



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **112151** (13) **C2**
(51) МПК
A61K 38/45 (2006.01)
A61P 7/06 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

| | | | |
|---|--|--|---|
| (21) Номер заявки: | а 2012 00344 | (72) Винахідник(и): | Ауербах Брюс (US), Краус Брайан (US), Хомен Рейнолд (US) |
| (22) Дата подання заявки: | 14.06.2010 | (73) Власник(и): | МедІммун, ЕлЕлСі, One MedImmune Way, Gaithersburg, Maryland 20878, United States of America (US) |
| (24) Дата, з якої є чинними права на винахід: | 10.08.2016 | (74) Представник: | Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр. №115 |
| (31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: | 61/186,668, 61/241,223 | (56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: | WO 97/17434 A2, 15.05.1997 WO 01/05943 A2, 25.01.2001 WO 2009/015314 A2, 29.01.2009 SUDA T. ET AL.: "Alterations in erythrocyte membrane lipid and its fragility in a patient with familial lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT) deficiency" J. MED. INVEST., vol. 49, 2002, pages 147-155, XP002600465 |
| (32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: | 12.06.2009, 10.09.2009 | | |
| (33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: | US, US | | |
| (41) Публікація відомостей про заявку: | 10.02.2012, Бюл.№ 3 | | |
| (46) Публікація відомостей про видачу патенту: | 10.08.2016, Бюл.№ 15 | | |
| (86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ | PCT/US2010/038494, 14.06.2010 | | |

(54) ВИКОРИСТАННЯ ЛХАТ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ АНЕМІЇ Й ДИСФУНКЦІЇ ЧЕРВОНИХ КРОВ'ЯНИХ КЛІТИН

(57) Реферат:

Винахід стосується лікування анемії або дисфункції червоних кров'яних клітин пацієнта, який має стан, що характеризується анемією або дисфункцією червоних кров'яних клітин, де вказаний стан вибраний з групи, яка складається з серповидноклітинної хвороби, діабету, таласемії, ревматоїдної хвороби, аутоімунного захворювання, артриту, захворювання печінки, цирозу, гепатиту, акантоцитозу, сепсису, деменції, мікросудинного порушення, запального захворювання, паразитарної хвороби, еректильної дисфункції, раку, прееклампсії, критичного захворювання або травми, який включає введення пацієнтові терапевтично ефективної кількості лецитин-холестерин ацилтрансферази (ЛХАТ). Винахід також стосується способу оцінки поліпшення стану, що характеризується одним або більше з таких: анемія, червоні кров'яні клітини зі зниженою здатністю до деформації, знижена оксигенація ККК, підвищена агрегація або адгезія ККК, знижена функція оксиду азоту, знижена тривалість життя ККК, одним з етапів якого є введення пацієнту, який цього потребує, терапевтично ефективної кількості агента, який збільшує активність ЛХАТ, або збільшує рівень ЛХАТ в плазмі, або виробляє обидва ефекти.

UA 112151 C2

[0001] Дана заявка заявляє про пріоритет відповідно до Попередньої заявки на патент США, серійний номер 61/186,668, поданої 12 червня 2009, і Попередньої заявки на патент США, серійний номер 61/241,223, поданої 9 вересня 2010. Повний зміст Попередньої заявки на патент США, серійний номер 61/186,668 і Попередньої заявки на патент США, серійний номер 61/241,223 включено в цей документ шляхом посилання.

ГАЛУЗЬ ТЕХНІКИ

[0002] Даний винахід у цілому стосується сфери медицини й, зокрема, лікування хвороб, що характеризуються анемією й/або червоними кров'яними клітинами, що мають аномальні функції у відношенні деформованості, оксигенації, агрегації, метаболізму оксиду азоту або тривалості життя.

РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

[0003] Якість або кількість червоних кров'яних клітин (ЧКК), що знаходяться у кровотоці, часто знижується в періоди збільшеного фізичного навантаження, що веде до анемії й зростання ризику захворюваності й смертності. Фізичні навантаження, які пов'язані з розвитком анемії, включають автоімунні захворювання, великі оперативні втручання, травми, інфекційні хвороби, рак, критичні захворювання, діабет, хвороби печінки, хвороби нирок, серцеву недостатність і паразитарні хвороби. Системне запалення, про яке свідчать підвищені рівні запальних цитокінів у кровотоці є характерною загальною рисою всіх цих станів. Навіть у людях, схильних до анемії через гемоглобінопатію, наприклад, до серповидноклітинної хвороби або таласемії, рівень запальних цитокінів часто збільшений і може загострювати симптоми хвороби, особливо під час кризових епізодів.

[0004] Одним з наслідків підвищеного рівня запальних цитокінів є скорочення виробництва печінкою ферменту лецитин-холестерин ацилтрансферази (ЛХАТ). У нормі, ЛХАТ виділяється в плазму з печінки, щоб полегшити кругообіг ліпідів у плазмі й забезпечити баланс холестерину й фосфоліпідів у крові й тканинах, омиваних кров'ю. Надлишковий холестерин видаляється із тканин, таких як артерії, і доставляється в печінку для екскреції в складі жовчі за допомогою процесу, відомого як зворотний транспорт холестерину (ЗТХ). На першому етапі ЗТХ холестерин переходить із тканинних клітин у ліпопротеїни високої щільності (ЛВЩ) у кровотоці. На другому етапі фермент ЛХАТ збільшує здатність ЛВЩ до переносу холестерину шляхом каталізу трансестерифікації жирної кислоти від фосфатиділхоліну (ФХ) (також відомого як лецитин) до холестерину з формуванням холестеринового ефіру (ХЕ). Вироблений ХЕ накопичується в ядрі ЛВЩ доти, поки не видаляється ЛВЩ-рецепторами печінки. ХЕ, доставлений ЛВЩ у печінку, перетворюється в холестерин і жовчні кислоти, які виділяються в складі жовчі.

[0005] Наслідки для здоров'я, викликані зменшенням активності ЛХАТ у плазмі, найбільш очевидні в людей із сімейним дефіцитом ЛХАТ (СДЛ), рідким генетичним захворюванням, при якому активність ЛХАТ у плазмі відсутня. Відсутність активності ЛХАТ у плазмі веде до значного зниження вмісту в плазмі ХЕ, що відбивається на зниженні ЛВЩ і ліпопротеїну низької щільності й в акумуляції надлишкового субстрату ЛХАТ у плазмі. Головні наслідки СДЛ для здоров'я полягають у погіршенні зору в результаті дифузійного накопичення ліпідів у роговиці, можливому розладі нирок через акумуляцію ліпідів у нирках (гломерулосклероз) і гемолітичної анемії.

[0006] Відхилення в ліпідному складі ліпопротеїнів плазми через порушення ліпідного обміну такі як ті, що є результатом низької активності ЛХАТ, пов'язані зі змінами в вмісті ліпідів у ЧКК. Зміна ліпідів у ЧКК у відповідь на зміни ліпідів у плазмі, може змінити функціональність і виживаність ЧКК, тому що ці властивості залежать від вмісту ліпідів у клітині. Типи змін ліпідів ЧКК, які можуть мати місце, виявляються в пацієнтів, що страждають СДЛ, у яких ЧКК збагачені холестерином і ФХ і збіднені вмістом сфінгомієліном (СМ). Свідчення того, що ці аномалії ліпідів ЧКК залежать від ліпідних і ліпопротеїнових порушень у плазмі, що є результатом дефіциту ЛХАТ, було отримано в експерименті, де тимчасова нормалізація вмісту холестерину в ЧКК відбулася після переливання хворому СДЛ нормальної плазми (Miyama et al., Амер.ж-л. Гематол. 16:129-137,1984). Ця тимчасова нормалізація ліпідів ЧКК могла відбутися через поповнення ЛХАТ, ЛВЩ, аполіпопротеїну А-1 або інших факторів плазми, які відсутні або значно знижені у пацієнтів із СДЛ.

[0007] У менш важких випадках зменшення активності ЛХАТ в плазмі не спостерігається зв'язку між анемією й активністю ЛХАТ. Наприклад, пацієнти із захворюванням «риб'яче око», м'якої форми дефіциту ЛХАТ, проявляють активність ЛХАТ, що складає менш 30% від нормальної активності ЛХАТ у плазмі, але мають нормальний гемоглобін і гематокрит (Rousset et al. Загальноновизнані думки в галузі імунології, Діабет, ожиріння й обмін речовин, 16:163-171, 2009). Подібним чином, при вивченні пацієнтів із захворюваннями печінки не знайдено кореляції

між зниженою активністю ЛХАТ і анемією (L.W. Powell et al. (1975) Австралійський і Новозеландський медичний журнал, 5:101-107) або між активністю ЛХАТ і аномаліями ліпідів ЧКК (RA Coorper et al. (1972) Журнал клінічних досліджень, 51:3182-3192).

[0008] Хоча спостерігаються шкідливі зміни ліпідів ЧКК у тих, хто піддається фізичному стресу, подібні з тими, які виявляються в пацієнтів із СДЛ, явний зв'язок між ЛХАТ і рівнем ліпідів у ЧКК відсутній. Приклади аномальної композиції ліпідів ЧКК включають повідомлення про збільшене відношення ФХ/СМ у ЧКК, виділених з організму з пацієнтів із захворюванням печінки й пацієнтів з дисліпідемією внаслідок дефіциту ліпопротеїнової ліпази або хворобою Танжера. Ми і інші (Фіг.1) також виявили збільшення відношення ФХ/СМ у ЧКК пацієнтів із серповидноклітинною хворобою, що не перебувають у кризі. Крім того, є повідомлення про збільшення вмісту холестерину в ЧКК в осіб, що страждають діабетом, хворобами серця (включаючи гострі коронарні синдроми), гіперхолестеринемією, серповидноклітинною анемією, і в осіб після космічного польоту.

