



УКРАЇНА

(19) UA (11) 35583 (13) C2

(51) 7 A61K39/04, 35/74

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ЗАСТОСУВАННЯ АНТИГЕННОГО ТА/АБО ІМУНОРЕГУЛЮЮЧОГО МАТЕРІАЛУ, ОДЕРЖАНОГО З МЫСОБАКТЕРІУМ ВАССАЕ, ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ПСИХІЧНОГО ЗАХВОРЮВАННЯ, ЗВ'ЯЗАНОГО З АУТОІМУННОЮ РЕАКЦІЄЮ, ВИКЛИКАНОЮ ІНФЕКЦІЄЮ

(21) 94095856

(22) 19.02.1993

(24) 16.04.2001

(31) 9203814.0

(32) 21.02.1992

(33) GB

(46) 16.04.2001, Бюл. № 3, 2001 р.

(72) Стенфорд Джон Лоосон, GB, Руук Грехем Артур Уільям, GB

(73) СТЕНФОРД РУК ЛІМІТЕД, GB

(86) PCT/GB93/00351, 19.02.1993

(56) GB, 2156673 A, 16.10.85. WO, 91/02542 A, 07.03.91. WO, 85/05034 A, 21.11.85. WO, 85/05034, 21.11.85.

(57) 1. Применение антигенного и/или иммунорегулирующего материала, полученного из *Mycobacterium vaccae*, для лечения психического заболевания, связанного с аутоиммунной реакцией, вызванной инфекцией.

2. Применение по п. 1 **отличающееся** тем, что антигенный или иммунорегулирующий материал, выделенный из *M. vaccae*, включает мертвые клетки *M. vaccae*.

3. Применение по п. 2, **отличающееся** тем, что клетки *M. vaccae* убивают автоклавированием.

4. Применение по любому из предыдущих пунктов, **отличающееся** тем, что материал, выделенный из *M. vaccae*, получают из штамма номер 11695, депонированного в национальной коллекции типов культур (NCTC).

5. Применение по любому из предыдущих пунктов, **отличающееся** тем, что материал представлен в форме фармацевтического средства, которое дополнительно содержит фармацевтически приемлемый растворитель.

6. Применение по п. 5, **отличающееся** тем, что фармацевтическое средство содержит 10^7 - 10^{10} микроорганизмов *M. vaccae* на одну дозу антигенного и/или иммунорегулирующего материала.

Настоящее изобретение относится к лечению психических заболеваний, сопровождаемых аутоиммунными реакциями инфекционного происхождения, а также к последствиям хронических инфекций, связанных с аутоиммунитетом (иных, нежели увсит).

В описании к британскому патенту № 2156673 описывается иммунологический препарат, содержащий убитые клетки *Mycobacterium vaccae*. Показано, что эти агенты полезны в иммунотерапии болезней, вызванных микобактериями, особенно туберкулеза и лепры. Указывалось также, что применение таких иммунотерапевтических агентов облегчает выведение из организма бацилл, ответственных за туберкулез или лепру и которые, как хорошо известно, очень трудно излечиваются с помощью только химиотерапевтических средств.

Предполагается, что иммунотерапевтический агент действует за счет введения общих «защитающих» антигенов, а также благодаря содержанию детерминантов иммунного супрессора, способных к активной регуляции нарушенных иммунных механизмов. В результате иммунная система узнает «стойкие» бациллы по наличию у них

общих микобактериальных антигенов и направляет против них эффективные механизмы иммунной защиты, при этом отсутствуют некротические формы ткани, характерные для работы иммунной системы в условиях микобактериальной инфекции.

В описании международной заявки PCT/GB 85/00183 описываются композиции, включающие в качестве активного ингредиента целые организмы *M. vaccae*, которые могут использоваться для облегчения течения, для лечения и диагностики различных заболеваний, имеющих отношение к артриту. В ней также указывалось, что препараты *M. vaccae* весьма полезны для лечения многих аутоиммунных болезней и особенно артритных состояний, включая ревматоидный артрит, анкилозирующий спондилоартрит, или болезнь Рейтера.

