

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201800542** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.05.29

(51) Int. Cl. *G01N 33/50* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.11.01

**(54) МОДИФИЦИРОВАННЫЙ РАДИОЛИГАНДНЫЙ СПОСОБ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ
ОЦЕНКИ АКТИВНОСТИ СВЯЗЫВАНИЯ БЕТА-АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ НА
ПОВЕРХНОСТИ Т-ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА**

(96) 2018000130 (RU) 2018.11.01

(71) Заявитель:
**ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
"НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ ПУЛЬМОНОЛОГИИ"
ФЕДЕРАЛЬНОГО МЕДИКО-
БИОЛОГИЧЕСКОГО
АГЕНТСТВА (ФГБУ "НИИ
ПУЛЬМОНОЛОГИИ" ФМБА
РОССИИ; ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО
ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО
ОБРАЗОВАНИЯ "МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИКО-
СТОМАТОЛОГИЧЕСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ А.И.
ЕВДОКИМОВА" МИНИСТЕРСТВА
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(ГБОУ ВПО МГМСУ ИМ. А.И.
ЕВДОКИМОВА МИНЗДРАВА
РОССИИ); ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
"НАЦИОНАЛЬНЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
КАРДИОЛОГИИ" МИНИСТЕРСТВА
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (ФГБУ
"НМИЦК" РОССИИ) (RU)**

(72) Изобретатель:

**Зыков Кирилл Алексеевич,
Смолякова Екатерина Владимировна,
Скоблов Юрий Самойлович,
Скоблова Наталья Александровна,
Масенко Валерий Павлович,
Амбатьелло Лали Гурамовна, Рвачёва
Анна Валерьевна, Чазова Ирина
Евгеньевна (RU)**

(74) Представитель:

Корнев К.А. (RU)

(57) Изобретение относится к области медицины и обеспечивает модифицированный радиолигандный способ количественной оценки активности связывания β -адренорецепторов (β -АР) на поверхности Т-лимфоцитов человека, позволяющий достоверно определять специфическое связывание с β 1- и β 2-адренорецепторами при их малых концентрациях, на основе которого могут быть выполнены анализы для клинических исследований. Способ включает стадию предынкубации среды, содержащей Т-лимфоциты, с лигандом, специфическим по отношению к β 1- и β 2-АР, с последующим взаимодействием с [125 I]цианопиндололом. Техническими результатами являются существенное повышение чувствительности анализа в отношении активности

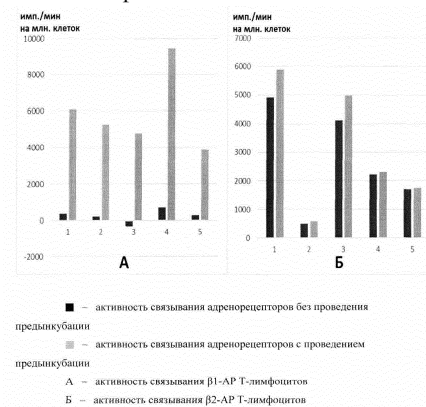
A1

201800542

201800542

A1

связывания $\beta 1$ -АР, а также возможность выявления характерных паттернов изменения характеристик β -АР звена под влиянием предынкубации со специфическими лигандами.



МОДИФИЦИРОВАННЫЙ РАДИОЛИГАНДНЫЙ СПОСОБ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ АКТИВНОСТИ СВЯЗЫВАНИЯ БЕТА-АДРЕНорецепТОРОВ НА ПОВЕРХНОСТИ Т-ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к области медицины. Более конкретно, изобретение обеспечивает модифицированный радиолигандный способ количественной оценки активности связывания β -адренорецепторов (β -АР) на поверхности Т-лимфоцитов человека, позволяющий достоверно определять специфическое связывание с β 1- и β 2-адренорецепторами при их малых концентрациях, на основе которого могут быть выполнены анализы для клинических исследований.

Предшествующий уровень техники

В структуре неинфекционной патологии наибольшее значение имеют сердечно-сосудистая и бронхо-легочная патологии. Заболевания сердечно-сосудистой системы находятся на первом месте среди причин заболеваемости и смертности, как в России, так и в других странах мира [Чазова И. Е., Чучалин А. Г., Зыков К. А., Ратова Л. Г. // Системные гипертензии. 2013. 10 (1) с. 5-35].

Среди бронхо-легочных патологий особого внимания требуют бронхообструктивные заболевания. [Global Initiative for Asthma (GINA) (updated 2014); Global strategy for the diagnosis, management and prevention of chronic obstructive pulmonary disease (GOLD). Update 2014.] Многим пациентам, имеющим данные патологии, необходимо назначение препаратов, воздействующих на β -адренорецепторы.

Адренорецепторы, по своей структуре, относятся к группе рецепторов, соединенных с гуанин-нуклеотид связывающими белками (G-белок). Анатомически β -адренорецепторы подразделяются на β 1-, β 2- и β 3-адренорецепторы, среди которых для диагностики и лечения сердечно-сосудистых и бронхо-легочных заболеваний наиболее значимы:

1) β 1-адренорецепторы, максимальное количество которых обнаруживают в правом предсердии,

2) β 2-адренорецепторы, которые присутствуют преимущественно в легких [Sano M., Yoshimasa T., Yagura T., Yamamoto I. Life Sci. 1993. v.52 (12). P.1063-70].

При заболеваниях легких часто в основе терапии лежат β -адреномиметики, а при сердечно-сосудистых заболеваниях – β -адреноблокаторы, которые для соответствующих рецепторов являются лигандами. Изменения экспрессии и аффинности рецепторов, происходящие под воздействием соответствующих препаратов, часто приводят к снижению эффективности назначенной терапии и, в ряде случаев, к развитию серьёзных побочных эффектов, таких как, увеличение частоты сердечных сокращений, удлинение интервала QT, снижение уровня калия, бронхоспазм и др.

