



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2010126653/15, 29.06.2010

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
29.06.2010

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
30.06.2009 ES 200930387

(45) Опубликовано: 20.12.2011 Бюл. № 35

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: US7459532 В2, 02.12.2008. Малащенко И.К. и др. Синдром хронической усталости // Русский медицинский журнал от 17 июня 1997 г., т.5, №12 [онлайн] [найден 2011-04-05] Найдено из базы данных YANDEX. WO 00/51623 А2, 08.09.2000. WO 2008/143633 А2, 27.11.2008. WO 98/05350 А1, 12.02.1998. WO 92/20327 А1, 26.11.1992. Alpha 1-Antitrypsin RN: (см. прод.)

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры", пат.пов. Е.Е.Назиной

(72) Автор(ы):

**ГАРСИЯ КИНТАНА Ана (ES),
АЛЕГРЕ MARTIN Хоце (ES)**

(73) Патентообладатель(и):

ГРИФОЛЬС, С.А. (ES)

(54) ПРИМЕНЕНИЕ АЛЬФА-1-АНТИТРИПСИНА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ СИНДРОМА ХРОНИЧЕСКОЙ УСТАЛОСТИ

(57) Реферат:

Предложено применение альфа-1-антитрипсина (ААТ) для получения лекарственных средств для лечения синдрома хронической усталости (СХУ). Показано: ААТ подавлял внутриклеточную эластазную активность мононуклеарных клеток периферической крови пациентов с СХУ, предотвращал деградацию 83 кДа РНКазы L с образованием сверхактивной формы 37 кДа РНКазы L. После лечения препаратом ААТ

активность эластазы в указанных клетках крови снижалась с 1459 Е/мг до 134 Е/мг; пациент демонстрировал явные клинические улучшения, снижение когнитивных нарушений, вернулся на работу. В частности, изобретение относится к применению плазмы или других терапевтических форм с содержанием альфа-1-антитрипсина, достаточным для получения дозировки альфа-1-антитрипсина, равной 6 мг или более на 1 кг массы тела, с частотой от 1 до 31 дня. 3 з.п. ф-лы.

(56) (продолжение):

9041-92-3 [онлайн] [найден 2011-04-04] (Найдено из базы данных ChemIDplus). Fregonese L. et al. Hereditary alpha-1-antitrypsin deficiency and its clinical consequences. Orphanet J Rare Dis. 2008 Jun 19;3:16. [онлайн] [найден 2011-04-04] Найдено из базы данных PubMed PMID: 18565211. Schmechel DE et al. Strategies for dissecting genetic-environmental interactions in neurodegenerative disorders. Neurotoxicology.

2006 Sep; 27(5):637-57. Реферат [онлайн] [найдено 2011-04-05] Найдено из базы данных PubMed PMID: 16870258. Wachter AM et al. Treatment of atopic dermatitis with alpha 1-proteinase inhibitor. Ann Allergy. 1992 Nov; 69(5):407-14. Реферат [онлайн] [найдено 2011-04-05] Найдено из базы данных PubMed PMID: 1456482. Torpy DJ et al. Familial corticosteroid-binding globulin deficiency due to a novel null mutation: association with fatigue and relative hypotension. J Clin Endocrinol Metab. 2001 Aug; 86(8):3692-700. [онлайн] [найдено 2011-04-04] Найдено из базы данных PubMed PMID: 11502797. Fossino G. et al. Pfeifer-Weber-Christian's panniculitis in an obese patient with antinuclear antibody-positive leukocytoclastic vasculitis. Ann Ital Med Int. 2002 Apr-Jun; 17(2): 121-5. Реферат [онлайн] [найдено 2011-04-04] Найдено из базы данных PubMed PMID: 12150046.

R U 2 4 3 6 5 9 0 C 1

R U 2 4 3 6 5 9 0 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

A61K 38/57 (2006.01)**A61P 25/00** (2006.01)**A61P 43/00** (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2010126653/15, 29.06.2010**(24) Effective date for property rights:
29.06.2010

Priority:

(30) Priority:
30.06.2009 ES 200930387(45) Date of publication: **20.12.2011 Bull. 35**

Mail address:

**129090, Moskva, ul. B.Spasskaja, 25, str.3, OOO
"Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery",
pat.pov. E.E.Nazinoj**

(72) Inventor(s):

**GARSIIa KINTANA Ana (ES),
ALEGRE MARTIN Khose (ES)**

(73) Proprietor(s):

GRIFOL'S, S.A. (ES)**(54) APPLICATION OF ALPHA-1-ANTITRYPSIN FOR PREPARING DRUG FOR TREATING CHRONIC FATIGUE SYNDROME**

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceuticals.

