



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 31/4985 (2018.08); A61K 39/395 (2018.08); A61P 9/00 (2018.08)

(21)(22) Заявка: 2017133480, 27.02.2015

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
27.02.2015

Дата регистрации:
22.02.2019

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 27.02.2015

(45) Опубликовано: 22.02.2019 Бюл. № 6

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 27.09.2017

(86) Заявка РСТ:
KR 2015/001902 (27.02.2015)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2016/137037 (01.09.2016)

Адрес для переписки:
109012, Москва, ул. Ильинка, 5/2, ООО
"Союзпатент"

(72) Автор(ы):

ЧАН Ын-Чу (KR),
СОН Чэ-Кван (KR),
КИМ Ми Чон (KR),
ЧХВЕ Бонккун (KR),
Ли Самин (KR)

(73) Патентообладатель(и):

ТЕ АСАН ФАУНДЕЙШН (KR),
ЮНИВЕРСИТИ ОФ УЛЬСАН
ФАУНДЕЙШН ФОР ИНДАСТРИ
КООПЕРЕЙШН (KR)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: IN 201202228 I3, 23.05.2014. CN
102470166 A, 23.05.2012. RU 2532330 C2,
10.11.2014. RU 2011116931 A, 10.11.2012.
ROBERT M. WEISS et al. Osteoprotegerin
inhibits aortic valve calcification and preserves
valve function in hypercholesterolemic mice.
PLOS one. Published June 6, 2013. Перечень
данных [он-лайн] 06.06.2013 [Найдено
2018.09.21] - (см. прод.)

(54) КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ПРЕДОТВРАЩЕНИЯ ИЛИ ЛЕЧЕНИЯ КАЛЬЦИНОЗА КЛАПАНА, СОДЕРЖАЩИЕ DPP-4 ИНГИБИТОР

(57) Реферат:

Изобретение относится к фармацевтической промышленности, а именно к композиции для предотвращения или лечения кальциноза клапана аорты. Применение фармацевтической композиции, содержащей ингибитор дипептидилпептидазы-4 (DPP-4), для предотвращения или лечения кальциноза клапана аорты, где ингибитор представляет собой по меньшей мере что-либо одно, выбранное из группы, состоящей из ситаглиптина, алоглиптина, эвоглиптина, линаглиптина, саксаглиптина и вилдаглиптина. Применение ингибитора дипептидилпептидазы-4 (DPP-4) для получения медикамента для предотвращения или лечения кальциноза клапана аорты, где ингибитор

представляет собой по меньшей мере что-либо одно, выбранное из группы, состоящей из ситаглиптина, алоглиптина, эвоглиптина, линаглиптина, саксаглиптина и вилдаглиптина. Применение композиции, содержащей ингибитор дипептидилпептидазы-4 (DPP-4), для предотвращения или лечения кальциноза клапана аорты, где ингибитор представляет собой по меньшей мере что-либо одно, выбранное из группы, состоящей из ситаглиптина, алоглиптина, эвоглиптина, линаглиптина, саксаглиптина и вилдаглиптина. Вышеописанная композиция эффективна для предотвращения или лечения кальциноза клапана аорты. 3 н. и 2 з.п. ф-лы, 11 ил., 2 табл., 7 пр.

(56) (продолжение):

найдено из Интернет: URL: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0065201>.
LYUBOV CHAYKOVSKA et al. Effects of DPP-4 inhibitors on the heart in a rat model of uremic cardiomyopathy //PLOS one, November 2011, vol.6, issue 11, e27861, p.1-8. POGGIO P., et al. Osteopontin controls endothelial cell migration in vitro and in excised human valvular tissue from patients with calcific aortic stenosis and controls //J. Cell Physiol., 2011 Aug, 226(8) 2139-49.

R U 2 6 8 0 5 2 7 C 1

R U 2 6 8 0 5 2 7 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
A61K 31/4985 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

A61K 31/4985 (2018.08); A61K 39/395 (2018.08); A61P 9/00 (2018.08)(21)(22) Application: **2017133480, 27.02.2015**(24) Effective date for property rights:
27.02.2015Registration date:
22.02.2019

Priority:

(22) Date of filing: **27.02.2015**(45) Date of publication: **22.02.2019** Bull. № 6(85) Commencement of national phase: **27.09.2017**(86) PCT application:
KR 2015/001902 (27.02.2015)(87) PCT publication:
WO 2016/137037 (01.09.2016)Mail address:
109012, Moskva, ul. Ilinka, 5/2, OOO "Soyuzpatent"

(72) Inventor(s):

CHANG, Eun-Ju (KR),
SONG, Jae-Kwan (KR),
KIM, Mi Jeong (KR),
CHOI, Bongkun (KR),
LEE, Sahmin (KR)

(73) Proprietor(s):

THE ASAN FOUNDATION (KR),
UNIVERSITY OF ULSAN FOUNDATION
FOR INDUSTRY COOPERATION (KR)

(54) **COMPOSITIONS CONTAINING DPP-4 INHIBITOR FOR PREVENTION OR TREATMENT OF VALVE CALCIFICATION**

(57) Abstract:

FIELD: medicine; pharmaceuticals.

SUBSTANCE: invention relates to the pharmaceutical industry, and in particular to a composition for preventing or treating aortic valve calcification. Use of a pharmaceutical composition containing a dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) inhibitor for preventing or treating aortic valve calcification, where the inhibitor is at least one selected from the group consisting of sitagliptin, alogliptin, evogliptin, linagliptin, saxagliptin and vildagliptin. Use of a dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) inhibitor to obtain a medicament for the prevention or treatment of aortic

valve calcification, where the inhibitor is at least one selected from the group consisting of sitagliptin, alogliptin, evogliptin, linagliptin, saxagliptin and vildagliptin. Use of a composition containing a dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) inhibitor for preventing or treating aortic valve calcification, where the inhibitor is at least one selected from the group consisting of sitagliptin, alogliptin, evogliptin, linagliptin, saxagliptin and vildagliptin.

EFFECT: above composition is effective in preventing or treating aortic valve calcification.

5 cl, 11 dwg, 2 tbl, 7 ex

Область техники

Настоящее раскрытие имеет отношение к фармацевтической композиции, предназначенной для предотвращения или лечения кальциноза клапана и включающей ингибитор дипептидилпептидазы-4 (DPP-4). Настоящее раскрытие также имеет
5 отношение к пищевой композиции для предотвращения или улучшения кальциноза клапана, включающей ингибитор дипептидилпептидазы-4 (DPP-4).

Уровень техники

Кальцификация сосудов сердца способствует усилению артериальной гипертензии, обострению сердечной недостаточности, усилению острого коронарного синдрома и
10 клапанного порока и таким образом, является причиной различных осложнений. Кроме того, целый ряд эпидемиологических исследований показал, что кальцификация (кальциноз) сосудов независимо повышает смертность. Сосудистая кальцификация осуществляется по механизму, сходному с остеогенной программой после нормального пренатального периода или перелома кости, и активируется в старческом возрасте и
15 при таких заболеваниях как, диабет, хроническая почечная недостаточность. Снижение содержания минералов в костях ускоряется воспалительной реакцией, при этом свободные минералы подвергаются эндоцитозу, попадая в аномальные эндотелиальные клетки сосудов.

Сосудистая эндотелиальная дисфункция является важным механизмом кальцификации
20 сосудов. В норме эндотелиальная синтаза оксида азота (eNOS) конститутивно экспрессируется на постоянном уровне в эндотелиальных клетках сосудов, эндомиокардиальных клетках, атриальных клетках, гладкомышечных клетках сосудов, эндотелиальных клетках дыхательных путей и тому подобных, и служит для регуляции сосудистого тонуса и поддержания гомеостаза эндотелиальных клеток сосудов путем
25 образования оксида азота (NO). При появлении дисфункции eNOS компенсаторно увеличиваются такие изоферменты, как нейрональная NOS (nNOS) или индуцибельная NOS (iNOS), имеющие структуры и функции сходные с eNOS, для того, чтобы возместить роль eNOS, но они не могут длительное время поддерживать нормальное функционирование эндотелиальных клеток сосудов легко. По этой причине
30 патологические изменения в кровеносных сосудах, включая атеросклероз, появляются на ранних этапах. На лабораторной животной модели, изучающей действие эндотелиальной синтазы оксида азота (eNOS) на сердечно-сосудистую систему, говоря другими словами, животной модели с нокаутом эндотелиальной синтазы оксида азота (eNOS KO), было показано, что ускоряется начало гипертензии и атеросклероза, и
35 возникают обширные участки повреждения и значительное ремоделирование после инсульта и инфаркта миокарда по сравнению с контролем.

