует, то бета-катенин фосфорилируется комплексом "аксин/GSK3-бета/APC" и вследствие этого после убиквитинилирования через посредство протеасомы разлагается. В случае бета-катениннезависимого "неканонического" сигнального пути "Wnt/Ca²⁺" после взаимодействия лигандов Wnt (как правило, Wnt5a) с рецепторами FZD (как правило, FZD2/FZD5) благодаря фосфолипазе C происходит проникновение Ca²⁺ и активация Ca²⁺-зависимых факторов, таких как протеинкиназа C (PKC) и Ca²⁺/калмодулинзависимая киназа II (CaMKII). Из этого может следовать транскрипционная активность, обусловленная факторами транскрипции NF-каппаB, NFAT и семейства AP1.

Сигнальный путь "Wnt/FZD" может ингибироваться двумя классами внеклеточных антагонистов, оба из которых блокируют взаимодействие между лигандом и рецептором. Первый класс образуют белки "secreted Frizzled-related protein" (sFRP, секретируемый родственник Frizzled белок), "Wnt-inhibitory-factor-1" (фактор-1 ингибирования Wnt) и "Cerberus", которые связывают белки Wnt и, таким образом, блокируют их связывание с рецепторами Wnt. Второй класс антагонистов Wnt образуют белки "Dickkopf" (DKK), которые могут вызывать блокирование корцептора LRP5/LRP6.

Сложность путей сигнальной трансдукции "Wnt/FZD" требует хорошо согласованной регуляции. Нарушение регуляции и сверхэкспрессии Wnt-сигналинга может способствовать ненаправленному росту разных клеток. В случае рака толстой кишки имеются мутации белков APC и аксина, вовлеченных в сигнальный путь Wnt. Кроме того, для многих видов опухолей эпигенетический "сайленсинг" (устранение шума) фактора-1 ингибирования Wnt показал, какое нарушение регуляции сигнального пути "Wnt/FZD" могло бы быть благоприятным.

Со времени первых сообщений о Wnt5a-опосредованной сверхэкспрессии цитокинов и провоспалительных цитокинов в фибробластах в случае ревматоидного артрита удалось показать роль сигнального пути "Wnt/FZD" для регуляции воспалительных процессов при псориазе, сепсисе, астме и туберкулезе. В случае эндотелиальных клеток было описано, что через бета-катениннезависимый сигнальный путь "Wnt/Ca²⁺" индуцируется экспрессия COX-2 и может усиливаться выделение цитокинов. В отличие от сигнального пути "Wnt/Ca²⁺" бета-катенинзависимый "канонический" Wnt-сигналинг, кажется, играет иммуномодулирующую и противовоспалительную роль. На это указывают недавно полученные резуль-

таты, которыми в случае макрофагов удалось показать уменьшенную экспрессию TNF-альфа после активации "Wnt/бета-катенин"-сигналинга посредством Wnt3a и ингибитора GSK-3-бета. В другом исследовании ингибирование экспрессии бета-катенина в дендритных клетках вело к усилению воспалительного ответа, чем удалось убедительно продемонстрировать роль бета-катенина для гашения иммунного ответа. Кроме того, экспрессия бета-катенина кишечными дендритными клетками представляется значимой для баланса статуса активации регуляторных и эффекторных Т-клеток.

На экспрессию Wnt оказывают влияние многие лекарственные средства. Интересно, что глюкокортикостероиды усиливают экспрессию антагонистов Wnt и, таким образом, могут подавлять Wnt-сигналинг. Таким образом, существует непосредственное взаимодействие между важнейшими в настоящее время лекарственными средствами в случае CRSwP, то есть глюкокортикостероидами, и сигнальным путем Wnt.

В случае ацетилсалициловой кислоты (АСК), которая по неизвестному до настоящего времени механизму играет важную роль в развитии CRSwP у пациентов с непереносимостью АСК, анализом экспрессии генов Са-клеточных линий толстой кишки удалось показать повышающую регуляцию фактором WIF-1 и, таким образом, супрессию Wnt.

Противо- и провоспалительные свойства "канонических" ("Wnt/бета-катенин"-сигналинг) и "неканонических" сигнальных путей Wnt в случае хронического риносинусита с полипозом (CRSwP), кажется, играют важную роль для модуляции острых и хронических воспалительных процессов. Лучшее понимание сигнального пути "Wnt/FZD" в случае CRSwP может способствовать разработке лекарственных композиций нового типа и, таким образом, уменьшению частоты рецидивов и необходимости оперативных вмешательств в случае CRSwP.

