

(19)



(10) **LT 4801 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(11) Patento numeris: **4801**

(51) Int. Cl. ⁷: **A61K 31/00**

(21) Paraiškos numeris: **99-114**

(22) Paraiškos padavimo data: **1999 09 16**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **2001 01 25**

(45) Patento paskelbimo data: **2001 06 25**

(62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —

(86) Tarptautinės paraiškos numeris: **PCT/CA98/01147**

(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: **1998 12 18**

(85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: **1999 09 16**

(30) Prioritetas: **993901, 1997 12 18, US**

(72) Išradėjas:

Egon NOVAK, CA

(73) Patento savininkas:

FORBES MEDI-TECH INC., 2000-1066 West Hastings Street, Vancouver, British Columbia V8E 3X2, CA

(74) Patentinis patikėtinis:

Rita LAURINAVIČIŪTĖ, UAB "Metida", Pilies g. 8/1-2, 2600 MTP Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Alchaimerio ligos profilaktikai ir sulaikymui skirta kompozicija

(57) Referatas:

Kompozicija, tinkanti Alchaimerio ligos profilaktikai ir/arba jos pasireiškimui gyvūnuose sulaikyti, yra fitosterolių kompozicija.

Išradimo sritis

Šis išradimas yra susijęs su Alchaimerio liga ir su jos profilaktikos bei pasireiškimo sulaikymo būdais.

Išradimo prielaidos

Alchaimerio liga ("AL") yra visą laiką progresuojanti silpnaprotystė. Jos pagrindinis patologinis požymis yra citoskeletinių pokyčių išsivystymas keliose jautriose neuroninėse ląstelėse. Šie pokyčiai nebūtinai atsiranda senstant, bet jeigu liga jau prasidėjo, savaiminio pasveikimo arba remisijų nepastebėta.

Pradiniai žieviniai pokyčiai, kurie aprašomi žemiau, išsivysto blogai mieliniamoje transentorinalinėje vidinės smilkininės skilties srityje. Po to seka prognozuojamos struktūros destruktiniai procesai, kurie išplinta į kitas žievės sritis. Pažeidimą turinčių neuronų padėtis ir pokyčių laipsnis leidžia išskirti šešias ligos progresavimo stadijas - nuo I-II stadijų, kurios kliniškai nėra matomos, iki V-VI stadijų, kurios žymi pilnai išsivysčiusią AL. Palyginus nedidelis skaičius pacientų turi ypatingai ankstyvus pokyčius, ir tai rodo, kad senyvas amžius nėra būtina sąlyga pažeidimų išsivystymui. Iš to seka, kad AL yra susijusi su amžiumi, bet nėra nuo amžiaus priklausanti liga.

Šiuo metu yra nemažai teorijų, aiškinančių AL progresavimo priežastis ir mechanizmą; dauguma siejasi su genetiniais defektais. Labai nedidelis procentas AL pacientų turi defektą chromosomoje 21, susijusioje su genu, skirtu amiloidinio baltymo-pirmtako ("APP") produkavimui. APP yra didelis baltymas, dalyvaujantis ląstelių augime ir atsistatyme, kuris, kai jis suskaldomas į mažą nebeskaldomą baltymą - beta-amiloidą ("B-A"), gali susikaupti plokštelėse smegenų viduje.

Kiti įdomūs tyrimai buvo sukoncentruoti į ryšį tarp vėlyvos pradžios šeimininės AL ir polimorfinio geno chromosomoje 19, koduojančio apolipoproteiną-E ("apo-E") - 34000 molekulinės masės baltymą, dalyvaujantį cholesterolio ir kitų lipidų transporte į ląsteles ir iš ląstelių visame organizme. Apo-E vaidmuo lipidų transporte ir metabolizme yra be galo svarbus ir bus aptariamas toliau. Apo-E neurobiologinis vaidmuo buvo nustatytas iš daugybės stebėjimų per eilę metų. Pirmia, smegenyse yra daug apo-E iRNR, kur pirmiausia ją sintetuoja ir sekretuoja astrocitai (Elshourbagy et al. 1985. Apolipoprotein E mRNA is abundant in the brain and adrenals, as well as in liver, and is present in other peripheral tissues in rats and marmosets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:203-207). Antra, apo-E turintys lipoproteinai yra randami cerebrospinaliniame skystyje ir pasirodo, kad jie vaidina pagrindinį vaidmenį lipidų transporte centrinėje nervų sistemoje (Pitas et al. 1987. Lipoproteins and their receptors in the CNS: Characterization of lipoproteins in CSF and identification of apolipoproteins B,E(LDL) in brain. *J. Biol. Chem.* 262:144352-14360). Trečia, apo-E plius cholesterolio šaltinis skatina didelį aksonų išplitimą užpakalinės nugaros smegenų šaknelės ganglijo ląstelių kultūroje (Handelmann et al. 1992. Effects of apolipoprotein E, Beta-very low density lipoproteins and cholesterol on the extension of neurites by rabbit dorsal root ganglion neurons in vivo. *J. Lipid Res.* 33:1677-1688). Ketvirta, apo-E kiekiai dramatiškai padidėja sužeidus periferinį nervą (Muller et al. 1985. A specific 37.000-dalton protein that accumulates in regenerating but not in non-regenerating mammalian nerves. *Science* 228:499-501). Tokiu būdu, atrodo, kad apo-E dalyvauja tiek lipidų, atsiradusių po aksono degeneracijos, utilizacijoje, tiek ir šių lipidų persikirstyme augantiems aksonams aksonų regeneracijai, o vėliau Švano ląstelėms naujų aksonų remielinimui (Boyles et al. 1989. A role for apolipoprotein-E, apolipoprotein A-I and low density lipoprotein receptors in cholesterol transport during regeneration and remyelination of the rat sciatic nerve. *J. Clin. Invest.* 83:1015-1031).

Apo-E, kuris egzistuoja trijose skirtingose izoformose, koduojamose trijų atskirų alelių (E-2, E-3, E-4), kurios yra paveldėtos kodominantiniu būdu atskirame genetiniame lokuse, vaidmens reikšmė AL patogenezėje kyla iš

apo-E ryšio su dviem būdingais neuropatologiniais AL-ekstraceliulinių aksoninių plokštelių (atitinkančių B-A nuosėdas) ir intraceliulinių neurofibrilinių raizginių (atitinkančių susijusio su mikrokanalėliais baltymo, vadinamo tau, filamentus), pažeidimais. (Apžvalgą žr. Weisgraber et al. 1994. Lipoproteins, neurobiology, and Alzheimer's disease: Structure and function of apolipoprotein-E. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 4:507-515).

Konkrečiai kalbant, buvo rastas genetinis ryšys tarp apo-E4 izoformos ir AL. E4 homozigotiniai individai turi didesnę riziką AL atsiradimui nei E4 heterozigotiniai individai, kurie, savo ruožtu, turi didesnę riziką nei individai be E4 alelės. Nors tikslus mechanizmas, pagal kurį egzistuoja tokia koreliacija, lieka neaiškus, tyrinėtojai pasiūlė keletą galimų atsakymų. Čia gali turėti reikšmės šios alelės produkuojamo baltymo biologinis efektas, analogiškas būdui, pagal kurį apo-E polinkio susijungti su LDL receptoriais sumažėjimas sukelia cholesterolio kiekio plazmoje padidėjimą E2 homozigotiniams individams. Strittmatter (Strittmatter et al., 1993. Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid beta-peptide: isoform specific effects and implications for late onset Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:8098-8102) parodė, kad apo-E4 susiriša daug efektyviau su B-A peptidu, o tai skatina senilinių plokštelių susidarymą, lyginant su kitomis dviem izoformomis, ir todėl buvo pasiūlyta, kad ne apo-E4 buvimas, bet kitų apo-E izoformų trūkumas, duoda padidintą palinkimą į AL (Strittmatter et al. 1994a. Isoform specific interactions of apolipoprotein-E with microtubule associated protein tau, implications for Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:11183-11186).