Между тем, хотя и сообщалось, что DPP-4 экспрессируется на повышенном уровне у животной модели с индуцированной сердечно-сосудистой кальцификацией, не было высказано предположение о том, что экспрессия DPP-4 связана с кальцификацией
40 сердечно-сосудистой системы, в частности, сердечных клапанов, или что ингибирование экспрессии или активности DPP-4 может предотвращать или лечить кальцификацию сердечных клапанов.

Настоящие изобретатели предприняли большие усилия, чтобы объяснить развитие сердечно-сосудистой кальцификации и разработать терапевтическое средство от сердечно-сосудистой кальцификации, и в результате этого, обнаружили, что DPP-4 ингибитор может
45 эффективно предотвращать или лечить кальцификацию клапанов, в частности, сердечных клапанов, таким образом завершив настоящее изобретение.

Раскрытие изобретения

Настоящее раскрытие предоставляет фармацевтическую композицию для предотвращения или лечения кальциноза клапанов, включающую ингибитор дипептидилпептидазы-4 (DPP-4).

Настоящее раскрытие также предоставляет пищевую композицию для предотвращения или улучшения кальциноза клапанов, включающую ингибитор DPP-4.

Настоящее раскрытие также предоставляет композицию для предотвращения или лечения кальциноза клапанов, включающую ингибитор дипептидилпептидазы-4 (DPP-4). Данная композиция включает фармацевтическую композицию или пищевую композицию.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 показывает профили экспрессии генов, связанных с кальцификацией, генов, связанных с фиброзом, и генов, связанных с воспалением у CAVD пациентов. Согласно Фиг. 1, повышающая регуляция показана красным цветом, понижающая регуляция показана зеленым цветом.

Фиг. 2a показывает уровни экспрессии hDPP-4 мРНК у пациентов с CAVD и нормальных людей, показанные с помощью кРВ-ПЦР; Фиг. 2b показывает профили экспрессии хемокинов, активированных DPP-4, и генов, регулируемых DPP-4; и Фиг. 2c показывает результаты кРВ-ПЦР, проведенной с целью измерения уровней мРНК генов, регулируемых DPP-4 в микроматричном анализе.

Фиг. 3 показывает результаты гистологического анализа, выполненного с помощью окрашивания по ван Косса, окрашивания ализариновым красным, DAPI, DPP-4 и смешением DAPI и DPP-4 у пациентов с CAVD и нормальных людей. Ядра были окрашены DAPI (синий).

Фиг. 4 показывает результаты AR и VK окрашивания залитых в парафин срезов аортального клапана мыши дикого типа или eNOS-/-/мышы. Срезы также были окрашены анти-мышиным DPP-4.

Фиг. 5 показывает результаты ALP, AR и VK окрашивания гладкомышечных клеток сосудов мыши дикого типа или eNOS-/-/мышы после инкубации в остеогенной базальной среде.

Фиг. 6a показывает результаты измерения уровней mDPP-4 в гладкомышечных клетках сосудов мыши дикого типа или eNOS-/-/мышы в культуральной среде с помощью метода ELISA; Фиг. 6b показывает результаты анализа уровней экспрессии mDPP-4 мРНК методом кРВ-ПЦР; и Фиг. 6c показывает результаты измерения уровней mDPP-4 в плазме методом ELISA.

Фиг. 7a показывает результаты анализа экспрессии DPP-4 в гладкомышечных клетках сосудов мыши дикого типа или eNOS-/- мышы методом RT-PCR через 24 часа после обработки DETA-NO; Фиг. 7b показывает результаты анализа экспрессии mDPP-4 в гладкомышечных клетках сосудов мыши мыши дикого типа или eNOS-/- мышы с помощью иммуноблот-анализа через 48 часов после обработки DETA-NO; Фиг. 7c показывает результаты измерения mDPP-4 промоторной активности в гладкомышечных клетках сосудов у мыши дикого типа или eNOS-/- мышы; Фиг. 7d показывает результаты анализа NF-κB активности в гладкомышечных клетках сосудов мыши дикого типа или eNOS-/- мышы; и Фиг. 7e показывает результаты измерения методом ELISA уровней mDPP-4 в гладкомышечных клетках сосудов мыши дикого типа или eNOS-/- мышы, обработанных NF-κB ингибитором.

Фиг. 8 показывает результаты измерения mDPP-4 промоторной активности в гладкомышечных клетках сосудов мыши мыши eNOS-/-, трансформированной mDPP-4

промотором, содержащим NF-κB сайт связывания, и промотором, содержащим ген люциферазы, после обработки DETA-NO.

Фиг. 9a и 9b показывают результаты введения конъюгированного с бисфосфонатом визуализирующего агента для обнаружения остеогенной активности, после введения ситаглиптина eNOS-/- мышам.

Фиг. 10a показывают результаты VK окрашивания всего тела (верхний ряд) и аортального клапана (нижний ряд) eNOS-/- мышей после введения ситаглиптина eNOS-/- мышам; и Фиг. 10b графически показывает VK-положительную область.

Фиг. 11 показывает, что дифференцировка остеобластов человеческих интерстициальных клеток клапанов (hVICs) ингибируется обработкой DPP-4.

Лучший вариант осуществления изобретения

Если не указано иное, все технические и научные термины, использованные в описании, имеют значение, понятное обычному среднему специалисту в той области техники, к которой относится данное изобретение. В общем, использованная в описании номенклатура и экспериментальные методы, которые будут описаны ниже, являются широко известными и обычно применяемыми в данной области техники.

Настоящее раскрытие относится к композиции для предотвращения и лечения кальциноза клапана, включающей ингибитор DPP-4 (дипептидилпептидазы-4), и к способу лечения кальциноза клапана с использованием композиции для предотвращения и лечения кальциноза клапана.

В настоящем раскрытии DPP-4 (дипептидилпептидаза-4) также называется кластером дифференцировки 26 (CD26) и известна как белок, вовлеченный в иммуномодуляцию, апоптоз, сигнальную трансдукцию и тому подобное.

В композиции настоящего раскрытия ингибитор DPP-4 может представлять собой или ингибитор для ингибирования экспрессии последовательности нуклеотидов DPP-4 или ингибитор для ингибирования активности DPP-4 протеина. Примеры ингибитора для ингибирования экспрессии последовательности нуклеотидов DPP-4 могут включать антисмысловую последовательность нуклеотидов к мРНК DPP-4, аптамер, небольшую интерферирующую РНК (сиРНК), короткую шпилечную РНК (шРНК), микро РНК (миРНК) или интерференция РНК (иРНК).

В дополнение к этому, примеры ингибитора для ингибирования активности DPP-4 протеина могут включать антитело к DPP-4, ситаглиптин, вилдаглиптин, саксаглиптин, линаглиптин, дутоглиптин, гемиглиптин, алоглиптин, анаглиптин, эвоглиптин, берберин, дипротин или люпеол. В настоящем раскрытии антитело к DPP-4 может быть или моноклональным антителом, или поликлональным антителом.

В настоящем раскрытии уровень экспрессии DPP-4 увеличивается в том случае, когда клапаны кальцифицируются, причем кальцификация заметно снижается после введения DPP-4 ингибитора. Поэтому DPP-4 ингибитор может использоваться для лечения и профилактики кальциноза клапанов.

В настоящем раскрытии термин «кальциноз клапана» относится к образованию, росту или отложению кристаллов гидроксиапатита (фосфата кальция) во внеклеточном матриксе в клапанах.

Кальцификация включает медиакальциноз или атеросклеротическую кальцификацию. Кальцифицированная ткань называется кальцинированным хрящом. Кальциноз клапана характерным образом возникает в двух областях. Интимальная кальцификация появляется в связи с атеросклерозом. В случае атеросклероза богатые жиром макрофагоциты и Т лимфоциты сначала накапливаются в клапанах с образованием слоя жира, а затем гладко-мышечные клетки мигрируют из медиального слоя внутрь

слоя жира. Считается, что хемокинетические соединения, стимулирующие движение таких клеток, продуцируются в проксимальных эндотелиальных клетках, активированных фагоцитах и тому подобном. Мигрировавшие гладко-мышечные клетки пролиферируют, жир накапливается в гладко-мышечных клетках, и формируются
 5 внеклеточные матрицы. Кальцификация происходит в центральной области атероматозной бляшки. Медиакальциноз происходит вне зависимости от атеросклероза и интимальной кальцификации. Медиальный кальциноз артерий, возникающий в дистальных артериях, также называется медиальным склерозом Менкеберга и часто
 10 наблюдается у пожилых людей с диабетом. Известно, что гладко-мышечные клетки и эластин связаны с возникновением медиального кальциноза артерий.