В последующем описании представлены и пояснены существующие в настоящее время перспективные результаты по "Wnt/FZD"-сигналингу в случае CRSwP.

Благодаря микроматричным анализам (Agilent Whole Human Genome Oligo) заявителем были получены обширные данные по экспрессии генов для 5 пар "полип/нижняя носовая раковина" у 5 пациентов с CRSwP.

Фактор-1 ингибирования Wnt (WIF-1).

При анализе данных микроматричных анализов в случае всех препаратов была отмечена понижающая регуляция фактором-1 ингибирования Wnt (WIF-1) в очень значительной мере, в отдельных случаях в 100 раз, что удалось подтвердить получением способом RT-PCR (набор "TaqMan Assay") значений понижающей регуляции от 4 до 230 раз.

В случае других ингибиторов Wnt, таких как DKK (Dickkopf) и SFRP (Secreted Frizzled Related Protein (секретируемый родственник Frizzled белок)) значительная понижающая регуляция была обнаружена только в случае SFRP 5 ($p < 0,01$). Иммуногистохимическим анализом WIF-1 в ткани носовой раковины была показана иммуноположительная реакция в области подэпителиальной стромы, в то время как эпителий показал иммуноположительную реакцию на WIF-1 в степени от слабой до отрицательной. В случае полипозной ткани была обнаружена только слабая иммуноположительная реакция.

Понижающая регуляция ингибиторами Wnt может иметь следствием нарушение регуляции сигнального пути "Wnt/FZD" и, таким образом, может способствовать воспалению и прогрессированию CRSwP.

Флуоресцентным иммуногистохимическим анализом в отношении WIF-1 в ткани носовой раковины была показана иммуноположительная реакция в области подэпителиальной стромы, в то время как эпителий показал иммуноположительную реакцию на WIF-1 в степени от слабой до отрицательной. В случае полипозной ткани были обнаружены только одиночные подэпителиальные области с незначительной иммуноположительной реакцией.

Была составлена диаграмма KEGG сигнального пути "Wnt/FZD" в случае CRSwP. Данные микроматричных анализов с применением компьютерной программы "Onto-Tools" были перенесены на диаграмму KEGG и оценены.

Белки Wnt.

Сравнение полипов и нижней носовой раковины на основе микроматричного анализа выявило (после "объединения в пул" результатов и коррекции ошибок с применением модели ошибок "Rosetta" компьютерной программы от компании "Rosetta Resolver") значительную повышающую регуляцию в случае многих белков Wnt.

Данные микроматричных анализов 5 полипов и 5 носовых раковин были объединены в пул и после коррекции ошибок (с применением компьютерной программы "Rosetta") было осуществлено их сравнение друг с другом. Были оценены различия в экспрессии в полипах по сравнению с носовыми раковинами. Подтверждение данных микроматричных анализов было осуществлено способом RT-qPCR (набор "TaqMan Assay"). Вплоть до Wnt7a была обнаружена хорошая корреляция данных микроматричных анализов с данными RT-qPCR.

Наряду со значительной повышающей регуляцией Wnt3a, ответственного за активацию пути "Wnt/бета-катенин", был показан четко повышенный уровень иPHK в случае Wnt4 и Wnt7a, роли которых в "Wnt/FZD"-сигналинге до настоящего времени мало охарактеризованы.

Уровень экспрессии иРНК белков Wnt, осуществляющих в значимой степени ($p < 0,05$) повышение или понижение в полипах и нижних носовых раковинах, удалось в значительной степени подтвердить способом RT-qPCR (набор "TaqMan Assay"). К настоящему времени заявителю удалось иммуногистохимически обнаружить Wnt3a и Wnt4.

Иммуногистохимический анализ LSAB в отношении Wnt3A и Wnt4 показал в случае полипозной ткани иммуноположительную реакцию как эпителия, так и фибробластов и воспаленного инфильтрата.

Обнаружение белка Wnt5a заявителю еще не удалось осуществить применяемыми в настоящее время способами (вестерн-блоттинга и иммуногистохимического анализа) и поэтому в скором времени им будет осуществлен анализ способом иммунопреципитации. Однако независимо от препарата обнаруживаемость Wnt5a на уровне белка в общем случае считается технически сложным.

Рецепторы Frizzled (FZD).