Взаимодействие лиганд-рецептор зависит от типа лиганда (агонист или обратный агонист) и проявляется в изменении клеточной активности. Агонисты, связываясь с рецептором, активируют G-белок и увеличивают внутриклеточное содержание циклического аденозинмонофосфата (цАМФ). Одновременно с возникновением клинического эффекта данные изменения в клетке также вызывают изменение активности рецептора. Зачастую назначение агонистов приводит к снижению чувствительности к лиганду и десенситизации рецепторов [Mickey J., Tate R., Lefkowitz R. J. J. Biol. Chem. 1975. №250. P. 5727-5729; Perkins J. P., Waldo G. L., Harden T. K. Federation Proc. 1982. V. 41. P. 1327], что, в ряде случаев, вызывает неблагоприятное изменение клинического течения заболевания, в виде утяжеляющейся бронхиальной обструкции и отсутствии ответа на проводимую терапию. Применение антагонистов, напротив, приводит к повышению плотности β -адренорецепторов [Парфенова Е. Ф., Красникова Т. Л., Арипова Н. А. и др. Гер. Архив. 1993. 65 (4). с. 49-52] на поверхности клеток млекопитающих и может повлиять на их аффинность.

Изменения рецепторной активности отмечаются не только под воздействием фармакологических препаратов. Отмечено, что при заболеваниях сердечно-сосудистой и бронхо-легочной систем имеется уже исходно измененный фон активности рецепторов. У пациентов с наличием желудочковой экстрасистолы количество β_2 -адренорецепторов на лимфоцитах периферической крови статистически выше, чем у группы нормы [Красникова Т. Л., Юркова В. Б., Кузьмина М. М. и др. Кардиология. 1989. №7. С.25-29].

У пациентов с артериальной гипертонией также отмечается статистически значимо повышенная экспрессия β_2 -адренорецепторов по отношению к норме, которая, кроме того, коррелирует с тяжестью заболевания. При этом наличие у последних сердечной недостаточности приводит к снижению показателя

максимального связывания β 2-лигандов. [Qing F., Rahman S. U., Rhodes C. G. et al. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1997. 155(3). P. 1130-1134].

При обследовании пациентов с обструктивной патологией легких отмечаются противоречивые данные: в одних источниках сообщается об исходно низкой плотности β 2-рецепторов на поверхности клеток крови, тогда как другие не отмечают связи изменения плотности рецепторов на поверхности клеток крови с наличием бронхиальной астмы [P. G. Stanley, L. Duriseti, Sh. Underwood, S. Allred, P.A. Insel. J. Clin. Invest. 1980. V. 65 (3). P.577-585].

Для определения рецепторной активности в последние десятилетия разработан ряд как прямых, так и косвенных методов: оценка изменения аффинности, экспрессии рецепторов, а также их активности за счет изменения вторичных мессенджеров.

Методы связывания с радиоактивными лигандами позволяют дать оценку интересующих параметров рецепторов как исходно, так и на фоне применения препаратов, влияющих на β -адренорецепторы, а также позволяют определить их аффинность [Blankestijn W. M., Graafsma S. J., Hectors M. P. Y. et al. Eur. J. Clin. Pharmacol. 1992. 42(6). P. 613-8]. Плотность поверхностных β -адренорецепторов определяют методом специфического связывания с использованием специфического лиганда, меченого радиоактивным изотопом ^{125}I или ^3H . Неспецифическое связывание определяют при добавлении значительного избытка немеченого лиганда. Специфическое связывание лиганда с рецептором рассчитывают по разности общего и неспецифического связывания, плотность рецепторов и константу диссоциации определяют в координатах Скэтчарда, используя коэффициент линейной регрессии. По кривым вытеснения меченого лиганда рассчитывают константу диссоциации «рецептор-лиганд» по формуле Ченга-Пруссова [Williams L. T., Snyderman R., Lefkowitz R. J. J. Clin. Invest. 1976, v.57 (1). P. 149-55; Красникова Т. Л., Коричнева И. Л., Радюхин В. А. Биохимия. 1989. 54 (2), с. 235-243].

Однако описанный традиционный радиOLIгандный метод определения количества и аффинности β -адренорецепторов является трудоемким, дорогостоящим и требует забора большого количества крови, особенно при исследовании влияния препаратов. Последнее наиболее существенно при оценке динамики влияния препаратов, воздействующих на β -адренорецепторы, что делает этот метод малоприменимым в условиях реальной клинической практики.

Наиболее близким, по сути, техническим решением является способ селективной количественной оценки активности связывания β -адренорецепторов на

поверхности лейкоцитов человека, раскрытый в патентной публикации ЕА 026837 (опубл. 31.05.2017), при осуществлении которого для оценки активности связывания $\beta 1$ -адренорецепторов по специфическому связыванию [125 I]-цианопиндолола с клетками, определяют разность связывания [125 I]-цианопиндолола клетками в присутствии 1,5-2,0 мкМ нерадиоактивного цианопиндолола и связывания [125 I]-цианопиндолола клетками в присутствии 0,20-0,28 мкМ $\beta 1$ -специфического лиганда CGP-20712 (химическое название - дигидрохлорид [2-((3-карбамоил-4-гидрокси)фенокси)этиламино]-3-[4-(1-метил-4-трифторметил-2-имидазолил)фенокси]-2-пропанола), для чего реакцию смесь, содержащую водный раствор [125 I]-цианопиндолола, фосфатный буферный раствор (PBS), раствор немеченого лиганда (цианопиндолола или CGP-20712) и суспензию клеток инкубируют в течение 45-60 мин при 37°C при осторожном перемешивании, процесс останавливают добавлением ледяной воды (холодная вода со льдом), клетки центрифугируют при 1800-2000g в течение 10-12 мин, супернатант отбрасывают, осадок осторожно суспендируют в холодном (+4°C) PBS и вновь центрифугируют при тех же условиях, супернатант отбрасывают и осадок осторожно суспендируют в холодном PBS и центрифугируют при 10000-12000g в течение 2-3 мин, супернатант отбрасывают, а осадок просчитывают на γ -счетчике, измеряя количество радиоактивного материала в каждой пробе, после чего вычисляют активность связывания $\beta 1$ -адренорецепторов по разности общего связывания и бета-специфического связывания цианопиндолола, отнесенное на 1 млн клеток.