Использованный в описании термин "атеросклеротическая кальцификация" относится к сосудистой кальцификации, возникающей в атероматозной бляшке по ходу внутренней оболочки сосудов.

В настоящем раскрытии медиакальциноз, кальцификация медиального слоя
 15 сосудистой стенки или артериосклероз Менкеберга относится к кальцификации, характеризующейся наличием кальция в медиальной стенке.

Кроме того, кальцификация согласно настоящему раскрытию может быть вызвана клапанным пороком, гиперлипидемией, старческим возрастом, дефицитом эстрогена, ангиной, сердечной недостаточностью, нефритом, уремией, диабетом, воспалительной
 20 болезнью или сердечнососудистым заболеванием. Примеры нефрита могут включать гломерулонефрит, диабетический нефрит, волчаночный нефрит, множественный пустулезный нефрит, пиелонефрит, почечнокаменную болезнь, нефротуберкулез, опухоль почки и тому подобное. При этом примеры воспалительной болезни включают астму, аллергический и неаллергический ринит, хронический и острый ринит,
 25 хронический и острый гастрит или энтерит, язвенный гастрит, острый и хронический нефрит, острый и хронический гепатит, хроническую обструктивную болезнь легких, фиброз легких, синдром раздраженного кишечника, воспалительную боль, мигрень, головную боль, боль в спине, синдром фибромиалгии, миофасциальную болезнь, вирусную инфекцию (например, гепатит С), бактериальную инфекцию, грибковую
 30 инфекцию, ожог, повреждение, вызванное хирургической или стоматологической операцией, синдром избытка простагландина Е, атеросклероз, подагру, артрит, ревматоидный артрит, анкилозирующий спондилит, болезнь Ходжкина, панкреатит, конъюнктивит, ирит, склерит, увеит, дерматит, экзему и рассеянный склероз. В дополнение к этому, примеры сердечнососудистого заболевания могут включать
 35 миокардиопатию, первичную остановку сердца, ишемическую сердечную недостаточность, гипертензию, ишемическую болезнь сердца, болезнь коронарных артерий, стенокардия, инфаркт миокарда, атеросклероз и аритмию.

В настоящем раскрытии обнаружено, что DPP-4 вовлечен в продолжающийся процесс кальцификации аортального клапана (CAVD) при кальцинозе клапана аорты.

40 Недостаток NO у мыши, утратившей восполнение NO, увеличивает экспрессию DPP-4. Это будет вызывать метастазирование и дифференцировку остеобластов и приведет к ускорению кальцификации в аортальном клапане.

При введении ингибитора DPP-4 субъекту, остеобластические метастазы гладкомышечных клеток сосудов могут быть ингибированы с целью подавления
 45 прогрессирования болезни, что подтверждает концепцию, что DPP-4 потенциально может использоваться для лечения CAVD.

Фармацевтическая композиция согласно одному типичному варианту осуществления настоящего изобретения может дополнительно включать фармацевтически приемлемый

носитель. Фармацевтически приемлемый носитель может включать физиологический раствор, стерильную воду, раствор Рингера, забуференный солевой раствор, раствор декстрозы, раствор мальтодекстрина, глицерин, этанол и смесь двух или более из них, которые могут использоваться по отдельности или в комбинации. При необходимости
 5 другие общепринятые добавки, такие как антиоксидант, буфер и бактериостатическое средство могут добавляться в композицию. Кроме того, к композиции дополнительно могут быть добавлены разбавитель, диспергирующее вещество, поверхностно-активное вещество, связывающее вещество и смазывающее вещество. В этом случае композиция может входить в инъекционный состав, такой как водный раствор, суспензия или
 10 эмульсия, входить в состав пилюли, капсулы, гранулы или таблетки. В дополнение к этому состав фармацевтической композиции предпочтительно может создаваться в соответствии с отдельными болезнями и компонентами с использованием надлежащего метода, известного в данной области техники, или метода, раскрытого в учебнике по фармацевтике Ремингтона (последняя версия), издательство Маск, Истон, Пенсильвания.
 15 Примеры фармацевтически приемлемых носителей, составы фармацевтических композиций и способы приготовления композиций известны в данной области техники.

Кроме того, такие фармацевтические композиции можно использовать при введении субъекту композиции, включающей DPP-4 ингибитор настоящего раскрытия в качестве активного ингредиента, с целью лечения кальциноза клапана, как описано выше.

20 Композиция согласно настоящему раскрытию может предоставляться в эффективном количестве для лечения кальциноза клапана у нуждающегося в этом субъекта. Доза ингибитора DPP-4 может варьировать в значительной степени в соответствии с весом, возрастом, полом, состоянием здоровья пациента, диетой, временем введения, способом введения, скоростью выведения и тяжестью болезни. В этом случае надлежащая
 25 дозировка ингибитора DPP-4 необязательно может быть установлена специалистом в соответствующей области.

Ежедневная дозировка ингибитора DPP-4 составляет от 0.0001 до 500 мг/кг, предпочтительно примерно от 0.01 до 5 мг/кг, причем она может быть введена за один раз в день или дробными дозами в течение дня.

30 Композиция настоящего изобретения может быть введена перорально или парентерально (например, внутривенно, внутривнутрибрюшинно, внутримышечно, внутрисосудистым образом или подкожно) в соответствии с желаемой целью. Предпочтительно композиция вводится перорально. Композиция для перорального приема может предоставляться в форме капсулы, таблетки, порошка, гранулы или
 35 суспензии. Кроме того, композиция может включать обычно применяемые добавки, такие как лактоза, маннитол, кукурузный крахмал или картофельный крахмал, при этом связывающее вещество, которое можно использовать в таких композициях, включает кристаллическую целлюлозу, аналог целлюлозы, гуммиарабик, кукурузный крахмал или натрий карбоксиметилцеллюлозу.

40 В дополнение к этому композиции могут предоставляться с двузамещенным фосфатом кальция или безводным натрий крахмал гликолятом. И наконец, композиции могут предоставляться со смазывающим веществом, например, тальком или стеаратом магния.

Кроме того, композиция настоящего раскрытия может использоваться отдельно или в комбинации с хирургическим методом лечения, гормональным лечением,
 45 лекарственной терапией и методами, использующими модификатор биологического ответа, для предотвращения или лечения кальциноза клапана.

Состав пищевой композиции для профилактики или улучшения кальциноза клапана настоящего раскрытия особенным образом не ограничивается. Примеры пищевых

продуктов, в которые может быть добавлена композиция, могут включать мясные продукты, сосиски, хлеб, шоколад, конфеты, закуски, кондитерские изделия, пиццу, суп рамен или другую лапшу, жвачки, молочные продукты, включая мороженое, различные супы, напитки, чай, алкогольные напитки и витаминные комплексы. В этом случае,

5 пищевые продукты включают все виды полноценной пищи в общепринятом аспекте.

В дополнение к ингибитору DPP-4, который может быть включен в пищевую композицию согласно настоящему раскрытию, другие компоненты, которые можно включить в пищевую композицию, особенным образом не ограничиваются. Например, пищевая композиция может дополнительно включать дополнительные компоненты,

10 а именно, различные экстракты трав, биологически активные пищевые добавки или обычные углеводы. Кроме того, пищевая композиция может дополнительно включать пищевую добавку. В этом случае пищевая добавка включает ароматизатор, вкусовую добавку, красящее вещество, наполнитель, стабилизирующее средство и тому подобное, широко используемое в соответствующей области техники. Примеры обычных углеводов

15 могут включать типичные сахара, такие как моносахариды, например, глюкозу, фруктозу и тому подобное; дисахариды, например, мальтозу, сахарозу и тому подобное; и полисахариды, например, декстрин, циклодекстрин и тому подобное, и сахарные спирты, такие как ксилит, сорбит, эритрит и тому подобное. В дополнение к перечисленным выше компонентам в качестве ароматизаторов при желании могут

20 использоваться природные ароматизирующие вещества (т.е., трауматин, экстракт стевии (например, ребаудиозид А, глициризин и т.д.)) и синтетические ароматизаторы (т.е. сахарин, аспартам и т.д.). В дополнение к этому пищевая композиция настоящего раскрытия может содержать различные питательные вещества, витамины, минералы (электролиты), вкусовые добавки, такие как синтетическое вкусовое вещество, природное

25 вкусовое вещество и т.д., красящее вещество, наполнитель (сыр, шоколад и т.д.), пектиновую кислоту и ее соль, альгиновую кислоту и ее соль, органическую кислоту, защитный коллоидный загуститель, регулятор pH, стабилизирующее вещество, консервирующее вещество, глицерин, спирт, карбонизирующее вещество, используемое в газированных напитках, и т.д. В дополнение к этому пищевая композиция настоящего

30 раскрытия может включать субстанцию, которая может использоваться для приготовления натурального фруктового сока, фруктовых напитков и овощных напитков. Такие компоненты могут использоваться по отдельности или в комбинации.