В международной заявке PCT/GB 90/01318 описаны композиции, включающие в качестве активного ингредиента *M. vaccae*, полезные для лечения и других патологических состояний, в которых у пациентов отмечается аномально высокая доля агалактозил IgG, а также для лечения хронических воспалительных заболеваний, вызванных

(19) UA (11) 35583 (13) C2

или сопровождающихся слишком высокой секрецией макрофагами интерлейкина-6 и/или фактора некроза опухолевых клеток.

В частности, в описании рассматривается лечение болезни Крона, реактивного артрита, первичного билиарного цирроза печени, саркоидоза, неспецифического язвенного колита, псориаза, системной красной волчанки (особенно в том случае, когда она сопровождается синдромом Шегрена), множественного склероза, синдрома Гийена-Барра, первичного сахарного диабета и некоторых аспектов отторжения трансплантата.

В международной заявке PCT/GB 90/01169 раскрываются антигенные и иммунорегуляторные продукты, приготовленные на основе *M. vaccae*, которые могут быть использованы для снижения или предотвращения проявлений синдрома СПИД.

В дополнение к этому, в неопубликованной заявке PCT/GB 91/01970 раскрывается использование *M. vaccae* в лечении увеита-иммунологически опосредованного позднего проявления лепры, вызывающего слепоту.

Настоящее изобретение основано на выявлении паразитерной способности *M. vaccae* эффективно лечить множество других состояний, в которые вовлечены инфекции, такие, как бактериальные или протозойные и, в частности, микобактериальные инфекции.

Было высказано предположение, что психические заболевания, такие, как шизофрения и маниакально-депрессивный психоз, сопровождаются аутоиммунными реакциями, развивающимися в результате предшествующей или текущей криптогенной инфекции.

Доказательством тому являются наблюдаемые при шизофрении аномалии в функционировании Т и В лимфоцитов, связанные со снижением Т клеток, увеличением В клеток и изменением уровня супрессорных клеток (см., например, P. Sirota, Israel J., Med. Sci., 1990, 26 694-697; Knight, Meth and Find Exptl Clin; Pharmacol., 1984, 64, 395-403; H.N. Fudenberg et al., Biomedicine & Pharmacotherapy, 1984, 38 285-290; F. Villemain et al, Annal. N.Y. Acad. Sci., 1987, 496. 669-675; и Ganguli et al, Annal. N.Y. Acad. Sci., 1987, 496. 675-685).

Доказательством этого предположения является также тот факт, что практически никогда у одного и того же пациента не встречаются одновременно шизофрения и ревматоидный артрит (T.D. Spector, J. Silman, Brit. J. Rheumatology, 1987, 26 307-310).

Мы полагаем, что шизофрения и ревматоидный артрит могут развиваться как результат генетически определенных взаимно исключаящих реакций организма на криптогенную инфекцию и, вероятно, в том числе, на микобактериальную инфекцию. В небольшом по масштабу исследовании мы показали существенное улучшение у трех из трех пациентов, страдающих от шизофрении, в случае их лечения *M. vaccae*.

В этой связи мы считаем, что *M. vaccae* может быть полезен при лечении психических заболеваний, связанных с аутоиммунной реакцией. Мы обнаружили также, что *M. vaccae* эффективен в лечении иммунологически опосредованных последствий хронических инфекций. Болезнь Шагаса

(Американский Трипаносомоз) представляет собой пример болезни, связанной с протозойной инфекцией, поздним проявлением которой является миокардит, который очень часто приводит к смерти пациента. Лечение с помощью *M. vaccae* может снизить частоту встречаемости миокардита.

Другим примером такой болезни является синдром Такаюсу, связанный с туберкулезом, который вызывается микобактериальной инфекцией. Мы полагаем, что для профилактики и лечения этого заболевания и других обструктивных сосудистых состояний, связанных с изменением иммунологических реакций, может использоваться *M. vaccae*.

Считается также, что *M. vaccae* может эффективно использоваться для профилактики и лечения имеющих иммунологическую природу осложнений диабета.