[0009] Наслідки модифікації ліпідної композиції ЧКК не до кінця відомі, але у випадку росту вмісту в ЧКК холестерину доведено, що активність мембранних протеїнів стає аномальною. Збагачені холестерином ЧКК пацієнтів із захворюваннями печінки показують знижену активність Mg^{++} АТФази й ацетилхолінестерази. Збагачення холестерином пов'язане з підвищенням переносом фосфатиділсерину від внутрішньої сторони клітинної мембрани до зовнішньої, що є сигналом для збільшення кліренсу ЧКК ретикулоендотеліальною системою. Збільшення холестерину ЧКК може знизити деформованість ЧКК і стати причиною аномальної морфології ЧКК, при цьому обоє явища можуть погіршити проходження еритроцитів через капіляри. Трансмембранний обмін газів, сутнісна функція ЧКК, також піддається впливу підвищення холестерину.

[0010] Сучасні дані говорять про те, що аномальна ліпідна композиція ЧКК може мати шкідливий вплив на функцію червоних кров'яних клітин і, отже, є потреба в способах нормалізації ліпідної композиції ЧКК і лікування дисфункції червоних кров'яних клітин.

СУТНІСТЬ ВИНАХОДУ

[0011] У літературі немає єдності щодо кореляції між ЛВЩ -Х (холестерином ліпопротеїнів високої щільності) і ендогенною активністю ЛХАТ. Ми зробили несподіване відкриття, що збільшення рівня ЛХАТ у плазмі шляхом ін'єкції рекомбінантної людської ЛХАТ викликає швидке видалення холестерину із тканин. Додатково, швидко збільшувався вміст ЛВЩ-Х. Обумовлені рівновагою, що існує між ЛВЩ і ЧКК, ці несподівані результати означають, що інфузія ЛХАТ також може бути використана для швидкої корекції ліпідних аномалій кров'яних клітин і поліпшити функцію кров'яних клітин.

[0012] Часто повідомляється, що рівні ЛВЩ-Х у плазмі зменшуються у випадках фізичного стресу, наприклад: автоімунних захворювань, великих оперативних втручань, травм, інфекційних хвороб, раку, критичних захворювань, діабету, хвороб печінки, хвороб нирок, серцевої недостатності й паразитарних хвороб, і можуть бути важливим фактором у виникненні відхилень ліпідної композиції ЧКК, у світлі прямого ліпідного обміну між ЧКК і ліпопротеїнами. Анемія широко поширена у випадках, де спостерігається зменшення ЛВЩ.

[0013] Даний винахід стосується способів модуляції вмісту ліпідів у мембранах червоних кров'яних клітин шляхом збільшення концентрації ЛХАТ і/або активності до рівнів, що перевищують нормальну концентрацію й/або активність ЛХАТ в організмі людини шляхом введення терапевтично ефективних доз ЛХАТ.

[0014] Одним з варіантів втілення винаходу є спосіб лікування пацієнта, що має стан, що характеризується дисфункцією червоних кров'яних клітин, шляхом введення йому терапевтично ефективної кількості ЛХАТ.

[0015] Іншим варіантом втілення винаходу є спосіб лікування пацієнта, що має стан, що характеризується анемією або червоними кров'яними клітинами зі зниженою деформованістю, зниженою оксигенацією, зниженою функцією оксиду азоту, збільшеною адгезією й/або агрегацією або зменшеним часом життя, або будь-якою комбінацією цих станів, шляхом введення пацієнтові, що потребує цього, терапевтично ефективної кількості ЛХАТ.

[0016] В іншому варіанті втілення винаходу спосіб лікування пацієнта, що має стан, що характеризується анемією або червоними кров'яними клітинами зі зниженою деформованістю, зниженою оксигенацією, зниженою функцією оксиду азоту, збільшеною адгезією й/або агрегацією або зменшеною тривалістю життя, будь-якою комбінацією цих станів, включаючи визначення вихідної деформованості ЧКК або оксигенації ЧКК або агрегації ЧКК або адгезії ЧКК або тривалості життя ЧКК, шляхом введення пацієнтові, що потребує цього, терапевтично ефективної кількості ЛХАТ, при цьому визначають зміни, викликані введенням ЛХАТ, за яких

збільшення деформованості ЧКК або оксигенації ЧКК або зменшення агрегації або адгезії ЧКК або збільшення тривалості життя ЧКК указує на поліпшення стану.

[0017] У деяких варіантах стан, при якому проводиться лікування, являє собою серповидноклітинну хворобу, діабет, таласемію, ревматоїдну хворобу, автоімунне захворювання, артрит, хворобу печінки, цироз, гепатит, акантоцитоз, сепсис, слабоуиствоанемію або мікросудинні розлади, запальні захворювання, паразитарне захворювання, еректильну дисфункцію, рак, прееклампсію, критичне захворювання або травму.

[0018] Інший варіант втілення винаходу є спосіб лікування пацієнта, що має стан, що характеризується високим рівнем ФХ у мембранах ЧКК, що включає введення пацієнтові, якщо буде потреба в цьому, терапевтично ефективної кількості ЛХАТ. Інший варіант втілення винаходу являє собою спосіб лікування пацієнта, що має стан, що характеризується високим рівнем ФХ у мембранах ЧКК, включаючи визначення вихідного відношення ФХ до ФЛ, шляхом введення пацієнтові, якщо буде потреба в цьому, терапевтично ефективної кількості ЛХАТ та визначення співвідношення ФХ до ФЛ, що має місце після введення ЛХАТ, при цьому зменшення відношення ФХ до ФЛ указує на поліпшення стану. Інший варіант втілення винаходу являє собою спосіб зменшення вмісту ФХ у кров'яних клітинах пацієнта, що включає в себе призначення пацієнтові терапевтично ефективної кількості ЛХАТ.

[0019] Інший варіант втілення винаходу являє собою спосіб лікування пацієнта, що має стан, що характеризується збільшенням співвідношення ФХ/СМ у мембранах ЧКК, що включає введення пацієнтові, якщо буде потреба в цьому, терапевтично ефективної кількості ЛХАТ. Інший варіант втілення винаходу являє собою спосіб лікування пацієнта, що має стан, що характеризується збільшенням співвідношення ФХ/СМ у мембранах ЧКК, що включає визначення вихідного співвідношення ФХ/СМ, шляхом введення пацієнтові, якщо буде потреба в цьому, терапевтично ефективного кількості ЛХАТ і визначення співвідношення ФХ/СМ після введення ЛХАТ, при цьому зменшення відношення ФХ до СМ указує на поліпшення стану. Інший варіант втілення винаходу являє собою спосіб зменшення співвідношення ФХ/СМ кров'яних клітин пацієнта, що включає введення пацієнтові терапевтично ефективної кількості ЛХАТ.

КОРОТКИЙ ОПИС ФІГУР

[0020] Фігура 1 показує фосфоліпідну композицію ЧКК нормальних пацієнтів і пацієнтів із серповидноклітинною хворобою.

[0021] Фігура 2 являє собою графік, що зображує збільшення рівня ЛВЩ-Х у плазмі трансгенних мишей з геном, що кодує людський аполіпопротеїн А-1, після ін'єкції ЛХАТ.

[0022] Фігура 3 зображує вміст холестерину в тканинах трансгенних мишей гібридної лінії, у яких сполучається нокаут гена ЛХАТ і експресія аполіпопротеїна А-1, після ін'єкції рекомбінантної людської ЛХАТ.

ДОКЛАДНИЙ ОПИС ВІНАХОДУ

[0023] Термін «терапевтично ефективна кількість», використовуваний у даному документі, означає кількість ЛХАТ, введену відповідно до бажаного режиму лікування, при якому буде виявлено бажаний терапевтичний ефект або відгук. Краще терапевтично ефективна кількість являє собою таку кількість ЛХАТ, що збільшує рівень значень ЛХАТ у плазмі до значень, що перевищують нормальні.

[0024] Використовуваний у даному документі термін «рівень ЛХАТ» стосується концентрації ЛХАТ у плазмі.

[0025] Використовуваний у даному документі термін «нормальний рівень» ЛХАТ означає концентрацію ЛХАТ у плазмі, що має середньо здоровий суб'єкт, що не проходив лікування, що не одержує в цей момент ніяких медикаментів, які могли б змінити рівні ЛХАТ. «Нормальний рівень» і «ендогенний рівень» використовуються тут взаємозамінним чином.

[0026] Щоб уникнути сумніву, наявні посилання на «лікування» і «спосіб лікування» включають в даному документі цілюще, паліативне й профілактичне лікування.

[0027] «Суб'єкт» і «Пацієнт» використовуються взаємозамінним чином.

[0028] «Між» використовується в даному документі з посиланням на ефективну кількість або об'єднану дозу, включно, наприклад, «між 1 мг і 5000 мг» включає 1 мг і 5000 мг.

[0029] «Від» використовується в даному документі з посиланням на ефективну кількість або єдину дозу, включно, наприклад, «від 1 мг до 5000 мг» включає 1 мг і 5000 мг.

[0030] «ВХ» є аббревіатурою для вільного холестерину, і у використовуваному в даному документі значенні означає не-етерифікований холестерин.

[0031] «Функція оксиду азоту» означає процеси, у яких ЧКК відіграють роль посередника, і які залежать від оксиду азоту, включаючи виробництво оксиду азоту, доставку оксиду азоту в

мікросудини, інгібування адгезії тромбоцитів і лейкоцитів, вазодилатацію, деформованість ЧКК і виживаність ЧКК.