Panašiu būdu, nagrinėjant izoformai specifinę apo-E sąveiką su tau baltymu, kurio fosforilintos formos yra pagrindinė neurofibrilinių raizginių sudedamoji dalis, buvo parodyta, kad apo-E3, bet ne E4, susiriša su tau labai tampriai (Strittmatter et al. 1994a. Isoform specific interactions of apolipoprotein-E with microtubule associated protein tau, implications for Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:11183-11186). Šis diferencijuotas efektas atvedė prie hipotezės, kad paprastai apo-E3 leidžia tau baltymui stabilizuoti mikrokanalėlius ir kad jo kiekio sumažėjimas arba jo

nebuvimas pacientuose su viena arba dviem apo-E4 alelėmis sukelia tau atskilimą nuo mikrokanalėlių ir jo sustiprintą fosforilinimą ir polimerizaciją į patologinius suporuotus spiralinius filamentus (Strittmatter et al. 1994b. Hypothesis: microtubule instability and paired helical filament formation in the Alzheimer's disease brain are related to apolipoprotein-E genotype. *Exp. Neurol.* 125:163-171).

Nepaisant milžiniško AL skirtų tyrimų progresavimo, gydymas yra mažai veiksmingas, o šio debilumą sukeliančio susirgimo profilaktikos ir/arba jos pasireiškimo sulaikymo būdų faktiškai nėra.

Šio išradimo tikslas yra pašalinti arba sušvelninti aukščiau aprašytus trūkumus.

Išradimo santrauka

Šiame išradime yra pateikiamas Alchaimerio ligos ("AL") profilaktikos bei pasireiškimo sulaikymo gyvūnuose būdas, kuris apima fitosterolių kompozicijų skyrimą tokiam gyvūnui.

Be to, šiame išradime pateikiamos kompozicijos, tinkančios AL profilaktikai arba jos pasireiškimui sulaikyti, į kurias įeina beta-sitosterolis, kampesterolis ir stigmastanolis.

Trumpas brėžinių aprašymas

Šis išradimas yra iliustruojamas toliau duodamais jo apimties neapribojančiais brėžiniais, kuriuose:

Fig.1 vaizduoja grafiką, rodantį Moriso vandens labirinto (Morris Water Maze) rezultatus, išreikštus laiko kiekviename kvadrante %, kai platforma buvo 1 kvadrante;

Fig.2 vaizduoja grafiką, rodantį Moriso vandens labirinto rezultatus, išreikštus laiko kiekviename kvadrante %, kai platforma buvo išimta iš 1 kvadranto;

Fig.3 vaizduoja grafiką, rodantį Moriso vandens labirinto rezultatus, išreikštus laiko kiekviename kvadrante %, kai platforma buvo 3 kvadrante; ir

Fig.4 vaizduoja grafiką, rodantį Moriso vandens labirinto rezultatus, išreikštus laiko kiekviename kvadrante %, kai platforma buvo išimta iš 3 kvadranto.

Tinkamiausi išradimo įgyvendinimo variantai

Fitosteroliai yra panašūs į sterolius junginiai, sintezuojami augaluose, kurie žmonėms neturi tiesioginės mitybinės vertės. Augaluose jie yra reikalingi ląstelių funkcionavimui panašiu būdu, kaip cholesterolis yra reikalingas žmonėms. Vidutinėje Western'o dietoje yra iki 360 mg fitosterolių per dieną. Neseniai šie maistiniai augaliniai steroliai patraukė nemažą dėmesį dėl jų galimų priešvėžinių savybių ir jų sugebėjimo sumažinti cholesterolio kiekius, jeigu jie duodami įvairiems gyvūnams, įskaitant žmones. Tačiau augalų steroliai nebuvo tyrinėti arba pasiūlyti AL profilaktikai ir jos pasireiškimo sulaikymo (gydymo) tikslams.

Cheminiu požiūriu, fitosterolių struktūra yra labai artima cholesteroliui. Svarbiausi fitosteroliai yra beta-sitosterolis, kampesterolis ir stigmasterolis. Kiti fitosteroliai yra stigmastanolis (beta-sistanolis), desmosterolis, chalinasterolis, poriferasterolis, klionasterolis ir brasikasterolis. Šio išradimo

kompozicijos apima visas gamtines ir sintetines fitosterolių formas, visus hidrintus atitikmenis, t.y. stanolius, ir visus jų darinius, įskaitant izomerus.

Nors fitosteroliai yra randami augaliniuose aliejuose ir daržovėse, jų kiekiai nebūtinai yra pakankamai dideli arba jie nebūtinai yra reikiamoje formoje, kad patenkintų šio išradimo siūlomus privalumus. Tai, ką apima šis išradimas, yra AL profilaktikos bei jos pasireiškimo sulaikymo būdas, skiriant gyvūnams, ypačiai žmonėms, fitosterolių kompozicijas. Šią kompoziciją galima tiesiogiai įdėti į maisto priedus, aliejus, vitaminus ir terapines vaistines formas, kaip yra reikalaujama ir aprašoma toliau.

Čia turima omenyje, kad šio išradimo fitosterolių kompozicijos gali būti įmaišomos į dažnai vartojamus maisto produktus, kad jas būtų galima plačiai paskleisti gyventojams, neatsižvelgiant į genetinį palinkimą į AL. Kitu atveju, tokios kompozicijos gali būti skiriamos pasirinktinai pagal labiau intensyvią programą, taikomą individams, kurie turi didesnę tam tikrų AL formų, t.y. šeimyninės AL, atsiradimo riziką. Tinkamiausioje formoje šios kompozicijos yra maišomos su augaliniu aliejumi, pasirinktu iš grupės, susidedančios iš saulėgrąžų aliejaus, sezamo sėklų aliejaus, kukurūzų aliejaus, ryžių sėlenų aliejaus, alyvų aliejaus ir rapsų sėklų aliejaus. Geriausia yra praturtinti fitosteroliais alyvų aliejų, nes šis aliejus yra plačiausiai naudojamas ir jame yra mažai fitosterolių ir polinesočiųjų riebalų rūgščių. Kitu atveju, tokios kompozicijos gali būti dedamos į produktus sočiųjų riebalų (kiaulės taukų) pagrindu arba į priedus tešlai, tokius kaip sviestas arba margarinas.

Kitame įgyvendinimo variante šios kompozicijos gali būti dedamos į vaistines formas su kitais įprastais arba žolių produktais, skirtas AL profilaktikai arba terapijai. Tokiais produktais yra (bet jais neapsiribojama) cholinesterazės inhibitoriai, kaip antai AriceptTM, risperidonas (rasta, kad šis vaistas nuo šizofrenijos tinka su AL susijusiai agresijai kontroliuoti) ir galimi atmintį gerinantys vaistai iš žolių, kai antai ginkgo.