В соответствии с этим, в настоящем изобретении предлагается метод для лечения психических заболеваний, сопровождающихся аутоиммунными реакциями, для лечения последствий болезни Шагаса, имеющих иммунологическую природу, а также для профилактики или лечения сосудистых заболеваний или иммунологически опосредованных осложнений, например, в случае туберкулеза или сахарного диабета, который включает введение страдающим от таких состояний пациентам эффективных количеств терапевтической композиции, включающей антигенный и иммунорегуляторный материал, полученный из *Mycobacterium vaccae*.

Кроме того, настоящее изобретение относится к антигенному и иммунорегуляторному материалу, полученному из *M. vaccae*, который используется для производства терапевтического средства с целью его применения в лечении психических болезней, связанных с аутоиммунными реакциями, которые могли развиваться в результате инфекции, для лечения иммунологически опосредованных последствий болезни Шагаса, а также для профилактики для лечения сосудистых заболеваний или осложнений, имеющих иммунологическую природу, возникающих, в частности, в случае туберкулеза или диабета.

Настоящее изобретение относится, в первую очередь, к лечению бактериальных или протозойных инфекций, например, микобактериальных инфекций.

Антигенный или иммунорегуляторный материал используется преимущественно для лечения психических болезней, сопровождающихся аутоиммунными реакциями, вызванными инфекциями, и, в частности, такой, как микобактериальная инфекция. Такой инфекцией может быть прошлая инфекция в прошлом, которая инициировала аутоиммунную реакцию. Аутоиммунный ответ может быть вызван также и текущей инфекцией, такой, как криптогенная микобактериальная инфекция, т.е. дремлющая, не сразу обнаруживаемая инфекция.

Терапевтическое средство включает предпочтительно мертвые клетки *M. vaccae*, убитые предпочтительно автоклавированием или облучением. В обычном случае терапевтическое средство включает более 10^8 микроорганизмов на мл разбавителя, а преимущественно от 10^8 до 10^{11} микроорганизмов *M. vaccae* на мл разбавителя.

Разбавителем может быть физиологический раствор сам по себе, свободный от пирогенов, или боратный буфер, имеющий pH 8,0. Разбавитель должен быть стерильным. Подходящий боратный буфер имеет следующий состав: $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$ - 3,63 г; H_3BO_3 - 5,25 г; NaCl - 16,19; Твин 80 - 0,0005 %; дистиллированная вода - до 1 литра.

Предпочтительным штаммом *M. vaccae* является штамм, обозначенный R877R, который извлечен из грязевых образцов в районе Ланго в Центральной Уганде (J.L. Stanford и R.C. Paul, Ann. Soc. Beige Mod. Trop. 1973, 53, 141-389).

Штамм представляет собой стабильный вариант, принадлежащий к подвиду *augum*. Его принадлежность к *M. vaccae* может быть идентифицирована по биохимическим и антигенным критериям. (R. Bonicke, S.E. Juhasz., Zentr. abbl. Bakteriол. Parasitenkd. Infection akr. Hyg. Abt. I, Orig., 1964, 192. 133).

Штамм R877R был депонирован в соответствии с Будапештской Конвенцией в Национальной Коллекции Типов Куль-тур (NCTC) Центральной Лаборатории Здравоохранения, Колиндал Авеню, Лондон NW9 5HT, Соединенное Королевство 13 февраля 1984 под номером NCTC 11659.

Для приготовления терапевтического средства микроорганизм *M. vaccae* выращивается на подходящей твердой среде. Предпочтительна жидкая среда Саутона (S.Y. Boyden и E. Sorkin., J. Immune, 1955, 75. 15), в которую для затвердевания добавлен агар. Как правило, твердые среды содержат 1,3% агара.

В среду инокулируются микроорганизмы, которые далее инкубируются в аэробных условиях, способствующих их росту, в общем случае при 32°C в течение 28 дней. Далее организмы собираются, взвешиваются и суспендируются в разбавителе. В качестве разбавителя может использоваться незабуференный физиологический раствор, однако предпочтительно применение боратного буфера, содержащего поверхностно активные вещества, такие, как, например, Твин 80, приведенный выше в прописи буферного раствора.

