



УКРАЇНА

(19) UA (11) 95099 (13) C2

(51) МПК

A61K 31/4412 (2006.01)

A61K 31/4196 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

**(54) ЗАСТОСУВАННЯ ДЕФЕРИПРОНУ ПРИ ЛІКУВАННІ ЗАЛІЗО-ІНДУКОВАНОГО ПОШКОДЖЕННЯ МІТОХОНДРІЙ, ЩО Є НАСЛІДКОМ АТАКСІЇ ФРИДРЕЙХА**

1

2

(21) a200810608

(22) 21.02.2007

(24) 11.07.2011

(86) PCT/CA2007/000252, 21.02.2007

(31) 60/775,320

(32) 22.02.2006

(33) US

(46) 11.07.2011, Бюл.№ 13, 2011 р.

(72) МУННІХ АРНОЛЬД, FR, СПІНО МАЙКЛ, СА,  
КАБАНЧИК ІОАВ, IL

(73) МУННІХ АРНОЛЬД, FR, СПІНО МАЙКЛ, СА,  
КАБАНЧИК ІОАВ, IL

(56) RICHARDSON: 'Friedreich's Ataxia: Iron Chelators that Target the Mitochondrion as a Therapeutic Strategy?' EXPERT OPINION ON INVESTIGATIONAL DRUGS vol. 12, no. 2, 2003, pages 235 - 245, XP008102655

KONTOGHIOGHES G J ET AL: "THE DESIGN AND DEVELOPMENT OF DEFERIPRONE (L1) AND OTHER IRON CHELATORS FOR CLINICAL USE: TARGETING METHODS AND APPLICATION PROSPECTS" CURRENT MEDICINAL CHEMISTRY, BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS BV, BE, vol. 11, no. 16, 1 August 2004 (2004-08-01), pages 2161-2183, XP009042933

WO 02/02114 A, 10.01.2002

US 2006/030619 A1, 09.02.2006

LOVEJOY DAVID B ET AL: "PCTH: A novel orally active chelator for the treatment of iron overload disease" HEMOGLOBIN, vol. 30, no. 1, 1 February 2006 (2006-02-01), pages 93-104, XP009118739

MANDEL SA ET AL: "Multifunctional activities of green tea catechins in neuroprotection. Modulation of cell survival genes, iron-dependent oxidative stress and PKC signaling pathway" Neurosignals, vol. 14, no. 1-2, 2005, pages 46-60

RICHARDSON: 'The Therapeutic Potential of Iron Chelators' EXPERT OPINION ON

INVESTIGATIONAL DRUGS vol. 8, no. 12, 1999, pages 2141 - 2158, XP008102673

(57) 1. Застосування терапевтично ефективної кількості деферипрону або його фізіологічно прийнятної солі для лікування залізо-індукованого пошкодження мітохондрій, що є наслідком атаксії Фридрейха, при відсутності загального перевантаження заліза у пацієнта, шляхом щоденного введення до 30 мг/кг деферипрону.

2. Застосування терапевтично ефективної кількості деферипрону або його фізіологічно прийнятної солі за п. 1, шляхом щоденного введення 20 мг/кг.

3. Застосування терапевтично ефективної кількості деферипрону або його фізіологічно прийнятної солі за п. 1, шляхом щоденного введення 30 мг/кг.

4. Застосування терапевтично ефективної кількості деферипрону або його фізіологічно прийнятної солі за будь-яким із пп. 1-3 для введення внутрішньовенно, трансдермально, ректально, перорально, букально або у вуха.

5. Застосування терапевтично ефективної кількості деферипрону або його фізіологічно прийнятної солі за п. 4 для перорального введення.

6. Застосування терапевтично ефективної кількості деферипрону або його фізіологічно прийнятної солі за пп. 4 або 5, до складу яких входить композиція з модифікованим вивільненням, у тому числі з уповільненням вивільненням.

7. Застосування терапевтично ефективної кількості деферипрону або його фізіологічно прийнятної солі за пп. 4 або 5 для введення додатково до інших схем.

8. Застосування терапевтично ефективної кількості деферипрону або його фізіологічно прийнятної солі за п. 5 у пероральній дозованій формі з іншими наповнювачами.

Представлений винахід стосується способу лікування або попередження порушень асоційованих з порушенням обміну заліза у клітинах та більш переважно нейродегенеративними пору-

шеннями, такими, як спадкова атаксія Фридрейха, за відсутності загального надлишку заліза. Більш детально, винахід стосується введення хелатору заліза, включаючи підходящий хелатор заліза де-

(13) C2

(11) 95099

(19) UA

ферипрон та деферазірокс, що натеper застосовуються для лікування надлишку заліза, що буде продемонстровано та встановлено тут, щоб безпечно усунути надлишок заліза з мітохондрій клітин, для зменшення внутрішньоклітинні та внутрішньомітохондріальні залізо-індуковані клітинні та субклітинні пошкодження.

Спадкова атаксія Фридрейха є дегенеративним аутосомально-рецесивним спадковим захворюванням, характерні прояви якого включають прогресуючу атаксію кінцівок та ходи, арефлексію та пірамідальні ознаки у ногах та гіпертрофовану кардіоміопатію. Вперше було описано у 1863 Ніколасом Фридрейхом, професором медицини з Гедельберга, Німеччина, коли він описав сім пацієнтів з двох родин (Friedreich N. Ueber degenerative atrophie der spinalen Hinterstränge. Virchow's Arch path Anat 1863; 26: 391-419, 433-59, and 1863; 27: 1-26 in Pearce JM. Friedreich's ataxia. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2004 May; 75: 688). Як повідомлялося, частота зустрічальності становить біля 1 до 30,000 новонароджених, в основному у європейців (Delatycki et al. Friedreich ataxia: an overview. J Med Genet 2000; 37: 1-8; та Delatycki et al. Friedreich ataxia: from genes to therapies? Most cases are caused by a single mutation, paving the way for therapeutic advances for this fatal disease. Med. J.Aust. 2005, Vol. 182 (9): 439).

Спадкова атаксія Фридрейха є результатом мутації генного локуса на хромосомі 9q13 (Chamberlain et al et al. Mapping of mutation causing Friedreich's ataxia to human chromosome 9. Nature 1988; 334: 248-50). Ген фратаксину кодує білок з 210 амінокислот з невідомою функцією; мутація є нестабільним збільшенням кількості ГАА-повторів у першому інтроні, що успадковується від обох батьків (Campuzano et al. Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. Science 1996; 271: 1423-7). Спадкова атаксія Фридрейха є результатом недостатності, але не повної відсутності фратаксину у клітинах мозку, нервів, серця та підшлункової залози (Becker and Richardson. Frataxin: its role in iron metabolism and the pathogenesis of Friedreich's ataxia. Int J Biochem Cell Biol. 2001 Jan; 33: 1-10). Смерть настає у віці біля 36 років, після появи симптомів захворювання та в основному є наслідком гіпертрофічної кардіоміопатії (Voncken et al. Friedreich ataxia-update on pathogenesis and possible therapies. Neurogenetics 2004; 5: 1-8).

Гістопатологічні та магнітно-резонансні способи (МРТ) дослідження показують, що залізо накопичується у серцевому м'язі, спиноцеребральних трактах (зубчасте ядро) та у спинному мозку пацієнтів зі спадковою атаксією Фридрейха. Далі недостатність фратаксину, дефіцит у кластері залізо-сульфурного протеїну впливає у накопичення нестабільного заліза, що веде до оксидативного ушкодження у спиноцеребральних трактах, спинному мозку та серцевому м'язі (Rotig et al. Aconitase and mitochondrial iron-sulphur protein deficiency in Friedreich ataxia. Nat Genet 1997; 17: 215-7; Delatycki et al.; Direct evidence that mitochondrial iron accumulation occurs in Friedreich ataxia. Ann Neurol 1999; 45: 673-5). Ідебенон, коротколанцюговий хіноновий аналог, що діє як силь-

ний поглинач вільних радикалів, захищає серцевий м'яз від індукованих вільними радикалами ушкоджень, але є недостатнім, щоб покращити або, навіть стабілізувати, атаксію та інші нейрологічні симптоми. (Rustin et al. Effect of idebenone on cardiomyopathy in Friedreich's ataxia: a preliminary study. Lancet 1999; 354: 477-9).

При станах з надлишком заліза, таких, як у трансфузійно-залежних пацієнтів з таласемією, накопичення заліза у всьому тілі та пошкодження печінки, серця та ендокринних органів проявляється у другій або третій декаді життя. Таким чином, пацієнтам вводять хелатор заліза, для зменшення загального навантаження тіла залізом та, можливо, щоб вплинути на специфічні органи, такі, як печінка або серце (Rund and Rachmilewitz. [beta]-Thalassemia. New Engl J Med 2005; 353: 1135-46).

Пацієнтів обстежують, щоб визначити рівень заліза у тілі, шляхом періодичного вимірювання феритину у сироватці та визначення концентрації заліза у печінці після біопсії, МРТ або SQUID-оцінювання. Концентрація феритину у сироватці є зазвичай значно більшою за 1000 мкг/л та типовою концентрацією заліза у печінці є >7 мг/г сухої маси печінки.