Примеры

Далее настоящее изобретение будет описано более подробно со ссылкой на примеры.

35 Среднему специалисту в данной области техники должно быть понятно, что эти примеры предоставляются только с иллюстративной целью и не могут истолковываться как ограничивающие рамки настоящего изобретения.

Пример 1: Анализ экспрессии DPP-4 у людей с болезнью кальцифицирования аортального клапана (CAVD)

40 Образцы аортального клапана были получены от нормальных пациентов, которым проводилось протезирование аортального клапана в медицинском центре Asan в Сеуле, и от пациентов с тяжелым кальцифицирующим поражением. Половину каждого образца немедленно помещали на хранение в RNeasy (Life Technology), а оставшуюся половину фиксировали в состав OCT (Sakura Finetek, Inc.). Исследовательский протокол для сбора

45 человеческих образцов был одобрен комиссией по биомедицинской этике (IRB) медицинского центра Asan в Сеуле (Сеул, Корея).

Профили экспрессии генов, вовлеченных в клеточную прогрессию у людей с болезнью кальцифицирования аортального клапана (CAVD), анализировали с помощью

микроанализа.

Анализ профилей экспрессии генов в образцах аортальных клапанов, полученных от нормальных пациентов без кальцификации и пациентов с кальцификацией, был проведен с использованием набора Affymetrix GeneChip® Human Gene 2.0 ST (Affymetrix, США). Квантильную нормализацию и анализ данных проводили с помощью программного обеспечения Affymetrix GCOS (Affymetrix, Inc.).

В результате, как показано на Фиг. 1, гены, связанные с кальцификацией, фиброзом и воспалением, были активированы в аортальных клапанах пациентов с CAVD по сравнению с нормальными людьми.

Более того, для измерения экспрессии DPP-4 у пациентов с CAVD была проведена количественная ПЦР с детекцией в реальном времени (кРВ-ПЦР). В процессе кРВ-ПЦР из каждого образца выделяли общую РНК с использованием набора RNeasy Lipid Tissue (Qiagen, США) и синтезировали кДНК с использованием набора для синтеза кДНК (Thermo scientific, EU). кРВ-ПЦР анализ синтезированной кДНК проводили в оптическом 96-луночном планшете с использованием набора Power SYBR green 1step и ПЦР системы в реальном времени ABI 7000 (Applied Biosystems). В качестве внутреннего контроля использовали GAPDH.

В итоге, как видно на Фиг. 2а, результаты ПЦР в реальном времени показали, что DPP-4 был экспрессирован на высоком уровне у пациентов с CAVD.

Результаты микроматричного анализа показали, что активность DPP-4 была активирована воспалительными цитокинами, и что гены вниз по ходу транскрипции, регулируемые генами DPP-4 и хемокинов, были активированы в кальцифицированной ткани аортального клапана (Фиг. 2b). В дополнение к этому, активация генов была подтверждена еще раз при исследовании мРНК экспрессии с использованием ПЦР в реальном времени (Фиг. 2с).

Образцы аортального клапана человека фиксировали в 4% растворе формалина в течение 24 часов, затем заливали в парафин и делали срезы толщиной 4 мкм. Для того, чтобы визуализировать отложения кальция в заключенном в парафин образце аортального клапана и кардиальном базальном сегменте, проводили окрашивание по вон Косса (VK) и ализариновым красным (AR). При окрашивании по вон Косса аортальный клапан, зафиксированный в формалине, промывали дистиллированной водой, а затем подвергали воздействию 5% водорастворимого AgNO₃ и интенсивного света при комнатной температуре в течение 60 минут. Затем, аортальный клапан обрабатывали 2.5% раствором тиосульфата в течение 5 минут, и в том случае, когда он показывал черновато-бурое окрашивание, он считался положительным. При окрашивании ализариновым красным аортальный клапан, зафиксированный в формалине, промывали дистиллированной водой, а затем обрабатывали 2% ализариновым красным S (водный, Sigma) в течение 5 минут, и в том случае, когда наблюдалось его красное или оранжевое окрашивание, он считался положительным.

Было проведено иммунофлуоресцентное окрашивание кальцифицированной ткани аортального клапана. В результате, как видно на Фиг. 3, обнаружено, что DPP-4 был высоко экспрессирован в кальцифицированной области, окрашенной по вон Косса (VK) и ализариновым красным, при этом экспрессия DPP-4 не наблюдалась в ткани аортального клапана здоровых людей.

Пример 2: Анализ экспрессии DPP-4 на мышинных моделях с нокаутом eNOS. Использовали мышей C57BL/6J eNOS^{-/-} (нокаут эндотелиальной синтазы оксида азота) (8-недельного возраста, n = 10, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Me, США) и мышей дикого типа C57BL/6J (8-недельного возраста, дикого типа, WT, n = 10). После покупки

мышей кормили стандартным кормом для грызунов до 3-месячного возраста.

Мышей подвергали глубокой анестезии и в этом состоянии мышам вводили PBS, содержащий 4% параформальдегида, и извлекали сердце и аорту. Извлеченные ткани фиксировали в течение ночи, заливали в парафин и делали срезы целого клапана аорты толщиной 5 мкм. Мышей подвергали эвтаназии, а образцы крови и аорты хранили для анализа.

Для визуализации отложений кальция в заключенном в парафин клапане аорты и сердечном базальном сегменте, проводили окрашивание по вон Косса и ализариновым красным.

В результате, как показано на Фиг.4, окрашенная в черновато-коричневый цвет область, указывающая на минерализацию в аортальном клапане eNOS KO мыши, наблюдалась при окрашивании аортального клапана по вон Косса, в отличие от контроля, и также была видна окрашенная в красный цвет область, показывающая отложение кальция, при окрашивании аортального клапана ализариновым красным. Более того, при AR окрашивании и VK окрашивании в кальцифицированной области были отмечены клетки, которые экспрессировали высокий уровень DPP-4.

Пример 3: Изучение кальцификации в клетках гладкой мускулатуры сосудов мышей (VSMC)

Аорты, извлеченные из мышей eNOS^{-/-} и мышей дикого типа вместе с сердцами в Примере 2, промывали в бессывороточном M199 (Cellgro), разрезали на мелкие куски и затем культивировали в M199, содержащем 20% эмбриональной телячьей сыворотки и 3 мг/мл коллагеназы (Sigma), на водяной бане при 37°C в течение 3 часов. То, что изолированные клетки являются клетками гладкой мускулатуры сосудов, устанавливали с использованием анти-SM моноклональных антител (Sigma). Изолированные клетки гладкой мускулатуры сосудов высевали в концентрации 30% и через 24 часа среду заменяли на остеогенную базальную среду (Osteogenic SingleQuots, Lonza, США). Среду меняли с 3-дневными интервалами в течение 28 дней культивирования.

Далее определяли, способствует ли CD26 остеогенной дифференцировке клеток гладкой мускулатуры сосудов у мышей дикого типа и мышей eNOS KO, при этом использовали окрашивание ALP в качестве метода окрашивания начальной стадии кальцификации, окрашивание ализариновым красным (AR) в качестве метода окрашивания средней стадии кальцификации и окрашивание по вон Косса (VK) в качестве метода окрашивания поздней стадии кальцификации.

В результате, как видно на Фиг. 5, остеогенная дифференцировка клеток гладкой мускулатуры сосудов (VSMCs) происходила у eNOS-нокаутных трансгенных мышей при сравнении с контрольными мышами.

Концентрация свободного CD26/DPP-4 в культуре клеток гладкой мускулатуры сосудов была измерена с использованием коммерческого набора ELISA (Sigma) согласно инструкциям производителя. В результате, как показано на Фиг.6а, повышенная концентрация DPP-4 наблюдалась в культуре гладкомышечных клеток сосудов от мышей eNOS^{-/-}.

Уровни экспрессии мРНК DPP-4 в тканях аортальных клапанов измеряли с помощью ПЦР в реальном времени. В результате, как видно на Фиг. 6b, наблюдалась повышенная экспрессия мРНК DPP-4 в тканях аортальных клапанов eNOS^{-/-} мышей при сравнении с мышами дикого типа.

Кроме того, уровни протеина DPP-4 в плазме у мышей eNOS^{-/-} и мышей дикого типа измеряли с помощью метода ELISA. В результате, как видно на Фиг. 6с, уровень протеина DPP-4 в плазме повышен у eNOS^{-/-} мышей по сравнению с мышами дикого

типа.