Микроматричным анализом выявлена неоднородная картина рецепторов Frizzled (FZD), регулирующих в сторону повышения и соответственно в сторону понижения, т.е. результаты микроматричного анализа показали неоднородную картину рецепторов FZD, регулирующих в сторону повышения и соответственно в сторону понижения. Выделяется более чем в 3 раза повышенная регуляция в случае FZD2, представляющего собой активатор "Wnt/ Ca^{2+} "-сигналинга.

Уровень экспрессии иРНК рецептора FZD2 был отрегулирован в сторону повышения в 3,53 раза (согласно микроматричного анализа) и в 2,21 раза (согласно RT-qPCR) соответственно. За счет FZD2, как и FZD5, может активироваться сигнальный путь "Wnt/ Ca^{2+} ", через который, в частности, вследствие активации макрофагов могут активироваться провоспалительные процессы. Иммуногистохимический анализ FZD2 показал выраженную интенсивность флуоресценции эпителия полипов. Способом вестерн-блоттинга удалось подтвердить найденную микроматричным анализом и способом RT-PCR усиленную экспрессию FZD2 в полипе по сравнению с нижней носовой раковиной.

Сравнение уровня иРНК рецептора FZD2 в случае полипа по сравнению с носовой раковиной осуществляли микроматричным анализом (МА) и способом RT-qPCR (ПЦР).

Иммуногистохимический анализ FZD2 показал выраженную интенсивность флуоресценции эпителия полипов. Способом вестерн-блоттинга удалось подтвердить найденную микроматричным анализом и способом RT-PCR усиленную экспрессию FZD2 в полипе по сравнению с нижней носовой раковиной.

"Wnt/бета-катенин"-сигналинг.

В воспаленном инфильтрате полипозной ткани иммуногистохимически удалось обнаружить нуклеарный бета-катенин. После инкубации суспензий одиночных полипозных клеток в слайд-камерах с SB216763, представляющим собой ингибитор GSK-3-бета, иммуногистохимическим анализом анти-бета-катенина была обнаружена аккумуляция бета-катенина в цитоплазме и транслокация бета-катенина в клеточное ядро.

Был осуществлен иммуногистохимический анализ антиактив-бета-катенина в инкубированной с SB216763, представляющим собой ингибитор GSK-3, в течение 24 ч суспензии одиночных полипозных клеток (в слайд-камере). Вследствие ингибирования разложения бета-катенина были обнаружены заметное обогащение бета-катенином и также транслокация бета-катенина в клеточное ядро.

Для функционального исследования роли "Wnt/бета-катенин"-сигналинга в экспрессии цитокинов первичную полипозную ткань инкубировали с Wnt3a и SB216763, представляющими собой активаторы "Wnt/бета-катенин"-сигналинга. В согласии с другими результатами в отношении пониженного воспалительного ответа в случае макрофагов после инкубации с Wnt3a и SB216763, представляющими собой ингибиторы GSK3-бета, в полипозной ткани была обнаружена уменьшенная экспрессия IL-6 и IL-8.

Обобщение исследований.

Можно кратко представить следующие результаты исследований:

влияние цинеола на выживаемость клеток и прогрессирование доброкачественных и злокачественных видов клеток; анализ характеристики клеточного цикла и механизмов возможной регуляции апоптоза;

влияние цинеола на миграционную активность клеток: геномно-расширенный микроматричный анализ экспрессируемых образцов иРНК при Polypsis nasi et sinuum под влиянием цинеола и последующая оценка по соответствующему параметру миграции;

влияние цинеола на профили активности NF-kB и фосфокиназ: верификация идентифицированных фосфокиназ на уровне белка и последующее определение функциональных характеристик;

влияние цинеола на профили экспрессии потенциальных маркеров стволовых клеток: верификация идентифицированных маркеров стволовых клеток на уровне белка и последующее определение функциональных характеристик.

Другие варианты клинического применения.

Таким образом, в порядке обобщения в рамках настоящего изобретения впервые разработана концепция лечения нового типа, по меньшей мере, по существу, не имеющего побочных действий, для профилактики и/или лечения полипов носа (Polypsis nasi et sinuum), в частности также рецидивирующих форм, на основе активного вещества на природной основе (цинеола, в частности 1,8-цинеола), в случае которой недостатки предшествующего уровня техники могут быть, по меньшей мере, в значительной

степени устранены или, по меньшей мере, ослаблены и достигается сравнимая, предпочтительно даже улучшенная эффективность по сравнению с концепцией лечения предшествующего уровня техники.