За минуле десятиріччя 2 хелатора заліза виявилися корисними у клінічній практиці й третину нещодавно було представлено органам державного регулювання у всьому світі для ліцензування (Hershko et al. Iron Overload and Chelation. Hematology, 2005; 10 Supplement 1: 171-173). Десфероксамін - сильний хелатор заліза, що не достатньо абсорбується після орального введення й відповідно повинний вводиться парентерально. Це загальне зниження заліза у тілі оцінюється як падінням концентрації феритину у сироватці та концентрації заліза у печінці, а також - заліза у серці. Деферипрон, що є хелатором заліза і поглинається орально, і також був показаний, щоб зменшувати загальне залізо у тілі, як оцінено за тими ж індексами. Третій хелатор заліза, деферазірокс, що також поглинається орально, демонструє клінічну корисність при станах надлишку заліза та був нещодавно ухвалений для ліцензування у УС.

На відміну від спадкової атаксії Фридрейха, виявляється картина, при якій повне навантаження тіла залізом у належній мірі не підвищується. Концентрація сироваткового феритину становить зазвичай <100 мкг/л та концентрація печінкового заліза є "нормальною". Таким чином, у той час, як пацієнти можуть зазнавати мітохондріальне залізо-індуковане ушкодження, не має загального надлишку заліза у тканині. Оскільки залізо є важливим компонентом багатьох біохімічних процесів, виникає занепокоєння, що введення хелатора заліза при станах без надлишку заліза, може призвести до серйозної токсичності. Дійсно, було запропоновано "індекс Портера" (Porter. A risk-benefit assessment of iron-chelation therapy. Drug Saf. 1997; 17: 407-21), як індикатор, для зменшення токсичності десферіоксаміну при трансфузії у пацієнтів з таласемією, шляхом індексування дози десферіоксаміну по відношенню до концентрації сироваткового феритину, як міри зменшення надлишкового заліза. Коли наявне зменшення конче-

нтрації феритину сироватки, пропонується зменшення дози або, навіть, припинення використання десферіоксаміну. Часто, зменшення феритину у сироватці менше 500 мкг/л веде до припинення лікування хелаторами. Хоча такі пацієнти залишаються із надлишком заліза у порівнянні із нормальними, або навіть із тими, що мають спадкову атаксію Фридрейха, однак рівень надлишку не є достатньо великим, щоб виправдати ризик лікування хелатором заліза. Таке занепокоєння є обґрунтованим деяких заперечень стосовно ідеї використання хелаторів заліза при спадковій атаксії Фридрейха або інших порушень клітинного обміну заліза, за відсутності загального надлишку заліза (Wilson et al. Normal serum iron and ferritin concentrations in patients with Friedreich's ataxia. *Ann Neurol.* 1998; 44: 132-4.)

Спочатку здавалося, що залізо відіграє важливу роль у розвитку симптоматики спадкової атаксії Фридрейха, та що видалення його з мітохондрій повинно полегшити стан. Однак, із збільшенням знання про захворювання та релевантної молекулярної біології, було відкинуто це уявлення та піддано сумніву, що хелатор заліза забезпечує загальний корисний результат, за відсутності відповідного доказу вибіркової дії на мітохондрії. (Delatycki et al. Friedreich Ataxia: from genes to therapies? *Med J Australia.* 2005; 182: 439); Sturm et al. Friedreich's Ataxia, No change in Mitochondrial Labile Iron to Human Lymphoblasts and Fibroblasts *J Biol Chem.* 2005; 280: 6701-8). Таким чином, якщо залізо є видаленим, то не лише з мітохондрій, а також з цитозолу, то втручання з важливими елементами проміжного обміну, у наступному веде до функціональної втрати заліза у майбутньому, перетворюючи обробку з корисної на токсичну. Дійсно, вже підтверджено є уявлення, що хелатор заліза, десферіоксамін, був насправді шкідливим для дихального ланцюгу, оскільки перерозподіляв залізо від мембран та збільшував оксидативний стрес та порушення дихального ланцюгу *in vitro* (Rustin et al. Effect of idebenone on cardiomyopathy in Friedreich's ataxia: a preliminary study. *Lancet.* 1999; 7; 354: 477-9). Було передбачуваним, що агент, який видаляє залізо з тіла, може в дійсності індукувати токсичність у пацієнтів без загального надлишку заліза.

Крім того, оскільки стало доступним більше інформації про генетику захворювання, шляхом делеції гена фратаксину було розроблено тваринні моделі спадкової атаксії Фридрейха, це зробило очевидним для вчених, що працюють у цій галузі, те, що надлишок заліза мітохондрій можливо не є основним моментом. Наприклад, у той час, як дефіцит фратаксину був визначений, як ключова ознака у спадковій атаксії Фридрейха, та було відомо, що залізо накопичується у мітохондріях, у тваринних моделях з виключеним геном фратаксину не було накопичення заліза у мозку до пізнього періоду життя тварин, що таким чином звело роль заліза до другорядної (Chantrel-Groussard et al. Disabled early recruitment of antioxidant defenses in Friedreich's ataxia. *Hum Mol Genet.* 2001 ; 10: 2061-7; Simon et al. Friedreich ataxia mouse models with progressive cerebellar and sensory ataxia reveal

autophagic neurodegeneration in dorsal root ganglia. *J. Neurosci.* 2004; 24: 1987-95).

Отже, на підставі біохімічних даних, що передбачають токсичність хелатору заліза, генетичних даних, включаючи тваринні моделі з виключеним геном фратаксину, очікується, що хелатори заліза не є корисними, увага у галузі відводиться від хелаторів заліза, як підходящих терапевтичних агентів та у відношенні до генної терапії (Voncken et al. Friedreich ataxia - update on pathogenesis and possible therapies. *Neurogenetics.* 2004; 5: 1-8).

Не дивлячись на відсутність загального надлишку заліза при спадковій атаксії Фридрейха, здається, що внутрішньоклітинні ушкодження при цій хворобі є очевидно залізо-індукованими. В мітохондріях клітин недостатність фратаксину призводить до накопичення вільного заліза, що призводить до оксидативного ушкодження. Один з підходів відносно цього питання полягає у використанні антиоксиданту, що проникає у клітини, ідебенону, який, як повідомляли, зменшує деякі симптоми спадкової атаксії Фридрейха, переважно пов'язані з серцевими ушкодженнями, що є результатом перешкоджання окисно-відновлювального циклу, що індуковане залізом (Hausse. Idebenone and reduced cardiac hypertrophy in Friedreich's ataxia. *Heart.* 2002; 87: 346-9). Однак не було виявлено ніяких ефектів, що можна виміряти, на атаксію або інші негативні ефекти хвороби, що асоційовані з відхиленнями у центральній нервовій системі, при використанні ідебенону, й таким чином відноситись до атаксії, як до одного з головних послаблюючих ефектів захворювання, та, що є причиною того, що більшість пацієнтів стають прикованими до інвалідних візків.

Нещодавні дослідження Glickstein та ін. (Blood 2005) та інших, що розглядаються C Hershko, G. Link, A. M. Konijn та Z I. Cabantchik, Objectives and Mechanism of Iron Chelation Therapy *Ann. N. Y. Acad Sci.* 1054: 124-135 (2005) визначають, що деякі проникаючі хелатори заліза зменшують продукцію різновидів реактивного кисню у живих клітинах разом із зменшенням у них кількості нестабільного заліза. У попередніх дослідженнях також було визначено, що хелатори у відносно низькій концентрації з підходящими характеристиками, такі як деферіпрон (Breuer et al. *Blood.* 2001; 97: 792-8; Pootrakul et al. *Blood.* 2004; 104: 1504-10) та деферазірокс (Hershko et al. *Blood.* 2001. 97: 1115-22 ) можуть мобілізувати нестабільне залізо з клітин та тканин, та безпечно передати їх до фізіологічних акцепторів, типу трансферину. Такий "замкнений" перерозподіл заліза був задуманий, як корисний для мінімізації втрати основного заліза хелаторами. Крім того, аналогічний механізм передбачений, як діючий у клітинах, завдяки чому деферіпрон може рухати залізо між клітинними компонентами та обходити крок, що заснований на фратаксині, включаючи постачання заліза для формування Fe-S-групи.

Деферіпрон (3-гідрокси-1,2-диметилпіридин-4-он), натеper використовується для лікування надлишку заліза при трансфузії, може проходити крізь клітинні мембрани (включаючи гематоенцефалічний бар'єр), збільшує доступ до клітинних органел, включаючи мітохондрії, та зменшує утворення за-

лізо-залежних вільних радикалів (Glickstein et al. Intracellular labile iron pools as direct targets of iron chelators: a fluorescence study of chelator action in living cells. *Blood* 2005; 106: 3242-50). Деферіпрон також видаляє залізо з серця, як визначено шляхом MPT T2\* та збільшує фракцію викиду лівого шлуночка у пацієнтів з таласемією, яких піддають переливанню крові, з надлишком заліза у серці (Pennell et al. Randomized Controlled Trial of Deferiprone or Deferoxamine in Beta-Thalassemia Major Patients with Asymptomatic Myocardial Siderosis. *Blood First Edition Paper*, prepublished online December 13, 2005; DOI 10.1182/blood-2005-07-2948), передбачається, що він також може виявити корисність для серця у пацієнтів із залізо-індукованими ушкодженнями серця.