Šio išradimo pagrindas yra fitosterolių naudojimas pagrindinai AL profilaktikai ir/arba AL pasireiškimo sulaikymui. Nors tinkamiausios kompozicijos šiam tikslui pasiekti yra išvardintos toliau, jų jokių būdu negalima laikyti apribojančiomis šio išradimo plačią apimtį, nes daug

fitosterolių, atskirų arba įvairiomis kombinacijomis, gali duoti tokius pačius naudingus rezultatus.

Į tinkamiausias šio išradimo fitosterolių kompozicijas įeina beta-sitosterolis, kampesterolis, stigmastanolis (sitostanolis) ir, esant reikalui, kampestanolis, ir jų analogai/dariniai.

Viename įgyvendinimo variante šio išradimo kompozicijoje yra mažiausiai 10 % kampesterolio ir ne daugiau nei 75 % beta-sitosterolio. Kitoje pageidautinoje formoje, kompozicijoje yra 10-25 % kampesterolio, 10-40 % stigmastanolio ir 45-75 % beta-sitosterolio. Jeigu norima, gali būti 1-10 %, geriausia 3 %, kampestanolio.

Kitoje tinkamoje formoje šio išradimo kompozicijose yra toks fitosterolių santykis: beta-sitosterolis (1), kampesterolis (0,2-0,4) ir stigmastanolis (0,2-0,5). Dar geriau, jei kampesterolis ir stigmastanolis kartu sudaro bent 50 % nuo bendros beta-sitosterolio koncentracijos. Šio išradimo kompozicijos apima tokius trijų pagrindinių augalų sterolių santykius:

beta-sitosterolis	kampesterolis	stigmastanolis
1	0,354	0,414
1	0,330	0,203
1	0,268	0,299

Buvo rasta, kad kita tinkamiausia kompozicija yra tokia, kurioje augalų sterolių pasiskirstymas (%) yra toks:

beta-sitosterolis	kampesterolis	stigmastanolis
62,6	16,6	23,2
64,7	16,4	17,2
60,0	13,6	16,3
32,0	14	29
25,5	7	42,5
51	14	19
61	17	23

Tačiau reikia suprasti, kad bet kurioje iš šių tinkamų kompozicijų gali būti ir kitų augalinių sterolių. Panašiu būdu, jeigu reikia, dalį kompozicijos gali sudaryti pagalbinės medžiagos arba nešikliai.

Priklausomai nuo šio išradimo kompozicijų įvedimo būdo, dozės gali būti šiek tiek keičiamos. Geriausia suvartoti apie 1,0 - 3,0 g per dieną.

Šio išradimo būde AL profilaktika ir/arba jos pasireiškimo sulaukymas pasiekiamas, skiriant individui aukščiau smulkiai aprašytas fitosterolių kompozijas. Tikslus mechanizmas, pagal kurį pagerinamas sugebėjimas išmokti ir sustiprinama atmintis, sumažinamas nuo amžiaus priklausantis sinapsės sumažėjimas ir sulėtinami neurodegeneraciniai procesai, vartojant šiuos dietinius fitosterolius, yra neaiškus, tačiau pareiškėjai turi keletą teorijų, kurios smulkiau apibūdinamos žemiau. Nelaikoma, kad šios teorijos riboja išradimo apimtį, bet atvirkščiai, jos tarnauja parodyti fitosterolių įtakos sudėtingumui gyvūnų lipidų homeostazėje.

Kaip jau buvo minėta aukščiau aprašytose išradimo prielaidose, buvo parodyta, kad žmonių atveju apo-e4 fenotipas atitinka svarbų AL rizikos faktorių. Taip pat yra duomenų, rodančių ryšį tarp AL ir širdies-kraujagyslių ligos (Kalaria, 1997. *Society Neurosci.* 23:2215). Žemiau pateikiamas apo-E funkcijos peržvelgimas kartu su informacija, rišančia apo-E su šiuo išradimu, siekiant suprasti pasiūlytus fitosterolių veikimo mechanizmus.

APO-E

Apo-E yra kaip tik viena iš lipidus nešančių molekulių, vadinamų apolipoproteinais. Šie baltymai turi tris pagrindines funkcijas. Pirmiausia, jie padeda soliubilizuoti labai hidrofobinius cholesterolį ir trigliceridus dėka sąveikos su fosfolipidais (komplekso centras yra lipidai, išorinis apvalkalas yra apolipoproteinas) ir suteikia šiems lipidams galimybę būti pernešamais. Antra, apolipoproteinais reguliuojama lipidų reakcija su fermentais, tokiais kaip lipoproteinlipazė ir lecitin:cholesterolaciltransferazė. Trečia, apolipoproteinais susiriša su ląstelių paviršiaus receptoriais ir tokiu būdu apsprendžia kitų lipoproteinų sudedamųjų dalių, daugiausia cholesterolio, sugėrimo vietas ir degradacijos greičius.

Apo-E yra unikalus lipoproteinas tuo, kad jis turi svarbų ryšį su nerviniu audiniu. Vystymosi metu arba po pažeidimo periferinėje nervų sistemoje apo-E koordinuoja cholesterolio mobilizaciją ir perskirstymą, atsistatant, augant ir

išlaikant mielinui ir neuroninėms membranoms (Boyles et al. 1989, supra). Daug mažiau yra žinoma apie apo-E funkciją centrinėje nervų sistemoje; vis labiau intriguojantys yra duomenys, kad apo-E yra galimas AL markeris (apsvarstyta aukščiau išradimo prielaidų skyrelyje).

APO-E PELĖS

Kai kurie tyrimai su žmonėmis ir gyvuliukais parodė, kad augalų steroliai turi cholesterolio kiekį mažinantį poveikį, įskaitant priešaterogeninius fitosterolių kompozicijų poveikius bandymuose su apo-E deficitą turinčiomis pelėmis (PCT patentinė paraiška PCT/CA95/00555, publikuota 1996 m. balandžio 4 d. ir čia duodama kaip literatūros šaltinis, ir Moghadasian et al. 1996, *Arteriosclero. Trom. Vasc. Biol.* 17:119-126). Neseniai buvo parodyta, kad apo-E deficitą turinčios pelės yra tinkami gyvuliukų modeliai AL patofiziologijai tirti. Kadangi apo-E deficitą turinčiose pelėse fitosteroliai užkerta kelią netipiskam cholesterolio pasiskirstymui (oda, sausgyslės, aorta ir pagrindinės arterijos), fitosteroliai gali turėti svarbią reikšmę, apsprendžiant cholesterolio pasiskirstymą audiniuose, o taip pat ir smegenų ląstelėse, nepriklausomai nuo apo-E fenotipų (pareiškėjai dabar vykdo tokius tyrimus).

CHILOMIKRONŲ LIEKANOS

Chilomikronai yra didžiausios lipoproteinų dalelės, susidedančios pagrindinai iš triglicerido ir mažesnių kiekių fosfolipido, laisvo cholesterolio ir esterių. Juos sintetuoja žarnyne enterocitai, kaip atsaką į maisto riebalus ir cholesterolį, įeina į mezenterinio ir torakalinio kanalo limfą, kur jie pasiekia apo-E. Fermentas lipoproteinlipazė ("LL") katalizuoja chilomikronų triglicerido hidrolizę, kur pasigaminusias laisvas riebalų rūgštis pirmiausia paima adipocitai, o likusios mažesnės lipoproteino dalys (kurios yra praturtintos cholesteroliu) yra vadinamos chilomikronų liekanomis ("CR"). CR greitai pašalinami iš plazmos pagal selektyvų kepenų nuo apo-E priklausančio receptoriaus mechanizmą (su mažo tankio lipoproteinu susijęs receptorių, "LRP receptorių"), kur cholesterolis yra panaudojamas membranoje arba lipoproteino biosintezei, arba išskiriamas kaip laisvas cholesterolis, arba

metabolizuojamas iki tulžies rūgščių. Kad dalelės būtų internalizuotos, laikoma, kad apo-E buvimas yra būtinas. Kepenų ir smegenų ląstelėse yra ypatingai daug šio LRP receptoriaus.