[0032] «ФХ» є аббревіатурою для фосфатиділхоліну.

[0033] «СМ» є аббревіатурою для сфінгомієліну.

5 [0034] «Деформованість ЧКК» означає здатність клітин адаптувати свою форму до динамічно мінливих умов потоку в напрямку мінімізації їхнього опору потокові й забезпечення їхнього проходження крізь просвіт дрібних кровоносних судин. Знижена деформованість прирівнюється до збільшеної твердості.

10 [0035] «Вектор генної терапії» означає агент, що використовується для впровадження й активізації експресії цільового гену в хромосомах клітин паренхімної тканини. Наприклад, аденовірус, перебудований, щоб нести ген ЛХАТ людини.

[0036] «Осмотична крихкість» означає чутливість клітин до розриву через зміни навколишнього осмотичного тиску.

15 [0037] «Агрегованість ЧКК» означає здатність формувати багатоклітинні агрегати, звичайно у формі монетних стовпчиків, у присутності білків плазми або інших макромолекул.

[0038] «ЛХАТ» використовується взаємозамінним чином з « лецитин-холестерин ацилтрансферазою».

20 [0039] «ЛХАТ» або «ЛХАТ поліпептид», як використовуються в даному документі, включають нативну послідовність ЛХАТ, варіанти ЛХАТ, модифіковану ЛХАТ і химерну ЛХАТ. Щоб точно визначити позиції амінокислот у послідовності ЛХАТ, виконується посилання на послідовність SEQ ID NO: 1

Людська ЛХАТ SEQ ID NO: 1 (Код доступу Генбанку № AAB34898)

```
FWLLNVLFPP HTTPKAELSN HTRPVILVPG CLGNQLEAKL
DKPDVWNWMC YRKTEDEFTI WLDLNMFLCL GVDCWIDNTR
VVYNRSSGLV SNAPGVQIRV PGFGKTYSE YLDSSKLAGY
LHTLVQNLVN NGYVRDETVR AAPYDWRLEP GQQEEYYRKL
AGLVEEMHAA YGKPVFLIGH SLGCLHLLYF LLRQPQAWKD
RFIDGFISLG APWGGSIKPM LVLASGDNQG IPIMSSIKLK
EEQRITTTSP WMFPSRMAWP EDHVFISTPS FNYTGRDFQR
FFADLHFEEG WYMWLQSRDL LAGLPAPGVE VYCLYGVGLP
TPRTYIYDHG FPYTDPVGV L YEDGDDTVAT RSTELCGLWQ
GRQPQPVHLL PLHGIQHLNM VFSNLTLEHI NAILLGAYRQ
GPFASPTASP EPPPE
```

25

[0040] Специфічні амінокислоти в білковій послідовності нативної людської ЛХАТ записані з використанням однобуквених позначень амінокислот, що слідує одна за одною у білковій послідовності, наприклад W2 означає, що позицію 2 займає триптофан. Щоб представити заміщення в конкретній позиції, що заміщає амінокислота ставиться наступною в цю ж позицію, наприклад W2Y означає, що триптофан у позиції 2 заміщений тирозином.

30

[0041] «Нативна послідовність ЛХАТ» включає поліпептид, що має амінокислотну послідовність, однакову із ЛХАТ, виділеної із природного об'єкта. Так, нативна послідовність ЛХАТ специфічно містить у собі усічені форми, що зустрічаються в природних умовах, ЛХАТ, що зустрічаються в природних умовах алельні варіанти ЛХАТ, а також різні форми (наприклад, форми, що походять від альтернативного сплайсинга). Краща нативна послідовність ЛХАТ - зріла нативна послідовність ЛХАТ.

35

[0042] «Модифікована ЛХАТ» означає поліпептид, де одна або більше амінокислоти в нативному поліпептиді ЛХАТ заміщена іншою амінокислотою, або одна або більше амінокислот додані до частини нативного поліпептиду, включаючи, не обмежуючись ними, N-кінцеві й C-кінцеві амінокислоти. Як необмежуючий приклад модифікована ЛХАТ може бути представлена модифікованим білком ЛХАТ, описаним у попередній заявці на патент США № 12/179,815. В інших варіантах втілення винаходу одна або більше амінокислот заміщені шляхом консервативного заміщення. Не-обмежуючі приклади консервативних заміщень наведені в Таблиці 2. В інших варіантах втілення винаходу одна або більше амінокислот заміщені амінокислотою, що не зустрічається в природних умовах. Додатково, модифіковані поліпептиди ЛХАТ включають похідні ЛХАТ або модифіковану ЛХАТ. Ці похідні можуть, наприклад, поліпшувати розчинність, абсорбцію, біологічну тривалість напівжиття поліпептидів. Похідні поліпептидів добре відомі фахівцям в даній галузі. Отже фахівцям даної галузі буде відомо, як змінити поліпептиди, щоб поліпшити їхні фармакологічні властивості.

50

ТАБЛИЦЯ 2

| Вихідний залишок | Зразкові консервативні заміщення |
|------------------|----------------------------------|
| A | G, S |
| R | K |
| N | Q, H |
| D | E |
| C | S |
| Q | N |
| E | D |
| G | A, P |
| H | N, Q |
| I | L, V |
| L | I, V |
| K | R, Q, E |
| M | L, Y, I |
| F | M, L, Y |
| S | T |
| T | S |
| W | Y |
| Tyr | W, F |
| Val | I, L |

[0043] Даний винахід спрямований на способи лікування пацієнтів, що мають стани, що характеризуються анемією або дисфункцією червоних кров'яних клітин, введенням пацієнтові, що потребує цього, агенту, що збільшує активність ЛХАТ або збільшує рівень ЛХАТ у плазмі, або виконує обидва ефекти. Рівень ЛХАТ і/або активність ЛХАТ можуть бути збільшені будь-якими доступними способами. Це включає, без обмеження, пряме введення ЛХАТ, експресію ЛХАТ за допомогою генної терапії й спрямовану на підвищення рівня регуляцію ендогенної ЛХАТ за допомогою введення ліків.

[0044] В одному із прикладів рівень ЛХАТ і/або активність ЛХАТ збільшується прямим введенням ЛХАТ. Переважно, ЛХАТ, що вводять у способах згідно з цим винаходом, являє собою продукovanу рекомбінантним шляхом людську ЛХАТ (наприклад, з використанням тварин, клітин ссавців, грибів, клітин комах або рослин як системи для експресії рекомбінантного білка). Способи виробництва білків рекомбінантним шляхом добре відомі фахівцям. ЛХАТ також може бути отримана будь-яким підходящим способом, наприклад, шляхом виділення з людської плазми. ЛХАТ може бути підготовлена у формах постійного об'єму або єдиної дози. В одному з варіантів рівень активності ЛХАТ збільшується шляхом використання генної терапії. Використовуваний тут термін «генна терапія» стосується переносу й, переважно, стійкої інтеграції нової генетичної інформації в клітини суб'єкта. Способи збільшення рівнів активності ЛХАТ шляхом генної терапії мають на увазі трансфіковані клітини з нуклеїновою кислотою, що містить послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує експресію ЛХАТ. Трансфіковані клітини здійснюють експресію ЛХАТ і виділяють її в плазму суб'єкта. Клітини трансфікуються у достатній кількості або такій, щоб забезпечити експресію ЛХАТ, достатню для збільшення кількості ЛХАТ до терапевтично ефективного рівня. Гени, що кодують ЛХАТ, можуть бути введені суб'єктові будь-яким підходящим способом. В одному з варіантів втілення винаходу гени впроваджуються в клітини індивіда in-vivo за допомогою векторів експресії. В іншому варіанті втілення винаходу гени вводяться в клітини ex-vivo, і трансфіковані клітини, які здійснюють експресію й секрецію ЛХАТ, вводяться суб'єктові. У підходах in-vivo мішенями трансфекції є клітини печінки. Клітини печінки продукують ЛХАТ, тому що вони мають

можливості для вироблення рекомбінантного білку. Крім того, вектори, ін'єковані в кровоток, швидко проходять крізь печінку, так що клітини печінки швидше інших піддаються впливові векторів. Кровотворні стовбурні клітини також використовуються як мішені для генної терапії, тому що вони швидко розмножуються, тим самим створюючи більшу кількість клітин, здатних продукувати ЛХАТ. Підходи ex-vivo також привабливі, тому що вони допускають більший контроль над процесом трансфекції. Наприклад, трансфіковані клітини можуть бути протестовані й вибрані ті, які здійснюють експресію ЛХАТ у найбільш високих кількостях. Кровотворні стовбурні клітини можуть бути взяті в суб'єкта, трансфікуються ex-vivo і повторно вводяться пацієнтові. Тому, в одному з варіантів втілення винаходу клітини являють собою клітини суб'єкта. Способи трансфікування генів в клітини ссавців, як in-vivo, так і ex-vivo, і досягання їхньої експресії добре відомі фахівцям в даній галузі.

[0045] Даний винахід стосується способів модуляції вмісту ліпідів мембран червоних кров'яних клітин шляхом підвищення рівнів вмісту або активності ЛХАТ понад нормальні рівні вмісту ЛХАТ у людському організмі. Одним з варіантів втілення винаходу є спосіб лікування пацієнта, що має стан, що характеризується дисфункцією червоних кров'яних клітин, що включає в себе введення суб'єктові терапевтично ефективної кількості ЛХАТ. Іншим варіантом втілення є спосіб лікування пацієнта, що має стан, що характеризується дисфункцією червоних кров'яних клітин, що включає введення суб'єктові терапевтично ефективної кількості ліків, що збільшують ендогенне продукування ЛХАТ або збільшують активність ЛХАТ. В особливих варіантах втілення винаходу ліки являють собою маленьку молекулу терапевтичного агента.