SUBSTANCE: application of alpha-1-antitrypsin (AAT) for preparing a drug for treating chronic fatigue syndrome (CFS) is offered. It is shown: AAT inhibited intracellular elastase activity of mononuclear cells of peripheral blood of the CFS patients, prevented degradation RNAase L 83 kDa with formation of the overactive RNAase L 37 kDa form. After treating with the preparation AAT, elastase activity in the specified blood cells

decreased from approximately 1459 U/mg to 134 U/mg; the patient showed obvious clinical improvements, decreased cognitive disorders cognitive infringements, has went back to work. Particularly, the invention refers to the application of plasma or other therapeutic forms containing alpha-1-antitrypsin sufficient for produce a dosage of alpha-1-antitrypsin equal to 6 mg or more per one kg of body weight with frequency 1 to 31 days.

EFFECT: higher clinical effectiveness.

4 cl

RU 2 436 590 C1

RU 2 436 590 C1

Настоящее изобретение относится к применению альфа-1-антитрипсина для получения эффективных лекарственных средств для лечения синдрома хронической усталости.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Синдром хронической усталости (СХУ) является комплексным нарушением, определяемым по международным критериям Fukuda (Fukuda K, et al., The chronic fatigue syndrome: a comprehensive approach to its definition and study, Ann Intern Med. 1994; 121: 953-959), утвержденным Центром контроля за заболеванием (CDC) в Атланте.

Согласно этим критериям диагноз СХУ основан на выявлении двух основных критериев и одновременном существовании как минимум четырех малых критериев.

Основные критерии:

1. Длительная физическая и умственная усталость в течение, по меньшей мере, шести месяцев или перемежающегося характера, новая или с определенным появлением, не вызванным недавними нагрузками, не облегчается после отдыха и усиливается в процессе активности, и которая вызывает существенное снижение предшествующих уровней ежедневной активности пациентов, которую пациент в конечном итоге не может побороть.

2. Исключение других нарушений, которые потенциально могут вызывать хроническую усталость, такие как эндокринные, инфекционные, неопластические и/или психические нарушения.

Малые критерии:

четыре или более следующих малых критериев должны выявляться параллельно и продолжаться в течение шести или более месяцев после возникновения усталости:

- нарушение концентрации или кратковременной памяти.
- Нарушение глотания.
- Болезненные аденопатии шейной или подмышечной области.
- Мышечная боль.
- Полиартралгия без признаков воспаления.
- Вновь возникающие головные боли или отличающиеся по признакам от привычных болей.
- Сон, не приносящий отдыха.
- Постнагрузочное чувство дискомфорта, длящееся более 24 часов.

Среди нарушений, которые могут приниматься за СХУ, находится фибромиалгия (ФМ), представляющая собой синдром, характеризующийся симптомами хронической генерализованной скелетно-мышечной боли внесуставного происхождения. Согласно классификационным критериям Американской школы ревматологов (The American College of Rheumatology, 1990, Criteria for the Classification of Fibromyalgia. Report of the Multicenter Criteria Committee, Arthritis Rheum 1990; 33(2): 160-172) двумя основными признаками для диагноза ФМ являются:

- 1) наличие генерализованной боли, длящейся более трех месяцев;
- 2) ненормальная чувствительность к пальцевому нажатию с усилием приблизительно в 4 кг, по меньшей мере, в 11-18 специфических точках, известных как "болезненные точки". Кроме боли, пациенты с ФМ имеют некоторые из следующих симптомов: расстройства сна, синдром раздраженного кишечника, неподвижность суставов и онемение, головные и лицевые боли, абдоминальный дискомфорт, раздражение мочевого пузыря, парестезия, онемение или зуд, грудные боли и костохондралгия (мышечная боль в месте прикрепления ребер к груди), головокружение и тошнота, и т.д. Симптомы обычно варьируются и необязательно

присутствуют одновременно.

ФМ и СХУ представляют собой два различных нарушения, но с очень похожими появлением и симптомами, что часто приводит в затруднение неспециалистов, несмотря на то, что они могут сосуществовать у многих пациентов. Почти 80% пораженных СХУ имеют классификационные критерии ФМ, хотя только от 7 до 10% пациентов с ФМ имеют таковые для СХУ. Дифференциальный диагноз между этими двумя и исключаящий другие возможные причины боли и усталости является ключевым для правильной диагностики, прогнозирования и адекватного терапевтического подхода.