LABAI MAŽO TANKIO LIPOPROTEINAI

Labai mažo tankio lipoproteinas ("VLDL") struktūriškai yra panašus į chilomikronus, bet yra mažesnis ir turi mažiau triglicerido, bet santykinai daugiau cholesterolio, fosfolipido ir baltymo (apo-E, apo-C ir apo-B100 mišinys). VLDL pagrindinai sintezuoja kepenys, o jo pagrindinė funkcija yra trigliceridų pernešimas. VLDL dalelių dydis yra įvairus, bet po lipolizės arba LL, arba kepenų lipazės ("HL") gaunamos dar mažesnės dalelės: VLDL liekanos (dar žinomos kaip tarpinio tankio lipoproteinai) ir mažo tankio lipoproteinai ("LDL").

LIPOPROTEINLIPAZĖS

Yra mažiausiai dvi atskiros trigliceridlipazės. Nekepenų arba lipoproteinlipazė ("LL") pagrindinai randama riebaliniame audinyje ir skeletiniame raumenyje. Kepenų lipazė ("HL") yra kepenų ląstelių endotelyje. Ir LL, ir HL dalyvauja CR ir VLDL katabolizme.

APO-E RECEPTORIAI

Yra žinomi keturi receptoriai, kurie dalyvauja apo-E/lipoproteino (chilomikrono, VLDL arba LDL) transportavime į ląsteles iš plazmos: mažo tankio lipoproteino receptorius ("LDL receptorius"), LRP receptorius (apibūdintas aukščiau), tik ką aprašyto labai mažo tankio lipoproteino receptorius ("VLDL receptorius") ir epitelinio glikoproteino 330 receptorius ("GP330 receptorius"). Visi keturi receptoriai randami smegenyse. Atradimas, kad aktyvuotos alfa2-makroglobulino formos ("alfa2/M") receptorius yra identiškas LRP receptoriui, yra įrodymas, kad LRP receptorius yra daugiafaktorinis receptorinis baltymas, vadinamas alfa2M/LRP receptoriumi. Šis receptorius ekspresuojamas beveik kiekvienoje organizmo ląstelėje, ypatingai kepenyse ir smegenyse, jo taikiniai yra fermentai, baltymai, CR ir

LDL cholesterolis, ir atrodo, kad jis vaidina sudėtingą vaidmenį proteolizėje, imunitete, ląstelių proliferacijoje ir ląstelių žuvime.

Kai dėl apo-E transporto į neuronines ląsteles, buvo rasta, kad neuronai turi ne tik kad daug paviršiaus LRP receptorių ir kad LRP receptorių imunoreaktingumas yra padidintas plokštelėse, sergant AL. (Rebeck et al., 1993. Apolipoprotein E in sporadic Alzheimer's disease: allelic variation and receptor interactions. *Neuron* 11(4):575-580), bet kad apo-E/LRP kompleksas taip pat yra lokalizuotas prie plokštelių žmogaus smegenyse (Ikeda et al., nepublikuoti duomenys). LRP ne tik suriša apo-E turinčias liekanas, bet taip pat sąveikauja su svarbiais chilomikronų metabolizmo fermentais, kaip antai LL. Pastarasis susirišimas nepriklauso nuo apo-E (Beisiegel et al. 1991. Lipoprotein lipase enhances the binding of chylomicrons to low density lipoprotein receptor related protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8342-8346). Svarbu pažymėti fitosterolių sugebėjimą užkirsti kelią aterosklerotinių plokštelių susidarymo didėjimui bandymuose su apo-E deficitą turinčiomis pelėmis.

Kepenyse CR yra katabolizuojamas pagal LL arba nuo apo-E priklausančio receptoriaus, būtent LRP arba alfa2M/LRP receptoriaus, mechanizmą.

SIŪLOMI FITOSTEROLIŲ POVEIKIO Į AL MECHANIZMAI

Yra trys tarpusavyje susiję pirminiai mechanizmai, pagal kuriuos fitosteroliai yra naudingi AL profilaktikai ir ligos pasireiškimo sulaukymui:

- 1) fitosteroliai padidina nuo apo-E nepriklausomą CR eliminavimą kepenyse per kepenų LRP pagal sudėtingą (iki šio dar nevisai aiškų) mechanizmą, kuris apima alosterinės LL aktyvaciją ir LL komplekso su CR susidarymą; ir/arba

- 2) fitosteroliai sumažina cirkuliaciją ir/arba nuo apo-E priklausančio receptoriaus tarpininkaujamą apo-E/lipoproteino kompleksų įvedimą apamai į ląsteles, ypač į smegenų ląsteles; ir/arba

- 3) fitosteroliai sumažina endotelinų ląstelių dangalo praradimą ir apsaugo hematoencefalinio barjero endotelinę funkciją.

Fitosteroliai turi ryšį su cirkuliuojančiais chilomikronais ir lipoproteinais ir turi modifikuojantį poveikį į šias daleles plazmoje, ir į fermentų, tokių kaip LL ir HL, fizikines-chemines savybes. Kitaip tariant, pareiškėjai mano, kad fitosteroliai funkcionuoja kaip apoproteinai, pakeisdami cirkuliuojančių chilomikronų ir lipoproteinų struktūrą, sudėtį ir funkciją, o taip pat veikia daug kitų labai svarbių ląstelės funkcijų netiesiogiai, per LRP receptorių.

Paprastai tariant, pagal pirmąjį mechanizmą, fitosteroliai susiriša su lipoproteinais, t.y. chilomikronais, ir sutrukdo susiršti šioms dalelėms su alfa2M/LRP receptoriais, o tuo pačiu ir sutrukdo pereiti šioms dalelėms per ląstelės barjerą į smegenis. Tokiu būdu, apo-E kiekis nervinėse ląstelėse sumažės, kas yra ypatingai svarbu tiems individams, kurie yra apo-E4 homozigotiniai.

Be to, fitosteroliai padidina LL aktyvumą per alosterines modifikacijas, ir šis fermentas greitai metabolizuoja fitosteroliu praturtintus chilomikronus. Tada nuo apo-E nepriklausomi hepatocitiniai CR receptoriai, kurie yra identiški LRP receptoriams, greitai pašalina CR iš cirkuliacijos. Kaip aukščiau minėta, LL yra pagrindinis fermentas, dalyvaujantis trigliceridų (chilomikrono ir VLDL) metabolizme, kuris susijęs su karboksi- ("C") ir azoto ("N") galais. Jo reguliacija, struktūros ir funkcijos ryšys ir C-galinė lipoproteino lipazinė sritis (CR katabolizmo per LRP receptorių indukcijoje) mokslininkams yra pakankamai aiški, ir tai leido pareiškėjams postuluoti nuo apo-E nepriklausomo lipoproteinų katabolizmo galimybę.