[0046] Деякі варіанти втілення винаходу спрямовані на способи нормалізації вмісту ВХ клітинних мембран ЧКК шляхом збільшення рівнів ЛХАТ або активності ЛХАТ в організмі пацієнта, що має потребу в цьому. Один з варіантів згідно із цим винаходом являє собою спосіб лікування пацієнта, що має стан, що характеризується наявністю ЧКК зі збільшеним вмістом ВХ, шляхом введення терапевтично ефективної дози ЛХАТ пацієнтові, що цього потребує. Збільшення рівнів ЛХАТ швидко викликає чистий перехід ВХ із ЧКК у ЛВЩ, у такий спосіб змінюючи композицію мембрани ЧКК у напрямку більш текучого стану. Ця дія збільшує оксигенацію ЧКК, поліпшує реологію (збільшує деформованість, плинність, зменшує екстерналізацію фосфатиділсерину, зменшує схильність до адгезії й агрегації), зменшує анемію (зменшує механічний стрес і деструкцію, зв'язані зі зниженням деформованості, збільшує тривалість життя ЧКК) і збільшує здатність ЧКК до оксигенації тканин, особливо периферичних тканин. У деяких варіантах втілення винаходу еритропоез збільшується внаслідок введення терапевтично ефективної кількості ЛХАТ. У деяких варіантах втілення винаходу функція оксиду азоту збільшується після введення терапевтично ефективної кількості ЛХАТ. Існує багато станів, за яких клітинні мембрани ЧКК мають підвищені рівні ВХ стосовно рівнів вмісту фосфоліпідів. Збільшення вмісту ВХ у мембранах кров'яних клітин присутня в ряді хворобливих станів, включаючи, не обмежуючись ними, серповидноклітинну хворобу, діабет, таласемію, ревматоїдну хворобу, автоімунне захворювання, артрит, захворювання печінки, цироз, гепатит, акантоцитоз, сепсис, деменцію, анемію або мікросудинні порушення, запальні захворювання, паразитарні хвороби, еректильну дисфункцію, рак, прееклампсію, критичне захворювання або травму.

[0047] Незважаючи на відсутність у цих захворюваннях первинної патології, зміна композиції й функції ЧКК веде до загострення захворюваності підлеглими розладами. Таким чином, одним з варіантів втілення винаходу є спосіб лікування пацієнта із серповидноклітинною хворобою, діабетом, таласемією, ревматоїдною хворобою, автоімунним захворюванням, артритом, захворюванням печінки, цирозом, гепатитом, акантацитозом, сепсисом, деменцією, анемією або мікросудинними порушеннями, запальними захворюваннями, паразитарними хворобами, еректильною дисфункцією, раком, пре еклампсією, критичним захворюванням або травмою шляхом введення терапевтично ефективної дози ЛХАТ пацієнтові, що потребує цього.

[0048] Мутації гена гемоглобіну, такі, як спостережувані при серповидноклітинній хворобі (СКХ), таласеміях і формуванні гемоглобіну Е (Гб Е), можуть виразитися у ряді патологій, які зменшують деформованість ЧКК і їхню здатність переносити/доставляти кисень. Наприклад, СКХ являє собою спадкоємний розлад, викликаний одиночним заміщенням амінокислоти в субодиниці бета-глобуліну або гемоглобіну (Гб ІЗ). В умовах низького вмісту кисню Гбс полімеризується (піддається агрегації), що призводить до зміни форми ЧКК із нормальної ввігнутої в «серповидну». Формування твердих полімерів Гбс зменшує еластичність або деформованість ЧКК, що шкодить їхній функції, тому що для оксигенації тканин вони повинні бути здатні багаторазово проходити крізь капіляри, у чотири рази менше їхнього власного розміру. Отже, серповидна форма веде до вазооклюзивного розладу через оклюзію посткапілярних венул всіх розмірів і збільшує крихкість ЧКК, призводячи до їхнього лізису й

гемолітичної анемії. Хоча вироблення серповидноклітинних еритроцитів при низькому вмісті кисню викликає гостру кризу і головні проблеми, пов'язані із цим захворюванням, не піддані серповидноклітинній деформації ЧКК пацієнтів, при нормальному вмісті кисню, мають більш тверді мембрани зі зниженою деформованістю й підвищеною здатністю до агрегації. Хімічний аналіз мембран еритроцитів пацієнтів із СКХ також показує збільшення вмісту ВХ. Додатково ці пацієнти мають низький рівень ЛВЩ зі зниженим вмістом холестеринового ефіру (ЛЕ), що припускає знижену активність ЛХАТ або функціональний дефіцит ЛХАТ. Фактично, в одному з досліджень було показано зменшення на 30% активності ЛХАТ у пацієнтів зі СКХ. Відповідно, один з варіантів втілення винаходу представляє спосіб лікування пацієнта, що має серповидноклітинну хворобу, введенням пацієнтові, що цього потребує, терапевтично ефективної кількості ЛХАТ.

[0049] Ін'єкування високих рівнів ЛХАТ, наприклад, кількості, що приводить до збільшення ендогенної активності ЛХАТ від двохразового до 1000-разового в пацієнтів зі СКХ, викликало б вихід ВХ із ЧКК і супутнє збільшення рівнів ЛВЩ-Х у плазмі. Зниження вмісту ВХ у ЧКК привело б до збільшення деформованості ЧКК і поліпшило б рівень кисневого обміну. Поліпшена функція ЧКК може зменшити випадки оклюзії, як через поліпшену здатність крові до потоку, так і через знижений рівень вироблення серповидноклітинних еритроцитів (завдяки кращій ре-оксигенації ЧКК). В іншому варіанті втілення винаходу введення терапевтично ефективної кількості ЛХАТ пацієнтові, що потребує цього, збільшує деформованість ЧКК і оксигенацію ЧКК. У деяких варіантах втілення винаходу тривалість життя ЧКК збільшується внаслідок введення ЛХАТ.

[0050] У випадку захворювання печінки вміст холестерину в ЧКК зростає і часто виникає анемія. Терапія ЛХАТ буде нормалізувати вміст холестерину в ЧКК, відновлювати нормальну форму й функцію, підданих впливу ЧКК, знижувати деструкцію ЧКК, збільшувати тривалість їхнього життя, тим самим зменшуючи схильність до анемії. Таким чином, ще одним варіантом втілення винаходу є спосіб лікування пацієнта, що страждає анемією, шляхом введення пацієнтові терапевтично ефективної кількості ЛХАТ.

[0051] Анемія мішеневидних клітин і шпоровидних клітин (акантоцитоз). Шпоровидні клітини й мішеневидні клітини мають збільшений вміст ВХ, що веде до зниження функції й збільшення гемолізу й анемії.

[0052] У станах таких, як сепсис, ревматичні хвороби й запальні захворювання (включаючи анемію запалення) існує безліч патологій, таких, як зниження деформованості ЧКК і аномальна реологія, які ведуть до подальших ускладнень. Шкода, нанесена системам тканин і органів через знижену оксигенацію й збільшену агрегацію ЧКК, веде до росту захворюваності й смертності, починаючи з ініціального запального удару. Отже, ще один варіант втілення винаходу є спосіб зменшення агрегованості ЧКК шляхом введення пацієнтові, що потребує цього, терапевтично ефективної кількості ЛХАТ. ЛХАТ може також впливати на окислені фосфоліпіди, що з'являються в період запалення. Окислені ліпіди дуже реактивні й можуть збільшити шкоду, що наноситься клітинам і системам органів. Нормалізація ліпідів мембран ЧКК поліпшила б потік крові й оксигенацію тканин і зменшила б концентрацію реактивних окислених ліпідів. Це було б корисно після оперативних втручань, де сховані інфекції можуть знижувати функцію ЧКК, збільшуючи час загоєння ран.

[0053] Мікросудинні розлади можуть траплятися, коли збільшується вміст ВХ у ЧКК, таким чином викликаючи твердість, збільшуючи адгезію й агрегованість ЧКК. Ці зміни збільшуються при слабкому потоці (або низькому тиску) крові, що виявляється в капілярах і венулах. Коли ЧКК не здатні деформуватися правильно, їхнє проходження істотно вповільнюється в цих дрібних судинах. Зі збільшенням схильності до агрегації й адгезії з'являється висока ймовірність блокади периферичних судин. В органах, де мікросудини є критичними для нормального функціонування (наприклад, очах, вухах, мозку, нирках, пенісі, легенів), повторні ішемічні події в цих судинах можуть призвести до втрати функції (наприклад, сліпоти, втрати слуху, ниркової недостатності, ішемічної мікросудинної поразки мозку (наприклад, деменції, хвороби Альцгеймера), еректильної дисфункції). Лікування ЛХАТ зменшило б вміст ВХ у ЧКК, поліпшило реологію ЧКК, знизило б ризик подальшого виникнення судинних блоkad і припинило б ушкодження органів.

[0054] Як показано в Прикладі 1 даного винаходу, миші із приблизно 30-кратним нормальним рівнем активності ЛХАТ мали збільшену масу ЧКК у порівнянні з нормальними мишами, що показує, що активність ЛХАТ є головним чинником у регуляції маси ЧКК, і у зв'язку із цим може лімітувати її рівень.

