



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 239 427** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) МПК⁷ **A 61 K 31/19, A 61 P 9/10, 35/00**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

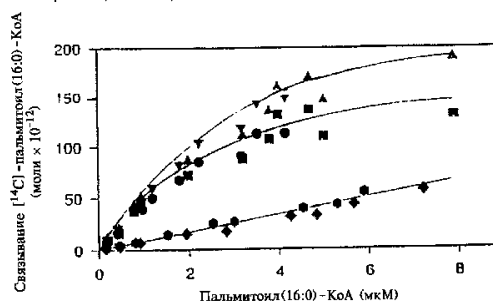
(21), (22) Заявка: 2000101334/15, 23.06.1998
(24) Дата начала действия патента: 23.06.1998
(30) Приоритет: 26.06.1997 IL 121165
(45) Дата публикации: 10.11.2004
(56) Ссылки: SU 1159578 A, 07.06.1985.
US 5502077 A, 26.03.1996.
BIOCHEM J. 1994, v.298, n. 2, p. 409-414. J.
Biol. Chem. 1995, v.270, n. 22, p.1347-1375.
(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную
фазу: 26.01.2000
(86) Заявка РСТ:
IB 98/00968 (23.06.1998)
(87) Публикация РСТ:
WO 99/00116 (07.01.1999)
(98) Адрес для переписки:
101000, Москва, М.Златоустинский пер., 10,
кв.15, "ЕВРОМАРКПАТ", пат.пов.
И.А.Веселицкой

(72) Изобретатель: БАР-ТАНА Якоб (IL)
(73) Патентообладатель:
ЙИССУМ РИСЕЧ ДЕВЕЛОПМЕНТ КОМПАНИ
ОФ ДЗЕ ГЕБРЕЮ ЮНИВЕРСИТИ ОФ
ДЖЕРУСАЛЭМ (IL)
(74) Патентный поверенный:
Веселицкая Ирина Александровна

(54) **КАРБОНОВЫЕ КИСЛОТЫ И ИХ ПРОИЗВОДНЫЕ И СОДЕРЖАЩИЕ ИХ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ**

(57)
В заявке описаны терапевтически эффективные соединения, представляющие собой амфипатический карбоксилат формулы R -COOH либо соль, эфир или амид такого соединения, где R обозначает насыщенную или ненасыщенную алкильную цепь, включающую 10-24 атома углерода, один или большее количество из которых может быть замещено гетероатомами, где один или большее количество входящих в цепь атомов углерода или гетероатомов необязательно образуют часть кольца и где указанная цепь необязательно замещена гидрокарбильным радикалом, гетероциклическим радикалом, (низш.) алкоксигруппой, замещенным гидроксилом, (низш.)алкилом, гидроксилом, карбоксилом, галогеном, фенилом или замещенным гидроксигруппой, (низш.)алкилом, (низш.)алкоксигруппой, (низш.)алкенилом или (низш.)алкинилом фенилом, C₃-C₇циклоалкилом или замещенным гидроксигруппой, (низш.)алкилом, (низш.)алкоксигруппой, (низш.)алкенилом или (низш.)алкинилом

C₃-C₇циклоалкилом, причем указанный амфипатический карбоксилат обладает способностью в эндогенных условиях превращаться в соответствующий тиоэфир кофермента А. Изобретение относится также к модуляции активности HNF-4 α и к способу лечения заболевания или синдрома путем введения терапевтически эффективного количества амфипатического карбоксилата. Изобретение объясняет модуляцию экспрессии генов, участвующих в инициации и развитии патологий у человека. 3 н. и 24 з.п. ф-лы, 4 ил., 1 табл.



ФИГ. 1a



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 239 427** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) Int. Cl.⁷ **A 61 K 31/19, A 61 P 9/10,**
35/00

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 2000101334/15, 23.06.1998

(24) Effective date for property rights: 23.06.1998

(30) Priority: 26.06.1997 IL 121165

(45) Date of publication: 10.11.2004

(85) Commencement of national phase: 26.01.2000

(86) PCT application:
IB 98/00968 (23.06.1998)

(87) PCT publication:
WO 99/00116 (07.01.1999)

(98) Mail address:
101000, Moskva, M.Zlatoustinskij per., 10,
kv.15, "EVROMARKPAT", pat.pov. I.A.Veselitskoj

(72) Inventor: BAR-TANA Jakob (IL)

(73) Proprietor:
JISSUM RISECH DEVELOPMENT KOMPANI OF
DZE GEBRJu JuNIVERSITI OF DZHERUSALEhM
(IL)

(74) Representative:
Veselitskaja Irina Aleksandrovna

(54) **CARBOXYLIC ACIDS AND THEIR DERIVATIVES AND PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS COMPRISING THEREOF**

(57) Abstract:

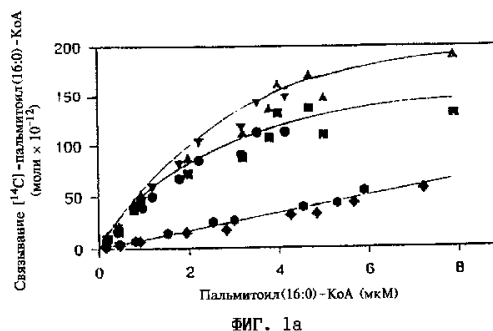
FIELD: medicine, pharmacy.

SUBSTANCE: claims describes therapeutically effective compounds representing amphipathic carboxylate of the formula R-COOH in the form of salt, ester of amide of such compound wherein R means saturated or unsaturated alkyl chain comprising 10-24 carbon atoms, one or more amount of that can be substituted with heteroatoms wherein one or more amount of carbon atoms or heteroatoms as components of this chain form optionally part of a ring and wherein indicated chain is substituted optionally with hydrocarbonyl radical, heterocyclyl radical, (lower)-alkoxy-group, substituted hydroxyl-(lower)-alkyl, hydroxyl, carboxyl, halogen atom, phenyl or substituted with hydroxy-group, (lower)-alkyl, (lower)-alkoxy-group, (lower)-alkenyl or (lower)-alkynyl, phenyl, (C₃-C₇)-cycloalkyl or substituted with hydroxy-group, (lower)-alkyl, (lower)-alkoxy-group, (lower)-alkenyl or (lower)-alkynyl-(C₃-C₇)-cycloalkyl being indicated amphipathic carboxylate elicits

ability to convert to the corresponding coenzyme A-thioester under endogenous conditions. Invention relates also to modulation of activity of HNF-4 α and to a method for treatment of disease or syndrome by administration of amphipathic carboxylate in the therapeutically effective dose. Invention explains modulation of expression of genes involving in initiation and development of pathologies in humans.

EFFECT: valuable medicinal properties of compounds.

27 ck, 4 ex



Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к терапевтически эффективным соединениям и к способам лечения определенных заболеваний/синдромов с помощью этих соединений.

Ссылки

В последующем описании ссылки на литературные источники, указанные в скобках или в виде верхнего индекса у соответствующей части описания, относятся к следующим публикациям:

1. Sladek F.M., Zhong W.M., Lai E., Darnell J.E., Jr. *Gene Dev.* 4, 2353-2365 (1990).

2. Sladek F.M. в: *Liver Gene Expression* (под ред. Tronche F. и Yaniv M.), стр. 207-230, R.G. Landes Co., Austin, TX (1994)

3. *The Metabolic and Inherited Bases of Inherited Disease* (под ред. Scriver C.R., Beaudet A.L., Sly W.S., Valle D.), том II, часть 8, 1995 (McGraw-Hill, Inc.)

4. Yamagata K. и др., *Nature* 384, 458-460 (1996).

5. DeFronzo R.A. и Eleaterio F., *Diabetes Care* 14, 173-194 (1991).

6. Leff T., Reue K., Melian A., Culver H. и Breslow J.L., *J. Biol. Chem.* 264, 16132-16137 (1989).

7. Cave W.T., *FASEB J.*, 5, 2160-2166 (1991).

8. Chin J.P.F., *Prost. Leuk. Essent. Fatty Acids* 50, 211-222 (1994).

9. Grundy S.M. и Denke M.A., *J. Lipid Res.* 31, 1149-1172 (1990).

10. Storlien L.H. и др., *Science* 237, 885-888 (1987).

11. Unger R.H., *Diabetes* 44, 863-870 (1995).

12. Morris M.C., Saks F. и Rosner B., *Circulation* 88, 523-533 (1993).

13. Hultin M.B., *Prog. Hemost. Thromb.* 10, 215-241 (1991).

14. Bar-Tana J., Rose-Kahn G., Frenkel B., Shafer Z. и Fainaru M., *J. Lipid Res.* 29, 431-441 (1988).

15. Tzur R., Rose-Kahn G., Adier J. и Bar-Tana J., *Diabetes* 37, 1618-1624 (1988).

16. Tzur R., Smith E. и Bar-Tana J., *Int. J. Obesity* 13, 313-326 (1989).

17. Russel J.C., Arny P.M., Graham S.E., Dolphin P.J. и Bar-Tana J., *Arterioscler. Thromb. Biol.* 15, 918-923 (1995).

Вышеуказанные публикации, описания к патентам и заявкам на патенты полностью включены в настоящее описание в виде ссылок, если это и не указано конкретно для каждой отдельной публикации, соответственно для каждого отдельного описания к патенту и заявке на патент.