Manoma, kad šio išradimo fitosterolių kompozicijos keičia lipoproteinų fizikines-chemines savybes per alosterinę modifikaciją. Dėl šios priežasties LL aktyvumas, kurį veikia fitosteroliai, leidžia efektyviau panaudoti fermento masę triglicerido katabolizmui per "N"-galo katalitinę vietą, o "C"-galo sritis gali būti ligandu CR. Tada "C" LL sritis-CR kompleksus su nedideliu riebalų rūgščių patekimu į kepenis internalizuoja receptorius, identiškas utilizaciniais receptoriais (alfa2M/LRP), o po to katabolizuoja kepenų lipazė, esant pastebimai tolimesnei CR riebalų rūgščių esterų degradacijai.

Kitaip tariant, gali būti, kad fitosteroliai sustiprina LL "C"-galo ligando ryšį su CR ir taip padidina CR katabolizmą. Kadangi šie procesai nepriklauso nuo apo-E, jie neturėtų duoti LDL receptoriaus aktyvacijos.

Pagal trečiąjį papildomą mechanizmą, kad fitosteroliai mažina ląstelių dangalo praradimą (endotelinis efektas), pareiškėjai nustatė, kad normalioms žiurkėms ir žiurkėms su padidintu cholesterolio kiekiu kraujyje fitosterolių kompozicijos pridėjimas į maistą sumažino endotelinų ląstelių dangalo praradimą atitinkamai 50-70 %. Tai yra labai svarbūs duomenys nagrinėjant endotelio vaidmenį hematoencefaliniame barjere ir nepageidaujamų kenksmingų dalelių, kurios gali sukelti AL, perėjimą į smegenis. Be to, į ląstelės ekstraceliulinės matricos ("ECM") sąveiką yra įtraukta kita glikoproteinų receptorių klasė - integrinai. Integrinų ekspresijos smegenyse nutraukimas gali būti susijęs su apo-E subendotelinio prasiskverbimo padidėjimu. ECM valdo dengiančio epitelio augimą, diferenciaciją ir funkcionavimą (Getlenburg et al. 1990. The tissue matrix: cell dynamic and hormone action. *Endocrine Review* 11:399).

Dar daugiau, pareiškėjai mano, kad augalų steroliai modifikuoja membranas, įskaitant hematoencefalinį barjerą. Tokiu būdu potencialiai toksiškų medžiagų, tokių kaip beta-amiloidinis pirmtakas, transportavimas per šią membraną gali būti sumažintas, o tai duoda AL pasireiškimo sulaukymą.

Be to, apo-E deficitą turinčios pelės kenčia nuo oksidacinio streso smegenyse (Mathews et al. 1996. *Brain Res.* 718:181-184). Tai gali turėti ryšį su AL. Pareiškėjai parodė dabar vykdomuose tyrimuose, kad augalų steroliai gali turėti antioksidantinį aktyvumą. Iš to seka, kad šie steroliai gali apsaugoti smegenis nuo oksidacinio streso ir sulaukyti AL pasireiškimą arba net ir užkirsti kelią AL.

Galimi fitosterolių poveikio būdai reziumuojami taip:

1) Poveikis į fermentus

alosterinė LL modifikacija ir molekulių konfigūracijos pokyčiai
lipoproteinų kompleksuose;

2) Chilomikronai ir CR

- LL → LL-praturtintos CR stimuliavimas;
- HL inhibavimas;
- CR → VLDL arba LRP receptoriaus nuo apo-E nepriklausomas sugėrimas, panaudojant LL monomero C-galą kaip ligandą receptoriaus surišimui ir/arba internalizacijai. HL monomero inhibavimas arba CR sugėrimas per LDL receptorių;
- atsiradimas negrūdėtojo hepatocitinio endoplazminio tinklelio;
- 7-alfa hidroksilazės stimuliavimas → tulžies rūgšties sintezės padidėjimas;
- cholesterolio tulžies rūgščių kiekio produkcijos padididinimas, kepenų cholesterolio kiekio sumažinimas, HMG-CoA aktyvumo padididinimas nepriklausančiu nuo LDL metabolizmo būdu, t.y. VLDL arba LDL receptorių gali inhibuoti CR;
- sumažintas endotelinių ląstelių dangalo praradimas;
- hidrofiliškesnių membranų susidarymas.

Toliau duodami išradimo apimties neribojantys pavyzdžiai, norint parodyti įvairius šio išradimo aspektus. Konkrečiau imant, tyrimai rodo, kad aterosklerozės vystymosi spartėjimas apo-E deficitą turinčioms pelėms yra sulaukomas, duodant fitosterolių kompoziciją ir yra sumažinamas AS pažeidimų vystymasis. "FCP-3PI" reiškia tinkamiausią kompoziciją, įeinančią į šį išradimą.

1 PAVYZDYS

Apo-E deficitą turinčių pelių sugebėjimo išmokti ir atminties pagerinimas, panaudojant FCP-3PI

Įvadas

Apo-E deficitą turinčios pelės yra žinomos kaip aterosklerozės, ksantomatozės ir Alchaimerio ligos modelis (Nakashine et al. *Arteriosclerol. Throm.* 1994; 14:133-140; van Ree et al. *Atherosclerosis* 1995; 112:237-243;

Oitzl et al. *Brain Research* 1997; 752:189-196). Apo-E deficitą turinčios pelės buvo naudojamos kaip tinkama sistema apolipoproteino E svarbai smegenų funkcijoje suprasti. Keletas iš šių tyrimų buvo skirti apo-E deficitą turinčių pelių sugebėjimo išmokti ir darbinės bei santykinės atminties įvertinimui (Gordon et al. *Neuroscience Letters* 1995; 199:1-4; Gordon et al. *Mol. Chem. Neuropathol.* 1996;97-103). Šiose pelėse buvo sumažėjęs hipokampo sinapsės tankis ir regeneracijos po hipokampo pažeidimo geba (Masliah et al. *Neurobiol. Aging* 1994; 15S:46; Poirier J. *Trends Neuroscience* 1994; 17:525-530). Pirmuosius du aukščiau paminėtus sutrikimus mes efektyviai uždelsėme arba užkirtome jiems kelią, panaudodami fitosterolių mišinį FCP-3P, kaip priedą prie pašaro (Moghadasian et al. 1996, *Arteriosclero. Throm. Vasc. Biol.* 17:119-126; Moghadasian et al. *Can. J. Cardiol.* 1997; 13:81B). Šio tyrimo tikslas yra įvertinti pašaro su PCT-3PI priedu (2 % pagal masę) įtaką į apo-E deficitą turinčių pelių sugebėjimą išmokti ir atmintį 33 savaičių bėgyje.

Hipotezė

Pašaras su PCT-3PI priedu pagerina apo-E deficitą turinčių pelių sugebėjimą išmokti ir atminti.

Medžiagos ir metodai

Dvidešimt keturi 2 savaičių amžiaus apo-E deficitą turinčių pelių patinėliai ir 24 panašūs laukinio tipo individai su žindančiomis motinomis buvo gauti iš Jackson Laboratory. Ketvirtą jų amžiaus savaitę pelės buvo nujunkytos ir padalintos į 4 grupes, kad atitiktų kūno svoris ir bendras cholesterolio kiekis plazmoje. Grupės buvo šeriamos 33 savaites tokiu pašaru:

1 grupė (n = 10): apo-E deficitą turinčios pelės šeriamos normaliu pelių pašaru, turinčiu 4,5 % (pagal masę) riebalų, (NC), su 2 % (pagal masę) FCP-3PI priedo;

2 grupė (n = 10): laukinio tipo pelės, šeriamos NC su 2 % (pagal masę) FCP-3PI priedo;

3 grupė (n = 10): apo-E deficitą turinčios pelės, šeriamos NC;

4 grupė (n = 10): laukinio tipo pelės, šeriamos NC.