[0055] Таким чином, введення високої дози ЛХАТ, наприклад, у діапазоні від 1-кратної до 1000-кратної від ендогенного рівня ЛХАТ або від 1-кратної до 500-кратної від ендогенного рівня

ЛХАТ або від 1-кратної до 100-кратної від ендogenousного рівня ЛХАТ пацієнтові, що має стан, що характеризується аномальною реологією (анемія, знижена деформованість, збільшена агрегація, знижена плинність, зменшена тривалість життя ЧКК) привело б до поліпшення стану.

[0056] Таким чином, ще один варіант втілення винаходу представляє спосіб лікування пацієнта із серповидноклітинною хворобою, діабетом, таласемією, ревматоїдною хворобою, автоімунним захворюванням, артритом, захворюванням печінки, цирозом, гепатитом, акантоцитозом, сепсисом, деменцією, анемією або мікросудинним розладом, запальним захворюванням, паразитарною хворобою, еректильною дисфункцією, раком, прееклампсією, критичним захворюванням або травмою шляхом введення терапевтично ефективної дози ЛХАТ. Ще одним варіантом втілення даного винаходу є спосіб лікування пацієнта із серповидноклітинною хворобою, таласемією, ревматоїдною хворобою, автоімунним захворюванням, артритом, захворюванням печінки, цирозом, гепатитом, акантоцитозом, сепсисом, деменцією, анемією або мікросудинним розладом, запальним захворюванням, паразитарною хворобою, еректильною дисфункцією, раком, прееклампсією, критичним захворюванням або травмою шляхом введення ліків, що збільшує активність ЛХАТ або рівень її вмісту. У кращих варіантах втілення даного винаходу ліки являють собою маленьку молекулу, що володіє терапевтичною дією. В іншому варіанті втілення даного винаходу рівень ЛХАТ та/або активність ЛХАТ збільшуються за допомогою генної терапії.

[0057] Ще один варіант втілення даного винаходу являє собою спосіб лікування пацієнта, що страждає деменцією, пов'язаною із хворобою Альцгеймера, шляхом введення терапевтично ефективної дози ЛХАТ. Інший варіант являє собою спосіб лікування пацієнта із серповидноклітинною хворобою, діабетом, таласемією, ревматоїдною хворобою, автоімунним захворюванням, артритом, захворюванням печінки, цирозом, гепатитом, акантоцитозом, сепсисом, деменцією, анемією або мікросудинним розладом, запальним захворюванням, паразитарною хворобою, еректильною дисфункцією, раком, прееклампсією, критичним захворюванням або травмою шляхом введення терапевтично ефективної дози модифікованої ЛХАТ. У деяких варіантах втілення даного винаходу модифікована ЛХАТ містить консервативну амінокислотну заміну. У деяких варіантах втілення даного винаходу модифікована ЛХАТ містить заміщення в позиції F1, L3, N5, L7, C31, N384 або E416. У різних варіантах втілення даного винаходу модифікована ЛХАТ містить амінокислотне заміщення в позиції 31. В інших варіантах втілення даного винаходу модифікована ЛХАТ містить C31Y заміщення й заміщення одного або більше амінокислотних залишків F1, L4, L32, N34. У іншому варіанті втілення даного винаходу модифікована ЛХАТ містить заміщення C31Y та одне або більше із наступних заміщень: F1S, F1W, L4M, L4K, N34S, L32F або L32H. У різних варіантах втілення даного винаходу модифікована ЛХАТ містить одне або більше з наступних заміщень: F1A, F1G, F1I, F1L, F1M, F1P, F1V, F1Y, F1T, F1Q, F1N, F1H, F1D, L3I, L3F, L3C, L3W, L3Y, L4A, L4I, L4M, L4F, L4V, L4W, L4Y, L4T, L4Q, L4R, N5A, N5M, N5H, N5K, N5D, N5E, L7M, L7R, L7E, C31A, C31I, C31M, C31F, C31V, C31W, C31Y, C31T, C31R, C31H, N384C, N384Q або E416C. В інших варіантах втілення даного винаходу рівень ЛХАТ у пацієнта збільшується з використанням техніки генної терапії. В інших варіантах втілення даного винаходу експресія ЛХАТ підвищується за допомогою введення ліків.

[0058] У способах, згідно з даним винаходом, ЛХАТ звичайно вводиться суб'єктові в складі фармацевтичної композиції, що включає фармацевтично прийнятний носій або розріджувач. Фармацевтична композиція може бути створена відповідно до звичайних методик, як фармацевтична композиція, адаптована до вибраного шляху введення препарату, тобто пероральним, парентеральним, внутрішньовенним, внутрішньовим або підшкірним шляхом.

[0059] Фармацевтичні композиції, що підходять для доставки сполук згідно до даного винаходу, і способи їхнього виготовлення легко можуть бути знайдені фахівцями в даній галузі. Такі композиції й способи їхнього виготовлення можуть бути знайдені, наприклад, у написаній Ремінгтоном книзі 'Фармацевтичні науки', 19-те видання (Mack Publishing Company, 1995).

[0060] Композиції можуть мати такі форми як суспензії, розчини, емульсії з масляним або водним носієм і можуть містити спеціальні агенти, такі як суспендувальні агенти, стабілізатори і/або диспергатори. Як альтернатива активна речовина може мати вигляд порошку для сполуки перед використанням з підходящим носієм, наприклад, стерильною апірогенною водою. Звичайно такі композиції являють собою розчини в стерильному ізотонічному водному буфері. Композиції можуть являти собою герметично закупорений контейнер, такий як ампула, шприц або флакон, з додаванням або без додавання консерванту.

[0061] Рідкий носій може являти собою розчинник або рідке дисперсійне середовище, включаючи, наприклад, воду, етанол, поліол (наприклад, гліцерин, пропіленгліколь, рідкі поліетиленгліколи й т.п.), рослинні масла, нетоксичні гліцеріолові ефіри або підходящі суміші цих

речовин. Потрібна рухливість може бути досягнута, наприклад, шляхом формування ліпосом, створення необхідного розміру часток у випадку дисперсії або шляхом використання поверхнево-активних речовин. Запобігання впливу мікроорганізмів може бути досягнуто використанням різних антибактеріальних і протигрибкових засобів, наприклад, парабенів, хлоробутанолу, фенолу, сорбінової кислоти, тімеросалу й т.п. У багатьох випадках було б переважно включати ізотонічні агенти, наприклад, цукри, буфери або хлорид натрію. Пролонгована абсорбція композицій для ін'єкцій може бути створена шляхом використання в якості інгредієнтів агентів, що затримують абсорбцію, наприклад, алюмінію моностеарату й желатину.

[0062] Згідно із даним винаходом, ЛХАТ може бути використана окремо або в комбінованій терапії з іншими ліками, використовуваними для лікування при вищевказаних станах. Така терапія включає, не обмежуючись ними, одночасне або послідовне застосування підібраних ліків. Наприклад, ЛХАТ може бути введена разом з ліками, які звичайно використовуються у конкретному стані. Наприклад, ЛХАТ може вводитися разом з агентами-стимуляторами еритропоеза (ACE), такими як еритропоетин, метоксіполіетилен-гліколь-епоетин бета, дарбепоєтин альфа, роміплостим і епоєтин альфа для лікування анемії. Або наприклад, ЛХАТ може бути введена в сполученні з гідроксімочевиною, гідроксікарбамідом, децитабином або бутиратом для лікування серповидноклітинної хвороби.

[0063] В одному з варіантів втілення винаходу терапевтично активна кількість ЛХАТ вводиться у вигляді підшкірної ін'єкції. В іншому варіанті втілення винаходу терапевтично ефективна кількість ЛХАТ вводиться у вигляді внутрішньозової ін'єкції. В іншому варіанті втілення винаходу терапевтично ефективна кількість ЛХАТ вводиться у вигляді внутрішньовенної ін'єкції або інфузії. У деяких варіантах втілення винаходу терапевтично ефективна кількість ЛХАТ становить від 1 мг до 5000 мг, або від 1 мг до 2000 мг, або від 10 мг до 5000 мг або від 10 мг до 1000мг, або від 10 мг до 500 мг, або від 5 мг до 100 мг.

[0064] У деяких варіантах втілення винаходу терапевтично ефективна кількість ЛХАТ знаходиться в діапазоні від 1- до 1000-кратного, від 25- до 1000-кратного, від 50- до 1000-кратного, від 1-до 100-кратного, від 50- до 500-кратного, від 1-до 500-кратного від ендogenous рівня ЛХАТ.

[0065] Використовуване специфічне дозування може змінюватися. Наприклад, дозування може залежати від ряду факторів, включаючи, не обмежуючись ними, частоту дозування, специфічну активність рекомбінантного ензиму ЛХАТ, масу тіла пацієнта, особливі вимоги пацієнта, особливі стани пацієнта (наприклад, аномальні функції нирок або печінки), стан, що піддається лікуванню й т.д. Частота й сума дозування можуть, по розсуду лікаря, вийти за межі звичайного діапазону, наведеного в даному документі. Ці дози розраховані на середнього людського суб'єкта, що має вагу близько 60-70 кг. Способи визначення оптимальних доз для конкретного пацієнта добре відомі фахівцям. Лікар буде здатний легко визначити дози суб'єктам, чия вага виходить за зазначені межі, такі як діти й люди похилого віку.

[0066] Залежно від розладу й пацієнта, що піддається лікуванню, фахівець (тобто лікар) може встановити, що підходящою є початкова доза, що вище, ніж наступні дози. Наприклад, пацієнтові із серповидноклітинною хворобою, що перебуває в стані кризи, може бути введена початкова доза, що в 30 разів перевищує «нормальний» рівень. Як тільки рівень оксигенації ЧКК пацієнта досягає бажаного рівня, доза може бути зменшена, наприклад, до 3-кратного «нормального» рівня.