Для дальнейшей клинической верификации концепции по настоящему изобретению требуются новые клинические данные. В частности, лечебное действие цинеола, в частности 1,8-цинеола, может быть проверено также в рамках хронического полипозного синусита с *Polyposis nasi et sinuum* (рандомизированное двойное слепое и плацебо-контролируемое исследование). В частности, целью концепции лечения по настоящему изобретению является также устойчивая безрецидивность и, по меньшей мере, удлинение интервала до появления рецидивов, в частности, вследствие противовоспалительного и кортикостероидоподобного действия цинеола, в частности 1,8-цинеола. Также обеспечивается предотвращение или, по меньшей мере, сокращение известного в настоящее время продолжительного лечения кортикостероидами (глюкокортикоидами), в частности, также в случае одновременно протекающей бронхиальной астмы.

Критерии включения.

Клинически (эндоскопические/радиологически/способом компьютерной томографии) подтвержденный хронический полипозный пансинусит с *Polyposis nasi* или без него, в случае необходимости также рецидив заболевания, в случае необходимости на основе бронхиальной астмы.

Проведение последней системной кортикостероидной терапии не позже чем за 6 недель.

Отсутствие лечения цинеолом в течение последних 6 недель.

Неизменность терапии в течение последних 4 недель перед началом исследований.

Отсутствие непереносимости эфирных масел.

Отсутствие бактериальных воспалительных заболеваний дыхательных путей в течение последних 4 недель.

Возможность регулярного последующего наблюдения.

Отсутствие беременности или грудного вскармливания.

Отсутствие тяжелых легочных и сердечных сопутствующих заболеваний.

Отсутствие онкологических заболеваний.

Отсутствие других хронических длительных заболеваний (неконтролируемого диабета, ревматоидного артрита).

Разделение пациентов на 3 группы.

1. Контрольная группа с традиционным назальным введением мометазона.

2. Назальное введение мометазона+системное введение цинеола.

3. Назальное введение мометазона+топическое введение цинеола.

Исследования.

1. Предтерапевтическое.

2. Предоперационное (интраоперационное физическое обследование).

3. Послеоперационное через 3 недели.

4. Послеоперационное через 6 недель.

5. Послеоперационное через 12 недель.

Клиническое врачебное ЛОР-исследование.

Эндоскопия (оптическая система с углом зрения 0°, 30°, 70°).

Тест на аллергию.

Риноманометрия.

Ольфактометрия.

Компьютерная томограмма околоносовых пазух.

В случае необходимости исследование функции легких/тотальная плетизмография.

Физическое обследование полипоза, а также в случае необходимости обследование средней и/или нижней носовой раковины по возможности при любых контрольных обследованиях.

Взятие проб крови.

Анкетирование для оценки качества жизни в соответствии с графиком контроля.

Последующее наблюдение с ведением "дневника" пациента.

Исследование цинеола микроматричным анализом.

Исследование экспрессии генов при хроническом риносинусите с полипозом (CRSwP) при лечении 1,8-цинеолом.

Критерии включения.

Хронический риносинусит с *Polyposis nasi et sinuum* (CRSwP).

Критерии исключения.

Системная или топическая глюкокортикоидная терапия позже чем за 6 недель.

Непереносимость эфирных масел или сорбита.

Бактериальные инфекции верхних дыхательных путей.

Лечение антибиотиками.

Онкологическое заболевание.

Бронхиальная астма.

Язва двенадцатиперстной кишки.
 Беременность или грудное вскармливание.
 Аллергия.
 Эксперименты.

Взятие ткани с Polyposis nasi приблизительно у 10 пациентов перед введением цинеола и после приблизительно однонедельного лечения цинеолом (интраоперационно).

Взятие ткани носовой раковины приблизительно у 10 "здоровых" пациентов (без CRS, в отсутствие другой лекарственной терапии, без аллергии) в ходе септопластики с конхотомией.

Сравнение экспрессии генов полипозной ткани, отобранной в предоперационный и интраоперационный периоды интраиндивидуально, а также интериндивидуально, со "здоровой" тканью носовой раковины способом микроматричного анализа.

Подтверждение результатов микроматричного анализа способом RT-qPCR, иммуногистохимическим анализом и вестерн-блоттингом.

Требуемые сведения о пациентах.
 Время проведения последней глюкокортикоидной терапии.
 Возраст.
 Пол.
 Аллергии/непереносимость АСК.
 Лекарственные средства.
 Побочные заболевания.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение фармацевтической композиции, содержащей цинеол в качестве активного вещества, для получения лекарственного средства для профилактики и/или лечения полипов носа (Polyposis nasi et sinuum).