Gyvuliukai buvo apgyvendinti po vieną (kiekvienai pelei buvo duotas tuščias butelis su didele anga, su kuriuo jos galėjo žaisti), kasdien buvo stebimas jų fizinis aktyvumas ir elgsena, o jų kūno svoris buvo registruojamas kas savaitę. Nulinę, ketvirtą, septynioliktą ir dvidešimt devintą tyrimo savaitę iš uodegos venos buvo paimamas kraujas ir fermentiniu būdu nustatomas cholesterolio kiekis plazmoje. Praėjus 33 savaitėms nuo eksperimentinio šėrimo pradžios, pelių elgsena buvo tiriama panaudojant Morris'o vandens labirinto metodiką, kaip aprašyta anksčiau. Procedūra buvo registruojama video-kamera, o rezultatai analizuojami kompiuterizuota sistema. Tyrimo pabaigoje pelės buvo numarinamos, jų smegenys fiksuojami 10 % formaline ir naudojami histocheminiam įvertinimui. Parafine įtvirtinti smegenų pjūviai buvo dažomi a) hematoksilinu ir eozinu (H&E), tai yra standartinis dažymo metodas histologiniam tyrimui, b) Kongo raudonuoju - amiloidinių plokštelių susidarymo įvertinimui, c) Bielchowsky dažais - aksonų įvertinimui ir d)

Luxol'o greituoju mėliu - mielino tyrimui. Be to, bendradarbiaujant su Miami universitetu, smegenys buvo nudažyti (imunohistochemiškai), norint gauti potencialius neurodegeneracinių ligų markerius, įskaitant neuroglijų fibrilinių rūgštinių baltymą (GFA), amiloidinį baltymą-pirmtaką (APP), neurofilamentą (NF) ir ubikvitiną. Viena pelė iš 1 grupės ir viena pelė iš 3 grupės buvo numarintos eksperimento pradžioje dėl svorio praradimo ir dėl to, kad mažai rijo pašaro. Viena pelė iš 2 grupės ir viena pelė iš 4 grupės buvo išimtos iš bandymo, kad būtų atitikimas tarp eksperimentinių grupių. Eksperimento metu viena pelė iš 1 grupės buvo numarinta 17-tą savaitę dėl odos žaizdų, o viena pelė iš 3 grupės staiga krito tikriausiai dėl širdies ligos 14-tą savaitę. Tyrimo Morris'o vandens labirinte metu vienai kontrolinei apo E-KO pelei (#15 iš 3 grupės) du kartus buvo priepuoliai pirmąją apmokymo dieną.

Rezultatai:

A: Kūno svoris

Pelių kūno svoris buvo registruojamas kas savaitę. Rezultatai pateikti 1 lentelėje. Galima matyti, kad eksperimento eigoje visi gyvuliukai priaugo svorio. Tai rodo, kad augimas ir vystymasis buvo panašus visose 4 pelių grupėse. FCP-3PI pridėjimas į pelių pašarą neturi poveikio kūno svoriui.

B: Cholesterolio kiekiai plazmoje

Bendrojo cholesterolio kiekiai plazmoje buvo nustatyti eksperimento pradžioje ir jo eigoje. Rezultatai pateikti 2 lentelėje. FCP-3PI pridėjimas į pelių pašarą yra susijęs su žymiu bendrojo cholesterolio kiekio sumažėjimu apo E-KO pelių plazmoje, kas sutampa su mūsų ankstesniais rezultatais. Antra vertus, pelių pašaro papildymas FCP-3PI turi nedidelį poveikį į bendrojo cholesterolio koncentracijas laukinio tipo pelių plazmoje.

C: Morris'o vandens labirinto testo analizė

Su visomis keturiomis pelių grupėmis buvo atliktas elgsenos testas, naudojant priimtą Morris'o vandens labirinto metodiką. Kompiuterizuota duomenų analizė neparodė žymių sugebėjimo išmokti ir atminties skirtumų tarp pelių grupių. Fig.1-4 susumuota gauti rezultatai kiekvienoje pelių grupėje. Fig.1 parodyta laiko, kurį kiekvienos grupės pelės praleido kiekviename

baseino kvadrante, kad įsikurtų ant platformos, procentai. Fig.2 parodyta laiko, kurį kiekvienos grupės pelės praleido kiekviename kvadrante, ieškodamos platformos, procentai po pelių apmokymo. Tai rodo pelių erdvinę atmintį. Šiuo požiūriu laukinio tipo pelės, šertos FCP-3PI, rodo tendenciją turėti geresnę atmintį nei kitos gyvuliukų grupės. Kaip matyti iš fig.2, FCP-3PI šertos laukinio tipo pelės praleido daugiau laiko 1 kvadrante, ieškodamos platformos (šioje vietoje buvo platforma apmokymo metu). Tas pats matyti ir fig.3, kuri rodo šiek tiek geresnį laukinių pelių, šertų FCP-3I, išmokimą nustatyti platformos padėtį (3 kvadrantas). Fig.4 nerodo jokio skirtumo tarp pelių grupių, kur buvo tikrinama, ar jos teiks pirmenybę 3 kvadrantui (atvirkštinis testas), kas rodo visų keturių pelių grupių blogą išlaikymą atmintyje.

D: Histochemija

Visų keturių pelių grupių smegenys buvo tirti histologiškai. Hematoksilino ir eozino nudažymas parodė nedidelius degeneracinius pokyčius visų keturių grupių gyvuliukų smegenyse. Kongo raudonojo nudažymas neparodė jokių amiloidinių plokštelių susidarymo požymių visų 4 grupių gyvuliukų smegenyse. Panašiai, Bielchowsky ir Luxol'o greitojo mėlio nudažymas neatskleidė jokių žymių skirtumų tarp visų 4 grupių gyvuliukų smegenų mielino ir aksonų charakteringų požymių atžvilgiu. Imunohistocheminius tyrimus vykdo nepriklausomas neuropatologas St. Paul's ligoninėje. Rezultatai bus pateikti tuoj pat, kai bus baigtas šis tyrimas.

Komentariai

Šis tyrimas parodė, kad pridėjus FCP-3PI (2 % pagal masę) žymiai sumažinamas bendrojo cholesterolio kiekis apo E-KO pelių plazmoje. Ši FCP-3PI dozė neturi pastebimo šalutinio poveikio ir visos gyvuliukų grupės ją gerai perneša. FCP-3PI pridėjimas į laukinio tipo pelių pašarą yra susijęs su jų sugebėjimo išmokyti ir jų atminties pagerėjimu, lyginant su kitomis grupėmis.