Для количественной селективной оценки активности связывания $\beta 2$ -адренорецепторов определяют разность связывания [125 I]-цианопиндолола клетками в присутствии 1,5-2,0 мкМ нерадиоактивного цианопиндолола и связывания [125 I]-цианопиндолола клетками в присутствии 0,14-0,18 мкМ $\beta 2$ -специфического лиганда ICI 118551 (химическое наименование гидрохлорид ($\pm$)-эритро-(S*,S*)-1-[2,3-(дигидро-7-метил-1H-инден-4-ил)окси]-3-[(1-метилэтил)амино]-2-бутанола), для чего реакцию смесь, содержащую водный раствор [125 I]-цианопиндолола, фосфатный буферный раствор (PBS), раствор немеченого лиганда (цианопиндолола или ICI 118551) и суспензию клеток, инкубируют в течение 45-60 мин при 37°C при осторожном перемешивании, процесс останавливают добавлением ледяной воды (холодная вода со льдом), клетки центрифугируют при 1800-2000g в течение 10-12 мин, супернатант отбрасывают, осадок осторожно суспендируют в холодном (+4°C) PBS и вновь центрифугируют при тех же условиях, супернатант отбрасывают и осадок

осторожно суспендируют в холодном PBS и центрифугируют при 10000-12000g в течение 2-3 мин, супернатант отбрасывают, а осадок просчитывают на γ -счетчике, измеряя количество радиоактивного материала в каждой пробе, после чего вычисляют активность связывания β 2-адренорецепторов по разности общего связывания и бета-специфического связывания цианопиндолола, отнесенное на 1 млн клеток.

Недостатком ближайшего аналога является низкая чувствительность в отношении β 1-адренорецепторов. Таким образом, существует потребность в разработке усовершенствованного метода радиолигандного анализа, который был бы, по существу, лишён недостатка решения, известного из уровня техники.

В соответствии с изобретением предложен способ радиолигандного определения активности связывания β 1- и β 2-адренорецепторов Т-лимфоцитов человека, для осуществления которого проводят

- а) забор у объекта крови из периферической вены;
- б) выделение Т-лимфоцитов общепринятым способом;
- в) постановку четырёх параллельных анализов с добавлением в каждом из них 100 мкл [125 I]цианопиндолола;
- г) инкубацию в течение 25-30 минут при 37°C и скорости движения шейкера 100 об/мин;
- д) остановку реакции добавлением холодной воды;
- е) центрифугирование реакционной массы при 2000 g в течение 10-12 минут с отбрасыванием супернатанта;
- ж) суспендирование осадка в холодном (+4°C) буфере PBS с последующим центрифугированием в тех же условиях с отбрасыванием супернатанта;
- з) суспендирование осадка в холодном (+4°C) буфере PBS с последующим центрифугированием при 10000-12000 g в течение 2-3 минут с отбрасыванием супернатанта;
- и) просчитывание осадка на γ -счетчике для измерения количества радиоактивного материала в каждой пробе и
- м) вычисление активности связывания β 1-адренорецепторов по разности общего связывания и бета-специфического связывания цианопиндолола, отнесенного на 1 млн клеток, отличающийся тем, что при постановке четырёх параллельных анализов, в первом из них к среде, содержащей Т-лимфоциты, добавляют воду, во втором в избытке добавляют «холодный» цианопиндолол, в третьем добавляют β 1-АР лиганд CGP 20712, в четвёртом добавляют β 2-АР лиганд ICI 118551 с и проводят

предынкубацию каждого анализируемого образца в течении 25-30 минут при 37°C и скорости движения шейкера 100 об/мин.

н) вычисление активности связывания β 2-адренорецепторов по разности общего связывания и бета-специфического связывания цианопиндолола, отнесенного на 1 млн клеток, отличающийся тем, что при постановке четырёх параллельных анализов, в первом из них к среде, содержащей Т-лимфоциты, добавляют воду, во втором в избытке добавляют «холодный» цианопиндолол, в третьем добавляют β 1-АР лиганд CGP 20712, в четвёртом добавляют β 2-АР лиганд ICI 118551 с и проводят предынкубацию каждого анализируемого образца в течении 25-30 минут при 37°C и скорости движения шейкера 100 об/мин.

Перечень фигур чертежей

На Фиг. 1 представлены гистограммы активности связывания β -адренорецепторов Т-лимфоцитов здоровых добровольцев и добровольцев, страдающих заболеваниями.

На Фиг. 2 представлен график зависимости процента связывания [125 I]цианопиндолола клетками ADL-7A в присутствии CGP-20712 от концентрации последнего.

На Фиг. 3 представлен график зависимости процента связывания [125 I]цианопиндолола клетками A2R9 в присутствии ICI 118,551 от концентрации последнего.

На Фиг. 4 представлены гистограммы активности связывания β 1-АР и β 2-АР Т-лимфоцитов в случаях проведения предынкубации и без проведения предынкубации.

Сущность изобретения

В качестве ближайшего аналога авторами настоящего изобретения был предложен способ оценки активности связывания β -1- и β -2-адренорецепторов, основанный на вытеснении из клеточных рецепторов меченного иодом-125 цианопиндолола, неспецифически связывающегося с несколькими типами рецепторов, лигандами с высокой специфичностью к адренорецепторам: CGP-20712 и ICI 118551. Была отмечена взаимосвязь β 2-АР с другими клиническими и лабораторными параметрами, имеющими доказанное клиническое значение. При этом активность связывания β 1-АР лимфоцитов была на крайне низком уровне – примерно в 10–20 раз

ниже активности связывания $\beta 2$ -АР этих же клеток. Поэтому ранее полученные результаты по активности связывания $\beta 1$ -АР Т-лимфоцитов не были всесторонне проанализированы из-за их малой достоверности.

Однако в ходе продолжающихся исследований с Т-лимфоцитами лиц, страдающих сочетанной кардиореспираторной патологией, авторами было выявлено, что для некоторых типов кардиологических патологий характерна чрезвычайно высокая активность связывания $\beta 1$ -адренорецепторов Т-лимфоцитов. Это явилось основанием для повторного рассмотрения вопроса специфичности и достоверной селективности предложенного ранее способа анализа, а также обусловило необходимость разработки модифицированного способа с целью увеличения достоверности получаемых результатов по активности связывания $\beta 1$ -адренорецепторов Т-лимфоцитов.