[0067] Ефективність особливої дози може бути визначена посиленням на біомаркери або поліпшення окремих фізіологічних параметрів. Підходящі біомаркери включають, не обмежуючись ними, відношення FC до PL, FC до мембранного білку, FX до CM або рівні ЛВЩ-Х. Підходящі фізіологічні параметри включають, не обмежуючись ними, зменшення анемії, поліпшення реології, вимірюване як збільшення деформованості ЧКК, плинності крові й/або агрегованості ЧКК, осмотичну крихкість або рівень оксигенації ЧКК, причому збільшення кожного із цих параметрів свідчить про поліпшення. Вимір рівнів біомаркерів і параметрів, описаних вище, може бути зроблене з використанням способів, добре відомих у науці. Наприклад, зменшення анемії може бути обмірюване за збільшенням гематокриту або гемоглобіну або продуктів розпаду гемоглобіну (наприклад, некон'югованого білірубину), обмірюваних стандартними, добре обґрунтованими клінічними методами. Деформованість може бути обмірювана шляхом фільтрації, віскозиметрії, ектацитометрії й шляхом застосування мікропіпеток. Агрегація може бути обмірювана за допомогою різних інструментів, включаючи ектацитометри й агрегометри. Оксигенація ЧКК може бути обмірювана шляхом стандартної пульсоксиметрії або аналізу газів крові. Оксигенація тканин може бути обмірювана прямим зондуванням з використанням тонометрів із сиеластика, з кисневими сенсорами. Фахівець

зрозуміє значення результатів і зможе вибрати дозу, відрегульовану на підставі визначень, таких, як описані вище.

[0068] Як описано в Прикладі 4 і показано на фігурі 2, в результаті введення ЛХАТ трансгенним мишам, в організмі яких присутній ген людського апополіпротеїна А-1, збільшилися рівні ЛПВ-Х у плазмі. Збільшення відбулися зненацька швидко; рівні ЛПВ-Х в плазмі збільшилися приблизно на 70% від контролю за 4 години й приблизно на 120% за 24 години. Таким чином, іншим варіантом втілення винаходу є спосіб лікування пацієнта, що має стан, що характеризується анемією або дисфункцією червоних кров'яних клітин, включаючи введення суб'єктові, що потребує цього, терапевтично ефективної кількості ЛХАТ, коли рівні ЛПВ-Х у плазмі суб'єкта швидко збільшуються після введення ЛХАТ. В особливому варіанті рівень ЛПВ-Х у плазмі суб'єкта через 4 години після введення ЛХАТ збільшується щонайменше на 30%, або щонайменше на 40%, або щонайменше на 50%, або щонайменше на 70% або щонайменше на 80% у порівнянні з рівнем ЛВЩ-Х перед введенням ЛХАТ. У ще одному варіанті втілення винаходу рівень ЛВЩ-Х у плазмі суб'єкта через 12 годин після введення ЛХАТ збільшується, щонайменше, на 40% або, щонайменше, на 50% або, щонайменше, на 60% або, щонайменше, на 70% або, щонайменше, на 80% або, щонайменше, на 90% або, щонайменше, на 100% або, щонайменше, на 110% або, щонайменше, на 120% у порівнянні з рівнем ЛВЩ-Х у плазмі перед введенням ЛХАТ. У ще одному варіанті втілення винаходу рівень ЛВЩ-Х у плазмі суб'єкта через 24 години після введення ЛХАТ збільшується, щонайменше, на 40% або, щонайменше на 50%, або щонайменше на 50%, або щонайменше на 60%, або щонайменше, на 70% або, щонайменше, на 80% або, щонайменше, на 90% або, щонайменше, на 100% або, щонайменше, на 110% або, щонайменше, на 120% або, щонайменше, на 130% або, щонайменше, на 140% або, щонайменше, на 150% у порівнянні з рівнем ЛВЩ-Х у плазмі перед введенням ЛХАТ.

[0069] Як описано в прикладі 5 і показано на фігурі 3, введення ЛХАТ трансгенним мишам з геном аполіпопротеїну А-1 і нокауту гена ЛХАТ, приводить до збільшення вмісту холестерину в тканинах (аорти й печінки) і збільшенню рівнів холестерину в плазмі. Зведені дані прикладів 4 і 5 показують, що ін'єкція ЛХАТ швидко перерозподіляє ліпіди із тканин у ЛПВ плазми. За умови впливу ін'єкції ЛХАТ на вміст холестерину в печінці й аорті можна очікувати, що подібна зміна швидко відбудеться в червоних кров'яних клітинах.

[0070] Перехід ФХ із ЧКК до ЛВЩ повинен змінити композицію мембрани ЧКК у бік більш нормального стану. Ця дія збільшить оксигенацію ЧКК, поліпшить реологію (збільшить деформованість, плинність, зменшить схильність до адгезії й агрегації), зменшить анемію (зменшить механічний стрес і деструкцію, зв'язану зі зниженням деформованості, збільшить час життя ЧКК) і збільшить здатність ЧКК оксигенувати тканини, особливо периферичні тканини.

[0071] У деяких варіантах введення ЛХАТ здійснюється пацієнтом самостійно шляхом підшкірної або внутрім'язової ін'єкції. Самостійне введення є кращим варіантом для лікування хронічних захворювань, включаючи, не обмежуючись ними, пацієнтів, що страждають серповидноклітинною хворобою, діабетом, ревматоїдним захворюванням або гепатитом.

Приклад 1

Вплив ЛХАТ на гематокрит у мишей.

[0072] Були взяті проби крові в трьох груп мишей: з дефіцитом ЛХАТ (ЛХАТ-ДО), з викликаного трансгенним шляхом надлишковою експресією ЛХАТ (що перевищує приблизно в 30 разів нормальну активність ЛХАТ) і контрольні С57/б6 миші. Із проб крові були виділені мембрани ЧКК і обмірювано рівень фосфоліпідів, що містять холін (Вако фосфоліпіди Б, Ричмонд) як замінник маси ЧКК або гематокриту. Маса ЧКК у Лхат-дефіцитних мишей була значно нижче, ніж у нормальних мишей (402 ± 22.0 мкг/мл всієї крові проти 486 ± 25.7 мкг/мл всієї крові, відповідно). Показана тут анемія у Лхат-Дефіцитних мишей подібна по ступеню з анемією, що спостерігається у пацієнтів зі СДЛ. Зненацька, маса ЧКК була істотно підвищеною у трансгенних мишей з надлишковою експресією ЛХАТ у порівнянні з мишами з нормальною активністю ЛХАТ (556 ± 20.1 мкг/л всієї крові проти 486 ± 25.7 мкг/мл всієї крові, відповідно). Ці результати показують наявність позитивного взаємозв'язку між рівнями ЛХАТ і гематокритом. Додатково й найбільше важливо, що рівні ЛХАТ, що перевершують нормальні, можуть збільшувати гематокрит у тварин, що не рахуються як анемічні. Ці дослідження показують, що підвищені рівні є можливим варіантом вибору в терапії пацієнтів з анемією, викликану різними причинами, навіть пацієнтів з нормальною активністю ЛХАТ.

Приклад 2

Фосфоліпідна композиція зовнішніх мембран ЧКК, виділених з організму нормальних і страждаючих СКХ пацієнтів (не в стані кризи)

[0073] Зразки відмитих ЧКК у фосфатному сольовому буфері були приготовлені зі свіжої крові, узятої в нормальних суб'єктів (n=7) і пацієнтів із СКХ (n=6). Аліквоти об'ємом п'ятдесят мікролітрів зібраних ЧКК були суспендовані в 0,95 мл фосфатного сольового буфера. Ліпіди були екстраговані шляхом з'єднання 0,4 мл аліквоти кожної суспензії ЧКК із 20 мкл розчину, що містить 1мг/мл 1-ейкосанола в суміші етил-ацетат:ацетон (2:1) (внутрішній стандарт) і 2 мл суміші етил-ацетат:ацетон:метанол (6:3:1) у скляних пробірках. Закриті пробірки струшували протягом 2 хвилин і потім центрифугували при 2000 об./хв протягом 5 хвилин. Верхня органічна фаза була перенесена в пухирці 12x32 мм для ВЕРХ. Випар розчинника здійснювався з пухирців під потоком азоту й за наступного застосування протягом, принаймні, 1 години сильного вакууму. Висушені ліпіди були відновлені в 200 мкл суміші триметилпентан: метанол: тетрагідрофуран (95:5:2). Мембранні ліпіди були хроматографовані способом високоефективної рідинної хроматографії із силікатною колонкою. Виявлення й визначення кількості фосфатиділхоліну (ФХ) і сфінгомієліну (СМ) зроблено за допомогою випарного детектора розсіяного світла. Результати показують, що ліпіди ЧКК у пацієнтів зі СКХ збагачені ФХ при зменшеному вмісті СМ, у порівнянні з нормальними суб'єктами (ФІГ.1), що приводить до збільшення відношення ФХ/СМ із 0.67 до 0.98 для контрольної групи й пацієнтів зі СКХ, відповідно. ЧКК пацієнтів зі СКХ, проаналізовані в цьому дослідженні, виявили характер фосфоліпідної композиції, що відрізняється від композиції нормальних ЧКК. Композиція ліпідів ЧКК при СКХ аналогічна тому, про що повідомляється в інших випадках низької активності ЛХАТ у плазмі.