Список процитованих посилань

1. Pearce JM. Friedreich's ataxia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2004; 75: 688.
2. Delatycki MB, Williamson R, Forrest SM. Friedreich ataxia: an overview. *J Med Genet*. 2000; 37: 1-8.
3. Delatycki MB, Ioannou, P.A.; Churchyard, A.J. Friedreich ataxia: from genes to therapies? Most cases are caused by a single mutation, paving the way for therapeutic advances for this fatal disease. *Med. J. Aust.* 2005, Vol. 182 (9): 439.
4. Chamberlain S, Shaw J, Rowland A, Wallis J, South S, Nakamura Y, von Gabain A, Farrell M, Williamson R. Mapping of mutation causing Friedreich's ataxia to human chromosome 9. *Nature*. 1988; 334: 248-50.
5. Voncken, M.; Ioannou, P.; Delatycki, M.B. Friedreich ataxia-update on pathogenesis and possible therapies. *Neurogenetics*. 2004; 5: 1-8.
6. Becker E, Richardson DR. Frataxin: its role in iron metabolism and the pathogenesis of Friedreich's ataxia. *Int J Biochem Cell Biol*. 2001 Jan; 33: 1-10.
7. Waldvogel D, van Gelderen P, Hallett M. Increased iron in the dentate nucleus of patients with Friedreich's ataxia. *Ann Neurol* 1999; 46: 123-5.
8. Campuzano V, Montermini L, Molto MD, et al. Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science* 1996; 271: 1423-7.
9. Rotig A, de Lonlay P, Chretien D, et al. Aconitase and mitochondrial iron-sulphur protein deficiency in Friedreich ataxia. *Nat Genet* 1997; 17: 215-7.
10. Delatycki MB, Camakaris J, Brooks H, et al. Direct evidence that mitochondrial iron accumulation occurs in Friedreich ataxia. *Ann Neurol* 1999; 45: 673-5.
11. Rustin P, von Kleist-Retzow JC, Chantrel-Groussard K, Sidi D, Munnich A, Rotig A. Effect of idebenone on cardiomyopathy in Friedreich's ataxia: a preliminary study. *Lancet* 1999; 354: 477-9.
12. Rund, D.; Rachmilewitz, E. Beta-thalassemia. *N. Engl. J. Med.* 2005; 353: 1135-1146.
13. Hershko, C.; Link, G.; Konijn, A.M.; Ioav, Cabantchik Z. Iron overload and chelation. *Hematology*. 2005; 10 Suppl 1: 171-173.
14. Porter J.B. A risk-benefit assessment of iron-chelation therapy. *Drug Safety* 1997; 17: 407-21.
15. Chantrel-Groussard K, Geromel V, Puccio H, Koenig M, Munnich A, Rotig A, Rustin P. Disabled

early recruitment of antioxidant defenses in Friedreich's ataxia. *Hum Mol Genet*. 2001; 10: 2061-7.

16. Hausse AO, Aggoun Y, Bonnet D, Sidi D, Munnich A, Rotig A, Rustin P. Idebenone and reduced cardiac hypertrophy in Friedreich's ataxia. *Heart*. 2002; 87: 346-9.

17. Franchini M, Veneri D. Iron-chelation therapy: an update. *Hematol J* 2004; 5: 287-92.

18. Glickstein H, El RB, Shvartsman M, Cabantchik ZI. Intracellular labile iron pools as direct targets of iron chelators: a fluorescence study of chelator action in living cells. *Blood* 2005; 106: 3242-50.

19. Pennell DJ, Berdoukas V, Karagiorga, M et al.. Randomized controlled trial of deferiprone or deferoxamine in beta-thalassemia major patients with asymptomatic myocardial siderosis. *Blood* 2005 Dec 13; [Epub ahead of print].

20. Cano SJ, Hobart JC, Hart PE, Korlipara LV, Schapira AH, Cooper JM. International cooperative ataxia rating scale (ICARS): Appropriate for studies of Friedreich's ataxia? *Mov Disord* 2005; 20: 1585-91.

21. Richardson DR. Friedreich's ataxia: iron chelators that target the mitochondrion as a therapeutic strategy *Expert Opin Investig Drugs*. 2003 Feb; 12: 235-45.

22. Richardson DR, Mouralian C, Ponka P, Becker E. Development of potential iron chelators for the treatment of Friedreich's ataxia: ligands that mobilize mitochondrial iron. *Biochimica et Biophysica Acta* 2001; 1536: 133-140.

23. Richardson DR. Novel chelators for central nervous system disorders that involve alterations in the metabolism of iron and other metal ions. *Ann N Y Acad Sci*. 2004; 1012: 326-41.

24. Haacke EM, Cheng NY, House MJ, et al. Imaging iron stores in the brain using magnetic resonance imaging. *Magn Reson Imaging* 2005; 23: 1-25.

25. Simon D, Seznec H, Gansmuller A, et al. Friedreich ataxia mouse models with progressive cerebellar and sensory ataxia reveal autophagic neurodegeneration in dorsal root ganglia. *J Neurosci* 2004; 24: 1987-95.

26. Sturm B, Bistrich U, Schranzhofer M et. al. Friedreich's Ataxia, No Changes in Mitochondrial Labile Iron in Human Lymphoblasts and Fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*, 2005; 280: 6701-08.

27. Hershko C, Link G, Konijn A and Cabantchik I. Objectives and Mechanism of Iron Chelation Therapy. *Ann NY Acad Sci*. 2005; 1054: 124-35.

28. Breuer W, Ermers MJ, Pootrakul P, et al. Desferrioxamine-chelatable iron, a component of serum non-transferrin-bound iron, used for assessing chelation therapy. *Blood*, 2001; 97: 792-8.

29. Pootrakul P, Breuer W, Sametband M, et al. Labile plasma iron (LPI) as an indicator of chelatable plasma redox activity in iron-overloaded -thalassemia/HbE patients treated with an oral chelator. *Blood*. 2004; 104: 1504-10.

30. Hershko C ICL670A: a new synthetic oral chelator: evaluation in hypertransfused rats with selective radioiron probes of hepatocellular and reticuloendothelial iron stores and in iron-loaded rat heart cells in culture. *Blood*. 2001; 97: 1115-22.

31. Gakh O, Park S, Liu G, Macomber L, Imlay JA, Ferreira GC, Isaya G. Mitochondrial iron detoxification is a primary function of frataxin that limits oxidative damage and preserves cell longevity. *Hum Mol Genet.* 2005 Dec 21; [Epub ahead of print].

32. Wilson RB, Lynch DR, Fischbeck KH. Normal serum iron and ferritin concentrations in patients with Friedreich's ataxia. *Ann Neurol.* 1998; 44: 132-4.

33. Richardson D, Bernhardt PV and Becker EM. University of Queensland, The Heart Research Institute Ltd., US Patent No. 6,989,397 B1, January 24, 2006.

34. Kontoghiorghes G.J., Pattichis K, Neocleous K, and Kolnagou A. The Design and Development of Deferiprone (LI) and Other Iron Chelators for Clinical Use: Targeting Methods and Application Prospects, *Current Medicinal Chemistry*, 2004.

35. Lodi, R, et. Antioxidant Treatment Improves In Vivo Cardiac and Skeletal Muscle Bioenergetics in Patients with Friedreich's Ataxia, Wiley-Liss, Inc., 2001.

Список процитованих патентів:

1. United States Patent No. 6,956,028, "Compositions and Methods for Treatment of Mitochondrial Diseases" Wellsat Therapeutics Corporation, October 18, 2005.

2. United States Patent No. 6,472,378, "Compositions and Methods for Treatment of Mitochondrial Diseases" Pro-Neuro, Inc., October 29, 2002.

3. United States Patent No. 6,133,322, "Quinone Derivatives for Treating or Preventing Diseases Associated with Iron Overload", October 17, 2000.

4. United States Patent No. 5,928,885, "Kit for Detecting Alzheimer's Disease" The McLean Hospital Corporation, July 27, 1999.

Посилання на патент US 6,989,397, що виданий 24 січня Університету Квінсленда, винайдений Des Richardson et al., наводиться тут, бо містить вказування на аналоги 2-піридилкарбоксальдегід ізонікотинол гідрозону (ПКІГ), які можуть бути підходящими, якщо вони є безпечними для використання *in vivo*, як хелатори заліза, для лікування захворювань із надлишком заліза. Й таласемія й спадкова атаксія Фридрейха визначаються, як захворювання, при яких можуть застосовуватися ці хелатори заліза, хоча такі сполуки все ще недоступні для клінічного застосування при цих станах. Зокрема, очікувані переваги ПКІГ-аналогів обговорюються у порівнянні із доступними зараз хелаторами заліза десферіоксаміном та деферіпроном.

У патенті зазначено про нестачу десферіоксаміну, від колонки 2 рядок 38 та далі. Патент описує нестачу у деферіпрононі у цьому місті, як наведено далі:

"Необхідність у орально ефективному та економічному хелаторі Fe була нещодавно підкреслена внаслідок недостатності деферіпронону (також відомого, як L1 або 1,2-диметил-3-гідроксипірид-4-он), як вдалого хелатору заліза у пацієнтів із надлишком Fe (Olivieri et al, 1988\*, *New Eng.J.Med.* 337 417-23). Фактично, лікування пацієнтів цими більш пізніми ліками призвела до печінкового фіброзу та до збільшення рівнів Fe у печінці." \* правильною датою є 1998.

Відповідно ясно, чому заява Richardson та ін. вказує в іншому напрямку від використання деферіпронону, як хелатору заліза при лікуванні пацієнтів. Однак ми виявили, що цей висновок є хибним, внаслідок причин описаних далі у цьому описі.

Ніде в літературі не зазначено, що дія хелаторних агентів, таких як деферіпрон або деферазірокс, здатних до зменшення накопичення вільного мітохондріального заліза, на користь для пацієнтів із спадковою атаксією Фридрейха, через зменшення залізо-індукованого внутрішньоклітинного ушкодження мітохондрій, коли призначається пацієнтам, що мають вказане захворювання, та, переважно, без індукування загальної токсичності.