Пример 4: Изучение NO-индуцированной регуляции экспрессии DPP-4 в клетках гладкой мускулатуры сосудов (VSMCs)

Обработка L-NAME (N ω -нитро-L-аргинин метиловым эфиром), который является ингибитором биосинтеза NO, значительно увеличивает экспрессию DPP-4 в аорте. Таким образом, известно, что истощение NO вызывает экспрессию DPP-4.

В этом примере, клетки гладкой мускулатуры сосудов, полученные согласно методу примера 3, обрабатывали DETA-NONOатом (DETA-NO), который является донором NO. В результате было показано, что экспрессия мРНК DPP-4 в гладкомышечных клетках сосудов понижена (Фиг. 7a) и также понижена экспрессия белка DPP-4 в гладкомышечных клетках сосудов (Фиг. 7b).

Для получения более прямого доказательства регуляторной функции NO в снижении экспрессии DPP-4, было установлено, регулирует ли NO промоторную активность DPP-4.

В итоге, было показано, что промоторная активность DPP-4 была более высокой в гладкомышечных клетках сосудов eNOS-/- мыши, чем в гладкомышечных клетках сосудов мыши дикого типа, и эта активность ингибировалась обработкой DETA-NO зависимым от концентрации образом (Фиг. 7c).

NO ингибирует активность NF- κ B в гладкомышечных клетках сосудов. Было показано, что NF- κ B активность была более высокой в гладкомышечных клетках сосудов eNOS-/- мыши, чем в гладкомышечных клетках сосудов мыши дикого типа, и эта активность уменьшалась при обработке DETA-NO (Фиг. 7d). Поскольку предполагается, что промотор DPP4 имеет предполагаемый сайт связывания NF- κ B, настоящие изобретатели определяли, может ли активность NF- κ B напрямую регулировать DPP-4 промоторную активность.

Сначала гладкомышечные клетки сосудов культивировали в 6-луночном планшете до достижения конfluence 80%. При использовании липофектамина 2000 (Life Technology) репортер DPP-4, содержащий нормальный или мутированный сайт связывания NF- κ B, был клонирован в рGL3-базовый вектор (Promega), и клетки трансфицировали этим вектором. Через 24 часа активность люциферазы светлячка и люциферазы Renilla в клетках измеряли с использованием системы анализа люциферазы Dual-Glo (Promega). Активность люциферазы светлячка была нормализована с активностью люциферазы Renilla.

Для сайт-направленного мутагенеза (SAM) сайта связывания NF- κ B проводили ПЦР с использованием следующих праймеров.

SEQ ID NO 1: 5'-CAGCCAGATAACATGCCACACCCAACCCCTTC-3';

SEQ ID NO 2: 5'-GAAGGGGTTGGGTGTGGCATGTTATCTGGCTG-3'.

В итоге, как показано на Фиг. 8, мутация сайта связывания NF- κ B промотора DPP-4 значительно ингибировала промоторную активность DPP-4, и обработка NF- κ B ингибитором полностью ингибировала выработку DPP-4 (Фиг. 7e). Такие результаты свидетельствуют о том, что индукция DPP-4 посредством NF- κ B активации в клетках гладкой мускулатуры сосудов происходит при истощении NO, и что остеогенная дифференцировка гладкомышечных клеток сосудов может регулироваться посредством контроля за доставкой NO.

Пример 5: Оценка действия ингибитора DPP-4 ситаглиптина на кальцификацию аортального клапана

Значительное увеличение DPP-4 в течение кальцификации клапана аорты дает основание предположить, что DPP-4 возможно играет роль в кальцификации клапана

аорты. Чтобы проиллюстрировать предположение, кальцификацию аорты мышей eNOS-/- лечили селективным ингибитором DPP-4 ситаглиптином и исследовали эффект ситаглиптина.

Использовали pC57BL/6J мышей eNOS-/- (с нокаутом эндотелиальной синтазы оксида азота) (8-недельного возраста, n = 10, лаборатория Jackson Laboratory, Bar Harbor, Me, США) и C57BL/6J мышей дикого типа (8-недельного возраста, дикого типа, WT, n = 10). После покупки мышей кормили стандартным кормом для грызунов до 3-месячного возраста и вводили физиологический раствор или ситаглиптин (15 мг/кг/день, Merck & Co., Inc.) в течение 12 недель.

Для обнаружения остеогенной активности у eNOS-/- мышей, конъюгированное с бисфосфонатом визуализирующее средство (Osteosense680, VisEn Medical Inc.) вводили через хвостовую вену. Osteosense680 связывается с кальцифицированным участком (в частности, гидроксипатитом) in vivo и функционирует как визуализирующий агент для обнаружения активности остеобластов. Мышей подвергали эвтаназии, и затем все тело или изолированные аорты визуализировали, используя OptixMX3 (ART Advanced Research Technologies, Inc).

В результате было показано, что наблюдалась тяжелая кальцификация аорты у eNOS-/- мышей (Фиг. 9), и что пероральное введение ситаглиптина уменьшало кальцификацию аорты у живых мышей (Фиг. 9а и 9b). Кроме того, в VK-окрашенных срезах аортальных клапанов от eNOS-/- мышей, было обнаружено, что когда активность DPP-4 подавляется, кальцификация аорты может быть заингибирована (Фиг. 10а и 10b).

Пример 6: Оценка эффекта обработки ситаглиптином на человеческих интерстициальных клетках аортального клапана (VICs)

Интерстициальные клетки аортального клапана человека (VICs) представляют собой набор разных видов клеток, включающий фибробласты, миобласты и гладко-мышечные клетки, имеющий характеристики, сходные с гладкомышечными клетками сосудов, и способных к дифференцировке в остеобласты.

Роль DPP-4 в остеобластной дифференцировке была исследована с использованием человеческих VICs.

Человеческие VICs выделяли из створок аортального клапана в соответствии с общепринятым методом выделения клеток и использовали клетки VIC на пассажах 2 - 10. Клетки VIC инкубировали с DPP-4 (R & D), ситаглиптином или DETA-NONOатом (Enzo Life Sciences).

В результате, как показано на Фиг.11, обработка DPP-4 увеличивала остеогенную способность VICs, причем это явление устранялось при обработке ситаглиптином.

Чтобы исследовать связь DPP-4 с активностью болезни, исследовали уровни DPP-4 в плазме у пациентов с САВД. Пациенты с ревматоидной болезнью аортального клапана и пациенты, которым вводили ингибитор DPP-4, были исключены из анализа.

В результате показано, что уровень DPP-4 у пациентов с САВД был более высокий, чем у нормальных субъектов (Таблица 1).

Таблица 1: Клинические характеристики пациентов с болезнью аортального клапана (AV)

□	AV патология (-) (n=111)	AV патология (+) (n=48)	p значение
Возраст, лет ^a	60±41	78±15	<0.001
Мужчины, n ^b	69 (62)	20 (42)	0.017
Площадь поверхности тела, м ²	1.7±0.4	1.54±0.35	<0.001
Систолическое давление крови, мм рт. ст.	118±38	123±45	0.079

Диастилическое давление крови, мм рт. ст.	71±32	66±33	0.023
Гипертензия, n	53 (48)	37 (77)	0.001
Диабет, n	23 (21)	12 (25)	0.550
Дислипидемия, n	53 (48)	25 (52)	0.616
Почечная недостаточность, n	3 (3)	8 (17)	0.001
Ишемическая болезнь сердца, n	56 (50)	19 (40)	0.208
Предшествующий инсульт, n	15 (14)	9 (19)	0.410
Гемоглобин, г/дл	13.6±4.5	11.8±6.7	<0.001
Креатинин, мг/дл	0.95±6.26	1.48±7.76	0.006
Холестерин, мг/дл	165±155	158±77	0.316
Аортальная Vmax (максимальная скорость), м/сек	1.4±1.1	4.6±2.1	<0.001

Уровень DPP-4 был на 34% выше у пациентов с CAVD с кальцификацией, чем у пациентов без кальцификации, и DPP-4, обладающий способностью разрушать активированный протеин, также был увеличен у пациентов с CAVD. Это говорит о том, что уровень циркуляции DPP-4 зависит от тяжести заболевания у пациентов с CAVD (Таблица 2).