Приклад 3

Виготовлення рекомбінантної людської ЛХАТ

[0074] Плазмідна рCMV6-XL4/LCAT, що кодує білок людської ЛХАТ, була придбана в Ориген Технолоджис (Роквілл, Меріленд) і вбудована в рсDNA3.1/Нупро (Інвитроген, Карлсбад, Каліфорнія). Вектор рсDNA3.1 був трансфікований у клітини НЕК293f. Стабільно трансфіковані клітини були вибрані за допомогою розчину, що містить 200 мкг/мл гідромицина Б, і вирощені в безсироватковому середовищі Freestyle 293 (інітроген) у струшуються флаконах, що, ємністю 10 л протягом 4 днів. Рекомбінантна людська ЛХАТ була виділена з культурального середовища шляхом осадження з хлоридом цинку, з наступним захопленням й елюцією з фенілсефарозою.

Приклад 4

Збільшення ЛПВ-Х в організмі трансгенних мишей з людським аполіпопротеїном А1, ін'єкованих ЛХАТ

[0075] Самці трансгенних мишей, що здійснюють експресію гена людського аполіпопротеїну А-1 (лабораторія Джексона), утримувалися на звичайному раціоні, без обмежень. Миші одержали однократну ін'єкцію через ретро-орбітальний синус сольового розчину або рекомбінантної людської ЛХАТ у сольовому розчині (4 мг/кг). Кров відбирали у тварин, анестезованих ізофлураном через орбітальний плексус, через 0, 1, 4, 24, 48 і 72 години після ін'єкції. Концентрація холестерину в плазмі була визначена за допомогою комерційного комплексу ферментативного аналізу. Кількість холестерину у ЛВЩ (ЛВЩ-Х) було визначено методом гель-електрофорезу з агарозою, використовуючи SPIFE систему від лабораторій Хелена (Helena Labs.). Фігура 2 доводить, що миші, яким була введена ЛХАТ, показали значне збільшення рівнів ЛВЩ-Х у плазмі, порядку 120% від контролю. Рівень ЛВЩ-Х залишається підвищеним протягом усього строку експерименту (72 години). Підвищення ЛВЩ у плазмі було дивно швидким, показавши близько 70% від контролю через 4 години й близько 120% від контролю через 24 години.

Приклад 5

Вплив ін'єкції ЛХАТ на вміст холестерину в тканинах трансгенних мишей з нокаутом гена ЛХАТ/експресією гена аполіпопротеїну А-1

[0076] Трансгенні миші, що здійснюють експресію людського аполіпопротеїна А-1 (лабораторія Джексона) були схрещені з LCAT-КО мишами для одержання LCAT-КО/аро-А1-Тг мишей (з нокаутом гена ЛХАТ і експресією гена аполіпопротеїна А-1). Миші лінії LCAT-КО/аро-А1-Тг утримувалися на звичайному для гризунів раціоні, без обмежень. Внутрішньовенні ін'єкції (ВІ) сольового розчину або 0.4 мг ЛХАТ вироблялися щодня протягом 4 днів через ретроорбітальний синус. Тварини були піддані дослідженню на п'ятий день. Тварини були анестезовані й знекровлені шляхом перфузії гепаринізованого сольового розчину. У кожній тварини були вилучені частка печінки й аорта й піддані екстракції розчином хлороформу й метанолу. Холестерин у ліпідах, отриманих з екстрагованих тканин, був обмірюваний за допомогою комерційного комплексу ферментативного аналізу.

[0077] Фігура 3 показує вміст холестерину в (А) печінки, (В) аорті й (З) плазмі мишей, ін'єкованих сольовим розчином (Контроль) або ЛХАТ (Дослід). Лікування ЛХАТ значно зменшує

рівні холестерину в печінці й аорті й значно підвищує рівень холестерину в плазмі. Зведені дані прикладів 4 і 5 показують, що ін'єкція ЛХАТ швидко перерозподіляє ліпіди із тканин до ЛПВ плазми. Даний вплив ін'єкції ЛХАТ на вміст холестерину в печінці й аорті дозволяє очікувати, що подібна зміна можна була б спостерігати в червоних кров'яних клітинах.

5 Приклад 6

[0078] Дитина (30кг) із серповидноклітинною хворобою потрапляє у лікарню в стані кризи. Поряд зі стандартним лікуванням, йому роблять інфузію рекомбінантної людської ЛХАТ (рЛЛХАТ) у кількості 5мг/кг, протягом години, при загальній кількості сольового розчину 100 мл. Після лікування вимірюють рівні кисню в крові й спостерігають поліпшення. Коли криза стихає, вимірюються морфологія червоних кров'яних клітин і їхні фізичні характеристики (деформованість ЧКК, агрегованість ЧКК і осмотична крихкість) і результати зіставляються з результатами дослідження проб крові, узятих при потрапленні. Поліпшення фізичних характеристик і оксигенації ЧКК досягаються при щотижневих підшкірних ін'єкціях рЛЛХАТ у дозі 0,5 мг/кг.

15 Приклад 7

[0079] 35-літня жінка (55 кг), що страждає ревматоїдним артритом, має анемію з рівнем гемоглобіну 9г/дл (нормальний рівень 12-14 г/дл). Узято пробу крові, що показує, що її червоні кров'яні клітини менш здатні до деформації й легше агрегуються, ніж нормальні червоні кров'яні клітини. Пацієнтці прописані щотижневі ін'єкції рЛЛХАТ у дозі 1мг/кг для введення підшкірно. Після 6 щотижневих ін'єкцій вимірюються рівні гемоглобіну і гематокриту, і виявляється збільшення на 20%. Після 6 місяців лікування гемоглобін досягає 14 г/дл. Лікар вирішує підтримувати пацієнтку на рЛЛХАТ у дозі 1мг/кг, що вводиться раз у два тижні.

20 Приклад 8

[0080] 65-літній чоловік (80 кг) запланований на четверне шунтування. Пацієнтові рекомендується припинити прийом клопідогрелу за п'ять днів до операції, щоб зменшити ймовірність післяопераційної кровотечі. Для того, щоб знизити ризик активації тромбоцитів, тромбозу або агрегації ЧКК, пацієнта приводять у кабінет лікаря для інфузії рЛЛХАТ у дозі 1мг/кг за 5 днів до операції. Пацієнтові вводять 1мг/кг рЛЛХАТ прямо після операції, через 7 днів після операції й через 14 днів після операції. По закінченні відновного періоду (через 21 день після операції) пацієнт повертається до постійного лікування клопідогрелом.

30 Приклад 9

Трансфер генів для специфічної надлишкової експресії ЛХАТ у печінці

[0081] Є пацієнт із ревматоїдним артритом, що супроводжується хронічною анемією. Пацієнтові вводиться доза 4×10^{12} аденовірусних часток (АдрЛХАТ)/кг шляхом ін'єкції через інтрапортальний катетер. Виконується щотижневий моніторинг рівнів ЛХАТ після лікування. Через 4 тижні після лікування пацієнт має рівень концентрації ЛХАТ 10 мг/л, або приблизно у два рази більший, ніж у суб'єкта, у якого немає артриту. Через 8 тижнів після лікування моніторинг виконується щомісяця. Якщо рівень ЛХАТ у пацієнта падає нижче 5мг/л, процедуру повторюють.

40 Приклад 10

[0082] Дитина (30кг) із серповидноклітинною хворобою в стані кризи потрапляє у лікарню. Поряд зі стандартним лікуванням, йому зроблена інфузія рекомбінантної людської ЛХАТ (рЛЛХАТ) у дозі 5мг/кг протягом 1 години при загальному об'ємі сольового розчину 100 мл. Після лікування вимірялися рівні кисню в крові, і знайдене поліпшення. Коли криза стихає, вимірюються морфологія червоних кров'яних клітин і їхні фізичні характеристики (деформованість ЧКК, агрегованість ЧКК і осмотична крихкість) і результати зіставляються з результатами дослідження проб крові, узятих при надходженні. Потім пацієнту виконують процедуру, при якій під шкіру поміщають медичний пристрій. Медичний пристрій містить у собі клітини ссавців, підготовлені шляхом клітинної інженерії для секреції активної ЛХАТ, ЛХАТ, виділюваної клітинами, у достатній кількості, щоб підняти ендогенну активність ЛХАТ до рівня, що становить більше 100% від нормального.