Суспензия разбавляется до содержания 100 мг микроорганизмов/мл. Далее с помощью забуференного боратсодержащего физиологического раствора суспензия разбавляется до конечного содержания микроорганизмов в количестве 10 мг сырого веса/мл в ампулах, содержащих много доз средства.

Микроорганизмы в ампулах могут быть убиты облучением с помощью, например, ^{60}Co в дозе 2,5 мегарад или другими методами, например, химическими, однако предпочтительно осуществлять этот процесс автоклавированием, например, при давлении в 15 фунтов на кв. дюйм (103,5 КПа) в течение 15 минут (115-125°C). Показано, что в результате автоклавирования получается более эффективный препарат, чем в случае применения облучения.

Терапевтическое средство вводится в основном в виде инъекции объемом от 0,1 до 0,2 мл, предпочтительно 0,1 мл, внутривенно.

Единичная доза содержит обычно от 10^7 до 10^{10} убитых микроорганизмов *M. vaccae*. Предпочтительно вводить пациентам единичную дозу, содержащую от 10^8 до 10^9 убитых клеток.

M. vaccae. В зависимости от состояния больного может вводиться либо единичная доза, либо указанная доза может быть повторена.

Несмотря на то, что терапевтическое средство вводится преимущественно в виде внутривенных инъекций, могут использоваться и другие способы его введения, например, пероральный.

Возможно использование более, чем одного штамма *M. vaccae*, настоящее изобретение относится также и к этому аспекту, и/или введение в состав антигенного или иммунорегуляторного материала иных близких видов микобактерий, таких, как *M. nonchrr omogenicum* или *M. chitae*. В состав средства может быть также включен туберкулин.

Терапевтическое средство может содержать и другие ингредиенты, например, адъюванты, консерванты, стабилизаторы и др. Он может изготавливаться в виде стерильных форм, готовых для инъекций, или в виде стерильных форм, высушенных замораживанием, нуждающихся в специальной подготовке перед применением.

По настоящему изобретению, для приготовления лекарственного средства, содержащего *M. vaccae*, данный микроорганизм может быть использован сам по себе, либо в виде экстракта, либо в виде определенной фракции микроорганизмов. Приведенный ниже пример иллюстрирует настоящее изобретение.

Пример

M. vaccae NCTC 11659 выращивается на твердой среде, которая представляет собой модифицированную среду Саутона, содержащую 1,3% агар. В среду инокулируются микроорганизмы, которые инкубируются в течение 28 дней при температуре 32°C для роста и созревания микроорганизмов.

Затем микроорганизмы осторожно соскребаются с поверхности агара, взвешиваются (без высушивания) и суспендируются в M/15 забуференном боратом физиологическом растворе при pH 8,0 с образованием 10 мг микроорганизмов/мл физиологического раствора. Суспензия помещается в 5-мл ампулы и далее автоклавируется в течение 15 минут при давлении 15 фунтов на кв. дюйм (103,5 КПа) с целью получения убитых клеток микроорганизмов.

После охлаждения полученное таким образом терапевтическое средство хранится, до его применения, при 4°C. Единичная доза включает 0,1 мл суспензии, содержащей 1 мг сырого веса *M. vaccae*, непосредственно перед применением содержимое ампулы необходимо хорошо перемешать. В обычном случае доза вводится внутривенно над левой дельтовидной мышцей.

ДП "Український інститут промислової власності" (Укрпатент)
Україна, 01133, Київ-133, бульв. Лесі Українки, 26
(044) 295-81-42, 295-61-97

Підписано до друку _____ 2001 р. Формат 60х84 1/8.
Обсяг _____ обл.-вид. арк. Тираж 50 прим. Зам. _____

УкрІНТЕІ, 03680, Київ-39 МСП, вул. Горького, 180.
(044) 268-25-22