Таблица 2: Клинические характеристики пациентов с CAVD, определенные по кальциевому индексу СТ

	Группа I sevAS_AVCi (-) (n=50)	Группа II sevAS_AVCi (+) (n=22)	p значение
Возраст, лет	66±21	79±14	<0.001
Мужчины, n	34 (68)	9 (41)	0.031
Площадь поверхности тела, м ²	1.7±0.5	1.6±0.3	0.004
Систолическое давление крови, мм рт. ст.	120±45	121±41	0.789
Диастилическое давление крови, мм рт. ст.	71±32	62±28	0.004
Гипертензия, n	31 (62)	19 (86)	0.039
Диабет, n	13 (26)	6 (27)	0.910
Дислипидемия, n	26 (52)	14 (64)	0.360
Почечная недостаточность, n	2 (4)	3 (14)	0.138
Ишемическая болезнь сердца, n	31 (62)	7 (32)	0.018
Предшествующий инсульт, n	9 (18)	2 (9)	0.318
Гемоглобин, г/дл	13.8±6.2	11.4±7.1	<0.001
Креатинин, мг/дл	1.1±8.0	1.1±1.2	0.994
Холестерин, мг/дл	167±129	157±66	0.262
Шкала Агатстона (AU) ^a	230±832	611±2515	0.011
Кальций в клапане (AU) ^a	184±1386	3460±4282	<0.001
Общий кальций (AU) ^a	422±1878	4185±6464	<0.001
Кальциевый индекс клапана/ BSA (AVCi, AU/м ²) ^a	119±866	2176±1964	<0.001
Аортальная Vmax (максимальная скорость), м/сек	1.9±3.0	5.2±1.4	<0.001

Пример 7: Оценка воздействия введения различных DPP-4 ингибиторов на ингибирование остеобластной дифференцировки VSMCs

Для того, чтобы проверить эффекты DPP-4 ингибиторов, отличных от ситаглиптина, на подавление кальциноза клапана, исследовали эффекты различных видов ингибиторов DPP-4 на подавление остеогенной дифференцировки VSMCs (клеток гладкой мускулатуры сосудов) у мыши eNOS-/-.

VSMCs мыши eNOS-/-, культивированные в 48-луночном планшете, были обработаны 10М раствором каждого из алоглиптина, эвоглиптина, линаглиптина, саксаглиптина и вилдаглиптина в течение 7 дней, и была измерена активность ALP в клетках. В результате наблюдалось ингибирование активности ALP до 50% или ниже по сравнению

с активностью в отрицательной контрольной группе, обработанной ингибитором DPP-4. Это говорит о том, что DPP-4 ингибиторы, отличные от ситаглиптина, также проявляют ингибиторный эффект в отношении кальциноза клапана аорты.

Несмотря на то, что настоящее изобретение подробно описано с учетом характерных особенностей, специалисту в данной области техники должно быть понятно, что это описание предоставляет только предпочтительный вариант осуществления и не ограничивает рамки настоящего изобретения. Таким образом, действительные рамки настоящего раскрытия будут определяться прилагаемыми пунктами формулы изобретения и их эквивалентами.

Промышленная применимость

DPP-4 настоящего раскрытия экспрессируется на повышенном уровне в том случае, когда клапаны кальцифицированы, причем кальцификация значительно снижается после введения DPP-4 ингибитора. Следовательно, ингибитор DPP-4 может использоваться для лечения или профилактики клапанов.

(57) Формула изобретения

1. Применение фармацевтической композиции, содержащей ингибитор дипептидилпептидазы-4 (DPP-4), для предотвращения или лечения кальциноза клапана аорты, где ингибитор представляет собой по меньшей мере что-либо одно, выбранное из группы, состоящей из ситаглиптина, алоглиптина, эвоглиптина, линаглиптина, саксаглиптина и вилдаглиптина.

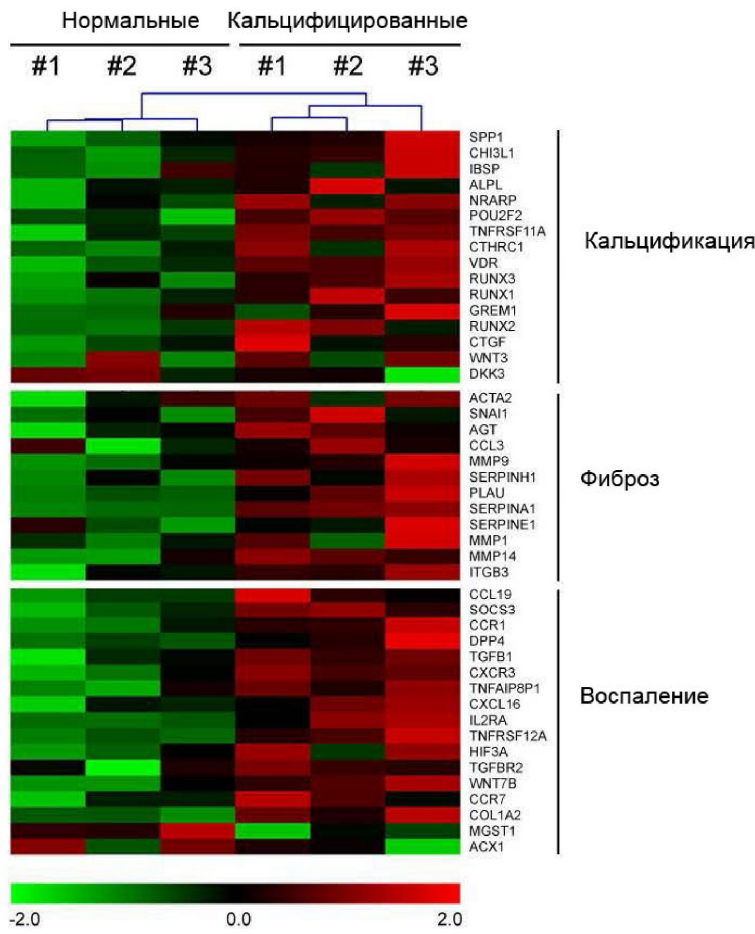
2. Применение по п. 1, отличающееся тем, что кальциноз клапана обусловлен сердечно-сосудистым заболеванием, выбранным из группы, состоящей из миокардиопатии, первичной остановки сердца, ишемической сердечной недостаточности, гипертензии, ишемической болезни сердца, болезни коронарных артерий, стенокардии, инфаркта миокарда, атеросклероза и аритмии.

3. Применение ингибитора дипептидилпептидазы-4 (DPP-4) для получения медикамента для предотвращения или лечения кальциноза клапана аорты, где ингибитор представляет собой по меньшей мере что-либо одно, выбранное из группы, состоящей из ситаглиптина, алоглиптина, эвоглиптина, линаглиптина, саксаглиптина и вилдаглиптина.

4. Применение композиции, содержащей ингибитор дипептидилпептидазы-4 (DPP-4), для предотвращения или лечения кальциноза клапана аорты, где ингибитор представляет собой по меньшей мере что-либо одно, выбранное из группы, состоящей из ситаглиптина, алоглиптина, эвоглиптина, линаглиптина, саксаглиптина и вилдаглиптина.

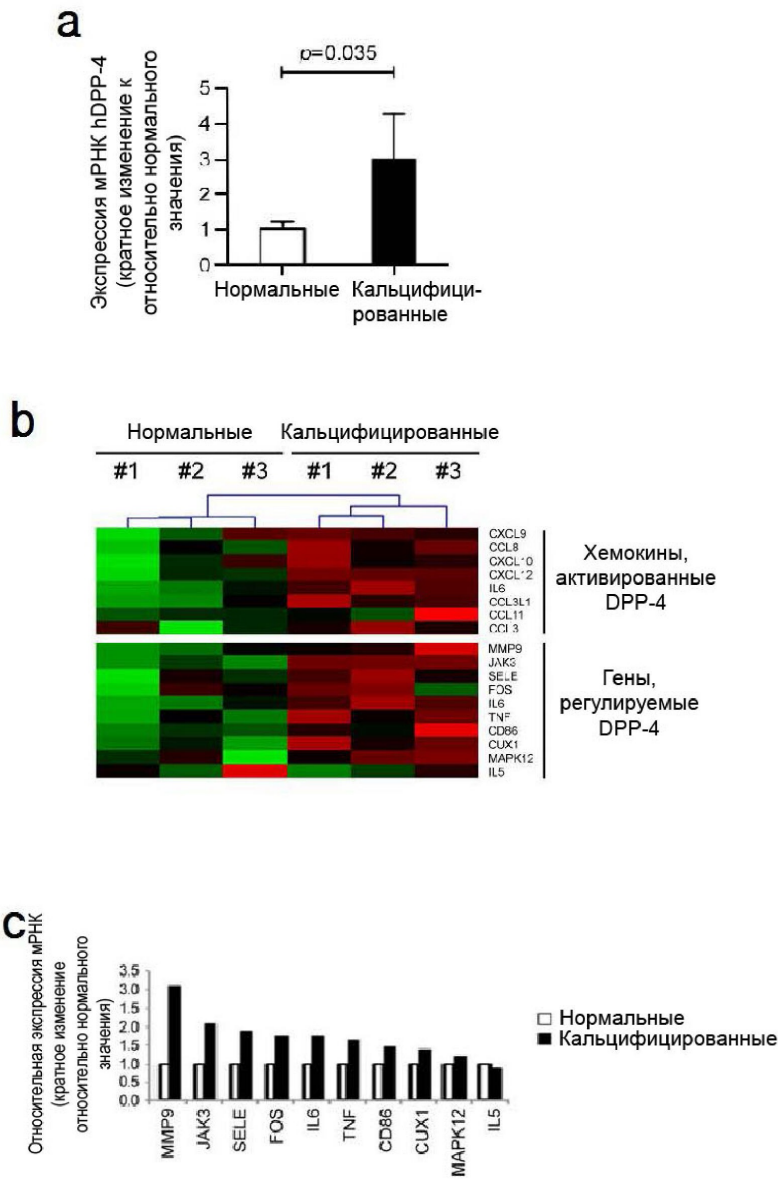
5. Применение по п. 3 или 4, в котором кальциноз клапана обусловлен сердечно-сосудистым заболеванием, выбранным из группы, состоящей из миокардиопатии, первичной остановки сердца, ишемической сердечной недостаточности, гипертензии, ишемической болезни сердца, болезни коронарных артерий, стенокардии, инфаркта миокарда, атеросклероза и аритмии.