В контексте настоящего изобретения активность связывания клеточных β -АР определяется как специфическое связывание меченого лиганда в определенных стандартизированных условиях. Так как для определения активности связывания основным измеряемым параметром является количество связанного с рецептором радиоактивного лиганда, считается, что для количественной оценки удобнее использовать величину имп/мин·млн клеток. Это позволяет проводить количественные сравнения изменений активности связывания как под действием различных внешних факторов, так и в динамике.

К сожалению, [125 I]цианопиндолол не обладает высокой специфичностью в отношении различных β -АР. По некоторым данным, константы связывания для $\beta 1$ - и $\beta 2$ -адренорецепторов из разных источников колеблются в диапазоне 7 – 40 пМ (Engel G, Hoyer D, Berthold R, Wagner H. // Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 1981. Vol. 317(4). Pp. 277-285). Это привело к идее использовать для селективного определения $\beta 1$ - и $\beta 2$ -адренорецепторов специфические лиганды CGP-20712 и ICI 118551, впервые опубликованной в 1989 году (Tsuchihashi H., Nagatomo T, Imai S. // J. Pharmacobiodyn. 1989 Vol. 12(9). Pp. 509-516).

Однако такой подход сложно использовать для определения активности связывания $\beta 1$ -АР лимфоцитов. Количество $\beta 1$ -АР на поверхности лимфоцитов слишком мало, и специфический $\beta 1$ -лиганд CGP-20712 не может специфически вытеснять [125 I]цианопиндолол из $\beta 1$ -АР просто из-за их слишком незначительного количества. У здоровых добровольцев (Фиг. 1А, образцы 1, 2, 3) активность связывания $\beta 1$ -АР весьма низкая и находится на уровне не превышающим 0.1 фмоль

(10^{-16} моль) рецепторов на 1 млн Т-лимфоцитов, или примерно 60 рецепторов на клетку. У пациентов с бронхо-лёгочной патологией (Фиг. 1А, образцы 4, 5, 6) этот уровень значимо выше. У пациентов с идиопатическими нарушениями сердечного ритма (Фиг. 1Б) активность связывания $\beta 1$ -адренорецепторов существенно выше – на уровне 1-1,5 фмоль на 1 млн. клеток, и сопоставима с активностью связывания $\beta 2$ -АР. Этот факт обуславливает важность разработки высокочувствительного способа определения активности связывания $\beta 1$ -АР как клинического показателя.

Для подтверждения специфичности ранее предложенного метода были проведены эксперименты по вытеснению меченного [125 I]цианопиндолола из клеточных рецепторов линии ADL-7А лигандом CGP-20712 в различных концентрациях (Фиг. 2). Аналогичная серия экспериментов по вытеснению меченого [125 I]цианопиндолола лигандом ICI 118551 в различных концентрациях была проведена для линии А2R9 (Фиг. 3).

Авторами настоящего изобретения было неожиданно обнаружено, что изменение порядка прибавления реагентов в инкубационную смесь резко увеличивает активность связывания $\beta 1$ -адренорецепторов, а также дает возможность выявления характерных паттернов изменения характеристик β -АР звена под влиянием предварительной инкубации со специфическими лигандами. В контексте настоящего изобретения такая процедура называется «предынкубацией». Было предложено сначала инкубировать клетки со специфическими лигандами CGP-20712 или ICI 118551, а затем добавлять меченый [125 I]цианопиндол. Результаты этих экспериментов на клетках ADL-7А и А2R9 представлены в Таблице 1.

Таблица 1

Клетки	Количество связанной радиоактивности, имп/мин·млн клеток					% связывания от максимального	
	Без лиганда	с CGP-20712		с ICI 118551			
		Без ПИ	ПИ	Без ПИ	ПИ	Без ПИ	ПИ
ADL-7A	53392	–	–	–	–	100	–
ADL-7A	–	17059	11846	–	–	32	22
ADL-7A	–	–	–	41335	52391	78	98
A2R9	55978	–	–	–	–	100	–
A2R9	–	54296	52391	–	–	97	92
A2R9	–	–	–	7293	12445	13	22

ПИ – предынкубация

Интересно, что предынкубация клеток с CGP-20712 (β 1-специфический лиганд) активирует клеточные β 1-АР, но, в то же время, предынкубация с ICI 118551 (β 2-специфический лиганд) существенных изменений в активность связывания β 2-АР не вносит.

Из данных, приведённых в Таблице 1, следует, что CGP-20712, даже в очень высокой концентрации (0,44 мкМ), практически не вытесняет [125 I]цианопиндолол из клеточных β 2-АР: вытеснение составляет около 3%. Это подтверждает специфичность предложенного модифицированного способа анализа, т.к. выбранная концентрация CGP-20712 будет оказывать минимальное влияние на активность связывания радиоактивного лиганда β 2-АР Т-лимфоцитами. В то же время лиганд ICI 118551 в высокой концентрации на уровне 0,32 мкМ частично (около 20%) вытесняет [125 I]цианопиндолол из клеточных лимфоцитарных β 1-АР. Впрочем, для селективного определения активности связывания β 1-АР Т-лимфоцитов это искажение количественной оценки не превысит 10% даже для лиц с чрезвычайно высокой активностью связывания β 1-АР Т-лимфоцитов, наблюдаемой при редких патологиях.

Таким образом, предложенный модифицированный способ определения активности связывания β 1- и β 2-адренорецепторов Т-лимфоцитов человека позволяет неожиданным образом преодолеть недостаток известного уровня техники с достижением технического результата изобретения – существенного повышения чувствительности определения активности связывания β 1-АР.

Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения

Материалы

Для анализа применяют специфические лиганды: CGP-20712 (β 1-адреноблокатор), ICI 118551 (β 2-адреноблокатор) и цианопиндолол, полученные от фирмы Sigma (США). Радиоактивный изотоп [125 I] в виде иодида натрия с молярной активностью более 2000 Ки/ммоль получен от фирмы В/О «Изотоп» (Российская Федерация). Остальные реактивы, использованные в исследованиях, были квалификации не ниже ч.д.а.