1 lentelė

Pelės kūno svoris eksperimento pradžioje ir jo eigoje (vidurkis $\pm$ SN, g)

Grupė	0 savaitė	4 savaitė	8 savaitė	12 savaitė	16 savaitė	20 savaitė	24 savaitė	33 savaitė
Apo E-KO, šerta FCP	18,2 $\pm$ 1,9	21,8 $\pm$ 1,1	23,6 $\pm$ 1,0	25 $\pm$ 0,8	25,3 $\pm$ 1,8	27 $\pm$ 0,9	27 $\pm$ 1,1	28,8 $\pm$ 1,8
Apo E-KO, kontrolė	18,2 $\pm$ 2,4	22,3 $\pm$ 2,2	24,2 $\pm$ 2,2	25,4 $\pm$ 2,1	25,2 $\pm$ 3,3	27,1 $\pm$ 1,4	28 $\pm$ 1,3	29,5 $\pm$ 1,4
Laukinio tipo, šerta FCP	17,9 $\pm$ 1,4	23 $\pm$ 1,3	24,7 $\pm$ 1,3	26 $\pm$ 1,3	27,2 $\pm$ 1,5	27,4 $\pm$ 1,3	27,9 $\pm$ 1,5	29,4 $\pm$ 1,8
Laukinio tipo, kontrolė	18,2 $\pm$ 1,4	23,5 $\pm$ 1,2	24,5 $\pm$ 0,9	26,4 $\pm$ 0,9	27,7 $\pm$ 0,9	27,8 $\pm$ 0,9	28,4 $\pm$ 1,1	30,5 $\pm$ 1,1

Bendrojo cholesterolio kiekis plazmoje eksperimento pradžioje ir jo eigoje (vidurkis $\pm$ SN, mmol/l)

Grupė	0 savaitė	4 savaitė	17 savaitė	29 savaitė
Apo E-KO, šerta FCP	12,6 $\pm$ 2,2	11,5 $\pm$ 2,6*	14,6 $\pm$ 2,2*	15,1 $\pm$ 2,8*
Apo E-KO, kontrolė	13,2 $\pm$ 2,5	16,4 $\pm$ 2,4	19,7 $\pm$ 3,5	20,3 $\pm$ 2,2
Laukinio tipo, šerta FCP	2 $\pm$ 0,2	1,6 $\pm$ 0,2	1,5 $\pm$ 0,2	1,6 $\pm$ 0,2
Laukinio tipo, kontrolė	2 $\pm$ 0,1	1,6 $\pm$ 0,1	1,6 $\pm$ 0,2	1,5 $\pm$ 0,2

p < 0,002 lyginant su kontrole

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Fitosterolio kompozicija, skirta panaudoti Alchaimerio ligos profilaktikai arba pasireiškimo sulaikymui gyvūnuose.
2. Kompozicija pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad gyvūnas yra žmogus.
3. Kompozicija pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad j kompoziciją įeina beta-sitosterolis, kampesterolis ir stigmastanolis.
4. Kompozicija pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad j kompoziciją įeina beta-sitosterolis, kampesterolis ir stigmastanolis, kur kampesterolis ir stigmastanolis kartu sudaro mažiausiai 50 % beta-sitosterolio koncentracijos.
5. Kompozicija pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad j kompoziciją įeina beta-sitosterolis, kampesterolis ir stigmastanolis, ir joje yra 10-25 % kampesterolio, 10-40 % stigmastanolio ir 45-75 % beta-sitosterolio.
6. Kompozicija pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad j kompoziciją įeina beta-sitosterolis, kampesterolis, stigmastanolis ir kampestanolis.
7. Terapiškai efektyvus produktas Alchaimerio ligos profilaktikai, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad j jį įeina beta-sitosterolis, kampesterolis ir stigmastanolis.
8. Produktas pagal 7 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jame kampesterolis ir stigmastanolis kartu sudaro mažiausiai 50 % beta-sitosterolio koncentracijos.
9. Produktas pagal 7 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jame yra 10-25 % kampesterolio, 10-40 % stigmastanolio ir 45-75 % beta-sitosterolio.
10. Produktas pagal 7 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jame yra dar ir kampestanolio.