Фиг. 1

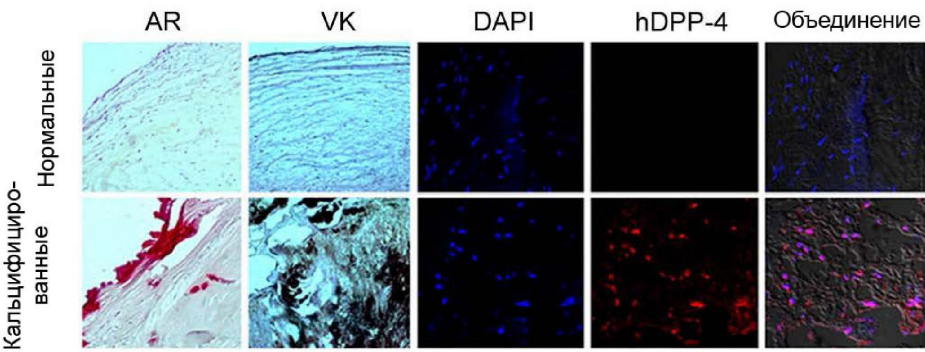


2/10

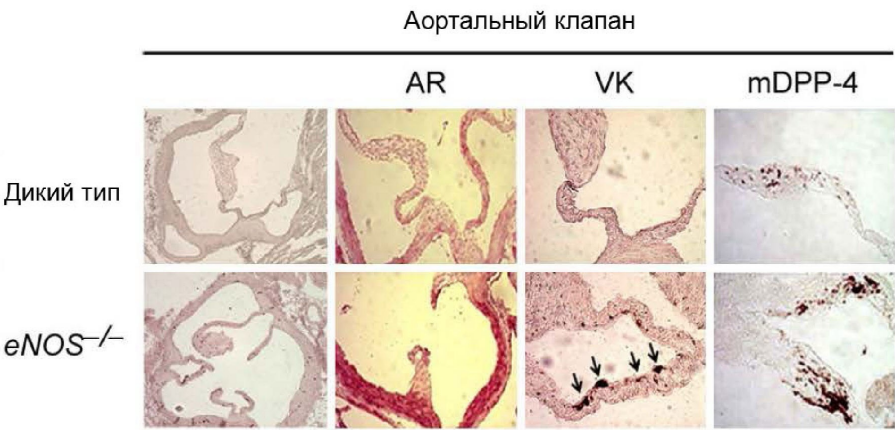
Фиг. 2



3/10

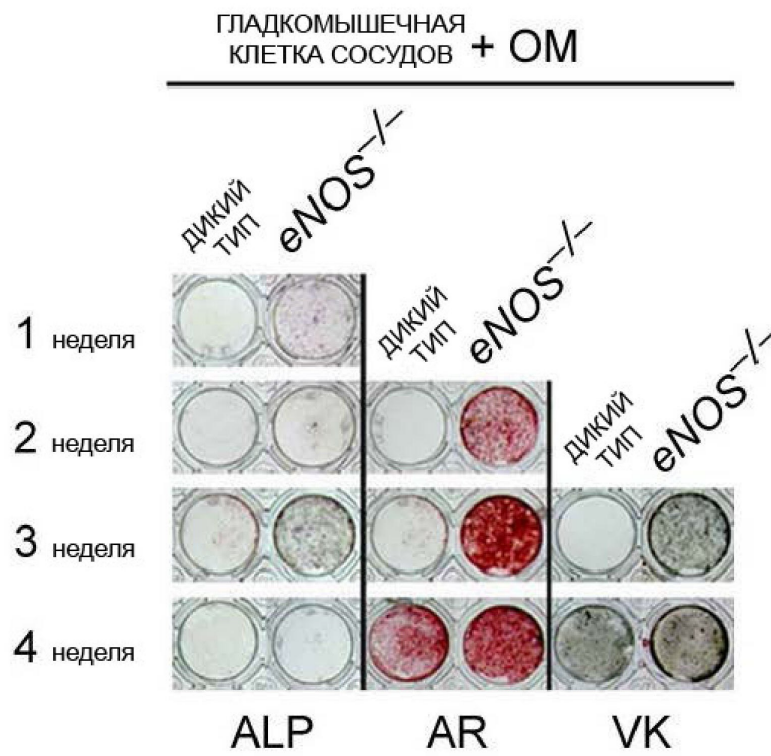


Фиг. 3



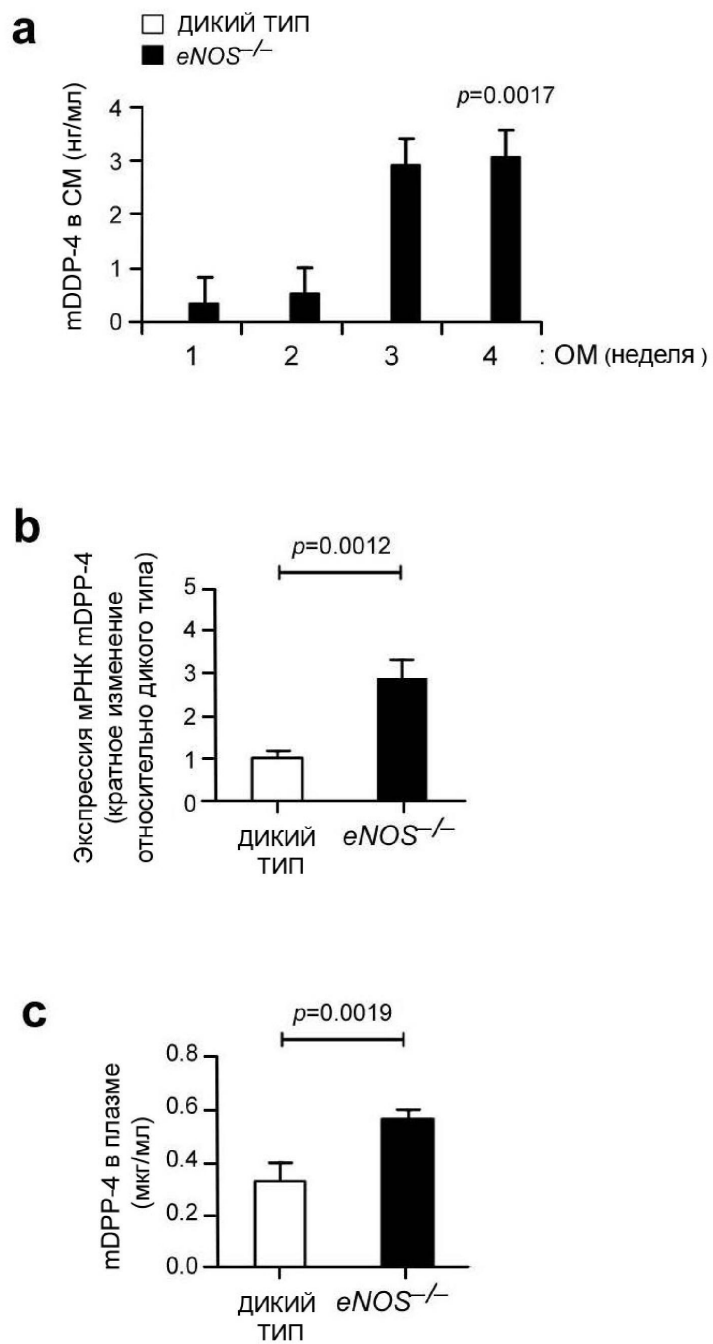
Фиг. 4

Фиг. 5