На основі попередніх спостережень, що попередньо викладені тут, ми припустили, що визначені підходящі хелатори заліза, що мають підходящі характеристики, щоб мати можливість проникати через клітинні мембрани та видалити органелове вільне залізо, можуть зменшити мітохондріальні залізо-індуковані клітинні пошкодження *in vivo* при спадковій атаксії Фридрейха та захистити центральну нервову систему та серце від оксидативного ушкодження без шкоди заліза для стану інших органів.

Тому об'єкт даного винаходу полягає у тому, щоб застосовувати хелаторні агенти підходящі для зменшення накопичення вільного мітохондріального заліза, такі, як наприклад деферіпрон або деферазірокс, або їх фізіологічно придатні солі, для лікування та/або попередження залізо-індукованого внутрішньоклітинного пошкодження у пацієнта.

Наступний об'єкт винаходу полягає у тому, щоб забезпечити спосіб лікування, зменшення, направлення або попередження залізо-індукованого нейрон-дегенеративного захворювання у пацієнта.

Наступний та інші об'єкти винаходу стануть очевидними спеціалісту у даній галузі, як тільки прийме до уваги коротке викладення суті винаходу та більш детальний опис здійснень винаходу, описаних тут.

Теперішні уявлення лідерів у галузі полягають у тому, що хелатори заліза не будуть корисними (оскільки акумуляцію заліза не розглядали, як важливий фактор у захворюванні), та можуть навіть бути шкідливими для пацієнтів без явного надлишку заліза (оскільки хелатор або режим комплексоутворення не був задуманий або запропонований ними, як селективний для зменшення ураження відповідних клітин, особливо від накопичення заліза внаслідок дефіциту фратаксину). Ми переконані, що вони, можливо, недооцінили ситуацію, й потенційна корисність для пацієнтів повинна бути настільки великою, що ми повинні провести попередні дослідження, щоб визначити чи може наше розуміння потенційної корисності терапії специфічними хелаторами, заснованої на агентах, таких як деферіпрон, покращити основні завдання та/або симптоми спадкової атаксії Фридрейха.

На підтримку нашого уявлення про використання проникаючого у клітини хелатору заліза, такого як деферіпрон або деферазірокс, щоб звернутись до мітохондріальної недостатності при спадковій атаксії Фридрейха, як до первинного

порушення, ми звертаємо увагу на нове дослідження, у якому повідомляється про можливу роль фратаксину у детоксифікації заліза у мітохондріях, як запропоновано Gakh та ін. (Mitochondrial iron detoxification is a primary function of frataxin that limits oxidative damage and preserves cell longevity. Hum Mol Genet. 2005 Dec. 21; [електронна публікація передусь друку]). Хоча дії проводились лише у системах *in vitro*, їх доклад підкріплено уявленнями стосовно одного з механізмів дії, відміченого у нашому новому дослідженні застосування деферіпрону при лікуванні спадкової атаксії Фридрейха, як описано нижче.

Відповідно до первинного аспекту винаходу забезпечується терапевтично ефективна кількість проникаючого орального хелатору заліза, такого як деферіпрон або деферазірокс, або їх фізіологічно прийнятних солей, для переважно зменшення або інактивування запасу токсичного заліза у субклітинних структурах мозку, та щоб усунути залізо з цих структур, та/або для зменшення клітинного або внутрішньоклітинного негативного обміну заліза у мозку.

У першому втіленні стан, що лікують, є спадковою атаксією Фридрейха.

У іншому втіленні стан, що лікують, є хворобою Хантінгтона.

У ще одному втіленні стан, що лікують, є хворобою Паркінсона.

У ще одному втіленні стан, що лікують, є хворобою Альцгеймера.

У ще одному втіленні стан, що лікують, є розсіяним склерозом.

У ще одному втіленні стан, що лікують, є гемохроматозом.

У ще одному втіленні стан, що лікують, є синдромом Голеворден-Шпатц.

У ще одному втіленні стан, що лікують, є синдромом Дауна.

У ще одному втіленні стан, що лікують, є дистрофією жовтої плями.

Відповідно до іншого аспекту винаходу забезпечується терапевтично ефективна кількість деферіпрону або деферазіроксу або його фізіологічно прийнятної солі, для переважно зменшення або інактивування запасу токсичного заліза у мозку та/або для зменшення клітинного або внутрішньоклітинного негативного обміну заліза у мозку для попередження залізо-індукованого пошкодження.

Відповідно до іншого аспекту винаходу забезпечується терапевтично ефективна кількість деферіпрону або деферазіроксу або їх фізіологічно прийнятних солей, для переважно зменшення або інактивування запасу токсичного заліза у мозку та/або для зменшення клітинного або внутрішньоклітинного негативного обміну заліза у мозку для стабілізації залізо-індукованого пошкодження.

Відповідно до іншого аспекту винаходу забезпечується терапевтично ефективна кількість деферіпрону або деферазіроксу або їх фізіологічно прийнятних солей, для переважно зменшення або інактивування запасу токсичного заліза у мозку та/або для зменшення клітинного або внутрішньоклітинного негативного обміну заліза у мозку для лікування залізо-індукованого пошкодження.

Відповідно до іншого аспекту винаходу забезпечується терапевтично ефективна кількість деферіпрону або деферазіроксу або їх фізіологічно прийнятних солей, для переважно зменшення або інактивування запасу токсичного заліза у мозку та/або для зменшення клітинного або внутрішньоклітинного негативного обміну заліза у мозку для усунення залізо-індукованого пошкодження.

У першому втіленні стан, що лікують, є спадковою атаксією Фридрейха.

У іншому втіленні стан, що лікують, є хворобою Хантінгтона.

У ще одному втіленні стан, що лікують, є хворобою Паркінсона.

У ще одному втіленні стан, що лікують, є хворобою Альцгеймера.

У ще одному втіленні стан, що лікують, є розсіяний склероз.

У ще одному втіленні стан, що лікують, є гемохроматозом.

У ще одному втіленні стан, що лікують, є синдромом Голеворден-Шпатц.

У ще одному втіленні стан, що лікують, є синдромом Дауна.

У ще одному втіленні стан, що лікують, є дистрофією жовтої плями.

Відповідно до іншого аспекту винаходу забезпечується терапевтично ефективна кількість деферіпрону або деферазіроксу, або їх фізіологічно прийнятних солей, для переважно зменшення або інактивування запасу токсичного заліза у мітохондріях для попередження мітохондріального залізо-індукованого пошкодження.

Відповідно до іншого аспекту винаходу забезпечується терапевтично ефективна кількість деферіпрону або деферазіроксу, або їх фізіологічно прийнятних солей, для переважно зменшення або інактивування запасу токсичного заліза у мітохондріях для стабілізації мітохондріального залізо-індукованого пошкодження.

Відповідно до іншого аспекту винаходу забезпечується терапевтично ефективна кількість деферіпрону або деферазіроксу, або їх фізіологічно прийнятних солей, для переважно зменшення або інактивування запасу токсичного заліза у мітохондріях для лікування мітохондріального залізо-індукованого пошкодження.

Відповідно до іншого аспекту винаходу забезпечується терапевтично ефективна кількість деферіпрону або деферазіроксу, або їх фізіологічно прийнятних солей, для переважно зменшення або інактивування запасу токсичного заліза у мітохондріях для усунення мітохондріального залізо-індукованого пошкодження.

Відповідно до іншого аспекту винаходу забезпечується застосування деферіпрону або деферазіроксу, або їх фізіологічно прийнятних солей при виготовленні фармацевтичної продукції для попередження симптомів спадкової атаксії Фридрейха.

Відповідно до іншого аспекту винаходу забезпечується застосування деферіпрону або деферазіроксу, або їх фізіологічно прийнятних солей при виготовленні фармацевтичної продукції для стабілізації симптомів спадкової атаксії Фридрейха.

Відповідно до іншого аспекту винаходу забезпечується застосування деферіпрону або дефера-





Відповідно до ще одного аспекту винаходу забезпечується терапевтично ефективна кількість деферіпрону або його фізіологічно прийнятної солі для лікування залізо-індукованого нейродегенеративного захворювання у пацієнтів, що є результатом мітохондріального залізо-індукованого пошкодження, що включає ефективну кількість деферіпрону або його фізіологічно прийнятної солі, для переважно зменшення запасу заліза у мітохондріях.

Відповідно до ще одного аспекту винаходу забезпечується терапевтично ефективна кількість деферіпрону або його фізіологічно прийнятної солі для усунення залізо-індукованого нейродегенеративного захворювання у пацієнтів, що є результатом мітохондріального залізо-індукованого пошкодження, що включає ефективну кількість деферіпрону або його фізіологічно прийнятної солі, для переважно зменшення запасу заліза у мітохондріях.

У першому втіленні способів за винаходом активний інгредієнт є деферіпроном, деферазіроксом або їх фізіологічно прийнятними солями для попередження розвитку симптомів спадкової атаксії Фридрейха, що є результатом мітохондріального залізо-індукованого пошкодження у пацієнтів.

У ще одному втіленні способів за винаходом активний інгредієнт є деферіпроном, деферазіроксом або їх фізіологічно прийнятними солями для стабілізації симптомів спадкової атаксії Фридрейха, що є результатом мітохондріального залізо-індукованого пошкодження у пацієнтів.

У ще одному втіленні способів за винаходом активний інгредієнт є деферіпроном, деферазіроксом або їх фізіологічно прийнятними солями для лікування спадкової атаксії Фридрейха, що є результатом мітохондріального залізо-індукованого пошкодження у пацієнтів.