СХУ главным образом поражает молодое взрослое население с пиком появления между 20 и 40 годами. У женщин он встречается в 2-3 раза чаще, чем у мужчин (Lloyd AR, et al., Prevalence of chronic fatigue syndrome in an Australian population, Med J Aug 1990; 153: 522-528), хотя это соотношение может быть следствием более частых обращений женщин за любой медицинской помощью (Henderson AS., Care-eliciting behavior in man, J Nerv Ment Dis 1974; 159: 172-181). Распространение СХУ в популяции составляет 0,4-2,5% (White PD, et al., Protocol for the PACE trial: a randomised controlled trial of adaptive pacing, cognitive behaviour therapy, and graded exercise, as supplements to standardised specialist medical care versus standardised specialist medical care alone for patients with the chronic fatigue syndrome/myalgic encephalomyelitis or encephalopathy, BMC Neurol 2007, 7: 6). Четыре исследования в США и Великобритании выявили значение 0,2-0,7%, другими словами, от 200 до 700 случаев на 100000 людей. В Японии зарегистрировано распространение в 1,5%. В целом, в центрах оказания первичной медицинской помощи, в зависимости от интенсивности медицинской, психологической и лабораторной оценки, отмечается распространение СХУ между 0,5% и 2,5% (The Royal Australasian College of Physicians. Chronic Fatigue Syndrome. Clinical Practice Guidelines 2002).

Прогноз излечения от СХУ чрезвычайно неблагоприятный и в настоящее время не существует универсального способа лечения, продемонстрировавшего эффективность в отношении лечения СХУ (Hill NF, et al., Natural history of severe chronic fatigue syndrome, Arch Phys Med Rehabil 1999; 80(9): 1090-1094). Таким образом, ситуация такова, что основным терапевтическим подходом является облегчение симптомов заболевания. Некоторые предлагаемые способы лечения включают: когнитивную поведенческую терапию, терапию дозированной физической нагрузкой, фармакологическое вмешательство (такое как противовирусные, антидепрессивные, седативные, обезболивающие, противовоспалительные и другие лекарственные средства) и пищевые добавки. Однако эти вмешательства часто не оказывают даже минимального благоприятного воздействия, считающегося необходимым для большинства пациентов с СХУ (Afari N, et al., Chronic fatigue syndrome: a review, Am J Psychiatry, 2003; 160(2): 221-236/Rimes KA, et al, Treatments for Chronic Fatigue Syndrome, Occupational Medicine 2005; 5(1); 32-39). Таким образом, существует очевидная необходимость в эффективных медицинских препаратах для лечения СХУ.

СХУ является мультисистемным заболеванием, этиология или патогенез которого пока не известны, несмотря на существование различных гипотез в отношении возбудителей заболевания: генетические дефекты, расстройства в центральной нервной системе, нервно-мышечные и метаболические нарушения, психологические факторы, токсические вещества, инфекции и иммунодефицитные состояния вследствие хронической активации иммунной системы (Afari N, et al., Chronic fatigue syndrome: a review, Am J Psychiatry, 2003; 160(2): 221-236). В частности, некоторые авторы,

основываясь на хроническом активированном иммунном статусе, полагают, что клинические и иммунологические нарушения, наблюдаемые при СХУ, могут включать дефекты в каскаде защитных реакций 2-5А, индуцированном интерферонами (Englebienn P, et al., Chronic Fatigue Syndrome. A Biological Approach, CRC Press LLC, 2002).

Интерфероны (ИФНы) представляют собой белки, обычно продуцируемые иммунной системой в ответ на внешние возбудители, такие как бактерии, вирусы, паразиты и злокачественные клетки. Двумя наиболее важными продуктами стимуляции ИФН являются протеинкиназа R (ПК R) и рибонуклеаза L (РНКаза L). ПК R ингибирует трансляцию вирусной мРНК, в то время как РНКаза L выключает дцРНК. Конечной целью обоих белков является индукция апоптоза инфекционных возбудителей.