[0083] Необхідно взяти до уваги, що обсяг цього винаходу визначається його формулою й не обмежується варіантами й прикладами, конкретно описаними в даному документі.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> AlphaCore Pharma, LLC
Auerbach, Bruce J.
Krause, Brian R.
Homan, Reynold

<120> ВИКОРИСТАННЯ ЛХАТ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ АНЕМІЇ Й ДИСФУНКЦІЇ ЧЕРВОНИХ КРОВ'ЯНИХ КЛІТИН

<130> 223373-000000

<150> 61/186,668
<151> 2009-06-12

<150> 61/241,223
<151> 2009-09-10

<160> 1

<170> патентна версія 3.5

<210> 1
<211> 416
<212> білок
<213> людина

<400> 1

Phe Trp Leu Leu Asn Val Leu Phe Pro Pro His Thr Thr Pro Lys Ala
1 5 10 15

Glu Leu Ser Asn His Thr Arg Pro Val Ile Leu Val Pro Gly Cys Leu
20 25 30

Gly Asn Gln Leu Glu Ala Lys Leu Asp Lys Pro Asp Val Val Asn Trp
35 40 45

Met Cys Tyr Arg Lys Thr Glu Asp Phe Phe Thr Ile Trp Leu Asp Leu
50 55 60

Asn Met Phe Leu Cys Leu Gly Val Asp Cys Trp Ile Asp Asn Thr Arg
65 70 75 80

Val Val Tyr Asn Arg Ser Ser Gly Leu Val Ser Asn Ala Pro Gly Val
85 90 95

Gln Ile Arg Val Pro Gly Phe Gly Lys Thr Tyr Ser Val Glu Tyr Leu
100 105 110

Asp Ser Ser Lys Leu Ala Gly Tyr Leu His Thr Leu Val Gln Asn Leu
115 120 125

Val Asn Asn Gly Tyr Val Arg Asp Glu Thr Val Arg Ala Ala Pro Tyr
130 135 140

```

Asp Trp Arg Leu Glu Pro Gly Gln Gln Glu Glu Tyr Tyr Arg Lys Leu
145                      150                      155                      160

Ala Gly Leu Val Glu Glu Met His Ala Ala Tyr Gly Lys Pro Val Phe
                      165                      170                      175

Leu Ile Gly His Ser Leu Gly Cys Leu His Leu Leu Tyr Phe Leu Leu
                      180                      185                      190

Arg Gln Pro Gln Ala Trp Lys Asp Arg Phe Ile Asp Gly Phe Ile Ser
                      195                      200                      205

Leu Gly Ala Pro Trp Gly Gly Ser Ile Lys Pro Met Leu Val Leu Ala
210                      215                      220

Ser Gly Asp Asn Gln Gly Ile Pro Ile Met Ser Ser Ile Lys Leu Lys
225                      230                      235                      240

Glu Glu Gln Arg Ile Thr Thr Thr Ser Pro Trp Met Phe Pro Ser Arg
                      245                      250                      255

Met Ala Trp Pro Glu Asp His Val Phe Ile Ser Thr Pro Ser Phe Asn
260                      265                      270

Tyr Thr Gly Arg Asp Phe Gln Arg Phe Phe Ala Asp Leu His Phe Glu
275                      280                      285

Glu Gly Trp Tyr Met Trp Leu Gln Ser Arg Asp Leu Leu Ala Gly Leu
290                      295                      300

Pro Ala Pro Gly Val Glu Val Tyr Cys Leu Tyr Gly Val Gly Leu Pro
305                      310                      315                      320

Thr Pro Arg Thr Tyr Ile Tyr Asp His Gly Phe Pro Tyr Thr Asp Pro
325                      330                      335

Val Gly Val Leu Tyr Glu Asp Gly Asp Asp Thr Val Ala Thr Arg Ser
340                      345                      350

Thr Glu Leu Cys Gly Leu Trp Gln Gly Arg Gln Pro Gln Pro Val His
355                      360                      365

Leu Leu Pro Leu His Gly Ile Gln His Leu Asn Met Val Phe Ser Asn
370                      375                      380

Leu Thr Leu Glu His Ile Asn Ala Ile Leu Leu Gly Ala Tyr Arg Gln
385                      390                      395                      400

Gly Pro Pro Ala Ser Pro Thr Ala Ser Pro Glu Pro Pro Pro Pro Glu
405                      410                      415

```

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

5

1. Спосіб лікування анемії або дисфункції червоних кров'яних клітин у пацієнта, який має стан, що характеризується анемією або дисфункцією червоних кров'яних клітин, де вказаний стан вибраний з групи, яка складається з серповидноклітинної хвороби, діабету, таласемії, ревматоїдної хвороби, аутоімунного захворювання, артриту, захворювання печінки, цирозу, гепатиту, акантоцитозу, сепсису, деменції, мікросудинного порушення, запального захворювання, паразитарної хвороби, еректильної дисфункції, раку, прееклампсії, критичного захворювання або травми, який включає введення пацієнтові терапевтично ефективної кількості лецитин-холестерин ацилтрансферази (ЛХАТ).

10

2. Спосіб за п. 1, де стан характеризується зниженим гематокритом, зниженим рівнем гемоглобіну, червоними кров'яними клітинами (ЧКК) із зниженою здатністю до деформації, зниженою оксигенацією, підвищеною агрегацією і адгезією, зниженою функцією оксиду азоту, зменшеною тривалістю життя або будь-якою комбінацією перерахованих явищ.

15

3. Спосіб за п. 1, де запальне захворювання являє собою сепсис, ревматоїдну хворобу, анемію запалення, запалення після оперативного втручання, мікросудинне порушення являє собою

деменцію або ретинопатію, паразитарна хвороба являє собою малярію, сонну хворобу, філяріатоз або лейшманіоз, або стан являє собою деменцію, пов'язану з хворобою Альцгеймера.

4. Спосіб за п. 1, де стан являє собою серповидноклітинну хворобу, захворювання печінки, паразитарну хворобу або запальне захворювання.

5. Спосіб за п. 1, де кількість ЛХАТ являє собою таку кількість, яка збільшує концентрацію ЛХАТ до рівня, що перевищує нормальний рівень ЛХАТ, або збільшує активність ЛХАТ до рівня, що перевищує нормальну активність ЛХАТ.

6. Спосіб за п. 1, де кількість ЛХАТ, що вводиться, становить від приблизно 10 мг до приблизно 5000 мг.

7. Спосіб за п. 1, де кількість ЛХАТ, що вводиться, становить від 1-кратного до 1000-кратного нормального рівня ЛХАТ.

8. Спосіб за п. 4, де стан є серповидноклітинною хворобою.

9. Спосіб за п. 4, де стан є анемією запалення.

10. Спосіб за п. 6, де кількість ЛХАТ, що вводиться, становить від приблизно 10 мг до приблизно 1000 мг.

11. Спосіб оцінки поліпшення стану, що характеризується одним або більше з таких: анемія, червоні кров'яні клітини зі зниженою здатністю до деформації, знижена оксигенація ЧКК, підвищена агрегація або адгезія ЧКК, знижена функція оксиду азоту, знижена тривалість життя ЧКК, який включає:

а) одержання вихідного значення одного або більше параметрів з наступних:

рівня гемоглобіну, рівня гематокриту, деформованості ЧКК, оксигенації ЧКК, агрегації і адгезії ЧКК або тривалості життя ЧКК;

б) введення пацієнту, який цього потребує, терапевтично ефективної кількості агента, який збільшує активність ЛХАТ або збільшує рівень ЛХАТ в плазмі, або виробляє обидва ефекти;

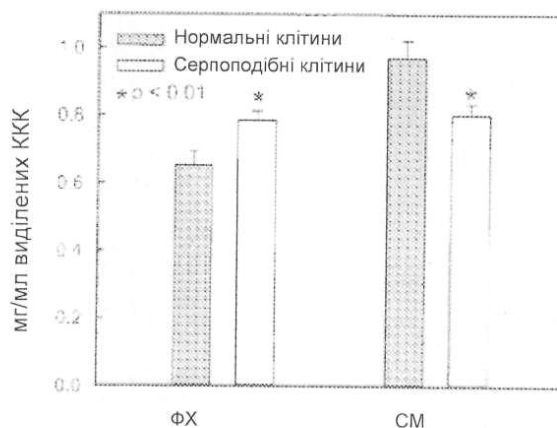
с) отримання значення після лікування одного або більше параметрів з наступних:

рівня гемоглобіну, рівня гематокриту, деформованості ЧКК, оксигенації ЧКК, агрегації і адгезії ЧКК або тривалості життя ЧКК;

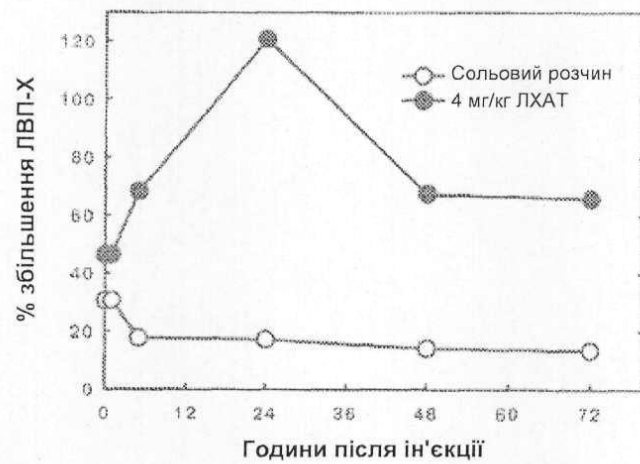
в) порівняння вихідного значення параметрів зі значенням після лікування, де знаходження одного або більше явищ з наступних: збільшення рівня гемоглобіну, рівня гематокриту, збільшення деформованості ЧКК, збільшення оксигенації ЧКК, зменшення агрегації і адгезії ЧКК або збільшення тривалості життя ЧКК, вказує на поліпшення в стані, де стан являє собою серповидноклітинну хворобу, діабет, таласемію, ревматоїдну хворобу, аутоімунне захворювання, артрит, захворювання печінки, цироз, гепатит, акантоцитоз, сепсис, деменцію, анемію або мікросудинний розлад, запальне захворювання, паразитарну хворобу, еректильну дисфункцію, рак, прееклампсію, критичне захворювання або травму, і де терапевтично ефективна кількість агента являє собою терапевтично ефективну кількість ЛХАТ.

12. Спосіб за п. 11, де кількість ЛХАТ являє собою таку кількість, яка збільшує концентрацію ЛХАТ до рівня, що перевищує нормальний рівень ЛХАТ, або збільшує активність ЛХАТ до рівня, що перевищує нормальну активність ЛХАТ.

ФІГУРА 1



ФІГУРА 2



ФІГУРА 3



Комп'ютерна верстка Л. Бурлак

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601