У ще одному втіленні способів за винаходом активний інгредієнт є деферіпроном, деферазіроксом або їх фізіологічно прийнятними солями для зменшення симптомів спадкової атаксії Фридрейха, що є результатом мітохондріального залізо-індукованого пошкодження у пацієнтів.

У іншому втіленні застосування винаходу активний інгредієнт є деферіпроном, деферазіроксом або їх фізіологічно прийнятними солями для попередження симптомів спадкової атаксії Фридрейха, що є результатом мітохондріального залізо-індукованого пошкодження у пацієнтів.

У ще одному втіленні застосування винаходу активний інгредієнт є

деферіпроном, деферазіроксом або їх фізіологічно прийнятними солями для

стабілізації симптомів спадкової атаксії Фридрейха, що є результатом мітохондріального залізо-індукованого пошкодження у пацієнтів.

У ще одному втіленні застосування винаходу активний інгредієнт є деферіпроном, деферазіроксом або їх фізіологічно прийнятними солями для лікування спадкової атаксії Фридрейха, що є результатом мітохондріального залізо-індукованого пошкодження у пацієнтів.

У ще одному втіленні застосування винаходу активний інгредієнт є деферіпроном, деферазіроксом або їх фізіологічно прийнятними солями для

зменшення симптомів спадкової атаксії Фридрейха, що є результатом мітохондріального залізо-індукованого пошкодження у пацієнтів.

У іншому втіленні способи за винаходом можуть далі включати оральну дозовану форму деферіпрону, деферазіроксу або їх фізіологічно прийнятних солей з іншими наповнювачами.

У ще одному втіленні винаходу застосування може далі включати оральну дозовану форму деферіпрону, деферазіроксу або їх фізіологічно прийнятних солей з іншими наповнювачами.

У іншому втіленні способи за винаходом можуть далі включати добове призначення пацієнту деферіпрону або його фізіологічно прийнятної солі у кількості, що в основному знаходиться у діапазоні до 80 мг/кг.

У ще одному втіленні винаходу застосування може далі включати добове призначення пацієнту деферіпрону або його фізіологічно прийнятної солі у кількості, що в основному знаходиться у діапазоні до 80 мг/кг.

У іншому втіленні способи за винаходом можуть далі включати призначення пацієнту добової дозованої кількості деферіпрону або його фізіологічно прийнятної солі, в основному у діапазоні до 30 мг/кг.

У ще одному втіленні винаходу застосування може далі включати призначення пацієнту добової дозованої кількості деферіпрону або його фізіологічно прийнятної солі, в основному у діапазоні до 30 мг/кг.

У іншому втіленні способи за винаходом можуть далі включати призначення пацієнту добової дозованої кількості деферіпрону або його фізіологічно прийнятної солі, в основному у діапазоні від 20 мг/кг до менше ніж 80 мг/кг.

У ще одному втіленні винаходу застосування може далі включати призначення пацієнту добової дозованої кількості деферіпрону або його фізіологічно прийнятної солі, в основному у діапазоні від 20 мг/кг до менше ніж 80 мг/кг.

Переважно деферіпрон призначають у спосіб, вибраний з групи: внутрішньовенно, трансдермально, ректально, орально, букально або у вухо.

У ще одному втіленні винаходу застосування може далі включати призначення деферіпрону у спосіб, вибраний з групи: внутрішньовенно, трансдермально, ректально, орально, букально або у вухо.

Переважно деферіпрон призначають орально.

У першому втіленні способів або використань винаходу дозована форма є складом з модифікованим вивільненням, включаючи уповільнене вивільнення.

У іншому втіленні методів або використань винаходу деферіпрон призначають на додаток до інших режимів.

Фігура 1 є візуалізацією МРТ даних по накопиченню заліза у зубчастому ядрі пацієнтів із спадковою атаксією Фридрейха.

Фігура 2 представляє період дії середніх значень показників R2\* у лівому та правому зубчастих ядрах пацієнтів зі спадковою атаксією Фридрейха, які одержують деферіпрон.

Два суттєвих фактора залишалися непоміченими та недоведеними, що заважали нашому ви-

користанню хелатору заліза взагалі, та зокрема, деферіпрону, при лікуванні спадкової атаксії Фридрейха. Перший полягав у тому, чи можна безпечно призначити пацієнтам без загального надлишку заліза дози препарату, що можуть усунути залізо з різних тканин. Другим було те, наскільки ефективним був деферіпрон, щоб вибірково усунути мітохондріальне залізо, що обґрунтовано не лише при ситуації оцінювання клітинної системи *in vitro*, але й *in vivo*? Ми провели дослідження на тваринах, щоб дослідити обидва.

Дослідження комплексоутворення заліза у мавп без надлишку заліза

Як частина більшого дослідження потенційної токсичності хелаторів заліза, ми оцінили токсичність деферіпрону у нормальних мавп, що отримували його по 150 мг/кг/день (75 мг/кг двічі на день) протягом 1 року.

#### 1.1. Мета

Визначити токсичність деферіпрону у яванських макак (*Macaca fascicularis* (лат.) без надлишку заліза, після призначення орально двічі на день (примусове годування) протягом 52 тижнів підряд, та оцінити регрес будь-якого токсичного ефекту протягом 4-тижневого періоду без лікування.

#### 1.2. Методи.

Мавпам у групах з 4 самців та 4 самиць (вік від 2 до 3 років) шляхом назогастральної інтубації вводили (у 0.5% ваг./об. водному карбоксиметилцелюлозному носії) 75 мг/кг деферіпрону двічі на день (як запропоновано), з періодом 6-8 годин між введеннями, протягом щонайменше 364 днів.

#### 1.3. Моніторинг.

Клінічні ознаки, вага тіла та споживання їжі оцінювали через короткі інтервали. Офтальмологічну та серцево-судинну експертизу було виконано на 17, 30, 43, 56 та 60 тижнях. Параметри гематології, коагуляції, клінічної хімії та сечі виміряли на вихідному етапі та на 8, 16, 30, 41, 56 та 60 тижнях. Зразки крові брали у перший день введення препарату та на 17 та 56 тижні для оцінювання профілю концентрації у часі деферіпрону у сироватці. Було проведено повний розтин трупів кожної тварини, відібрані органи зважували та проводили гістопатологічні дослідження відхилень та вибраних тканин.

#### 1.4. Результати.

Клінічні ознаки у тварин були несуттєвими після призначення деферіпрону інтраперітоніальним шляхом (IP route). Був відсутній вплив, пов'язаний з деферіпроном, на вагу тіла, прийом їжі, офтальмологію, серцеву провідність, кров'яний тиск, серцевий ритм та гематологічний або сечовий склад.

Деферіпрон визначався (HPLC) через 0.5 год. Після введення, та до 7 год. Середні пікові концентрації знаходились у межах від 25 до 30 мкг/мл через 52-тижневий період лікування, відображені концентрації були близькими до трьох пікових концентрацій, що спостерігались у пацієнтів з таласемією, яких лікували стандартною дозою 25 мг/кг тричі на день. Період напіврозпаду у особин у сироватці знаходився у межах від 0.35-2.39 год.

Не було виявлено ніяких макроскопічних одержаних даних, пов'язаних з деферіпроном. Ніякі мікроскопічні одержані дані у мавп без надлишку

заліза не могли бути приписані лікуванню деферіпроном.

#### 1.5. Підсумок.

Деферіпрон, що давали орально яванським макакам (*Macaca fascicularis* (лат.)) без надлишку заліза у дозі 75 мг/кг двічі на день протягом 52 тижнів, не мав суттєвого негативного ефекту.

Загальна денна доза, що застосовувалася у цих дослідженнях, була подвійною дозою, що зазвичай використовують при лікуванні надлишку заліза у пацієнтів з таласемією. Ці дані були неочікуваними та важливими для встановлення факту, що деферіпрон може бути введений приматам за відсутності загального надлишку заліза. Без цієї інформації, ми не могли б рекомендувати хелатор заліза загалом, та деферіпрон особливо, випробувати у пацієнтів із спадковою атаксією Фридрейха.

Дослідження виведення мітохондріального заліза шляхом комплексоутворення *in vivo* у щурів

Як частина більшого дослідження, що порівнює хелатори заліза, ми провели гістологічне дослідження та електронну мікроскопію (ЕМ) тканин після навантаження залізом (100 мг/кг заліза давали інтраперітоніально двічі на тиждень протягом чотирьох тижнів) у щурів (200-250 г) та лікування деферіпроном. Були досліджені дві контрольні групи щурів, одна без навантаження залізом ("Naive") та інша з навантаженням залізом, але без хелатирування заліза.

Деферіпрон вводили п'ять разів на тиждень (кожен день з понеділка по п'ятницю). Тварини одержували 89 доз за 127 днів по 100 мг/кг кожен день, шляхом орального примусового згодовування.

Якісне гістологічне дослідження препаратів пофарбованих H&E не показало дегенеративних змін у печінці та серці при надлишку заліза, хоча було значне накопичення заліза у печінці та вибіркове накопичення заліза у серці.

Значне накопичення електронно-щільного гранулоподібного матеріалу спостерігалось у печінці та відділах серця у щурів із навантаженням заліза. Накопичення електронно-щільного матеріалу було менш очевидним у серці ніж у печінці. Найбільш помітні зміни від навантаження залізом зустрічались у макрофагах (або клітини Купфера) у ворітних шляхах печінки. Макрофаги у ворітних шляхах часто мали велике накопичення заліза у матриксі мітохондрій. Мітохондріальна мембранна структура була аномальною з внутрішнім ураженням структури, результатом чого було злиття та збільшення уражених мітохондрій. Іноді у цитоплазмі було помітно великі аморфні агрегації дегенеративних мітохондрій, з або без утворення вакуолей, сильно уражених моноцитів/макрофагів та схожих на фаголізосоми. На додаток, було невелике підтвердження, що моноцити/макрофаги дегенерують з втратою цитоплазматичної цілісності та руйнуванням цитоплазми та органел.