Характеристика пациентов

Все включенные добровольцы перед включением в исследование подписывают информированное согласие в соответствии со всеми правилами этического положения Хельсинской декларации и Национальным стандартом Российской Федерации «Надлежащая клиническая практика» ГОСТ Р 52379-2005.

В исследование включены 11 добровольцев: 3 добровольца без сердечно-сосудистой и бронхо-лёгочной патологий; 3 пациента с бронхиальной астмой средней степени тяжести контролируемого течения; 5 пациентов с нарушением ритма сердца (идиопатической аритмией).

Все добровольцы имеют возраст старше 18 лет и не принимают препараты, воздействующие на β -адренорецепторы. Участвующие проходят врачебный осмотр, обследование с помощью стандартных методик оценки состояния сердечно-сосудистой и бронхо-легочной систем перед забором крови. Пациенты с бронхиальной астмой в течение 48 часов не принимают длительно действующие β 2-агонисты и М-холинолитические препараты, а короткодействующие – в течение 12 часов до исследования.

Исследование β 1-адренорецепторов проводят у 3 здоровых добровольцев и 3 пациентов с бронхо-легочной патологией. Определение активности связывания β 2-адренорецепторов проводят у 5 добровольцев с сочетанной кардиореспираторной патологией.

Получение [125 I]-цианопиндолола

Введение радиоактивного изотопа 125 I в молекулу цианопиндолола проводят модифицированным способом, описанным в статье Greenwood F. C, Hunter W. M. The preparation of labelled human growth hormone of high specific radioactivity. Biochem. J., 1963, 89(1). P. 114-123.

Реакционная смесь для радиоiodирования содержит 1 мкг цианопиндолола, 0,2М калий-фосфатный буфер (pH 7,0), 1 мКи Na^{125}I в объеме 50 мкл. Реакцию инициируют добавлением 10 мл раствора хлорамина Т (10 мг/мл). Длительность инкубации при комнатной температуре составляет 1 мин. Реакцию останавливают добавлением 10 мкл тиосульфата натрия (20 мг/мл) и после 5 мин инкубации при комнатной температуре добавляют 1 мкл раствора «холодного» йодида натрия (6 мг/мл).

Целевой продукт выделяют ВЭЖХ (хроматограф производства фирмы Gilson, Франция) на колонке Nucleosil 100 C-18 (5 мкм, 150 мм) в ион-парном режиме. Буфер А: 10% уксусная кислота, буфер Б: 100% ацетонитрил. Элюирование осуществляют градиентом концентрации ацетонитрила от 0 до 100% за 20 минут с расходом 0,5 мл/мин. Детектирование элюата производят по УФ-поглощению при 280 нм и по поточному детектору радиоактивности. Фракции, содержащие

[¹²⁵I]цианопиндолол, объединяют, выпаривают досуха, растворяют в 70% этаноле и хранят при –20°C.

Забор крови и выделение клеток

Кровь пациента из периферической вены забирают в 2 вакуумные пробирки S-Monovette EDTA KE (Sarstedt, Германия) объемом 9 мл. Кровь отстаивают 60 мин при комнатной температуре до осаждения эритроцитов. Далее используют плазму, обогащенную лейкоцитами.

Плазму из двух пробирок (18 мл) отбирают и аккуратно наслаивают на 15 мл Histopaque-1077 (Sigma, США; кат. № H8889), содержащегося в пробирке объемом 50 мл. Для работы используют стерильные пробирки, стерильные пипетки или пипетки с дозатором. Проводят центрифугирование при комнатной температуре в течение 25 минут на центрифуге с горизонтальным ротором при 400 g. После центрифугирования собирают интерфазное кольцо, содержащее моноклеарные клетки (лимфоциты) в чистые пробирки объемом 50 мл.

Суспензию лимфоцитов однократно отмывают 30 мл буфера PBS (фосфатно-солевой буфер, pH 7,2, 2мМ ЭДТА; autoMACS Rinsing solution, Miltenyi Biotec, Германия, кат. № 130-091-222) и центрифугируют 10 минут при 400 g. Надосадочную жидкость удаляют, а осадок ресуспендируют в 500 мкл буфера PBS и переносят в 1,5 мл микроцентрифужные пробирки эппендорф, используя автоматическую пипетку и наконечники с фильтром. Центрифугируют 10 мин при 400 g при комнатной температуре. Надосадочную жидкость аккуратно удаляют.

Осадок из пробирок используют для выделения Т-лимфоцитов с помощью набора Pan T cell isolation kit (human) (Miltenyi Biotec, Германия, кат. № 130-096-535), согласно инструкции к набору. Для этого осадок в пробирке ресуспендируют в 40 мкл буфера PBS-BSA и добавляют 10 мкл смеси антител (Pan T Cell Biotin Antibody Cocktail), хорошо перемешивают и инкубируют 7 мин в холодильнике при температуре 2-8°C. В пробирку к полученной смеси добавляют 30 мкл буфера PBS-BSA и 20 мкл магнитных частиц (Pan T Cell MicroBead Cocktail), аккуратно перемешивают и инкубируют 15 мин в холодильнике при температуре 2-8°C. Далее в пробирку добавляют 500 мкл буфера PBS-BSA, перемешивают и пропускают полученные суспензии через магнитные колонки, заранее промытые буфером PBS-BSA. Магнитную сепарацию проводят с применением сепаратора OctoMACS (Miltenyi Biotec, Германия, кат. № 130-042-201) согласно инструкции производителя. Проходящий раствор (Т-клетки) собирают в пробирку.

500 мкл раствора из пробирки переносят в эппендорф, добавляют 500 мкл питательной среды 199, хорошо перемешивают. Из полученного объема (1 мл) отбирают 10 мкл в отдельный эппендорф для подсчета клеток (приблизительно 10^6 клеток/мл). Полученные клетки хранят в холодильнике при 4°C в течение не более 24 часов до использования в радиолигандном анализе.