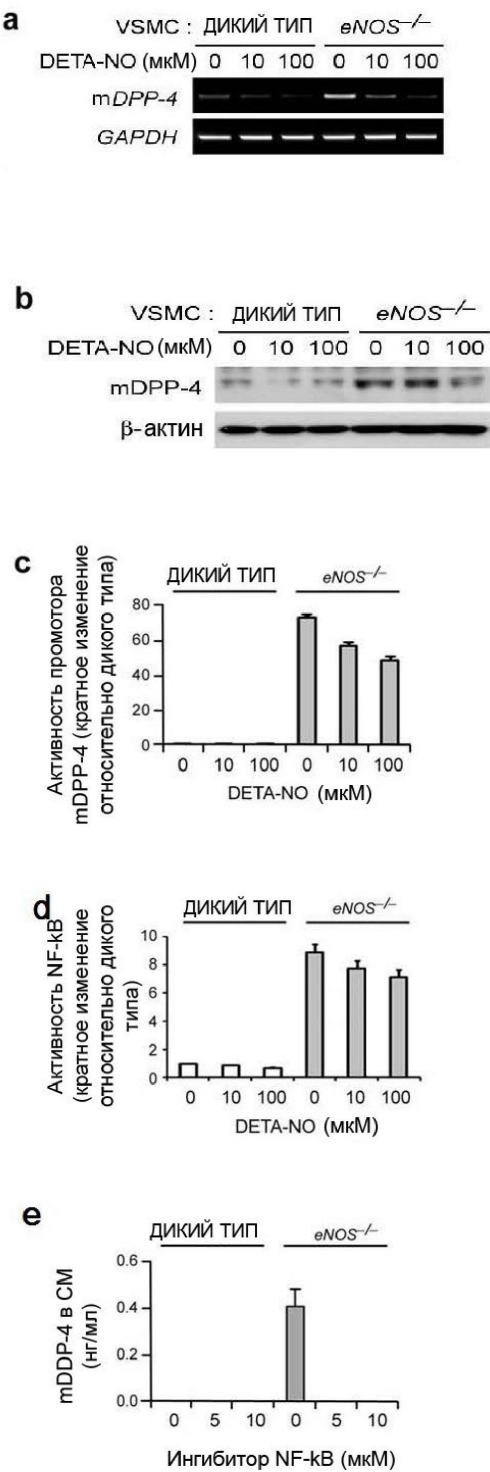
5/10

Фиг. 6



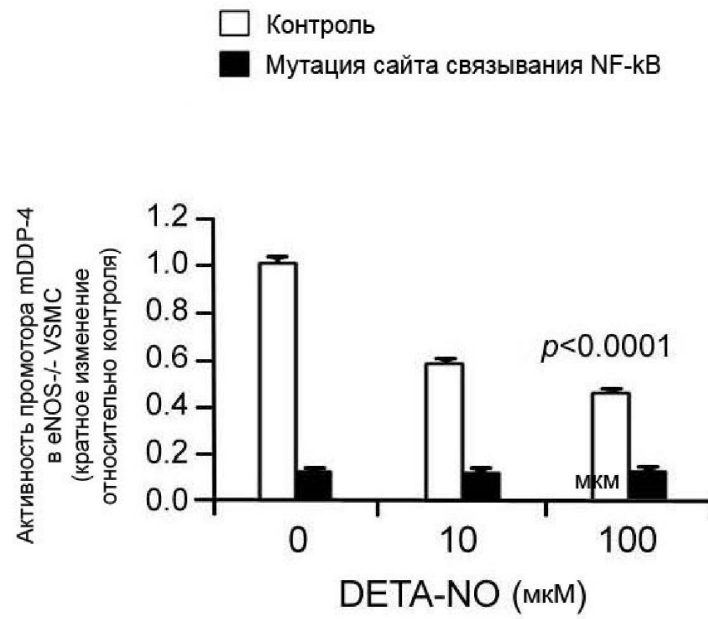
6/10

Фиг. 7

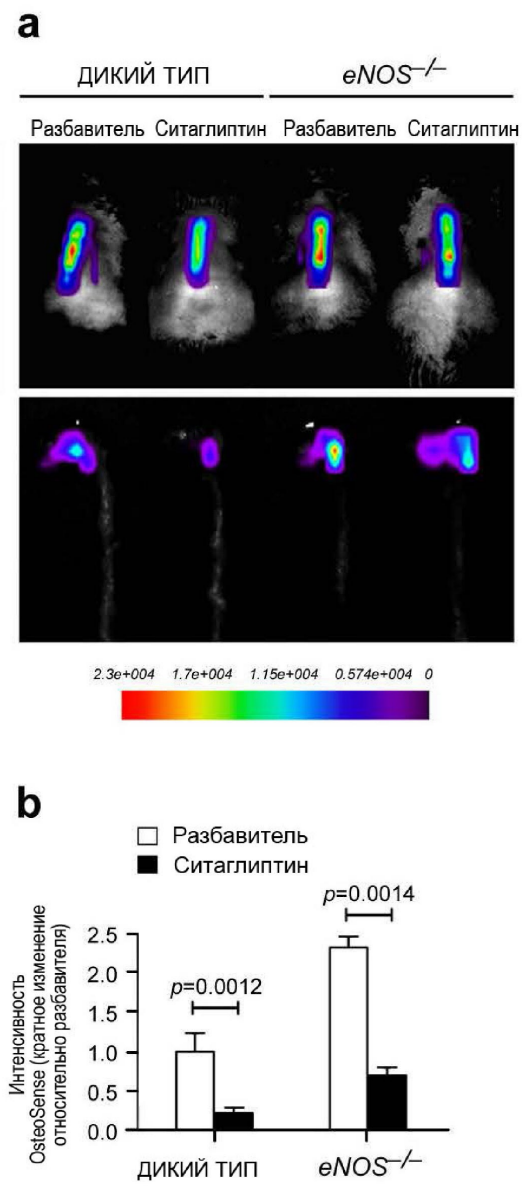


7/10

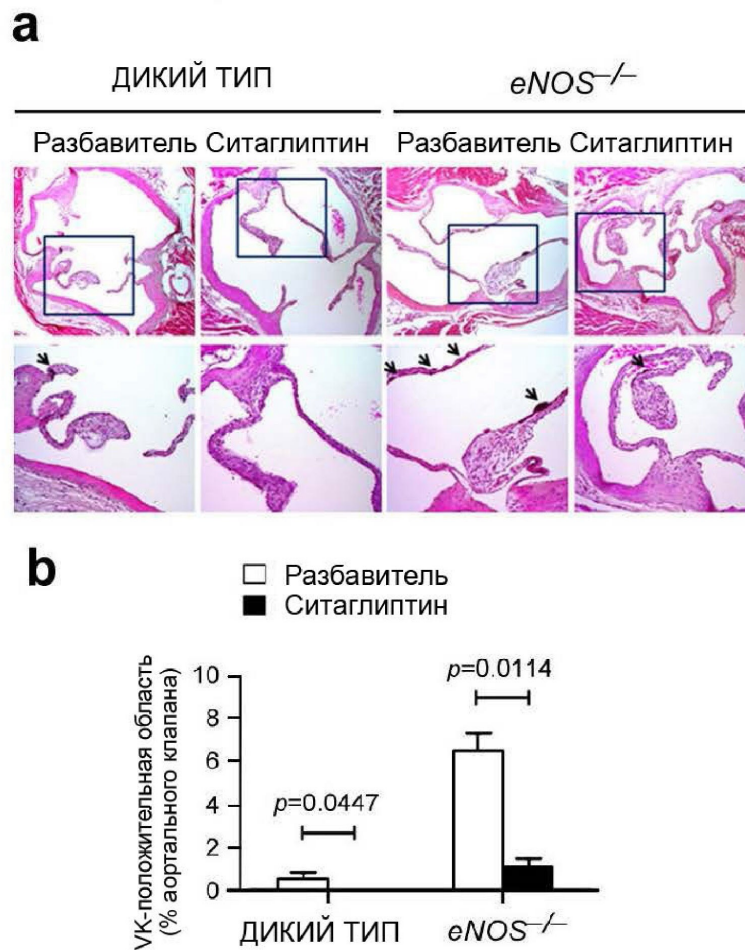
Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11