В 1994 г. Suhadolnik et al. (Upregulation of the 2-5A synthetase/RNase L antiviral pathway associated with chronic fatigue syndrome, Clin Infect Dis 1994; 18 (Suppl. I): S96-S104) обнаружили, что мононуклеарные клетки периферической крови (МНПК) пациентов с СХУ обладали сверхактивной РНКазой L с молярной массой 37 кДа, образующейся посредством протеолиза исходной 83 кДа формы РНКазы L. Позднее, De Meirleir et al. (A 37 kDa 2-5A binding protein as a potential biochemical marker for chronic fatigue syndrome, Am J Med 2000; 108(2): 99-105) заметили, что соотношение между концентрациями 37 кДа и 83 кДа молекулами в МНПК было полезно для различения пациентов с СХУ и страдающих от ФМ или глубокой депрессии.

Пациенты с СХУ проявляют множество симптомов, характерных для нарушений функций транспорта ионного канала. Потенциал закрытия ионного канала у пациентов с СХУ взяли в расчет, когда было установлено, что ингибитор РНКазы L (РЛИ) принадлежит к суперсемейству ABC переносчиков ионного канала. РЛИ дезактивирует РНКазу L посредством соединения с ее анкириновыми доменами. Удаление анкиринового домена в процессе фрагментации РНКазы L, наблюдаемое у пациентов с СХУ, позволило предположить, что такие анкириновые фрагменты могут отвечать за взаимодействие с ионными каналами и нарушение их нормальной работы. А дисфункцией этих переносчиков можно объяснить множество симптомов, обнаруженных у пациентов с СХУ: ночные потоотделения, саркоидоз, химическая гиперчувствительность, макрофагальная дисфункция, иммунодефицитное состояние, нарушенный транспорт моноаминов, повышенная болевая чувствительность, преобладание Тх2, нарушения в центральной нервной системы, проблемы со зрением, потеря калия в мышцах, транзиторная гипогликемия и депрессия (Englebienn P, et al., Interactions between RNase L, ankyrin domain and ABC transporters as a possible origin of pain, ion transport, CNS and immune disorders of chronic fatigue immune dysfunction syndrome, J Chronic Fatigue Syndrome 2001; 8 (3/4): 83-102).

Эластаза, катепсин-G и m-кальпаин являются ферментами, способными вызывать протеолиз или фрагментацию РНКазы L (Englebienn P, et al., Interactions between RNase L, ankyrin domain and ABC transporters as a possible origin of pain, ion transport, CNS and immune disorders of chronic fatigue immune dysfunction syndrome, J Chronic Fatigue Syndrome 2001, 8 (3/4): 83-102/Demetre E, et al., Ribonuclease L proteolysis in peripheral blood mononuclear cells of chronic fatigue syndrome patients, J Biol Chem 2002; 277(38): 35746-35751). Эти три протеазы участвуют в механизмах защиты от патогенных возбудителей и в воспалительных реакциях, и поэтому в процессе воспалительного ответа они часто обнаруживаются в чрезмерно высоких концентрациях. В случае СХУ было установлено, что пациенты, страдающие от этого заболевания, обычно имели

высокие концентрации эластазы (Demetre E, et al., Ribonuclease L proteolysis in peripheral blood mononuclear cells of chronic fatigue syndrome patients, J Biol Chem 2002; 277(38): 35746-35751/Nijls J, et al. Chronic fatigue syndrome: exercise performance related to immune dysfunction, Med Sci Sports Exerc 2005; 37(10): 1647-1654).

Demetre E. et al. продемонстрировали, что эластаза играет значительную роль в деградации РНКазы L, когда доказали, что специфический ингибитор эластазы был способен в значительной степени подавлять протеолиз РНКазы L в культуре МНПК пациентов с СХУ.

Столкнувшись с необходимостью поиска эффективных лекарственных средств для лечения СХУ, изобретатели проводили очень обширные и углубленные исследования и анализы, которые привели к настоящему изобретению, основанному на применении альфа-1-антитрипсина (ААТ) для получения лекарственных средств для лечения СХУ.

ОПИСАНИЕ ПО ИЗОБРЕТЕНИЮ

Альфа-1-антитрипсин (ААТ) представляет собой секретируемый в гепатоцитах гликопротеин и обычно в высоких концентрациях присутствует в сыворотке и в большинстве тканей, где функционирует в качестве ингибитора сериновой протеазы. Нормальное содержание ААТ в сыворотке здоровых субъектов составляет 0,83-2,00 г/л (Kratz A, et al., Laboratory Reference Values, N Engl J Med 2004; 315(15): 1548-1563). Помимо своей активности как ингибитора протеазы, ААТ был описан как потенциально имеющий важную противовоспалительную биологическую функцию, поскольку он обладает выраженной способностью подавлять многие медиаторы воспаления и окислительные радикалы (Brantly M., Alpha-1-antitrypsin: not just an antiprotease: extending the half-life of a natural anti-inflammatory molecule by conjugation with polyethylene glycol, Am J Respir Cell Mol Biol 2002; 27(6): 652-654).