Предынкубация со специфическими лигандами

В четыре отдельно взятых эппендорфа помещают (1) 10 мкл воды, (2) 10 мкл водного раствора «холодного» цианопиндолола с концентрацией в интервале 10^{-6} - 10^{-8} М, содержащего избыток «холодного» цианопиндолола, (3) 10 мкл 0,20-0,28 мкМ β_1 -специфического лиганда CGP-20712 (химическое название – дигидрохлорид [2-((3-карбамоил-4-гидрокси)фенокси)этиламино]-3-[4-(1-метил-4-трифторметил-2-имидазолил)фенокси]-2-пропанола) и (4) 10 мкл 0,14-0,18 мкМ β_2 -специфического лиганда ICI 118551 (химическое название - гидрохлорид ($\pm$)-эритро-(S*,S*)-1-[2,3-(дигидро-7-метил-1Н-инден-4-ил)окси]-3-[(1-метилэтил)амино]-2-бутанола), фосфатный буферный раствор (PBS) и 100 мкл суспензии клеток с концентрацией 5-10 млн/мл. Смеси предынкубируют в течение 25-30 минут при 37°C и осторожном перемешивании на шейкере со скоростью 100 об/мин. Процесс останавливают добавлением ледяной воды (холодная вода со льдом), клетки центрифугируют при 1800-2000 g в течение 10-12 минут, супернатант отбрасывают, осадок осторожно суспендируют в холодном (+4°C) PBS и вновь центрифугируют в тех же условиях. Супернатант отбрасывают и осадок осторожно суспендируют в холодном PBS и центрифугируют при 10000-12000 g в течение 2-3 минут и отбрасывают супернатант.

Радиолигандный анализ активности связывания β -адренорецепторов

Для экспериментов с предынкубацией каждый из осадков (1)-(4) после центрифугирования разбавляют буфером PBS с 0,1% BSA до концентрации 10 млн/мл и 100 мкл клеточной суспензии инкубируют в течение 25-30 минут при 37°C и осторожном перемешивании на шейкере со скоростью 100 об/мин. Затем в реакционную смесь добавляют 100 мкл раствора [125 I]цианопиндолола в буфере PBS с концентрацией 1000 имп/мин·мкл и инкубируют ещё 25-30 минут. Процесс останавливают добавлением в каждую пробу по 400 мкл ледяной воды (холодная вода со льдом). Для отмывки от не связавшейся радиоактивности клетки центрифугируют при 2000 g в течение 10 минут, осадок трижды промывают суспендированием в 200 мкл холодного буфера PBS и центрифугированием в тех же условиях, после чего просчитывают на γ -счетчике Wallac Wizard 1470 (PerkinElmer, США). Вычисляют

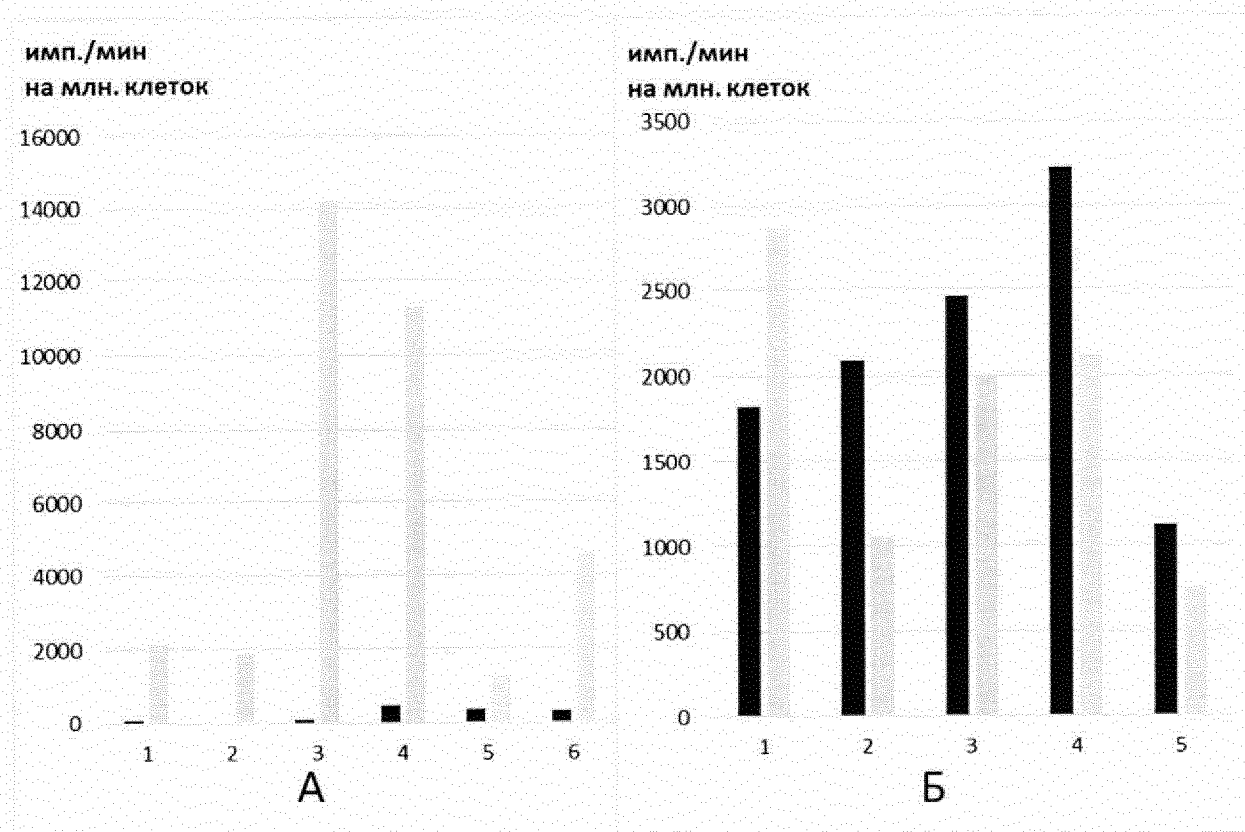
активность связывания $\beta 1$ - и $\beta 2$ -адренорецепторов по разности общего связывания и бета-специфического связывания цианопиндолола, отнесенное на 1 млн клеток.