2. Применение по п.1 для профилактики и/или лечения рецидивирующих форм полипов носа (Polyposis nasi et sinuum).

3. Применение по п.1 или 2 для профилактики и/или лечения связанных с сигнальным путем Wnt, в частности с путем сигнальной трансдукции "Wnt/бета-катенин", и предпочтительно таким образом индуцируемых и/или стимулируемых форм полипов носа (Polyposis nasi et sinuum).

4. Применение по любому из предыдущих пунктов для профилактики и/или лечения полипов носа (Polyposis nasi et sinuum) после предшествовавшего хирургического удаления полипов носа.

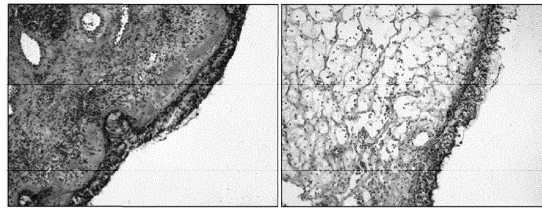
5. Применение по любому из предыдущих пунктов, причем композиция содержит цинеол в виде чистого вещества, которое не содержит других терпенов, с чистотой по меньшей мере 95 мас.% в расчете на цинеол, и причем композиция содержит цинеол в качестве единственного активного вещества, предпочтительно в качестве единственного фармацевтически активного вещества.

6. Применение по любому из предыдущих пунктов, причем композиция содержит цинеол в расчете на композицию в относительном количестве в интервале от 0,0001 до 80 мас.%, в частности от 0,001 до 75 мас.%, преимущественно от 0,005 до 70 мас.%, предпочтительно от 0,01 до 60 мас.%, более предпочтительно от 0,05 до 55 мас.% и особенно предпочтительно от 0,1 до 50 мас.%.

7. Применение по любому из предыдущих пунктов, причем цинеол применяют с суточной дозой в интервале от 0,1 до 5000 мг/день, в частности в интервале от 1 до 3000 мг/день, преимущественно в интервале от 5 до 2500 мг/день, предпочтительно в интервале от 10 до 2000 мг/день и особенно предпочтительно в интервале от 50 до 1500 мг/день.

8. Применение по любому из предыдущих пунктов, причем цинеол применяют системно с суточной дозой в интервале от 10 до 5000 мг/день, в частности в интервале от 50 до 3000 мг/день, преимущественно в интервале от 100 до 2500 мг/день, предпочтительно в интервале от 150 до 2000 мг/день и особенно предпочтительно в интервале от 200 до 1500 мг/день, или причем цинеол применяют топически с суточной дозой в интервале от 0,1 до 2000 мг/день, в частности в интервале от 0,5 до 1500 мг/день, преимущественно в интервале от 1 до 1000 мг/день, предпочтительно в интервале от 2 до 1500 мг/день и особенно предпочтительно в интервале от 5 до 1000 мг/день.

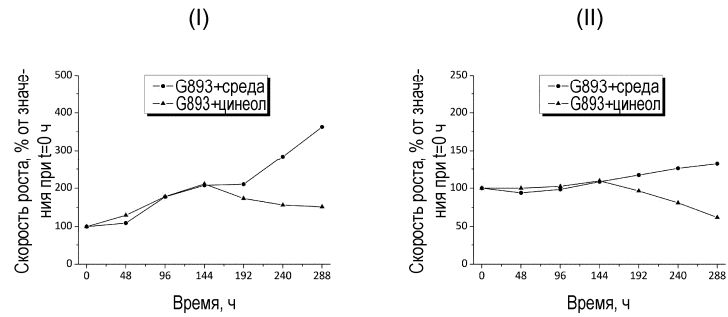
9. Применение по любому из предыдущих пунктов, причем композицию применяют в виде лекарственного средства, комбинированного с кортикостероидами, предпочтительно с системно или топически применяемыми кортикостероидами.