Предпосылки создания изобретения

Гепатоцитный ядерный

фактор-4 α^1 (HNF-4 α) (данные обобщены в ссылке 2) является орфановым представителем надсемейства ядерных рецепторов. HNF-4 α экспрессируется в печени, в почках, в кишечнике и в поджелудочной железе взрослых и эмбрионов и обуславливает различные нарушения у мышей. Гомологичная рекомбинация HNF-4 α приводит к смерти эмбриона. Подобно другим представителям надсемейства рецептор HNF-4 α состоит из модулярной структуры, включающей высококонсервативный N-концевой ДНК-связывающий домен, который через

шарнир соединен с гидрофобным C-концевым лигандсвязывающим доменом. Ранее было проведено клонирование и получены характеристики двух изоформ HNF-4 α : HNF-4 α_1 и HNF-4 α_2 , которая представляет собой вариант сплайсинга, имеющего вставку из 10 аминокислот в C-концевом домене.

HNF-4 α является активатором экспрессии гена. Активация транскрипции с помощью HNF-4 α опосредована его связыванием в виде гомодимера с реактивными последовательностями промотора DR-1 генов-мишеней, что приводит к активации комплекса инициации транскрипции. Активируемые HNF-4 α гены (данные обобщены в ссылке 2), кодируют различные ферменты и протеины, участвующие в метаболизме липопротеинов, холестерина и триглицеридов (аполипопротеины AI, AII, AIV, V, CIII, микросомальный протеин переноса триглицеридов, холестерин-7 α -гидроксилаза), в метаболизме липидов (митохондриальная ацил-КоА-дегидрогеназа жирных кислот со средней длиной цепи, пероксисомальная ацил-КоА-оксидаза жирных кислот, изоферменты цитохрома P450, участвующие в ω -окислении жирных ацилов и гидроксилировании стероидов, протеин, связывающий жирные кислоты, клеточный ретинолсвязывающий протеин II, трастиретин), в метаболизме глюкозы (фосфоенолпируват-карбоксикиназа, пируваткиназа, альдолаза, glut2), в метаболизме аминокислот (тирозин-аминотрансфераза, орнитин-транскарбамилаза), в свертывании крови (факторы VII, IX, X), в метаболизме железа (трансферрин, эритропоэтин) и в активации макрофагов (протеин типа гепатоцитного фактора роста/стимулирующий макрофаги протеин, протеины ядра вируса гепатита Б и Х-протеины, длинный концевой повтор человеческого ВИЧ-1, α -1-антитрипсин).

Некоторые гены, которые активируются с помощью HNF-4 α , играют основную роль в возникновении и развитии атерогенеза, рака, аутоиммунных и некоторых других болезней [3]. Так, например, сверхэкспрессия аполипопротеинов B, AIV и CIII, а также протеина переноса микросомальных триглицеридов может привести к дислипидемии (комбинация гипертриглицеридемии и гиперхолестеринемии) вследствие увеличения производства липопротеинов с очень низкой плотностью (ОНПЛ) и хиломикронов в сочетании с понижением их клиренса из плазмы. Аналогично этому увеличение скоростей гликолиза в поджелудочной железе, приводящее к индуцируемой HNF-4 α /HNF-1 сверхэкспрессии/повышенной секреции инсулина в поджелудочной железе, может привести к гиперинсулинемии, обуславливающей устойчивость к инсулину. К настоящему времени установлено, что мутации в HNF-4 α и HNF-1 ответственны за развитие юношеского сахарного диабета (MODY) [4]. Устойчивость к инсулину в сочетании с индуцированной HNF-4 α сверхэкспрессией фосфоенолпируват-карбоксикиназы и с

повышением производства глюкозы в печени может привести к нарушению толерантности к глюкозе (НТГ) и в итоге - к инсулиннезависимому сахарному диабету (ИНСД). Кроме того, в настоящее время гиперинсулинемия рассматривается как основной этиологический фактор, обуславливающий возникновение и развитие эссенциальной гипертензии, и, следовательно, сверхэкспрессия контролируемых HNF-4 α генов может дополнительно привести к гипертензии. Индуцируемая HNF-4 α сверхэкспрессия факторов свертывания крови в сочетании с возможной сверхэкспрессией ингибиторов фибринолиза крови (например, ингибитор-1 активатора плазминогена) также может привести к усиленному образованию тромбов и к понижению фибринолиза, что сопровождается увеличением предрасположенности к атеросклеротическим процессам.

Установлено также, что дислиппротеинемия, ожирение, НТГ/ИНСД, гипертензия и нарушения свертываемости/фибринолиза могут быть объединены одним синдромом (Х-синдром, метаболический синдром, синдром устойчивости к инсулину) [5]. Высокая активность HNF-4 α в отношении транскрипции, приводящая к сверхэкспрессии контролируемых HNF-4 α генов, вероятно может привести к возникновению этиологии, характерной для Х-синдрома. По современным данным категории Х-синдрома и сам этот синдром в целом рассматриваются в качестве основных факторов риска возникновения атеросклеротических сердечно-сосудистых заболеваний в западных странах, позволяя предположить, что HNF-4 α играет определенную роль в возникновении и развитии атерогенеза. Кроме того, поскольку у людей, страдающих Х-синдромом, возникает и развивается рак молочной железы, толстой кишки и предстательной железы, можно предположить, что сверхэкспрессия контролируемых HNF-4 α генов может принимать участие в возникновении и развитии этих злокачественных заболеваний.

В дополнение к той роли, которую HNF-4 α играет в экспрессии генов, связанных с Х-синдромом, HNF-4 α активирует экспрессию генов, которые кодируют протеины, участвующие в модуляции процесса аутоиммунных реакций. Так, например, индуцированная HNF-4 α сверхэкспрессия стимулирующего макрофаги протеина может привести к сенсibilизации макрофагов по отношению к собственным антигенам или к антигенам с перекрестной реактивностью, что приводит к возникновению и развитию аутоиммунных заболеваний, например, ревматоидного артрита, рассеянного склероза и псориаза. Кроме того, поскольку транскрипция протеинов ядра вируса гепатита Б и Х-протеинов, а также длинного концевго повтора человеческого ВИЧ-1 контролируются HNF-4 α , то HNF-4 α может принимать участие в модуляции процесса инфекции, вызванного этими вирусными агентами.

Поскольку сверхэкспрессия индуцируемых

HNF-4 α генов может привести к дислиппротеинемии, НТГ/ИНСД, гипертензии, нарушениям свертываемости и фибринолиза крови, атерогенезу, раку, воспалению, иммунодефициту и к другим заболеваниям, можно ожидать, что ингибирование активности HNF-4 α в отношении транскрипции приведет к уменьшению обусловленных HNF-4 α патологий. Однако пока еще не обнаружены лиганды для HNF-4 α , которые могли бы служить основой для создания ингибиторов активности HNF-4 α в отношении транскрипции. В настоящем изобретении предложены лиганды для HNF-4 α с низкой молекулярной массой, которые специально были созданы с той целью, чтобы действовать в качестве модуляторов индуцируемой HNF-4 α транскрипции, которые в результате этого являются потенциальными лекарственными средствами, предназначенными для лечения патологий, вызванных контролируемыми HNF-4 α генами, или в которых принимают участие контролируемые HNF-4 α гены.

Краткое изложение сущности изобретения

Согласно настоящему изобретению

предложены терапевтически эффективные соединения, включающие амфипатический карбоксилат формулы R-COOH или соль, эфир или амид такого соединения, где R обозначает насыщенную или ненасыщенную алкильную цепь, включающую 10-24 атома углерода, один или большее количество из которых может быть замещено гетероатомами, где один или большее количество входящих в цепь атомов углерода или гетероатомов необязательно образуют часть кольца и где указанная цепь необязательно замещена гидрокарбильным радикалом, гетероциклическим радикалом, (низш.)алкоксигруппой, замещенным гидроксилом (низш.)алкилом, гидроксилом, карбоксилом, галогеном, фенилом или замещенным гидроксигруппой, (низш.)алкилом, (низш.)алкоксигруппой, (низш.)алкенилом или (низш.)алкинилом фенилом, C₃-C₇циклоалкилом или замещенным гидроксигруппой, (низш.)алкилом, (низш.)алкоксигруппой, (низш.)алкенилом или (низш.)алкинилом C₃-C₇циклоалкилом, причем указанный амфипатический карбоксилат обладает способностью в эндогенных условиях превращаться в соответствующий тиоэфир кофермента А.