Формула изобретения

Способ радиолигандного определения активности связывания $\beta 1$ - и $\beta 2$ -адренорецепторов Т-лимфоцитов человека, для осуществления которого проводят

- а) забор у объекта крови из периферической вены;
- б) выделение Т-лимфоцитов общепринятым способом;
- в) постановку четырёх параллельных анализов с добавлением в каждом из них 100 мкл [125 I]цианопиндолола;
- г) инкубацию в течение 25-30 минут при 37°C и скорости движения шейкера 100 об/мин;
- д) остановку реакции добавлением холодной воды;
- е) центрифугирование реакционной массы при 2000 g в течение 10-12 минут с отбрасыванием супернатанта;
- ж) суспендирование осадка в холодном (+4°C) буфере PBS с последующим центрифугированием в тех же условиях с отбрасыванием супернатанта;
- з) суспендирование осадка в холодном (+4°C) буфере PBS с последующим центрифугированием при 10000-12000 g в течение 2-3 минут с отбрасыванием супернатанта;
- и) просчитывание осадка на γ -счетчике для измерения количества радиоактивного материала в каждой пробе и
- к) вычисление активности связывания $\beta 1$ -адренорецепторов по разности общего связывания и бета-специфического связывания цианопиндолола, отнесенного на 1 млн клеток, отличающийся тем, что при постановке четырёх параллельных анализов, в первом из них к среде, содержащей Т-лимфоциты, добавляют воду, во втором в избытке добавляют «холодный» цианопиндолол, в третьем добавляют $\beta 1$ -АР лиганд CGP 20712, в четвёртом добавляют $\beta 2$ -АР лиганд ICI 118551 с и проводят предынкубацию каждого анализируемого образца в течении 25-30 минут при 37°C и скорости движения шейкера 100 об/мин.
- л) вычисление активности связывания $\beta 2$ -адренорецепторов по разности общего связывания и бета-специфического связывания цианопиндолола, отнесенного на 1 млн клеток, отличающийся тем, что при постановке четырёх параллельных анализов, в первом из них к среде, содержащей Т-лимфоциты, добавляют воду, во втором в избытке добавляют «холодный» цианопиндолол, в третьем добавляют $\beta 1$ -АР лиганд CGP 20712, в четвёртом добавляют $\beta 2$ -АР лиганд ICI 118551 с и

проводят предынкубацию каждого анализируемого образца в течении 25-30 минут при 37°C и скорости движения шейкера 100 об/мин.



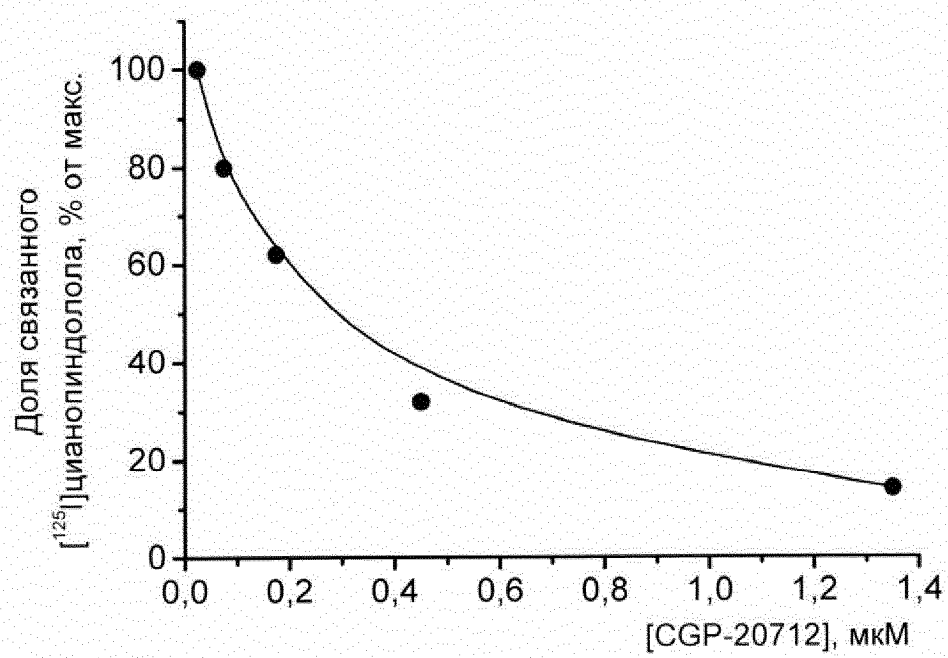
■ — активность связывания β_1 -адренорецепторов Т-лимфоцитов

▨ — активность связывания β_2 -адренорецепторов Т-лимфоцитов

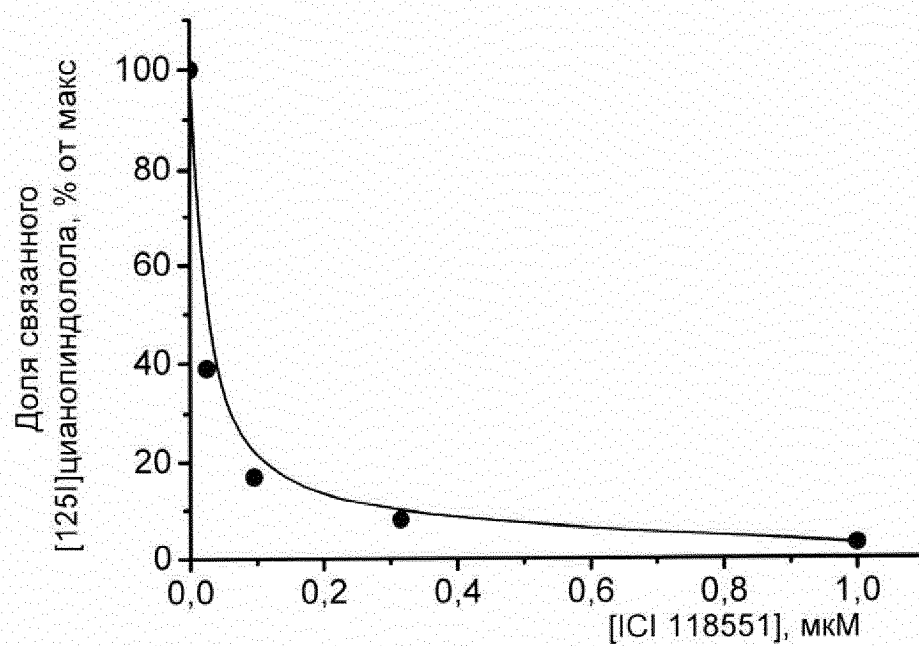
А — активность связывания адренорецепторов здоровых добровольцев (1, 2, 3) и пациентов с бронхо-легочной патологией (4, 5, 6)