Дефицит ААТ является наследственным заболеванием, которое главным образом вызывает легочную эмфизему на ранних этапах взрослой жизни (30-40 лет). Другим наиболее частым проявлением является заболевание печени, которое может поражать новорожденных, детей и взрослых. Реже встречается воспалительное заболевание кожи, известное как некротический целлюлит (American Thoracic Society/European Respiratory Society Statement: Standards for the diagnosis and management of individuals with alpha-1 antitrypsin deficiency, Am J Respir Crit Care Med 2003; 168: 818-900).

В настоящее время существуют терапевтические концентраты ААТ, получаемые посредством фракционирования плазмы человеческой крови, которые используют для заместительной ААТ терапии при лечении индивидуумов с дефицитом этого белка и ассоциированной легочной эмфиземой. Было показано, что такие концентраты являются биохимически эффективными для повышения сывороточной концентрации ААТ выше минимального уровня, считающегося протективным (11 нмоль/л) (Wewers MD, et al., Replacement therapy for alpha-1-antitrypsin deficiency associated with emphysema, New Eng J Med 1987; 316: 1055-1062). Кроме того, различные клинические исследования предположили, что заместительная ААТ терапия является клинически эффективной для замедления развития легочной эмфиземы и снижения смертности (Seersholm N, et al., Does alpha-1-antitrypsin augmentation therapy slow the annual decline in FEV1 in patients with severe hereditary alpha-1-antitrypsin deficiency?, Eur Respir J 1997; 10: 2260-2263/The Alpha-1-Antitrypsin Deficiency Registry Study Group, Survival and FEV1 decline in individuals with severe deficiency of alpha-1-antitrypsin, Am J Respir Crit Care Med 1998; 158:49-59).

Большой клинический опыт заместительной ААТ терапии подтверждает, что терапевтические концентраты ААТ, полученные из плазмы человека, имеют превосходные показатели безопасности (Wencker M, et al., Long term treatment of alpha-1-

antitrypsin deficiency-related pulmonary emphysema with human alpha-1-antitrypsin, Eur Respir J 1998; 11: 428-433 / American Thoracic Society/European Respiratory Society Statement: Standards for the diagnosis and management of individuals with alpha-1 antitrypsin deficiency, Am J Respir Crit Care Med 2003; 168: 818-900).

Для проверки способности ААТ предотвращать деградацию РНКазы L посредством подавления эластазы изобретатели осуществляли различные исследования *in vitro* с использованием культур МНПК от пациентов с СХУ вместе с концентратами ААТ. На основе этих исследований изобретатели установили, что выделенные у пациентов с СХУ МНПК проявляют значительно более высокую индуцированную эластазную активность, чем МНПК, выделенные у здоровых индивидуумов. Экстракты МНПК от шести здоровых индивидуумов обладали средней эластазной активностью, равной 81 Е/мг на экстракт (CV=38,9), с минимумом-максимумом, равными 51-125 Е/мг на экстракт, в то время как экстракты МНПК восьми пациентов с СХУ демонстрировали среднюю эластазную активность, равную 322 Е/мг на экстракт (CV=30,5), с минимумом-максимумом, равными 193-453 Е/мг на экстракт.

Изобретатели также установили, что ААТ был способен существенно подавлять внутриклеточную эластазную активность в культурах МНПК от пациентов с СХУ. МНПК от 10 пациентов с СХУ культивировали в течение 12 часов в отсутствие и в присутствии двух различных концентраций ААТ: 3 г/л и 6 г/л. Полученные результаты в процентах подавления эластазной активности по сравнению с контролем без ААТ были следующими: для культур с 3 мг/мл ААТ внутриклеточная эластазная активность подавлялась в среднем на -87,2% (CV=0,09), с минимумом-максимумом от -75,3 до -95,4%; для культур с 6 мг/мл ААТ внутриклеточная активность подавлялась в среднем на -91,0% (CV=0,08), с минимумом-максимумом от -76,1 до 97,4%.