В предпочтительном варианте осуществления амфипатический карбоксилат представляет собой ксенобиотический амфипатический карбоксилат. В более предпочтительном варианте осуществления ксенобиотический амфипатический карбоксилат может представлять собой дикарбоновую кислоту с длинной цепью, ω -ОН-карбоновую кислоту, ω -B(OH)₂-карбоновую кислоту, аналог клофибриновой кислоты или нестероидного противовоспалительного лекарства. В наиболее предпочтительном варианте осуществления амфипатический карбоксилат выбирают из группы, включающей стеарил(18:0)-КоА, олеил(18:1)-КоА, линолеил(18:2)-КоА, линоленоил(18:3)-КоА,

эйкозапентаеноил(20:5)-КоА,
докозагексаеноил(22:6)-КоА,
1,16-гексадекандионовую кислоту,
1,18-октадекандионовую кислоту,
2,2,15,15-тетраметилгексан-декан-1,16-дионо-
ую кислоту,
2,2,17,17-тетраметилоктадекан-1,18-дионовою
кислоту,
3,3,14,14-тетраметилгексадекан-1,16-дионо-
ую кислоту,
3,3,16,16-тетраметилоктадекан-1,18-дионовою
кислоту,
4,4,13,13-тетраметилгексадекан-1,16-дионо-
ую кислоту,
4,4,15,15-тетраметилоктадекан-1,18-дионовою
кислоту, 16-В(ОН)₂-гексадекановую кислоту,
18-В(ОН)₂-октадекановую кислоту,
16-В(ОН)₂-2,2-диметилгексадекановую
кислоту,
18-В(ОН)₂-2,2-диметилоктадекановую
кислоту,
16-В(ОН)₂-3,3-диметилгексадекановую
кислоту,
18-В(ОН)₂-3,3-диметилоктадекановую
кислоту,
16-В(ОН)₂-4,4-диметилгексадекановую
кислоту,
18-В(ОН)₂-4,4-диметилоктадекановую
кислоту, 16-гидроксигексадекановую кислоту,
18-гидроксиоктадекановую кислоту,
16-гидрокси-2,2-диметилгексадекановую
кислоту,
18-гидрокси-2,2-диметилоктадекановую
кислоту,
16-гидрокси-3,3-диметилгексадекановую
кислоту,
18-гидрокси-3,3-диметилоктадекановую
кислоту,
16-гидрокси-4,4-диметилгексадекановую
кислоту и
18-гидрокси-4,4-диметилоктадекановую
кислоту.

Другим объектом настоящего изобретения является способ лечения Х-синдрома, предусматривающий введение терапевтически эффективного количества амфипатического карбоксилата. В предпочтительном варианте осуществления каждую из болезней, относящихся к категории Х-синдрома, можно лечить по отдельности.

Еще одним объектом настоящего изобретения являются способы модуляции активности HNF-4 α .

И, наконец, еще одним объектом изобретения являются способы лечения заболевания или синдрома, предусматривающие введение терапевтически эффективного количества амфипатического карбоксилата. С помощью способов по изобретению можно лечить такие болезни, как, например, рак молочной железы, рак толстой кишки и рак предстательной железы.

Краткое описание чертежей

На фиг.1 показано, что тиоэфиры ацилов с длинной цепью и КоА (ацилы с длинной цепью-КоА) являются лигандами для HNF-4 α . Слитый протеин GST-HNF-4 α (LBD) (I) состоит из HNF-4 α (LBD), слитого с глутатион-S-трансферазой (GST). His-HNF-4 α (n) состоит из полноразмерного HNF-4 α , меченного 6 остатками гистидина.

а. Кривая насыщения связывания для

пальмитоил(16:0)-КоА

Соответствующие рекомбинантные протеины инкубируют до достижения состояния равновесия с [³H]-пальмитоил(16:0)-КоА (0,05 мкКи) и с возрастающими концентрациями немеченого пальмитоил(16:0)-КоА, как показано на чертеже. Константу диссоциации (K_d), равную 2,6 мкМ, и максимальное связывание, составляющее 1 моль пальмитоил(16:0)-КоА на 1 моль HNF-4 α , определяют с помощью метода Scatchard.

б. Конкурентное связывание с миристоил (14:0)-КоА

Соответствующие рекомбинантные протеины инкубируют с 8нМ [³H]-пальмитоил(16:0)-КоА (60 Ки/ммоль) и с возрастающими концентрациями немеченого миристоил(14:0)-КоА, как показано на чертеже. Процент связывания соответствует количеству радиоактивно меченного [³H]-пальмитоил(16:0)-КоА в связанной фракции. 100%-ное связывание происходит при концентрации [³H]-пальмитоил(16:0)-КоА 0,3 нмоля. Значение ЕС₅₀ (50%-ная специфичная конкуренция) для миристоил(14:0)-КоА составляет 1,4 мкМ (диапазон 1,2-1,5 мкМ). Значения ЕС₅₀ для других тиозифиров жирных ацилов и КоА, а также ксенобиотических ацилов и КоА приведены в таблице.

додеканоил(12:0)-КоА	2,3мкМ (диапазон 2,1-2,4мкМ)
пальмитоил(16:0)-КоА	2,6мкМ (диапазон 1,3-3,4мкМ)
стеароил(18:0)-КоА	2,7мкМ (диапазон 2,1-3,3мкМ)
олеоил(18:1)-КоА	1,4мкМ (диапазон 1,0-1,8мкМ)
линолеоил(18:2)-КоА	1,9мкМ (диапазон 1,5-2,3мкМ)
линоленоил(18:3)-КоА	2,9мкМ (диапазон 2,9-3,8мкМ)
эйкозапентаеноил(20:5)-КоА	0,6мкМ (диапазон 0,5-0,7мкМ)
докозагексаеноил(22:6)-КоА	1,6мкМ (диапазон 0,6-2,7мкМ)
3,3,16,16-тетраметилоктадекандио- вая кислота	8мкМ (диапазон 5-15мкМ)
3,3,14,14-тетраметилгексадекандио- вая кислота	8мкМ (диапазон 5-15мкМ)
3,3,12,12-тетраметилтетрадекандио- вая кислота	40мкМ
безафибрат	90мкМ
нафенолин	90мкМ
ибупрофен	40мкМ

На фиг.2 показано, что лиганды HNF-4 α , представляющие собой тиоэфиры жирных ацилов и КоА, модулируют связывание HNF-4 α со специфичным для него ДНК-энхансером.

а. Связывание His-HNF-4 α (14 нг) с СЗР в отсутствии (полоса 1) или в присутствии либо 10 мкМ миристоил(14:0)-КоА (полоса 2), либо 10 мкМ пальмитоил(16:0)-КоА (полоса 3)

б. Связывание His-HNF-4 α (20 нг) с СЗР в отсутствии (полоса 1) или в присутствии либо 10 мкМ стеароил(18:0)-КоА (полоса 2), либо 10 мкМ линолеоил(18:2, w-3)-КоА (полоса 3)

в. Активация связывания His-HNF-4 α (14 нг) с СЗР при использовании возрастающих концентраций миристоил(14:0)-КоА.

Показан срез геля, содержащий радиоактивно меченный СЗР, связанный с димером His-HNF-4 α .

На фиг.3 показана модуляция активности HNF-4 α в отношении транскрипции in vitro с помощью тиоэфиров жирных ацилов с длинной цепью и КоА.

а. Приведены данные репрезентативных экспериментов, в которых оценивали

транскрипцию in vitro тестируемой матрицы при добавлении указанных на чертеже возрастающих концентраций His-HNF-4 α и без His-HNF-4 α (полосы 1-3, 7-9) или при добавлении 10 мкМ пальмитоил(16:0)-КоА (полосы 4-6) или 10 мкМ стеариол(18:0)-КоА (полосы 10-11). Транскрипты тестируемых и контрольных матриц с правильным началом транскрипции обозначены простой стрелкой ($\rightarrow$) и жирной стрелкой ($\rightarrow$) соответственно.

б. Индуцированная HNF-4 α транскрипция в отсутствие (незакрашенные столбики) либо в присутствии 10 мкМ пальмитоил(16:0)-КоА (закрашенные столбики) или 10 мкМ стеариол(18:0)-КоА (заштрихованные столбики). Кратность транскрипции обозначает соотношение специфичных транскриптов, полученных с помощью тестируемой матрицы, и транскриптов, полученных с помощью контрольной матрицы, стандартизованное по отношению к соотношению, полученному без HNF-4 α . На чертеже обобщены данные по 5 независимым экспериментам для каждого ацил-КоА. Символом * обозначены достоверные данные, полученные при сравнении с соответствующим значением в опытах без добавления лиганда.

На фиг.4 показана модуляция активности HNF-4 α с помощью жирных кислот с длинной цепью и с помощью ксенобиотических амфипатических карбоксилатов, обнаруженная в опытах по кратковременной трансфекции.

а. Модуляция активности HNF-4 α с помощью жирных кислот с длинной цепью

Кратность индукции CAT-активности при трансфекции HNF-4 α определяют, сравнивая CAT-активность при добавлении рSG5-HNF-4 α и при добавлении плазмиды рSG5, а также в зависимости от соответствующих указанных на чертеже жирных кислот, добавленных в культуральную среду. На чертеже обобщены данные по 3-4-м независимым экспериментам для каждой жирной кислоты. Данные приведены в виде среднего значения $\pm$ среднеквадратичное отклонение (СКО9).