Б — активность связывания адренорецепторов у пациентов с идиопатической аритмией

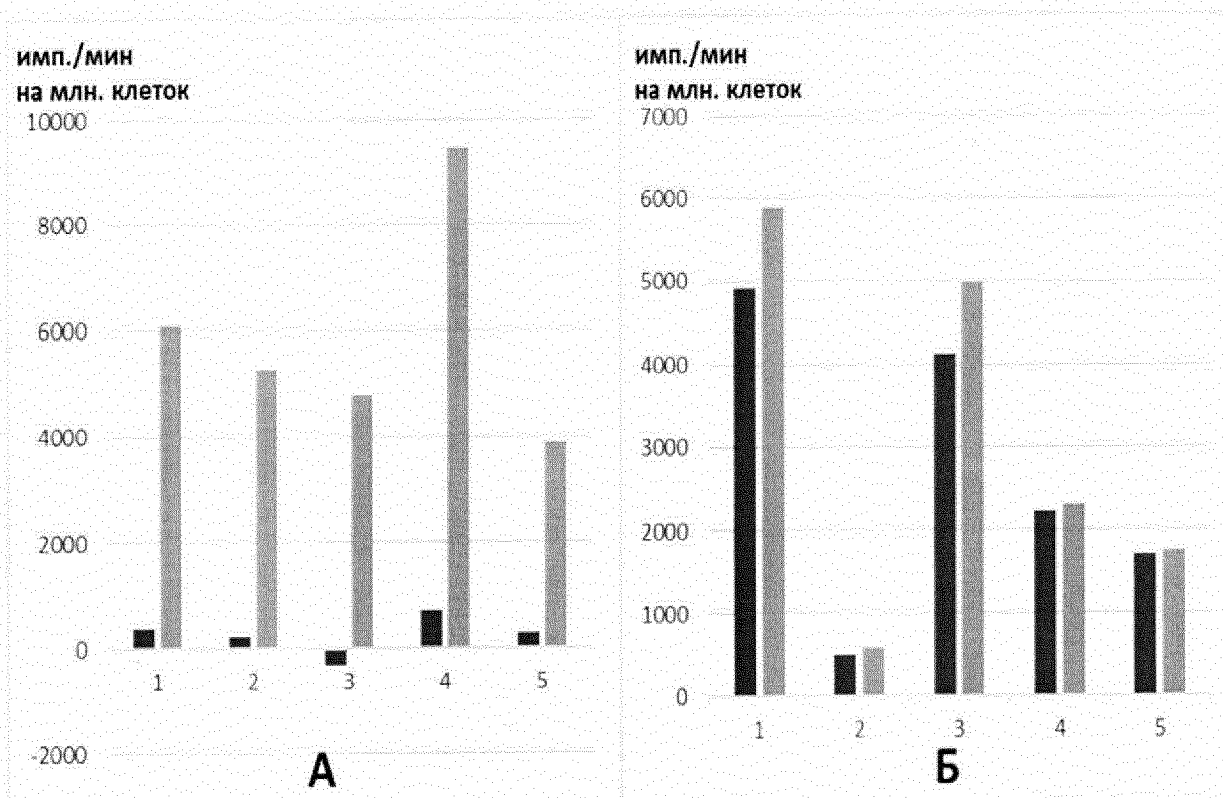
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



■ — активность связывания адренорецепторов без проведения предынкубации

■ — активность связывания адренорецепторов с проведением предынкубации

А — активность связывания β_1 -АР Т-лимфоцитов

Б — активность связывания β_2 -АР Т-лимфоцитов

Фиг. 4

ЕВРАЗИЙСКОЕ ПАТЕНТНОЕ ВЕДОМСТВО

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

Номер евразийской заявки:

201800542

Дата подачи: 01/11/2018

Дата испрашиваемого приоритета:

Название изобретения: МОДИФИЦИРОВАННЫЙ РАДИОЛИГАНДНЫЙ СПОСОБ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ АКТИВНОСТИ СВЯЗЫВАНИЯ БЕТА-АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ НА ПОВЕРХНОСТИ Т-ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

Заявитель: ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ "НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ПУЛЬМОНОЛОГИИ" ФЕДЕРАЛЬНОГО МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНСТВА (ФГБУ "НИИ ПУЛЬМОНОЛОГИИ" ФМБА РОССИИ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ "МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИКО-СТОМОТОЛОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ А. И. ЕВДОКИМОВА" МИНИСТЕРСТВА

☐ Некоторые пункты формулы не подлежат поиску (см. раздел I дополнительного листа).☐ Единство изобретения не соблюдено (см. раздел II дополнительного листа)

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ: G01N 33/50 (01/01/2006)

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Минимум просмотренной документации (система классификации и индексы МПК)
G01N 33/50 (01/01/2006)

Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в область поиска:

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
YD	EA 26837 B1 2017.05.31, весь документ.	1
Y	О. Ю. Агапова, Ю. С. Скоблов, К. А. Зыков, А. В. Рвачева, В. Б. Бейлина, В. П. Масенко, И. Е. Чазова. Радиолигандный метод оценки рецепторной активности р-адренорецепторов т-лимфоцитов человека. БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 2015, том 41, № 5, с. 592-598, ФГУП «Издательство «Наука», весь документ.	1

☐ последующие документы указаны в продолжении графы В☐ данные о патентах-аналогах указаны в приложении

* Особые категории ссылочных документов:

"А" документ, определяющий общий уровень техники

"Е" более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

"О" документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

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

"D" документ, приведенный в евразийской заявке

"Т" более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

"Х" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

"У" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

"&" документ, являющийся патентом-аналогом

"L" документ, приведенный в других целях

Дата действительного завершения патентного поиска: 14/05/2019

Уполномоченное лицо:

Главный эксперт
Отдела химии и медицины

А.Н. Тимонин

Телефон: +7(495)411-61-60*315