Найбільш явне накопичення у серці, що спостерігалось нерегулярно, було відмічено у мітохондріях периваскулярних моноцитів (макрофагів). Ступінь накопичення був меншим, ніж спостережуваний у моноцитах печінки. Таким чином ставало явним, що на додаток до загального надлишку

заліза, був надлишок заліза у мітохондріях, останній стан стосується спадкової атаксії Фридрейха.

Призначення деферіпрону зменшувало рівні заліза у печінці та серці та у більшості органів, як проілюстровано у наступній таблиці.

	Серце	Печінка	Нирки	Щитовидна залоза	Легені	Скелетні м'язи
Naive (без навантаження залізом)	276±25	376±127	305±80	95±13	376±45	50±17
Fe-контроль	1,088±36	11,534±554	801±39	583±275	1,234±227	205±109
Деферіпрон	586±143	7,780±1,637	642±104	425±228	1065±101	146±49

Дані демонструють, що надлишок заліза був в результаті накопичення заліза у мітохондріях цих тварин та, що деферіпрон мав здатність зменшувати надлишок заліза у ключових органах.

Суттєвий компонент для ясної інтерпретації цих досліджень на щурах, є недавно опублікована робота одного з нас (Cabantchik), що стосується виведення внутрішньоклітинного заліза з використанням флуоресцентного дослідження (Glickstein et al. Intracellular labile iron pools as direct targets of iron chelators: a fluorescence study of chelator action in living cells. Blood. 2005; 106: 3242-50). Дослідження призначалося, щоб оцінити роль клінічно значимих хелаторів заліза, таких як деферіпрон, десферіоксамін та деферазірокс у: (а) корисності одержаного доступу до запасів внутрішньоклітинного заліза у ключових клітинах накопичення заліза (у клітинних лініях макрофагів, гепатоцитів та кардіоміоцитів); (b) хелату нестабільного заліза представленого у окремих клітинних відділах/органах; та (c) запобіганні участі нестабільного заліза у сукупності різновидів реактивних окислювачів.

Дослідження показало, що хелірування з використанням десферіоксаміну є повільним, хоча підвищувалося у клітинах з відносно високою ендцитною активністю (наприклад, у гепатоцитах), у той час, як деферазірокс та деферіпрон швидко проникають у більшість клітин та ефективно досягають головних внутрішньоклітинних відділів накопичення заліза.

Наведене вище дослідження накопичення заліза у тварин, разом із даними Glickstein та ін., демонструє, що деферіпрон може усувати залізо, не лише з ключових органів, а також з мітохондрій, що вказує на те, що деферіпрон та деферазірокс, й таким чином інші хелатори з підходящими властивостями щодо зв'язування заліза та проникнення крізь мембрану, як вказувалося вище, повинні бути здатними для попередження залізоопосередкованого пошкодження у мітохондріях.

Ці дослідження показують, що деферіпрон може усувати залізо з мітохондрій різних клітин, in vivo, без генералізованої клітинної або тканинної токсичності, та оскільки мітохондрії є ключовими внутрішньоклітинними органами, втягнутими у розвиток спадкової атаксії Фридрейха, це наводило на думку, що він не може бути токсичним, якщо використовується при лікуванні спадкової атаксії Фридрейха. У комбінації з надійними даними 1-річного лікування мавп, ці дослідження забезпечують основні частини інформації, необхідної, щоб побороти перепони стосовно проведеного дослідження,

Вміст заліза у мікрограмах на грам сухої тканини ± SD, що визначено шляхом ICP-MS

у якому хелатор заліза загалом, та особливо деферіпрон, буде призначений пацієнтам зі спадковою атаксією Фридрейха. Таким чином, наступне дослідження було проведено, як частина винаходу.

#### ДІЯ ДЕФЕРІПРОНУ НА АТАКСІЮ ТА НАКОПИЧЕННЯ ЗАЛІЗА У МОЗОЧКУ ПРИ СПАДКОВІЙ АТАКСІЇ ФРИДРЕЙХА: ПОПЕРЕДНЄ ДОСЛІДЖЕННЯ

На цій фазі I-II відкритого випробування ефективності-токсичності, ми продемонстрували, що орально призначений деферіпрон зменшує концентрацію заліза, яке накопичилося у зубчастому ядрі мозочка у молодих пацієнтів зі спадковою атаксією Фридрейха та покращує їх неврологічний стан.

##### Пацієнти та Схема

Дослідили десять підлітків (четверо чоловіків, шість жінок віком від 14 до 23 років) з діагнозом спадкової атаксії Фридрейха, підтвердженим шляхом визначення збільшення тринуклеотидних повторів у першому інтроні гену фратаксину. Пацієнти одержували деферіпрон (Ferriprox™, Apotex Inc., Toronto, Canada) орально, у два прийоми протягом 1-5 місяців. Трьох пацієнтів включали, послідовно, протягом мінімального періоду у два місяці на кожну дозу. Реєстрація пацієнтів відбувалася поетапно протягом двох тижнів, щоб було можливим контролювання реакції. За відсутності токсичності, та при очевидності ефективності у будь-якого з перших 3 пацієнтів, друга група з 3 пацієнтів повинна бути включена у ту ж саму дозу, для повної тривалості у 6 місяців. Якщо був відсутній й ефект й токсичність, другій групі трьох пацієнтів повинно бути призначено вищу дозу. Якщо розвивалася токсичність, дане введення повинно бути перервано та дослідження продовжується з наступною групою пацієнтів з нижчими дозами. Пацієнти були на ідебеноні (10 мг/кг/день, у трьох дозах) протягом щонайменше двох років до включення та були залишені на препараті у тих же дозах протягом дослідження. МРТ дослідження проводилося при включенні та на 1, 2, 4 та 6 місяці. Протокол був підтриманий Assistance Publique-Hopitaux de Paris та схвалений місцевим комітетом з етики, й зареєстрований у Національному міністерстві охорони здоров'я (AFSSAPS) та у Системі міжнародної реєстрації протоколів (www.clinicaltrials.gov). Письмова згода про надання повної інформації була одержана від пацієнтів та батьків.

Використовували шкалу International Cooperative Ataxia Rating Score (ICARS) для оці-

нювання симптомів атаксії до та після 1-5 місяців (Capo et al. International cooperative ataxia rating scale (ICARS): Appropriate for studies of Friedreich's ataxia? *Mov Disord* 2005; 20: 1585-91). Ця шкала має чотири нижні шкали: поза та порушення ходи, кінетичні функції, розлади мовлення та окуломоторні розлади. Бали нижчих шкал сумуються, що дає загальне значення у межах від 0 до 100. Вищі значення вказують на гіршу атаксію. У ході дослідження включили тест з набірною дошкою Перд'ю, який оцінює швидкість виконання, тонкі рухи та маніпуляторну вправність. Цей тест оцінює здатність учасника вставити як можна більше цвяхів у задані отвори, лінійно встромлюючи у дерев'яну дошку за обмежений проміжок часу (20 секунд обома руками, разом та окремо). Тестами керував один і той самий дослідник. Пацієнтів контролювали для визначення нейтропенії, агранулоцитозу, м'язево-скелетних болів та дефіциту цинку, та підраховували у аналізах крові кожного тижня, залізо у плазмі, феритин у сироватці та вимірювали концентрацію трансферину, також оцінювали функції нирок та печінки.

#### MPT-вимірювання

Було використано послідовність мульти-градієнт ехо, щоб провести контроль концентрації заліза у мозку (Waldvogel et al. Increased iron in the dentate nucleus of patients with Friedreich's ataxia. *Ann Neurol* 1999; 46: 123-5), використовуючи одиниці вимірювання 1.5T Signa (GE Medical Systems, Milwaukee, WI, USA) та використовуючи фазовану решітчасту катушку для голови. Глибокі сірі структури визначали шляхом застосування T2\*-зв'язаної ехо-планарної послідовності (TR 3000 мс, TE 60 мс, вісім середніх, поле зору: 24 см, матриця 256×224 та товщина зрізу: 5мм, 24 зрізи/1.1 min). Визначали розташування фагоцитованого елемента тривимірного простору лівого та правого ядер на найбільшій ділянці зубчастого ядра (розміри 6 × 3 × 2 см). Одержані дані, що дозволяють контролювання заліза, було проведено шляхом використання послідовності мульти-градієнт ехо одиничних зрізів (TR: 400 мс, обернений кут: 50°, щоб збільшити сигнал сірої речовини, час експозиції: 3 хвилини).

Визначення R2\* виконували шляхом використання даних послідовності мульти-градієнт ехо. У кожному пікселі, сигнали Si від десяти зображень, одержані під час ехо TEi (-i = 1.10), використовували, щоб розрахувати параметр R2\*, шляхом коригування затухаючого сигналу відповідно до рівняння  $Si = So \cdot \exp(-R2^* \cdot TEi)$ . Параметричне відображення локальних значень R2\* розраховували з тою ж просторовою роздільною здатністю, що притаманна зображенням. Середнє значення R2\* розраховували у різних зонах впливу, всі визначення проводяться тим же самим експериментатором радіологом. Для зубчастих ядер, еліптична ділянка 24 мм була відкладена у центрі кожного зубчастого ядра, що візуалізується, як ділянка із послабленим сигналом (Фігура 1). Було відібрано розташування ділянок впливу для зменшення варіації R2\*. Круглі ділянки 24 мм<sup>2</sup> було накреслено на білій речовині мозочкових півкуль, що слідує за зубчастими ядрами, ділянці, де як передбачали,

концентрація заліза буде низькою, та у палідумальних та таламичних ядрах.