б. Суппрессия HNF-4 α с помощью ксенобиотических дикарбоновых кислот

Кратность индукции определяют как CAT-активность в клетках, инкубированных с такими пролигандами, как 3,3,12,12-тетраметилтетрадекандионовая кислота (*),

3,3,14,14-тетраметилгексадекандионовая кислота (g) и

3,3,16,16-тетраметилоктадекандионовая кислота (5), стандартизованную по отношению к активности клеток, инкубированных без добавления пролигандов. Значения EC₅₀ для вышеуказанных и для других ксенобиотических лигандов приведены ниже:

3,3,12,12-тетраметилтетрадекандионовая кислота >300 мкМ

3,3,14,14-тетраметилгексадекандионовая кислота 155 мкМ

3,3,16,16-тетраметилоктадекандионовая кислота 150 мкМ

2,2,13,13-тетраметилтетрадекандионовая кислота 230 мкМ

2,2,15,15-тетраметилгексадекандионовая кислота 150 мкМ

2,2,17,17-тетраметилоктадекандионовая кислота 150 мкМ

4,4,13,13-тетраметилгексадекандионовая кислота 150 мкМ

5 4,4,15,15-тетраметилоктадекандионовая кислота 150 мкМ

безафибрат 260 мкМ

нафенопин 160 мкМ

индометацин 130 мкМ

Подробное описание изобретения

10 При создании настоящего изобретения было установлено, что жирные кислоты с длинной цепью непосредственно модулируют активность HNF-4 α в отношении транскрипции путем связывания соответствующих тиоэфиров жирных ацилов и КоА с

15 лигандсвязывающим доменом HNF-4 α . Модуляция активности HNF-4 α в отношении транскрипции при использовании в качестве агонистических или антагонистических лигандов тиоэфиров ацил-КоА может привести к двум совершенно независимым

20 индуцируемым лигандами реакциям, а именно к сдвигу равновесия между олигомерной и димерной формами HNF-4 α или к воздействию на присущее димерной форме HNF-4 α сродство к связыванию со

25 специфичным для нее энхансером. В контексте настоящего описания указанные понятия имеют следующие значения.

30 Понятие "амфипатический карбоксилат" обозначает соединение, имеющее гидрофобный скелет и карбоксильную функцию.

Понятие "ксенобиотический" относится к соединениям, чужеродным по отношению к промежуточному метаболизму млекопитающих.

35 Понятие "Х-синдром" относится к синдрому, включающему некоторые или все нижеперечисленные болезни, такие как 1) дислиппротеинемия (комбинация гиперхолестеринемии и

40 гипертриглицеридемии, низкий уровень ВПЛ-холестерина), 2) ожирение (в частности выраженное ожирение), 3) нарушение толерантности к глюкозе (НТГ), приводящее к инсулиннезависимому сахарному диабету (ИНСД), 4) эссенциальная гипертензия и 5) тромбогенные/фибринолитические дефекты.

45 Понятие "модуляция" относится либо к повышению, либо к понижению проявления активности HNF-4 α . Модуляция HNF-4 α может быть непосредственной, например, при связывании с HNF-4 α , или опосредованной, например, связанной с другим механизмом, например, таким, как киназная активность. Соединения по настоящему изобретению, которые связываются с HNF-4 α , в зависимости от

50 длины цепи и/или степени насыщения могут либо активировать, либо ингибировать его связывание со специфичным для него энхансером.

55 Способы лечения Х-синдрома подпадают под объем настоящего изобретения. Эти способы включают введение естественных для организма или ксенобиотических амфипатических карбоксилатов. Способы ингибирования активности HNF-4 α в отношении транскрипции, также подпадающие под объем изобретения, представляют собой подавление с помощью

антисмыслового транскрипта, с помощью антител или с помощью любого другого метода снижения избыточной активности HNF-4 α .

Методы

Рекомбинантные протеины HNF-4 α

кДНК крысиного HNF-4 α (pLEN4S) [1] субклонировали в кодирующей глутатин-S-трансферазу (GST) плазмиде pGEX-2T (фирма Pharmacia) и образовавшуюся плазмиду расщепляли с помощью SmaI и AclI и повторно лигировали, получая слитую плазмиду GST-HNF-4 α (LBD). Слитую плазмиду экспрессировали в штамме E. coli BL21(DE3) путем индукции 0,2 mM IPTG в течение 60 мин и продукт очищали аффинной хроматографией с использованием глутатион-агарозных гранул (фирма Sigma), получая слитый протеин GST-HNF-4 α (LBD), состоящий из 96-455 аминокислот последовательности HNF-4 α дикого типа, слитых с GST. Полноразмерную кДНК HNF-4 α 1, клонированную в векторе 6His-pET11d, экспрессировали в штамме E. coli BL21(DE3)plysS.

Анализ связывания лигандов

Рекомбинантный GST-HNF-41(LBD) (100 пмоль) или His-HNF-4 α (100 пмоль) инкубировали в течение 60 мин при 22°C с [3 H]-пальмитоил(16:0)-CoA (фирма American Radiolabelled Chemicals) в 100 мкл 10 mM фосфатного буфера (pH 7,4). Добавляли в указанных концентрациях лиганды-конкуренты или только растворитель. Свободный и связанный с HNF-4 α [3 H]-пальмитоил(16:0)-CoA разделяли с помощью древесного угля с нанесенным на него Dowex и определяли количество связанного лиганда с помощью жидкостного сцинтилляционного счетчика. Неспецифическое связывание [3 H]-пальмитоил(16:0)-CoA определяли по его связыванию с фрагментом GST или с карбонат-дегидрогеназой в качестве неспецифического протеина.

Анализ изменения подвижности в геле His-HNF-4 α и указанный ацил-CoA предварительно инкубировали в течение 30 мин при 22°C в ПмМ Hepes (pH 7,9), содержащем 50 mM KCl, 1 mM дитиотреитола, 2,5 mM MgCl₂, 10% глицерина, 1 мкг поли(dI-dC) в конечном объеме 20 мкл. Затем добавляли меченный с помощью 32 P олигонуклеотид (0,1 нг), включающий элемент C3P последовательности промотора аполипопротеина CIII (apo CIII) человека (-87/-66)⁶, и инкубацию продолжали в течение еще 15 мин. Комплексы протеин-ДНК растворяли в 5%-ном неденатурирующем полиакриламидном геле в 0,6-кратном TBE и количественно оценивали путем томографии с помощью устройства Phosphor Imager.

Анализ транскрипции in vitro

Реакционная смесь содержала 20 mM Hepes-KOH (pH 7,9), 5 mM MgCl₂, 60 mM KCl, 8% глицерина, 2 mM ДТТ, 1 mM 3'-О-метил-ГТФ, 10 ед. РНКазы T1, 20 ед. RNasin, 0,5 мкг обработанной ультразвуком ДНК спермы лосося и His-HNF-4 α , а также указанный тестируемый лиганд. Смесь предварительно инкубировали в течение 30 мин при 22°C, затем добавляли 10 нг контрольной матрицы pAdML200,

включающей основной последний промотор аденовируса (-400/+10), связанный с не содержащей G кассетой длиной 200 пар оснований, и 200 нг тестируемой матрицы, включающей три копии элемента C3P последовательности промотора apo CIII (-87/-66), расположенные против хода транскрипции относительно синтетического промотора бокса Хогнесса овальбумина и перед не содержащей G кассетой длиной 377 пар оснований. Смесь дополнительно предварительно инкубировали в течение 10 мин при 22°C, а затем добавляли 40 мкг ядерного экстракта HeLa и дополнительно предварительно инкубировали в течение 30 мин при 30°C. Затем добавляли 0,5 mM АТФ, 0,5 mM ЦТФ, 25 мкМ УТФ и 10 мкКи [α ³²P]-УТФ (т.е. 800 Ки/моль, фирма Amersham) и полную реакционную смесь инкубировали в течение 45 мин при 30°C в конечной концентрации 25 мкл. Реакцию прекращали, добавляя 175 мкл стоп-смеси (0,1 M ацетата натрия (pH 5,2), 10 mM ЭДТК, 0,1% ДСН, 200 мкг/мл tPHK), а затем экстрагировали фенолом и осаждали этанолом. РНК ресуспендировали в образце буфера, содержащего 80% формамида и 10 mM трис-HCl (pH 7,4), и разделяли на 5%-ном полиакриламидном геле, содержащем 7 M мочевины в TBE. Путем томографии с помощью устройства Phosphor Imager количественно оценивали правильно инициированные транскрипты. Тестируемую ДНК-матрицу конструировали, встраивая в плазмиду pC₂AT19 амплифицированный с помощью ПЦР олигонуклеотид, полученный с использованием в качестве матрицы плазмиды (C3P)₃-TK-CAT и состоящий из трех копий элемента C3P последовательности промотора гена apo CIII (-87/-66), имеющей сайты EcoRI и SSTI на 5'- и 3'-концах соответственно. Образовавшуюся плазмиду расщепляли с помощью SphI и Sad и лигировали с синтетическим олигонуклеотидом (5'-CGAGGTCCACTTCGSTATATATTCCTCCCGA GCT-3'), содержащим последовательности промотора тимидинкиназы вируса герпеса простого (HSV) (-41/-29) и промотора овальбумина цыпленка (-33/-21).