FIG. 1

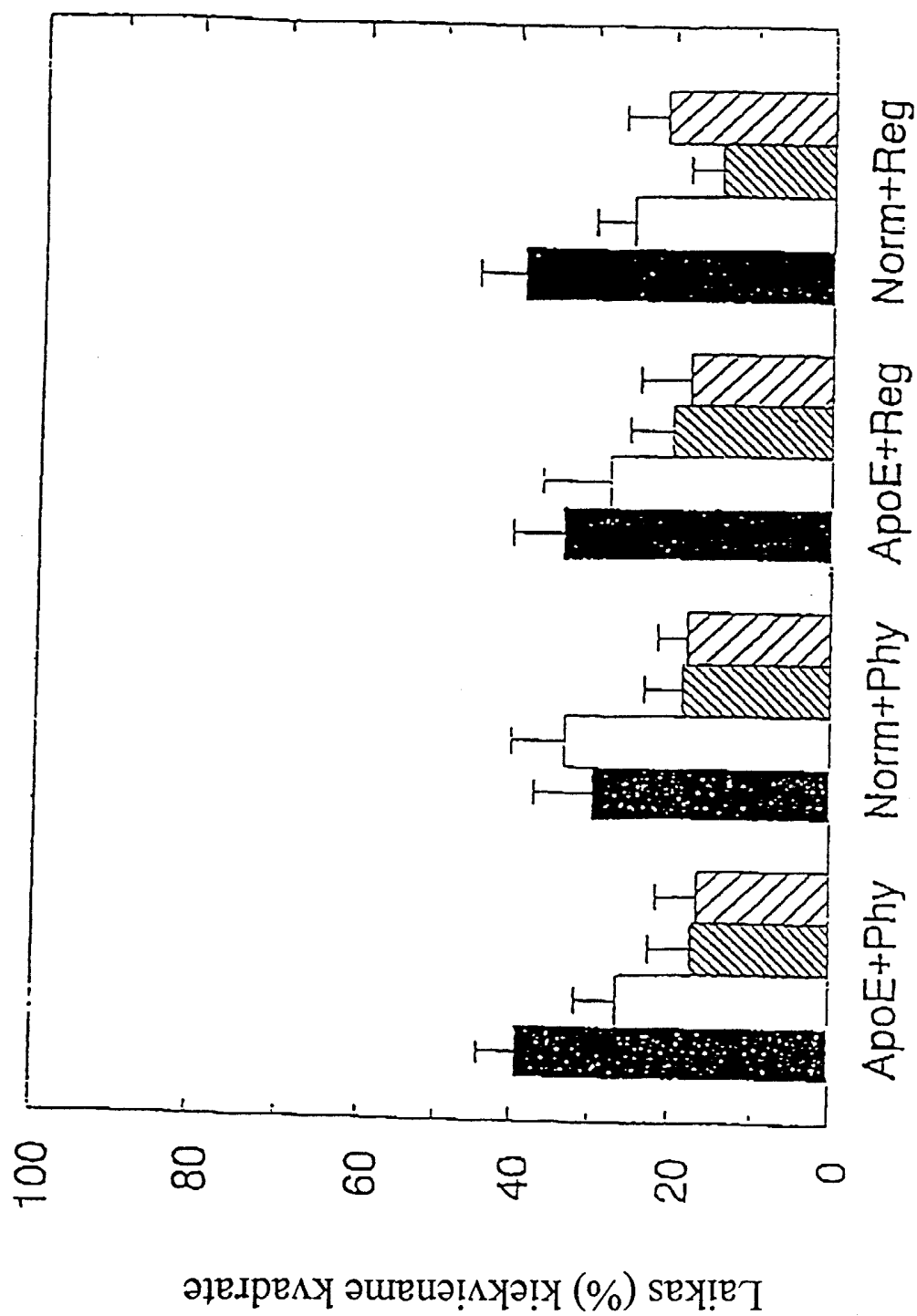
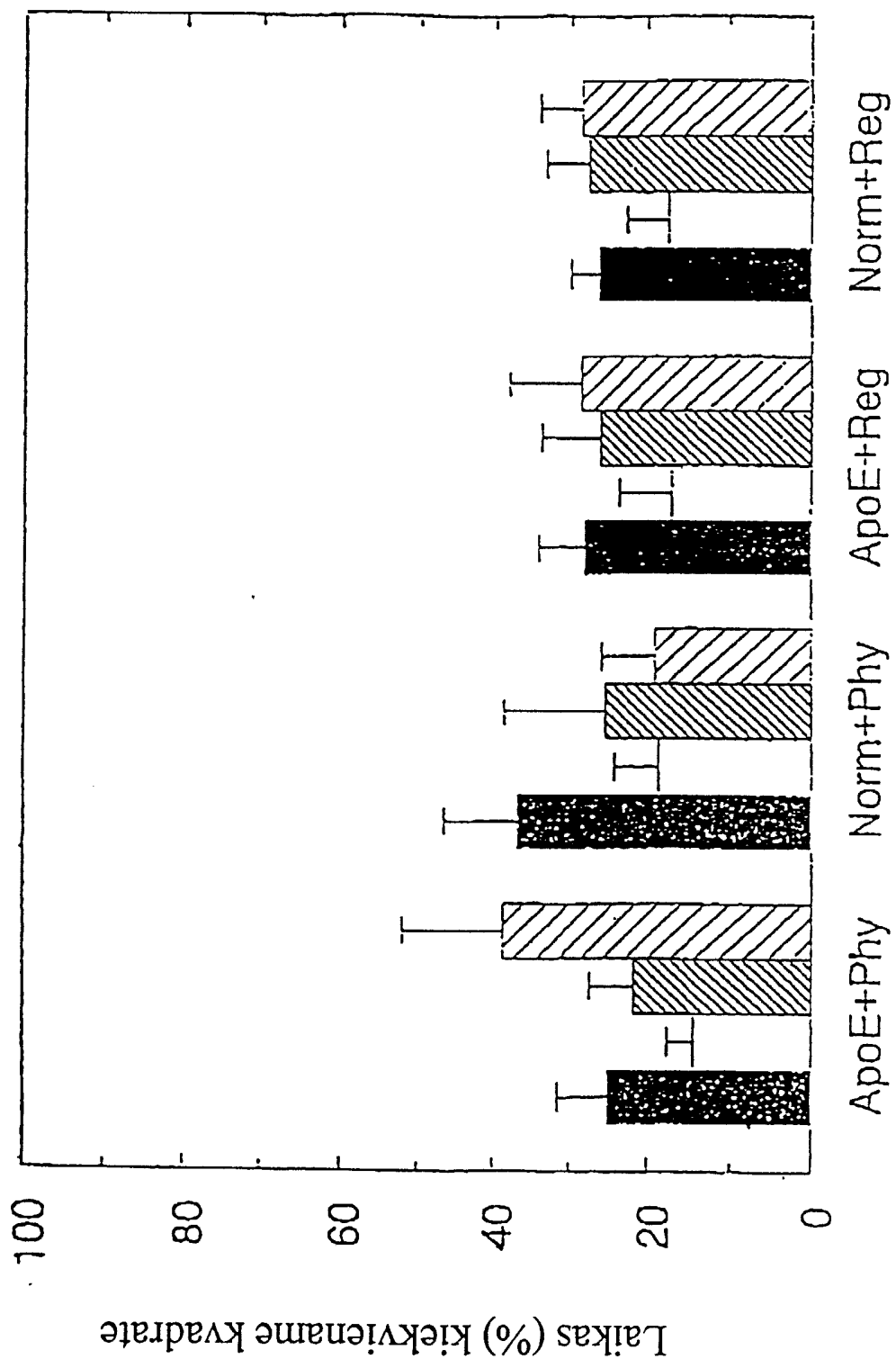
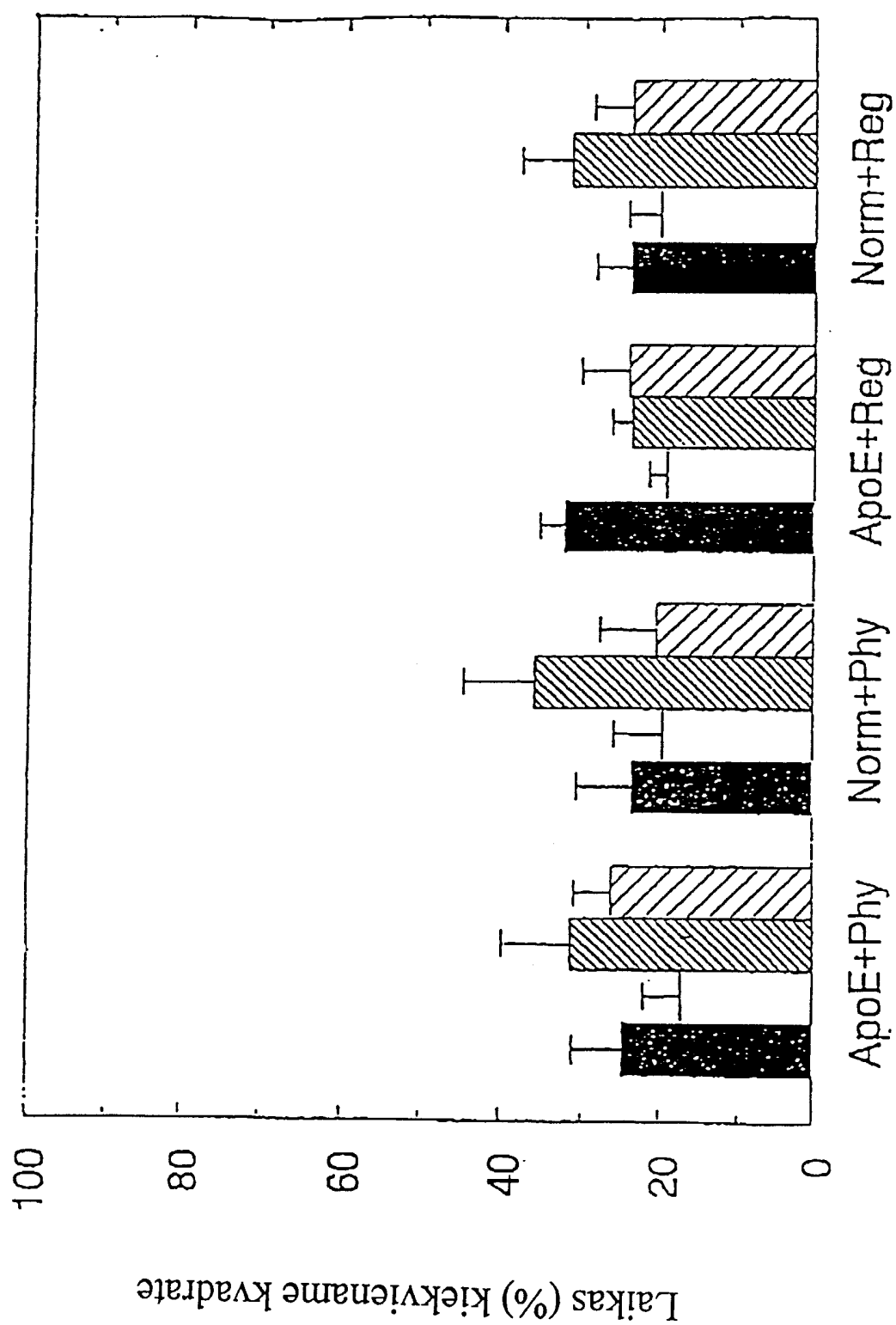


FIG. 2



3/4

FIG. 3



4/4

FIG. 4