#### Статистичний аналіз

В основному режимі, значення R2\* у різних структурах порівнювали використовуючи модель узагальненого оціночного рівняння (GEE), приймаючи до уваги індивідуальні рівні, як у мозкових структурах, так й з боку категоріальних коваріацій. Для кожної мозкової структури, повторювані після тривалого періоду MPT вимірювання, аналізували з використанням GEE-моделі з часом вимірювання, як фактором, поряд із яким зберігається кореляційна структура між значеннями тієї ж самої особи. Індивідуальні внески визначались з використанням інверсії варіантності R2\* у відповідній ділянці вимірювання. Всі розрахунки виконувалися з використанням GEE процедури з geepack-бібліотеки, R статистичний пакет (<http://www.R-project.org>). Значення p < 0.05 вважали вірогідним. Дослідження пристосовували для багаторазових порівнянь відповідно до правила Бонфероні.

#### Результати

Базуючись на фармакокінетичних дослідженнях на суб'єктах з таласемією, перший пацієнт був включений при початковому дозуванні 80 мг/кг/день деферіпрону. Обґрунтування для використання цієї дози полягало у тому, що очікується, що концентрації у ЦНС повинні бути в основному нижчі, ніж концентрації у сироватці та, що очікується, що концентрації усередині мітохондрій повинні бути навіть ще нижчими. Таким чином необхідні були більші дози, щоб одержати бажаний ефект хелатирування заліза усередині мітохондрій. Однак, ці дози, що відповідають таким, які застосовуються у пацієнтів з великим надлишком заліза, такого як при таласемії, призводили до серії небажаних наслідків, що починалися на восьмий день, що в результаті призвело до завершення призначення препарату на 17 день у першого пацієнта (P1). На додаток, було припинено призначення деферіпрону другому пацієнту (P2), якого лікували лише 2 дні при такій же самій дозі. Ці небажані події включали: втому, головний біль, нудоту, запаморочення, потім м'язову в'ялість, слабкий головний контроль, ненормальні рухи очей та змінену свідомість, які повільно зникали після припинення прийому препарату. Ніколи не повідомлялося про такі події у пацієнтів із загальним надлишком заліза при таласемії, які залежать від переливання, та одержують деферіпрон, бо передбачали, що може бути нижчий пороговий рівень для токсичності препарату при спадковій атаксії Фридрейха, коли є відсутнім загальний надлишок заліза. Ці результати здавались такими, що підтримують лінію думок, що хелатори заліза не будуть корисними при спадковій атаксії Фридрейха, оскільки не є здатними, щоб відділити хелатирування заліза у мітохондріях від цитозольного, та тому, що залізо є важливим елементом у багатьох біохімічних процесах, що є необхідним у опосередкованому метаболізмі (Richardson Friedreich's ataxia: iron chelators that target the mitochondrion as a therapeutic strategy? *Expert Opin Investig Drugs*. 2003 Feb; 12: 235-45).

Було здійснено переоцінку як попередньогенерованих даних, так й характеру кінетики де-

феріпрону, та було прийнято рішення, щоб відновити дослідження з четвертиною початкової дози (20 мг/кг/день) на нових пацієнтах.

Протягом кількох тижнів, неочікуване нейрологічне покращення було відмічено батьками та непоінформованими родичами у всіх пацієнтів, яких лікували. Запор, нетримання та деякі суб'єктивні ознаки периферичної нефорпатії пройшли через 1-2 місяці, всі без ознак токсичності, окрім незначних небажаних ефектів, таких, як нудота. Кінцівки, які були холодні, плямисті та гіперчутливі, нагрілися з поверненням чутливості, про що свідчить повернене відчуття ніг та поверхні підлоги. Тонкі рухи та маніпуляторна вправність (наприклад, почерк, друкування на клавіатурі, зачісування, накладання макіяжу, і т.д.), та вільне мовлення за повідомленнями були покращені у кількох (Таблиця-додаток 1). Також покращилися загальна сила, якість сидіння, стояння та легкість пересування (від ліжка до інвалідного візочка або туалету). Пацієнти, що були наймолодшими (14 років) та довше лікувались (P1-P3, 4-5 місяців), також виявилися тими, хто отримав найбільшу користь від лікування виражену у тонких рухах, рівновазі та автономії, що наводить на думку, що ефективність може бути вищою у молодших пацієнтів. Є маловірогідним, що ці зміни відбувалися внаслідок ефекту плацебо, оскільки вони не раз та однаково повідомлялися різними непоінформованими батьками (Таблиця-додаток 1). Ці особливості також призвели до продуктивних помірних змін ICARS балів протягом нетривалого періоду лікування.

На підставі очевидної відсутності токсичності при низькій дозі та явній можливій клінічній ефективності, було додатково включено два пацієнти, яким підвищили дозу деферіпрону на 50 % (30 мг/кг/день) та включили тест з набірною дошкою Перд'ю, для того, щоб оцінити дію препарату на маніпуляторну вправність. Результати у цій групі підтверджували наведені вище спостереження у показаннях толерантності та відносної ефективності деферіпрону та показали покращення швидкості та вправності (кількість цвяхів, що вставлені обома руками по-окремі та разом, на початку та через 1-2 місяці після початку дослідження, відповідно (Таблиця-додаток 1).

MPT відображення залізо-індукованого сигналу мозку показало, що значення  $R2^*$  у зубчастому ядрі було вищим у підлітків при спадковій атаксії Фридрейха, ніж у підлітків неуразених хворобою ( $R2^*=17.4\pm1.6\text{ s}^{-1}$  та  $13.7\pm0.6\text{ s}^{-1}$  у пацієнтів та у контролі відповідно,  $p<0.001$ ). Не було відмічено кореляції між віком або половинами мозку та не спостерігалася суттєвих змін  $R2^*$  у палідумальних ядрах (не показано). Ці спостереження підтримують думку, що накопичення заліза у мозку є ранішньою подією при спадковій атаксії Фридрейха, що суперечить раніше повідомленим результатам при спадковій атаксії Фридрейха у нокаутних тварин.

Призначення деферіпрону значно зменшувало швидкість релаксації  $R2^*$ , після одного місяця ( $16.6\pm1.3\text{ s}^{-1}$ ), після двох місяців ( $15.9\pm0.6\text{ s}^{-1}$ ) та

після чотирьох місяців призначення препарату (Фігура-2). Окрім того, не спостерігалася короткотривалої різниці між двома дозами деферіпрону, що досліджували (20 та 30 мг/кг/день, Фігура-2). Не було одержано ніяких суттєвих змін  $R2^*$  у палідумальних ядрах, таламічних та мозочкових областях білої речовини. На кінець, призначення хелатору заліза мало незначний вплив на рівні гіпосидерозної анемії та гіпоферитинемії, які залишаються переважно незмінними незалежно від дози деферіпрону (Таблиця-додаток 1).

Первинне лікування препаратом для деяких симптомів спадкової атаксії Фридрейха, хоча ще не є схваленим будь-якими регуляторними органами, є аналогічним як для хінонів (ідебенон, Takeda) та діє, як сильний захоплювач вільних радикалів, що захищає серцевий м'яз від залізо-індукованого пошкодження (Rustin et al. Effect of idebenone on cardiomyopathy in Friedreich's ataxia: a preliminary study. *Lancet* 1999; 35: 477-9). Довготривале призначення ідебенону покращує кардіоміопатію, але є неспроможним, щоб покращити або хоча б стабілізувати протікання нейрологічних симптомів. Збільшення виживання, за відсутності суттєвого покращення у наслідках виснаження ЦНС при захворюванні, можливо не є дійсно корисним для пацієнтів або їх опікунів. Лікування, яке є необхідним, щоб покращити як серцево-судинні, так й ЦНС симптоми, та узагальнені дані, зазначені вище, разом із відповідними даними інших, що демонструють високу проникність хелаторів заліза, що призначаються орально, особливо деферіпрону, робить їх придатними, щоб одержувати сильний ефект для покращення симптомів спадкової атаксії Фридрейха.

На Фігурі 1 показано MPT-візуалізоване накопичення заліза у зубчастих ядрах пацієнтів зі спадковою атаксією Фридрейха. Показано параметричне відображення значень  $R2^*$  у задній черепній ямці, що одержане від послідовності мультиградієнт ехо, виконане при 1.5 Тесла. Зубчасті ядра з великими значеннями  $R2^*$  (що виміряні у овальній зоні, тут 17 s-l) проявляються, як більш темніші, ніж оточуючий мозочок. Значення  $R2^*$  у суміжному контрольному регіоні впливу 13 s-l, вказує на гарну регіональну однорідність магнітного поля.

На Фігурі 2 показано залежність від часу середніх значень  $R2^*$  у лівому та правому зубчастих ядрах пацієнтів зі спадковою атаксією Фридрейха, що одержують деферіпрон. Значення  $R2^*$  у зубчастих ядрах відображає вміст заліза до та після 1-5 місяців орального призначення деферіпрону (20-30мг/кг/день).

Таблиця 1: Як обговорювалося вище, таблиця, наведена далі, показує вік пацієнтів та вік на початку захворювання, тривалість атаксії, розмір збільшення ГАА у гені фратаксину, дозування та тривалість призначення деферіпрону (DFP), бали за ICARS та біологічні параметри до та після досліджень (сила прояву ознак). Також наводяться спостереження батьків.