Анализ с использованием трансфекции

Клетки линии COS-7, совместно трансфектированные в течение 6 ч репортерной плазмидой (C3P)₃-TK-CAT (5 мкг) и либо экспрессирующей плазмидой pSG5-HNF-4 α (0,025 мкг), либо плазмидой pSG5 (0,025 мкг), которые добавляли путем осаждения с использованием фосфата кальция, культивировали в бессывороточной среде с добавлением указанных выше жирных кислот (в виде комплексов с альбумином в молярном соотношении 6:1). К каждому осадку в качестве внутреннего контроля трансфекции добавляли экспрессирующий β -галактозидазу вектор pRSGAL (1 мкг). Конструкцию (C3P)₃-TK-CAT получали, встраивая синтетический олигонуклеотид, включающий последовательность промотора гена apo CHG (-87/-66) (5'-GCAGGTGACCTTTGCCAGCGCC-3'), фланкированную сайтом рестрикции HindIII, в pBLCAT2⁴⁷ против хода транскрипции относительно промотора тимидинкиназы

длиной 105 пар оснований. Отбирали конструкцию, содержащую три копии синтетического олигонуклеотида в прямой ориентации, и ее строение подтверждали секвенированием.

Тиоэфиры жирных ацилов и КоА

Тиоэфиры жирных ацилов и КоА получали взаимодействием свободной жирной кислоты, растворенной в безводном ацетонитриле, с 1,1'-карбонилдии-мидазолом. Реакционную смесь упаривали досуха и соответствующий конъюгат ацил-имидазол подвергали взаимодействию с одним эквивалентом восстановленного КоА, растворенного в смеси ТГФ с водой в соотношении 1:1. По завершении реакции проводили анализ методом ТСХ на пластинках из силикагеля 60Н (фирма Merck) (бутанол/уксусная кислота/вода 5:2:3). Производное в виде ацил-КоА осаждали с помощью 0,1 М HCl и осадок промывали трижды 0,1 М HCl, трижды простым эфиром, не содержащем перекиси, и трижды ацетоном. Спектрофотометрически при использовании соотношения длин волн 260/232 нм определяли содержание ацил-КоА.

Примеры

Ниже изобретение и достигаемые при его осуществлении преимущества дополнительно проиллюстрированы на примерах, которые не ограничивают его объем.

Пример 1

Тиоэфиры ацилов с длинной цепью и КоА являются лигандами для HNF-4 α

Установлено, что тиоэфиры ацилов с различной длиной цепи и степенью насыщения и КоА специфично связываются с HNF-4 α . Связывание оценивали либо на примере связывания с лигандсвязывающим доменом HNF-4 α , слитым с глутатион-S-трансферазой (GST-HNF-4 α (LBD)), либо на примере связывания с полноразмерным протеином HNF-4 α , меченным шестью остатками гистидина (His-HNF-4 α).

Связывание пальмитоил(16:0)-КоА с лигандсвязывающим доменом или с полноразмерными протеинами HNF-4 α достигало насыщения при K_d 2,6 мкМ и имело тенденцию к насыщению при соотношении 1 моль тиоэфира жирный ацил-КоА/1 моль HNF-4 α (фиг.1а). Связывание с ацил-КоА оказалось специфичным, в то время как свободная жирная кислота и свободный КоА были неактивными. Связывание тиоэфиров ацилов с разной длиной цепи и с разной степенью насыщения и КоА оценивали по конкурентному связыванию радиоактивно меченного пальмитоил(16:0)-КоА с рекомбинантными GST-HNF-4 α (LBD) или с His-HNF-4 α (фиг.1б). Связывание не было выявлено при использовании тиоэфира насыщенного жирного ацила с длиной цепи короче C₁₂ и КоА. Однако сродство к связыванию с HNF-4 α тиоэфира жирного ацила с длинной цепью и КоА не существенно зависело от длины цепи или степени насыщения соответствующих лигандов, сохраняясь в диапазоне 0,5-0,3 мкМ. Специфичность связывания с HNF-4 α тиоэфира жирного ацила с длинной цепью и КоА также оценивали, анализируя предполагаемое связывание

пальмитоил(16:0)-КоА с рекомбинантным меченным с помощью гистидина, активированным с помощью пролифератов пероксисомы α -рецептором (His-PPAR α). В отличие от результатов, полученных при использовании HNF-4 α , тиоэфиры жирных ацилов с длинной цепью и КоА не связывались с PPAR α или α -рецептором ретиноевой кислоты X (RXR α). Эти результаты свидетельствуют о том, что тиоэфиры естественных для организма жирных ацилов с длинной цепью и КоА могут связываться с лигандсвязывающим доменом HNF-4 α и служить в качестве специфичных для этого протеина лигандов.

Связывание тиоэфиров ацил-КоА с

HNF-4 α не ограничено приведенными выше в качестве примера тиоэфирами естественных для организма жирных ацилов и КоА. Так, например, связывание также обнаружено при использовании тиоэфиров ксенобиотических ацилов и КоА (RCOSKoA), где R обозначает радикал, включающий насыщенную или ненасыщенную алкильную цепь, состоящую из 10-24 атомов углерода, один или большее количество которых может быть замещено гетероатомом, где один или большее количество этих входящих в состав цепи атомов углерода или гетероатомов необязательно образуют часть кольца и где эта цепь необязательно может быть замещена (фиг.1б).

Пример 2

Модуляция активности HNF-4 α с помощью тиоэфиров ацилов с длинной цепью и КоА

Влияние на активность

HNF-4 α связывания тиоэфиров ацилов с длинной цепью и КоА оценивали, изучая связывание HNF-4 α со специфичным для него элементом СЗР последовательности промотора гена apo CIII (-87/-66)⁶ в присутствии тиоэфиров ацилов с различной длиной цепи, степенью насыщения и степенью замещения и КоА и без указанных тиоэфиров. Связывание определили с помощью анализа изменения подвижности в геле. Как видно на фиг.2, связывание СЗР с HNF-4 α повышалось при увеличении концентраций His-HNF-4 α и активировалось при использовании тиоэфиров естественных для организма насыщенных жирных ацил с длиной цепи C₁₂-C₁₆ и КоА. Активация зависела от концентрации и была максимальной при добавлении миристоил(14:0)-КоА в диапазоне концентраций, необходимом для его связывания с HNF-4 α . Кроме того, обнаружено, что некоторые тиоэфиры жирных ацилов и КоА, а также ксенобиотических ацилов и КоА являются истинными антагонистами HNF-4 α , т.е. они ингибируют присущее ему связывание со специфичным для него энхансером. Так, в частности, инкубация HNF-4 α в присутствии либо стеариол(18:0)-КоА, либо α -линоленоил(18:3)-КоА приводила к выраженному ингибированию его связывания с олигонуклеотидом СЗР (фиг.2). Аналогично этому инкубация HNF-4 α в присутствии различных тиоэфиров ксенобиотических ацилов и КоА приводила к ингибированию его связывания со специфичным для него олигонуклеотидом СЗР. Таким образом, тиоэфиры естественных для организма или

ксенобиотических ацилов и КоА, которые связываются с HNF-4 α , в зависимости от длины цепи, степени насыщения или степени замещения могут служить агонистами, частичных агонистов или антагонистов активности HNF-4 α в отношении транскрипции.

Пример 3

Модуляция индуцируемой HNF-4 α активности в отношении транскрипции с помощью агонистов и антагонистов HNF-4 α

Воздействие лигандов, являющихся агонистами или антагонистами для HNF-4 α , также оценивали путем анализа катализируемой добавлением ядерного экстракта HeLa и индуцируемой рекомбинантным HNF-4 α скорости транскрипции *in vitro* тестируемой матрицы, включающей не содержащую G кассету длиной 377 пар оснований под контролем промоторов, представляющих собой последовательности тимидинкиназы HSV и овальбумина цыпленка, и усиленную тремя копиями элемента СЗР промотора гена аро СIII. Способность HNF-4 α активировать транскрипцию оценивали при добавлении репрезентативного тиозефира ацила с длинной цепью и КоА и без него. Для оценки транскрипции в качестве внутренней контрольной матрицы использовали матрицу, включающую не содержащую G кассету длиной 200 пар оснований под контролем основного последнего промотора аденовируса (AdML) и лишенную энхансера HNF-4 α . Как видно на фиг.3, транскрипция *in vitro* тестируемой матрицы возрастала в зависимости от концентрации HNF-4 α , достигая насыщения при концентрации HNF-4 α 200 нг. Индуцируемая HNF-4 α транскрипция активировалась при добавлении пальмитоил(16:0)-КоА и ингибировалась при добавлении стеариол(18:0)-КоА, что согласуется с данными о воздействии агонистов и антагонистов HNF-4 α , полученными в опытах по оценке изменения подвижности в геле. Таким образом, тиозефиры ацилов КоА, которые связываются с HNF-4 α , могут непосредственно модулировать его активность в отношении транскрипции в бесклеточной системе.