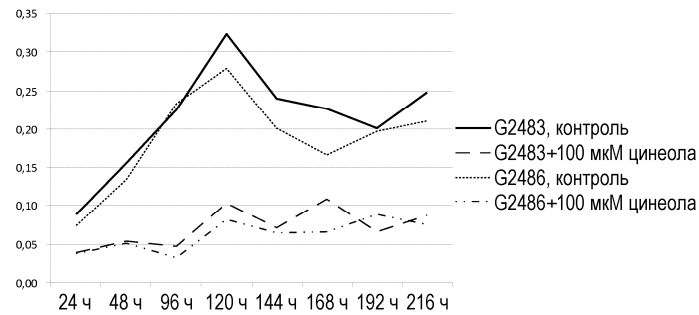
Здоровая слизистая оболочка

Polyposis nasi

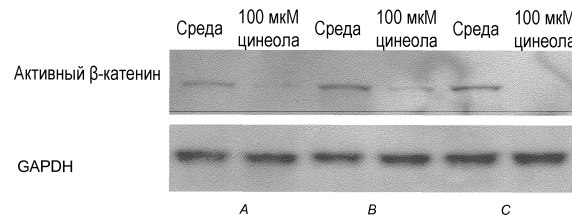
Фиг. 1



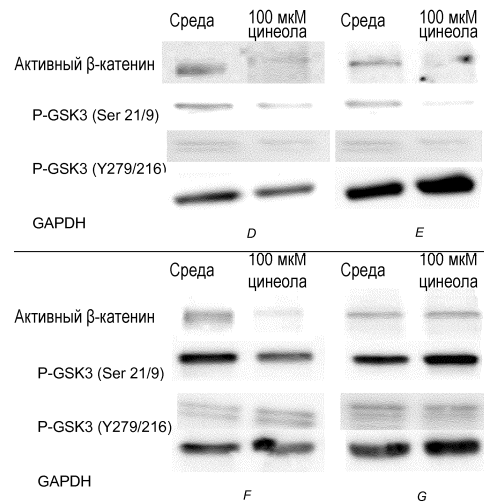
Фиг. 2А

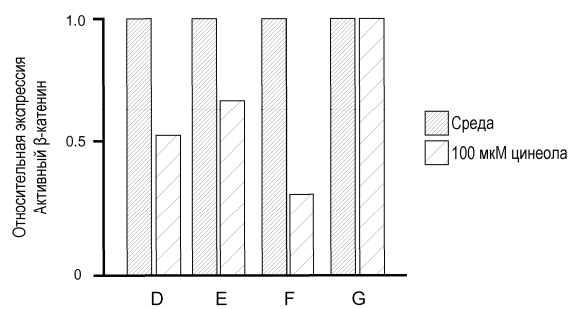


Фиг. 2В

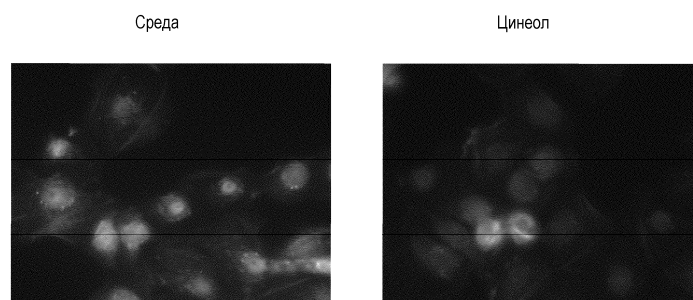


Фиг. 3

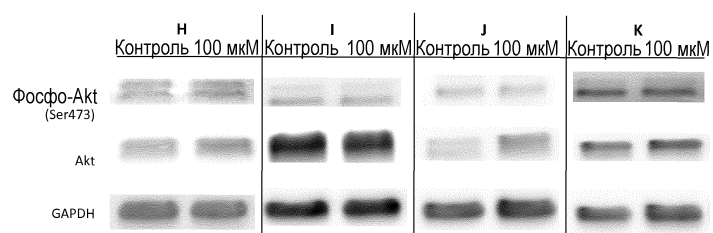




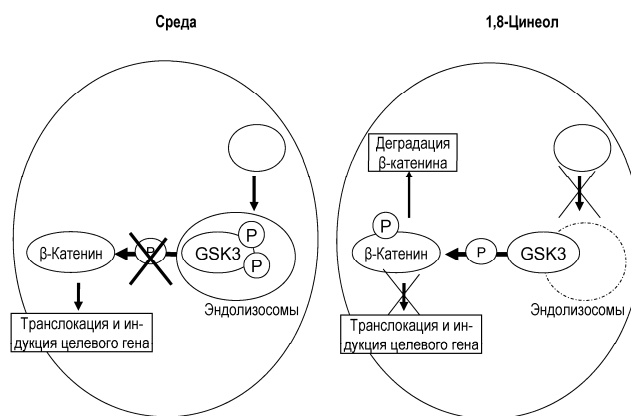
Фиг. 4В



Фиг. 4С



Фиг. 5



Фиг. 6



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2