	ДФР (мг/кг) Стать	Вік (роки)	Вік на початку захворювання	Тривалість атакси (роки)	Розмір GAA (кб)	Порушення положення та ходи				
						хода	темп ходи	розмах кроку	тривалість відкриття очей	7 ознак (/34)
CS	80 17 д Ж	19	7	12	2 5/3 6					
DL	80 2 д Ч	18	5	13	2 7/3					
KH	20 5 міс Ч	14	7	7	2/2 8					
MT	20 5 міс Ж	17	9	8	2 5/2 6	7 7	3 3	3 2	4 4	28 27
NG	20 4 міс Ж	20	14	6	0 75/0 75	3 2	1 1	3 3	2 1	12 9
YL	20 3 міс Ч	13	5	8	2 4/3 9	7 7	4 4	4 4	6 6	33 32
KS	20 2 міс Ч	18	10	8	2 2/3 7	3 3	1 1	2 2	3 1	16 13
MV	20 2 міс Ж	23	12	11	0 45/0 93	7 7	2 2	3 3	5 4	17 16
MC	30 1 міс Ж	18	11	7	1 6/3 6	2 2	2 2	1 0	2 1	11 8
SB	30 1 міс Ж	15	12	3	G130V/??? ??	7 7	1 1	2 2	3 2	20 17

	Кінетична функція (/29)	Порушення мовлення (/8)	Окуломоторні порушення (/6)	Загальне значення ICARS (/100)	Тест з набірною дошкою Перд'ю	Гемоглобін (г/дл) Залізо плазми (мкмол/л) Феритин (мкг/л)	Спостереження
CS							небажані події на 17 день втома, головний біль, нудота, запаморочення, м'язова в'язкість, ненормальні рухи очей, змінена свідомість
DL							передчасна зупинка на 2 день
KH						14, 13 14, 9 106, 13	покращення ходи, письма, тонких рухів, можливість рухати пальцями ніг, відчуття своїх ніг, нагрівання нижніх кінцівок

29					95099		30	
MT	8 7	1 0	2 2	39 37	/	13, 11 7, 4 8, 4	покращення ходи, письма, тонких рухів, можливість рухати пальцями ніг, відчуття своїх ніг, нагрівання нижніх кінцівок	
NG	7 7	2 2	2 2	23 20	/	14, 12 27, 6 15, 6	відсутнє нетримання, покращення ходи та рівноваги, нагрівання нижніх кінцівок	
YL	21 21	4 4	3 2	61 59	/	13, 12 21, 14 16, 8	відсутність втоми, покращення тонких рухів	
KS	13 12	2 2	0 0	31 27	37 29	16, 15 16, 16 19, 15		
MV	11 11	3 2	0 0	31 29	37 44	13, 13 26, 4 12, 7		
MC	8 8	2 2	2 2	23 20		12, 10 16, 13 5, 4	відсутність запорів, нетримання та згинання, покращення рівноваги та ходи	
SB	9 9	0 0	0 0	29 26	52 39	13, 13 18, 22 117, 114	покращення ходи та постави, відсутність запорів	

У той час, як результати МРТ підтримують уявлення, що деферіпрон впливає на внутрішньоклітинні рівні заліза у мозку, що, як відомо, приводить до змін при спадковій атаксії Фридрейха, клінічні дані змін фізичних функцій є головною підтримкою цього винаходу, що показують справжню користь для благополуччя цих пацієнтів.

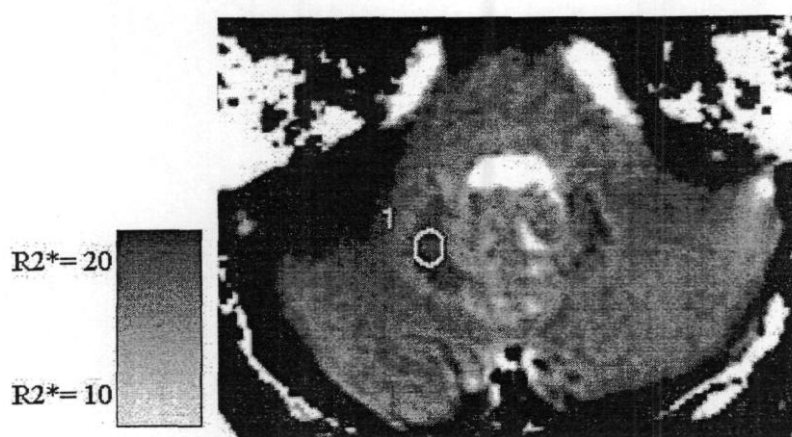
Під час вдосконалення цих досліджень, вчення у галузі визначає, що натеper доступні хелатори заліза, такі як деферіпрон, не є корисними, як заявлено Річардсоном "Дійсно, стандартні режими хелатоутворення, можливо не будуть працювати при ФА, оскільки ці пацієнти не показують значного надлишку заліза." (Richardson. Friedreich's ataxia: iron chelators that target the mitochondrion as a therapeutic strategy? Expert Opin Investig Drugs. 2003; 12: 235-45.) Це викликає здивування, оскільки 2-ма роками раніше Річардсон та інші були переконані, що хелатори заліза повинні працювати, та пропонували логічне пояснення, чому деферіпрон може бути корисним (Richardson et al. Development of potential iron chelators for the treatment of Friedreich's ataxia: ligands that mobilize mitochondrial iron. Biochimica et Biophysica Acta 2001; 1536: 133-140). До 2004, він повністю знецінив деферіпрон та навіть не згадує його у огляді потенційних хелаторів при спадковій атаксії Фридрейха (Richardson DR. Novel chelators for central nervous system disorders that involve alterations in the metabolism of iron and other metal ions. Ann N Y Acad Sci. 2004; 1012: 326-41).

У світлі результатів, одержаних стосовно деферіпрону при лікуванні спадкової атаксії Фридрейха, та його здатності проникати у клітини та виводити залізо з мітохондрій, стає ясным, що ін-

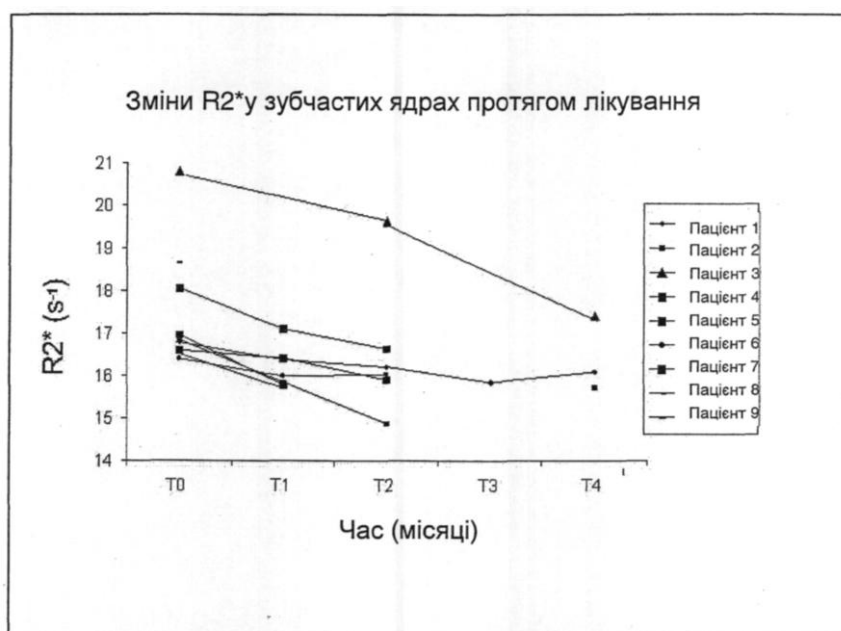
ший зазначений вище хелатор, деферазірокс, який може проходити крізь мембрани, та також може зменшувати внутрішньомітохондріальне накопичення заліза (Glickstein et al. Intracellular labile iron pools as direct targets of iron chelators: a fluorescence study of chelator action in living cells. Blood 2005; 106: 3242-50), повинний досягати тих же самих результатів.

Оскільки ключові фактори у цьому відкритті стосуються накопичення заліза у субклітинних частинах мозку, включаючи мітохондрії, та здатності проникати у клітини у оральних хелаторів заліза, подібних до деферіпрону та деферазіроксу, щоб виводити залізо з цих частин, то є резонним зробити висновок, що для інших станів, при яких присутній негативний обмін внутрішньоклітинного заліза є важливим фактором у розвитку патології, буде корисним лікування деферіпроном або деферазіроксом. Базуючись на МРТ оцінюванні збільшення заліза у різних клітинах усередині мозку, за відсутності загального надлишку заліза, це відкриття можна поширити на застосування деферіпрону або деферазіроксу при наступних станах: спадкова атаксія Фридрейха, хвороба Хантінгтона, хвороба Паркінсона, хвороба Альцгеймера, розсіяний склероз, гемохроматоз, синдром Голеворден-Шпатц, синдромом Дауна, та у оці людини з дистрофією жовтої плями (Haacke et al. Imaging iron stores in the brain using magnetic resonance imaging. Magn Reson Imaging. 2005 ; 23: 1-25).

Можна зробити багато змін стосовно винаходу, не виходячи за межі винаходу, що передбачає, що всі дані, які тут містяться, повинні розумітись як такі, що пояснюють винахід, та не обмежують його.



ФІГ. 1



ФІГ. 2