Внутриклеточное воздействие лигандов HNF-4 α на опосредуемую HNF-4 α транскрипцию оценивали на клетках линии COS-7, которые трансфектировали совместно вектором экспрессии HNF-4 α и репортерной плазмидой САТ под контролем промотора тимидинкиназы и усиленной одной из трех копий СЗР промотора гена аро СIII. Трансфектированные клетки инкубировали в присутствии свободных жирных кислот и ксенобиотических амфипатических карбоксилатов, представляющих собой соответствующие пролиганды для HNF-4 α с агонистической или антагонистической активностью. Как видно на фиг.4а, в случае, когда в культуральную среду не добавляли жирные кислоты, экспрессия усиленной СЗР репортерной плазмиды активировалась с помощью HNF-4 α в 7 раз. Активация транскрипции при трансфекции HNF-4 α может являться отражением

активности в отношении транскрипции, присущей несвязанному с лигандом димеру HNF-4 α , или может являться результатом связывания HNF-4 α , активированного в эндогенных условиях ацил-КоА. Добавление в культуральную среду миристиновой(14:0) или пальмитиновой(16:0) кислоты привело к зависящей от дозы активации HNF-4 α -зависимой транскрипции, в то время как стеариновая (18:0), α -линоленовая(18:3) или эйкозапентановая (20:5) кислоты подавляли транскрипцию, что согласуется с данными об агонистический или антагонистической активности соответствующих тиозефиров жирных ацилов и КоА, полученными как в опытах по оценке изменения подвижности в геле (фиг.2), так и при анализе в бесклеточной системе транскрипции (фиг.3). Аналогично этому ингибирование активности HNF-4 α в отношении транскрипции можно быть обнаружено в опытах по трансфекции (фиг.4б) при добавлении в культуральную среду ксенобиотических амфипатических карбоксилатов (RCOOH), где R обозначает радикал, представляющий собой насыщенную или ненасыщенную алкильную цепь, включающую 10-24 атома углерода, один или большее количество из которых может быть замещено гетероатомами, где один или большее количество входящих в цепь атомов углерода или гетероатомов необязательно образуют часть кольца и где указанная цепь необязательно замещена гидрокарбильным радикалом, гетероциклическим радикалом, (низш.)алкоксигруппой, (низш.)алкилом, замещенным гидроксилом, гидроксилом, карбоксилом, галогеном, фенилом, замещенным фенилом, С₃-С₇циклоалкилом или замещенным С₃-С₇циклоалкилом. Таким образом, внутриклеточная опосредуемая HNF-4 α экспрессия может модулироваться с помощью естественных для организма жирных кислот, а также с помощью ксенобиотических амфипатических карбоксилатов, которые в эндогенных условиях обладают способностью превращаться в соответствующие тиозефиры КоА (RCOSCoA). Высокоэффективными ингибиторами являются следующие соединения, в которых R замещен ω -карбоксилом:
2,2,15,15-тетраметилгексадекан-1,16-дионовая кислота, 2,2,17,17-тетраметилоктадекан-1,18-дионовая кислота, 3,3,14,14-тетраметилгексадекан-1,16-дионовая кислота, 3,3,16,16-тетраметилоктадекан-1,18-дионовая кислота, 4,4,13,13-тетраметилгексадекан-1,16-дионовая кислота, 4,4,15,15-тетраметилоктадекан-1,18-дионовая кислота. К другой группе эффективных соединений относятся следующие соединения, в которых R замещен ω -гидроксилом:
16-гидроксигексадекановая кислота, 18-гидроксиоктадекановая кислота, 16-гидрокси-2,2-диметилгексадекановая кислота, 18-гидрокси-2,2-диметилоктадекановая кислота, 16-гидрокси-3,3-диметилгексадекановая кислота,

18-гидрокси-3,3-диметилоктадекановая кислота,
16-гидрокси-4,4-диметилгексадекановая кислота,
18-гидрокси-4,4-диметилоктадекановая кислота. Еще одна группа несколько менее эффективных соединений включает аналоги клофибриновой кислоты (фибраты) или нестероидные противовоспалительные лекарства. Общее оказываемое действие может определяться главным образом композицией ядерных тиозэфиров ацил-КоА и агонистической/антагонистической активностью каждого из них при связывании с HNF-4 α .

Пример 4

Физиологические механизмы действия
Ингибирование активности HNF-4 α в отношении транскрипции с помощью естественных для организма или ксенобиотических амфипатических карбоксилатов, которые в эндогенных условиях обладают способностью превращаться в соответствующие тиозефире КоА, может служить терапевтическим целям при лечении болезней, которые вызываются и/или развиваются при сверхэкспрессии контролируемых HNF-4 α генов. Действие определенного амфипатического карбоксилата в качестве ингибитора активности HNF-4 α в отношении транскрипции может зависеть в первую очередь от способности, присущей соответствующему ему тиозефиру КоА, действовать в качестве антагониста HNF-4 α . В настоящее время нельзя предсказать, какие из амфипатических карбоксилатов, обладающих способностью превращаться в эндогенных условиях в соответствующие тиозефире КоА, могут рассматриваться как истинные антагонисты HNF-4 α . Так, например, доказано, что миристоил(14:0)-КоА или пальмитоил(16:0)-КоА являются активаторами способности HNF-4 α активировать транскрипцию, в то время как следующий гомолог в этой серии, т.е. стеароил(18:0)-КоА, является истинным антагонистом. Однако следует отметить, что частичные агонисты могут вызывать выраженное ингибирование активности HNF-4 α при замещении в эндогенных условиях сильными агонистами HNF-4 α или при конкуренции с более активными агонистами за связывание с HNF-4 α .

Общая активность амфипатического карбоксилата в качестве ингибитора активности HNF-4 α в отношении транскрипции *in vivo* может зависеть не только от присущей соответствующему ему тиозефиру КоА способности действовать в качестве антагониста HNF-4 α , но также зависеть от конкретного типа клеток и превалирующей композиции ядерных тиозэфиров жирных ацилов и КоА. Характеристики этой композиции определяются профилем питательной/фармакологической доступности соответствующих кислот, доступностью каждой из них для КоА-тиозетерификации, а также доступностью соответствующих ацил-КоА для гидролиза ацил-КоА-гидролазами, способностью к этерификации с образованием липидов, к окислению в соответствующие продукты, к элонгации, десатурации или к связыванию с

другими ацил-КоА-связывающими протеинами. Кроме того, эндогенные ацил-КоА, образовавшиеся в результате КоА-тиозетерификации амфипатических карбоксилатов, не относящихся к жирным кислотам (например ретиноевой кислоты, простагландинов, лейкотриенов и др.), могут связываться с HNF-4 α и модулировать его активность в качестве агонистов или антагонистов. Полученное действие может также зависеть от дополнительных ядерных факторов, которые могут влиять на равновесие между олигомерной и димерной формами HNF-4 α , на сродство связывания HNF-4 α со специфичным для него энхансером или на взаимодействие HNF-4 α с протеинами комплекса инициации транскрипции. В частности, поскольку HNF-4 α и активируемый пероксисомальными активаторами рецептор (PPAR) имеют сходные консенсусные последовательности DR-1, а HNF-4 α так же, как и PPAR, в большей степени может активироваться свободными жирными кислотами с длинной цепью, чем их соответствующими КоА-тиозефиреми, активность, характерная для определенных ацил-КоА и опосредованно влияющая на HNF-4 α , может оказаться аналогичной активности, обнаруженной при активации PPAR соответствующей свободной кислотой, либо может быть обнаружен антагонизм.

Несмотря на указанную выше гипотетичность, агонистический/антагонистический профиль лигандов для HNF-4 α из группы ацил-КоА, продемонстрированный в приведенных в настоящем описании примерах, может способствовать разработке молекулярной основы воздействий, выявленных *in vivo* при использовании пищевых жирных кислот, которые затрагивают некоторые из регулируемых HNF-4 α генов. Жирный ацил с длинной цепью состоит из пищевого жира, на долю которого приходится 30-40% калорий, поглощаемых с пищей в западных странах. Помимо их роли в качестве субстратов вследствие того, что они наиболее легко окисляются с выделением энергии или превращаются в результате этерификации в триглицериды и фосфолипиды, необходимые для образования жировой ткани и клеточных мембран соответственно, некоторые пищевые жирные кислоты уже давно признаны в качестве пищевых модуляторов возникновения и развития рака [7], атерогенза [8], дислипидемии [9], устойчивости к инсулину [10,11], гипертензии [12], дефектов свертываемости крови и фибринолиза [13], воспаления, иммунодефицита и других болезней. Эти ранее необъяснимые воздействия в настоящее время могут быть расшифрованы с учетом данных о влиянии соответствующих ацил-КоА на активность HNF-4 α в отношении транскрипции, что приводит к модуляции экспрессии генов, участвующих в инициации и развитии вышеуказанных патологий. Специфические воздействия пищевых жирных кислот с длинной цепью на липиды крови и на свертываемость крови следует рассматривать с учетом точно доказанного воздействия HNF-4 α на гены, кодирующие протеины, которые участвуют в метаболизме липопротеинов (аполипопротеины AI, AII, B,

CIII, микросомальный протеин переноса триглицеридов) и в свертывании крови (факторы IV, IX, X). Фактически точно доказанное увеличение содержания в плазме ОВПЛ-, НПЛ- и ВПЛ-холестерина, вызванное пищевыми насыщенными жирными кислотами с длиной цепи C₁₂-C₁₆ в целом и миристиновой кислотой в частности, согласуется с активацией HNF-4 α под воздействием соответствующих тиоэфиров насыщенных ацилов и КоА и с отсутствием эффекта под воздействием тиоэфиров насыщенных ацилов и КоА с длиной цепи меньше C₁₂. Неожиданное снижение уровня липидов в крови при использовании насыщенной стеариновой (18:0) кислоты также может быть связано с антагонистическим действием стеариол(18:0)-КоА на активность HNF-4 α . Аналогично этому снижение уровня липидов под воздействием моно- и полиненасыщенных жирных кислот [9], связанное с замещением ими насыщенных пищевых жирных кислот, согласуется с активностью тиоэфиров поли- или мононенасыщенных ацилов и КоА по сравнению с тиоэфирами насыщенных жирных ацилов и КоА, что также дополняется непосредственным ингибированием HNF-4 α с помощью линоленоил(18:3)-КоА, эйкозапентаеноил (20:5)-КоА или докозагексаеноил(22:6)-КоА. Кроме того, повышение свертываемости крови, индуцируемое насыщенными пищевыми жирными кислотами с длиной цепи C₁₂-C₁₆ и коррелирующее с соответствующим повышением фактора VII, понижение свертываемости крови, индуцируемое полиненасыщенными пищевыми жирными кислотами, а также неожиданно установленное понижение содержания фактора VII и свертываемости крови, специфично индуцируемое пищевой стеариновой(18:0) кислотой, аналогичным образом могут быть обусловлены воздействием соответствующих тиоэфиров жирных ацилов и КоА на активность HNF-4 α , что приводит к модуляции экспрессии контролируемых HNF-4 α генов, кодирующих зависимые от витамина К факторы свертывания крови.