Кроме того, изобретатели установили, что в культурах МНПК пациентов с СХУ ААТ предотвращал деградацию 83 кДа РНКазы L с образованием сверхактивной формы 37 кДа РНКазы L. МНПК двух здоровых индивидуумов и МНПК двух пациентов с СХУ культивировали в течение 12 часов в отсутствие и в присутствии 3 г/л ААТ. В культурах МНПК двух здоровых индивидуумов, при анализе деградация РНКазы L не было обнаружено значимых различий между двумя культурами. Для культур МНПК без ААТ соотношения 83 кДа РНКазы L к 37 кДа РНКазе L составляли 0,3 и 0,4, в то время как для культур с ААТ соотношения 83 кДа РНКазы L к 37 кДа РНКазе L составляло 0,2 и 0,3 соответственно. Оба значения были ниже предела 0,5, соответствующего протеолизу 83 кДа РНКазы L. В культурах МНПК пациентов с СХУ обнаружили, что в присутствие ААТ деградация РНКазы L снижалась на 80%. Для культур МНПК двух пациентов с СХУ без ААТ соотношения 83 кДа РНКазы L к 37 кДа РНКазе L составляло 1,4 и 2,4, в то время как для культур с ААТ соотношения 83 кДа РНКазы L к 37 кДа РНКазе L составляло 0,2 и 0,6, соответственно.

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что активирующий экспрессию генов ААТ был вовлечен в каскад 2-5А синтетазы, и, таким образом, введение экзогенного ААТ могло восстанавливать нормальную активность РНКазы L и предотвращать ее протеолиз в МНПК пациентов с СХУ. МНПК шести пациентов с СХУ культивировали в отсутствие и в присутствии двух различных концентраций ААТ: 0,5 г/л и 3,0 г/л. Затем выделяли РНК и анализировали с помощью системы Genchips Human Genome U133 Plus 2,0 (Affymetrix). Экспрессия гена, кодирующего 2,5-

олигоаденилатсинтетазу, фермента, ответственного за синтез молекулы 2-5А, и таким образом активаторов РНКазы L, возрастала в 2,9 и 3,2 раза в культурах с 0,5 г/л и 3,0 г/л ААТ, соответственно, по сравнению с культурами в отсутствие ААТ. Таким образом, стимуляция экспрессии 2,5-олигоаденилатсинтетазы посредством ААТ способна восстанавливать активность самой РНКазы L и в то же время помогает предотвратить ее протеолиз.

Изобретатели также обнаружили, что ААТ подавлял экспрессию металлотионеинов, и, таким образом, введение экзогенного ААТ могло снижать активацию провоспалительных каскадов в МНПК пациентов с СХУ. МНПК шести пациентов с СХУ культивировали в отсутствие и в присутствии двух различных концентраций ААТ: 0,5 г/л и 3,0 г/л. Затем выделяли РНК и анализировали с помощью системы Genechips Human Genome U133 Plus 2,0 (Affymetrix). Результаты представляли в виде отношения экспрессии генов в присутствии ААТ к экспрессии генов в отсутствие ААТ. Экспрессия различных генов, кодирующих металлотионеины, снижалась в указанных культурах в присутствии ААТ. В частности, экспрессия металлотионеина 2А, металлотионеина 1Х, металлотионеина 1Н, металлотионеина 1F и металлотионеина 1Е снижалась в среднем в 2,2 и 4,5 раза в культурах с 0,5 г/л и 3,0 г/л ААТ, соответственно, по сравнению с культурами в отсутствие ААТ. Как известно, дефицит металлотионеина снижает продукцию провоспалительных цитокинов (ИЛ-1б, ИЛ-6, ФНО-а) (Itoh N, et al., Cytokine-induced metallothioneine экспрессия and modulation of cytokine expression by metallothioneine, Yakugaku Zasshi 2007; 127(4): 685-694). Таким образом, подавление экспрессии, вызванное посредством ААТ, могло производить такой же эффект и снижать активность провоспалительных каскадов в МНПК. Кроме того, металлотионеины также играют очень важную роль в выработке оксида азота (NO), иммунного медиатора, находящегося в повышенной концентрации у пациентов с СХУ (Kurup RK, et al., Hypothalamic digoxin, cerebral chemical dominance and myalgic encephalomyelitis, Int J Neurosci 2003; 113(5): 683-701). Падение выработки NO вследствие снижения экспрессии металлотионеинов, индуцированного посредством ААТ, могло быть еще одним полезным эффектом данного белка в отношении пациентов с СХУ.