Кроме того, модуляция транскрипции контролируемых HNF-4 α генов ксенобиотическими амфипатическими карбоксилатами, которые в эндогенных условиях могут быть этерифицированы с образованием соответствующих им тиоэфиров КоА и которые действуют в качестве агонистов или антагонистов HNF-4 α , может являться фармакологическим терапевтическим механизмом болезней, возникающих и развивающихся в результате сверхэкспрессии контролируемых HNF-4 α генов. Возможность применения ксенобиотических замещенных амфипатических карбоксилатов следует рассматривать в свете обобщенной информации, полученной с помощью моделирования на животных [14-17], которая касается их фармакологической характеристики в отношении изменения течения дислипидотеинемии, ожирения, устойчивости к инсулину и атеросклероза, т.е. болезней, связанных со сверхэкспрессией

некоторых контролируемых HNF-4 α генов. Терапевтическая эффективность этих лекарственных средств может быть обусловлена ингибированием активности HNF-4 α в отношении транскрипции, как это описано в примерах, приведенных в настоящем описании.

Формула изобретения:

1. Применение ксенобиотического соединения формулы R-COOH или соли, эфира или амида такого соединения, где R обозначает насыщенную или ненасыщенную алкильную цепь, включающую 10-24 атома углерода, один или большее количество из которых может быть замещено гетероатомами, где один или большее количество входящих в цепь атомов углерода или гетероатомов необязательно образуют часть кольца и где указанная цепь необязательно замещена гидрокарбильным радикалом, гетероциклическим радикалом, (низш.)алкоксигруппой, замещенным гидроксильной (низш.)алкилом, гидроксильной, карбоксильной, фенилом или замещенным гидроксильной группой, (низш.)алкилом, (низш.)алкоксигруппой, (низш.)алкенилом или (низш.)алкинилом фенилом, C₃-C₇циклоалкилом или замещенным гидроксильной группой, (низш.)алкилом, (низш.)алкоксигруппой, (низш.)алкенилом или (низш.)алкинилом C₃-C₇циклоалкилом, причем указанное соединение обладает способностью в эндогенных условиях превращаться в соответствующий ему тиоэфир кофермента А, т.е. в RCOSКоА, для лечения X-синдрома и/или любой болезни, включающей X-синдром, независимо от активации PPAR α печени.

2. Применение по п.1, где R выбирают из группы, включающей ω -карбоксильные и ω -гидроксильные цепи.

3. Применение по п.1, где RCOOH обозначает жирную кислоту с длинной цепью.

4. Применение по п.1, где действующее вещество выбирают из группы, включающей следующие соединения, в которых R обозначает ω -карбоксил и RCOOH выбирают из группы, включающей 1,16-гексадекандионовую кислоту, 1,18-октадекандионовую кислоту, 2,2,15,15-тетраметилгексадекан-1,16-дионовую кислоту, 2,2,17,17-тетраметилоктадекан-1,18-дионовую кислоту, 3,3,14,14-тетраметилгексадекан-1,16-дионовую кислоту, 3,3,16,16-тетраметилоктадекан-1,18-дионовую кислоту, 4,4,13,13-тетраметилгексадекан-1,16-дионовую кислоту и 4,4,15,15-тетраметилоктадекан-1,18-дионовую кислоту.

5. Применение по п.1, где R обозначает ω -гидрокси, а RCOOH выбирают из группы, включающей 16-гидроксигексадекановую кислоту, 18-гидроксиоктадекановую кислоту, 16-гидрокси-2,2-диметилгексадекановую кислоту, 18-гидрокси-2,2-диметилоктадекановую кислоту, 16-гидрокси-3,3-диметилгексадекановую кислоту, 18-гидрокси-3,3-диметилоктадекановую

кислоту,
16-гидрокси-4,4-диметилгексадекановую
кислоту и
18-гидрокси-4,4-диметилгексадекановую
кислоту.

6. Применение по одному из пп.1-5, предназначенное для лечения дислипотеинемии (гипертриглицеридемия, гиперхолестеринемия, низкое содержание ВПЛ-холестерина).

7. Применение по одному из пп.1-5, предназначенное для лечения устойчивости к инсулину, нарушения толерантности к глюкозе и инсулиннезависимого сахарного диабета (ИНСД).

8. Применение по одному из пп.1-5, предназначенное для лечения эссенциальной гипертензии.

9. Применение по одному из пп.1-5, предназначенное для снижения свертываемости крови или повышения фибринолиза крови.

10. Применение по одному из пп.1-5, предназначенное для лечения коронарного или периферического атеросклероза.

11. Применение по одному из пп.1-6, предназначенное для лечения ревматоидного артрита, рассеянного склероза, псориаза или воспалительных заболеваний кишечника.

12. Применение по одному из пп.1-6, предназначенное для лечения рака молочной железы, рака толстой кишки или рака предстательной железы.

13. Фармацевтическая композиция для орального применения, предназначенная для лечения X-синдрома и/или любой болезни, включающей X-синдром, независимо от активации PPAR α печени, включающая терапевтически эффективное количество ксенобиотического соединения формулы R-COOH или соль, эфир или амид такого соединения, где R обозначает насыщенную или ненасыщенную алкильную цепь, включающую 10-24 атома углерода, один или большее количество из которых может быть замещено гетероатомами, где один или большее количество входящих в цепь атомов углерода или гетероатомов необязательно образуют часть кольца и где указанная цепь необязательно замещена гидрокарбильным радикалом, гетероциклическим радикалом, (низш.)алкоксигруппой, замещенным гидроксиллом (низш.)алкилом, гидроксиллом, карбоксиллом, фенилом или замещенным гидроксигруппой, (низш.)алкилом, (низш.)алкоксигруппой, (низш.)алкенилом или (низш.)алкинилом фенилом, C₃-C₇циклоалкилом или замещенным гидроксигруппой, (низш.)алкилом, (низш.)алкоксигруппой, (низш.)алкенилом или (низш.)алкинилом C₃-C₇циклоалкилом, причем указанное соединение обладает способностью в эндогенных условиях превращаться в соответствующий ему тиозфир кофермента А, т.е. в RCOSKoA и целевые добавки.

14. Композиция по п.13, где R выбирают из группы, включающей ω -карбоксильные и ω -гидроксильные цепи.

15. Композиция по п.13, где RCOOH обозначает жирную кислоту с длинной цепью.

16. Композиция по п.13, где действующее вещество выбирают из группы, включающей следующие соединения, в которых R обозначает ω -карбоксил и RCOOH выбирают

из группы, включающей
1,16-гексадекандионовую кислоту,
1,18-октадекандионовую кислоту,
2,2,15,15-тетраметилгексадекан-1,16-дионо-
вую кислоту,
2,2,17,17-тетраметилоктадекан-1,18-дионо-
вую кислоту,
3,3,14,14-тетраметилгексадекан-1,16-дионо-
вую кислоту,
3,3,16,16-тетраметилоктадекан-1,18-дионо-
вую кислоту,
4,4,13,13-тетраметилгексадекан-1,16-дионо-
вую кислоту и
4,4,15,15-тетраметилоктадекан-1,18-дионо-
вую кислоту.

17. Композиция по п.13, где R обозначает ω -гидрокси, а RCOOH выбирают из группы, включающей
16-гидроксигексадекановую кислоту,
18-гидроксиоктадекановую кислоту,
16-гидрокси-2,2-диметилгексадекановую
кислоту,
18-гидрокси-2,2-диметилоктадекановую
кислоту,
16-гидрокси-3,3-диметилгексадекановую
кислоту,
18-гидрокси-3,3-диметилоктадекановую
кислоту,
16-гидрокси-4,4-диметилгексадекановую
кислоту и
18-гидрокси-4,4-диметилоктадекановую
кислоту.

18. Композиция по одному из пп.13-17, предназначенная для лечения дислипотеинемии (гипертриглицеридемия, гиперхолестеринемия, низкое содержание ВПЛ-холестерина).

19. Композиция по одному из пп.13-17, предназначенная для лечения устойчивости к инсулину, нарушения толерантности к глюкозе и инсулиннезависимого сахарного диабета (ИНСД).

20. Композиция по одному из пп.13-17, предназначенная для лечения эссенциальной гипертензии.

21. Композиция по одному из пп.13-17, предназначенная для снижения свертываемости крови или повышенного фибринолиза крови.