Изобретатели также установили, что ААТ активировал экспрессию гена, кодирующего ААТ, и, таким образом, введение экзогенного ААТ могло стимулировать его собственную экспрессию в МНПК пациентов с СХУ. МНПК шести пациентов с СХУ культивировали в отсутствие и в присутствии двух различных концентраций ААТ: 0,5 г/л и 3,0 г/л. Затем выделяли РНК и анализировали с помощью системы Genechips Human Genome U133 Plus 2,0 (Affymetrix). Результаты представляли как отношение экспрессии генов в присутствии ААТ к экспрессии генов в отсутствии ААТ. Экспрессия гена, кодирующего ААТ (SERPINA1), увеличивалась в среднем в 1,4 и 2,0 раз в культурах с 0,5 г/л и 3,0 г/л ААТ, соответственно, по сравнению с культурами без ААТ. Хотя ААТ в основном синтезируется в гепатоцитах, Perlmuter D.H. et al. описали его экспрессию также и в моноцитах (The cellular defect in alpha 1-proteinase inhibitor (alpha 1-PI) deficiency is expressed in human monocytes and in Xenopus oocytes injected with human liver mRNA, Proc Natl Acad Sci USA, 1985; 82(20): 6918-6921). Таким образом, ААТ экспрессировался внутри клеток и, индуцированный в присутствии ААТ, мог оказывать подавляющее влияние на эластазу в культурах МНПК пациентов с СХУ. Кроме того, нельзя не учитывать, что ААТ может напрямую подавлять внутриклеточную эластазу после проникновения внутрь МНПК, как описано для других типов клеток (Zhang B, et al., Alpha 1-antitrypsin protects beta-

cells from apoptosis, Diabetes 2007; 56(5): 1316-1323). Таким образом, два этих механизма подавления эластазы в культурах МНПК от пациентов с СХУ могут существовать вместе и даже производить суммарный эффект.

5 Эти открытия кажутся еще более удивительными с учетом того, что вытекающие из данных экспериментов новые потенциальные терапевтические способы применения лекарственных средств, содержащих ААТ, не имеют никакого отношения к известным ранее применениям этого белка, направленным исключительно на компенсацию врожденной недостаточности, проявляющейся в виде легочных заболеваний (легочная эмфизема) или воспалительных поражений кожи (целлюлит).

10 Хотя изобретатели не желают быть ограниченными любыми гипотезами относительно свойств, проявляемых новыми лекарственными средствами, содержащими ААТ, при лечения СХУ, они в неограниченном порядке доказали гипотезу, что ААТ играет важную роль в регуляции иммунных клеток, отвечающих за связанные с СХУ симптомы, и в регуляции экспрессии генов, имеющих отношение к иммунной системе.

СХУ можно лечить терапевтическими концентратами ААТ, выделенными из плазмы человека или полученными с помощью рекомбинантной или трансгенной технологии. Лечение также возможно за счет плазмы или других терапевтических продуктов, содержащих достаточное количество ААТ для получения минимальной дозировки.

20 Как и в случае с другими белками, наличие целой молекулы ААТ не считается необходимым для получения желаемого результата. Таким образом, для лечения СХУ можно использовать молекулы, содержащие частичные последовательности аминокислот, полученные из соответствующих последовательностей молекулы ААТ. Эти молекулы можно выделять из плазмы человека или получать посредством синтетических способов или с помощью рекомбинантной или трансгенной технологии.

30 Настоящее изобретение также относится к способу лечения СХУ, включающему введение терапевтически эффективного количества ААТ в сочетании с одним или несколькими фармацевтически инертными или активными носителями пациенту с риском развития или страдающему от СХУ.

40 Схема лечения по изобретению включает периодическое и повторное введение ААТ в целях снижения или устранения симптомов СХУ. Достаточной для лечения СХУ считается дозировка ААТ в 6 мг или более на килограмм (кг) массы тела, вводимая с частотой от 1 до 31 дней. Предпочтительной дозировкой ААТ будет 15-360 мг на кг массы тела, вводимая с частотой от 1 до 31 дня. Еще более предпочтительной дозировкой будет 25-60 мг на кг массы тела каждую неделю или кратные количества, вводимые пропорционально в зависимости от предполагаемого временного интервала перед следующей дозировкой.

Альтернативно настоящее изобретение относится к схеме лечения, назначаемой для достижения в течение 24 часов после введения необходимого уровня ААТ в сыворотке вплоть до 8-кратного его увеличения по сравнению с исходным уровнем.