22. Композиция по одному из пп.13-17, предназначенная для лечения коронарного или периферического атеросклероза.

23. Композиция по одному из пп.13-17, предназначенная для лечения ревматоидного артрита, рассеянного склероза, псориаза или воспалительных заболеваний кишечника.

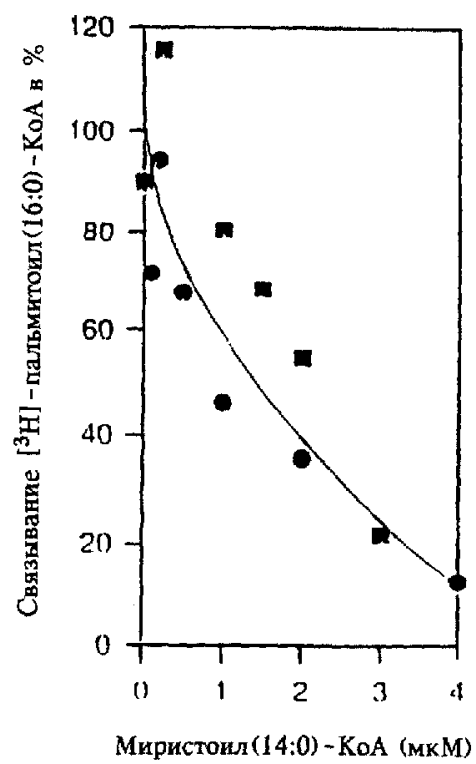
24. Композиция по одному из пп.13-17, предназначенная для лечения рака молочной железы, рака толстой кишки или рака предстательной железы.

25. Способ лечения X-синдрома, предусматривающий введение терапевтически эффективного количества соединения, которое ингибирует контролируемую HNF-4 α транскрипцию.

26. Способ модуляции активности HNF-4 α , включающий введение эффективного количества амфипатического карбоксилата.

27. Способ по п.26, отличающийся тем, что модуляция представляет собой ингибирование активности HNF-4.

28. Способ по п.26, отличающийся тем, что модуляция представляет собой активацию активности HNF-4.

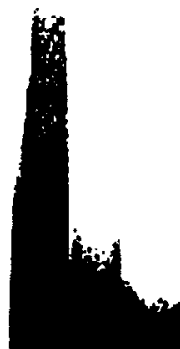


ФИГ. 16



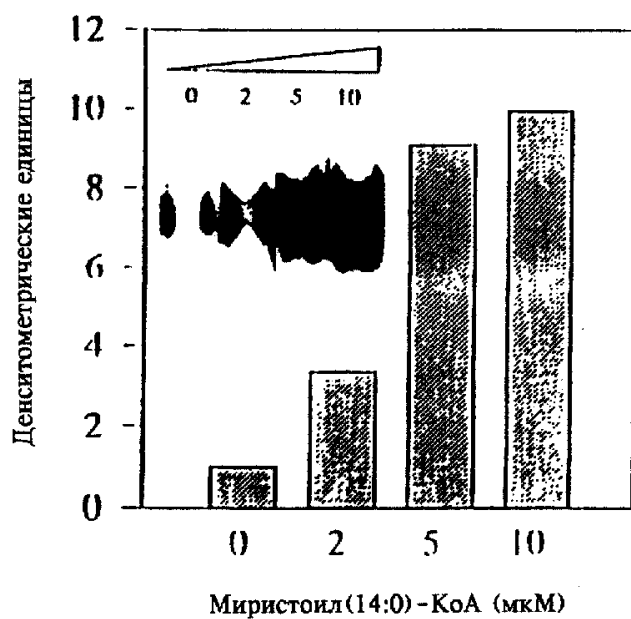
1 2 3

ФИГ. 2a

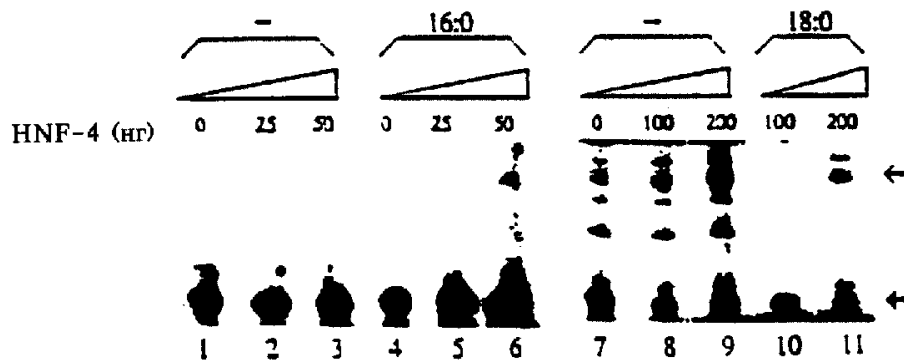


1 2 3

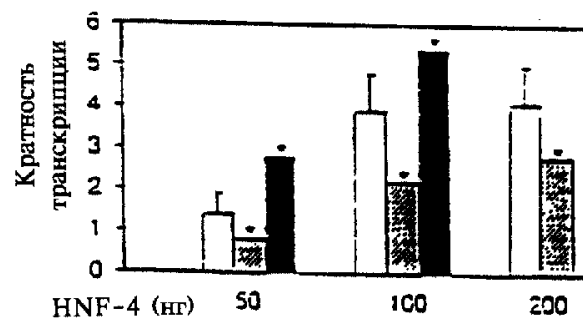
ФИГ. 2б



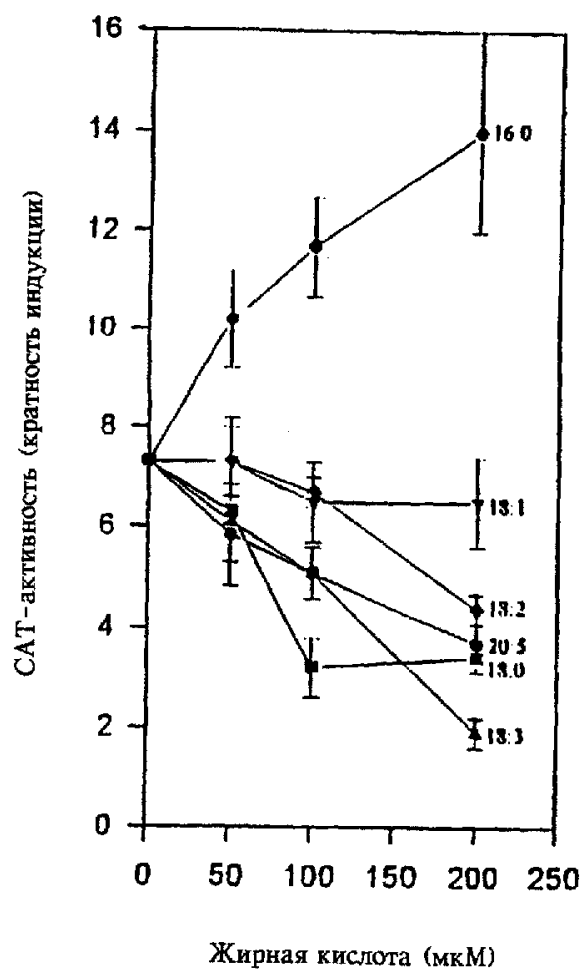
ФИГ. 2в



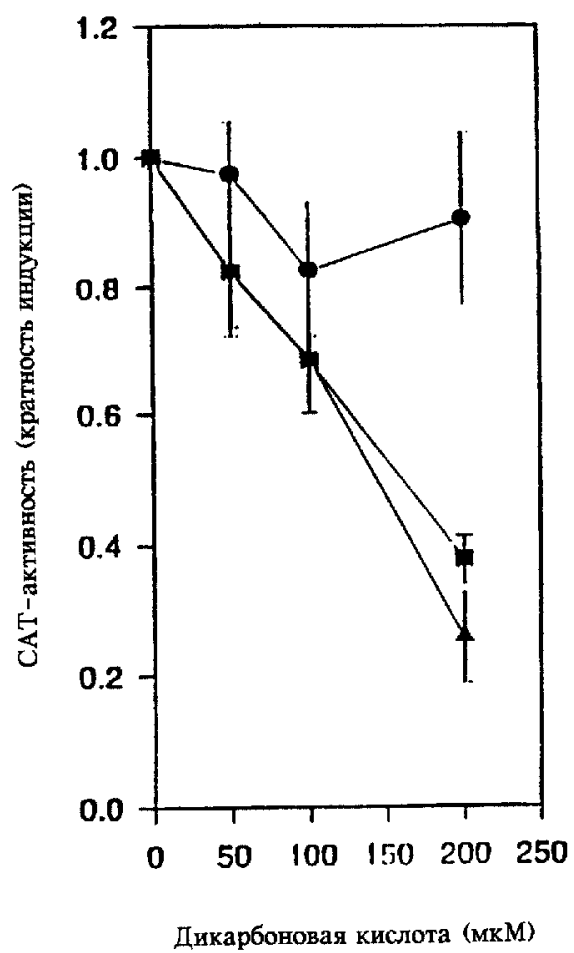
ФИГ. 3а



ФИГ. 3б



ФИГ. 4а



ФИГ. 4б

RU 2239427 C2

RU 2239427 C2