50 Согласно варианту осуществления изобретения, ААТ можно вводить посредством парентеральной инъекции и согласно предпочтительному варианту осуществления внутривенное введение имеет место, хотя его также можно вводить внутримышечно или внутривенно. Альтернативно, ААТ можно вводить посредством ингаляции. В зависимости от способа введения, препарат ААТ получают в виде раствора или суспензии в фармацевтически приемлемой основе или носителе. Подходящие примеры таких основ включают: воду для инъекций, стерильную воду для инъекций и другие

водные основы (например, инъекционный хлорид натрия, инъекционный раствор Рингера, инъекционную декстрозу, инъекционную декстрозу и хлорид натрия, инъекционный лактат Рингера); основы, которые можно смешивать в воде (например, этиловый спирт, полиэтиленгликоль, пропиленгликоль); неводные основы (например,

кукурузное масло, хлопковое масло, арахисовое масло и сезамовое масло). Необходимость и подбор других эксципиентов, консервантов, буферных растворов, антисептиков и подобных веществ находится в сфере деятельности специалистов в данной области и будет зависеть от различных факторов, включая систему и способ введения, необходимый срок годности и условия хранения и транспортировки.

ПРИМЕР

В ходе ожидания получаемых *in vitro* результатов изобретатели, в рамках благотворительно-испытательного применения препарата, вводили основанный на ААТ препарат пациенту с диагнозом СХУ.

Для пациентки с установленным в 2003 году на основании диагностических критериев Fukuda диагнозом СХУ исключали другие патологические состояния, вызывающие хроническую усталость, такие как эндокринные, инфекционные, неопластические и/или психические нарушения. Перед началом лечения концентратами ААТ пациентка имела концентрацию эластазы в МНПК, равную 1459 Е/мг (единицы активности на мг экстракта МНПК); в тестах оценки функционального резерва пациентка показывала максимальное потребление кислорода, равное 17,2 мл/кг/мин (63,5% от теоретического), максимальную силу, равную 64 Вт (54,0% от теоретической), максимальную частоту сердцебиений, равную 149 ударам (87,6% от теоретической); и при исследовании нервно-когнитивных расстройств демонстрировала очень серьезные когнитивные нарушения. Пациентка получала лечение посредством внутривенных введений препарата ААТ (60 мг/кг массы тела еженедельно) в течение восьми недель. К концу лечения пациентка имела концентрацию эластазы в МНПК, равную 134 Е/мг (единицы активности на мг экстракта МНПК); в тестах оценки функционального резерва пациентка показывала максимальное потребление кислорода, равное 16,4 мл/кг/мин (60,6% от теоретического), максимальную силу, равную 85 Вт (71,7% от теоретической), максимальную частоту сердцебиений, равную 151 удару (88,8% от теоретической); и при исследовании нервно-когнитивных расстройств демонстрировала серьезные когнитивные нарушения. Было сделано заключение, что после лечения препаратом ААТ пациентка демонстрировала явное клиническое улучшение, она вернулась на работу, чувствовала меньшую усталость и демонстрировала повышенную устойчивость к физической нагрузке и несколько восстановившиеся когнитивные расстройства.

Таким образом, было показано, что посредством настоящего изобретения пациентов с СХУ можно эффективно лечить лекарственными средствами, полученными на основе ААТ. Такие пациенты наиболее вероятно страдают от хронического воспаления за счет иммунных клеток и, по настоящему изобретению, ААТ подавляет эластазу и препятствует деградации РНКазы L, таким образом предотвращает нарушение регуляции ионного канала, предположительно ответственного за ассоциированную с СХУ симптоматику. Кроме того и согласно результатам, полученным *in vitro*, ААТ способен регулировать экспрессию отдельных генов, ассоциированных с иммунной системой с восстановлением нормальной деятельности иммунной системы и снижения активации провоспалительных каскадов.

Хотя изобретение описано в отношении примеров предпочтительных вариантов

осуществления, они не должны расцениваться ограничивающими изобретение, описанное в самом широком понимании следующей формулой изобретения.

Формула изобретения

5

1. Применение альфа-1-антитрипсина для получения лекарственных средств для лечения синдрома хронической усталости, которое включает терапевтические формы альфа-1-антитрипсина, которые можно вводить людям.

10

2. Применение по п.1, включающее применение плазмы или других терапевтических форм с содержанием альфа-1-антитрипсина достаточным для получения дозировки альфа-1-антитрипсина равной 6 мг или более на кг массы тела с частотой от 1 до 31 дня.

3. Применение по п.1, где альфа-1-антитрипсин выделен из плазмы человека.

15

4. Применение по п.1, где альфа-1-антитрипсин получают посредством синтетической, трансгенной или рекомбинантной технологии.

20

25

30

35

40

45

50