



EESTI VABARIIK

PATENDIAMET

(11) **EE-EP 1 920 769 B1**

(51) Int. Cl.
A61K 31/195 (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01)

(12) **EESTIS KEHTIVA EUROOPA PATENDI
 PATENDIKIRJELDUSE TÕLGE**

(10) Registreeringu number:	E007758	(73) Patendiomanik:	
(11) Patendikirjelduse tõlke number:	EE-EP 1 920 769	Prekulab Ltd. A/S af 8. marts 2004	
(30) Prioriteediandmed:	28.07.2003 US 490473	Revvej 41,	
(96) Euroopa patenditaotluse esitamise kuupäev:	19.04.2004	4220 Korsør, DK	
(96) Euroopa patendi-taotluse number:	08001078.8	(72) Leiutise autor:	
(97) Euroopa patendi väljaandmisest teatamise kuupäev:	16.01.2013	Matalon, Reuben	
(97) Euroopa patendi number:	EP 1 920 769	3707 Emerald Falls Drive,	
Patendikirjelduse tõlke esitamise kuupäev:	15.04.2013	Houston TX 77059, US	
Patendikirjelduse tõlke avalikustamise kuupäev:	17.06.2013	(74) Patendivolinik:	
		Piret Niidas	
		LASVET Patendibüroo OÜ	
		Suurtüki 4a, 10133 Tallinn, EE	

(54) **Metabolismihäiretega seotud haigusseisundite ravimeetodid ja materjalid**

KIRJELDUS**LEIUTISE ALA**

[0001] Leiutises käsitletakse üldiselt metabolismihäirega seotud haigusseisundite ravimeetodeid ja materjale ning täpsemalt teatud aminohapete metabolismihäiretega seotud haigusseisundite ravimeetodeid ning vastavaid materjale.

LEIUTISE EELDUS

[0002] Hulk haigusseisundeid, mis vaevavad inimesi ja loomi, on põhjustatud teatud aminohapete metabolismihäiretest. Paljude nende haigusseisundite puhul hõlmab ravi teatud aminohapete või haigusseisundiga seotud aminohapete kasutamise piiranguid toidus. Kuid toidupiirangul põhinev ravi nõuab patsiendi nõusolekut ja nõuab ka, et patsient teaks, kas konkreetne toit sisaldab teatud aminohapet või haigusseisundiga seotud aminohapet.

[0003] Näiteks fenüülketonuuria ("PKU") on fenüülalaniini (Phe) hüperaminoatsideemia, mis on seotud fenüülalaniini kaasasündinud metaboliseerumisveaga, fenüülalaniini türosiiniks muutva fenüülalaniin-4-hüdroksülaasi ("PAH") kodeeriva geeni mutatsiooniga. Mõningatel juhtudel esineb täiendav metaboliseerumisviga kas dihidropteridiini või tetrahüdrobiopteriini ("BH4") sünteesirajas, PAH kofaktorites, mis avaldavad lisaks mõju hüperfenüülalanineemiale ("HPA"). Kui Phe normaalne tase plasmas on ligikaudu 0,05 mM (Pardridge, "Blood-Brain Barrier Amino Acid Transport: Clinical Implications," pt. 6, Inborn Errors of Metabolism in Humans, Cockburn et al., toim., Lancaster, England: MTP Press Ltd. (1980) ("Pardridge")), siis ravimata "klassikalistel" PKU patsientidel on Phe tase plasmas üle 1 mM (nt Phe tase plasmas on ligikaudu 1 mM kuni 2,5 mM või enam), ja kuigi ravi eesmärgiks on Phe madala tasemega toiduga langetada Phe tase plasmas alla 0,3 mM, on seda raske saavutada toidupiiranguga seotud probleemide tõttu. US-s sünnib 1 laps 10000-st PKU-ga.

[0004] PKU puhul täheldatud fenüülalaniini kõrge tase plasmas kombinatsioonis Phe suhteliselt kõrge afiinsusega neutraalsete aminohapete transpordisüsteemi kandevalgu sidumiskohade suhtes vere-aju barjääris ("BBB") põhjustab (i) Phe ja selle neurotoksiliste metaboliitide (nt fenüülpüruvaadi, fenüülatsetaadi, fenüüllaktaadi) ladestumist ajus ja (ii) ajusse sisenevate Phe-st erinevate neutraalsete aminohapete tasemete mahasurumist, mille tulemuseks on aju arengu ja funktsioneerimise häired, sest metaboliseerumise võtmerajad ajus (nt neurotrans-

mitterite süntees) nõuavad eelaminohapete nagu türosiini olemasolu. See mahasurumine on ilmekas türosiini puhul, mille varu plasmas on madal PKU puhul esineva metaboliseerumiseva tõttu ensüümis, mis vastutab fenüülalaniini türosiiniks muutmise eest. Praegune seisukoht on, et PKU puudus neuroloogilisel tasandil on põhjustatud peamiselt ajusse sisenevate Phe-st erinevate neutraalsete aminohapete tasemete mahasurumisest (Kaufman, "Some Facts Relevant to a Consideration of a Possible Alternative Treatment for Classical Phenylketonuria," *J. Inher. Metab. Dis.*, 21 (lisa 3), 4-19 (1998) ("Kaufman")).

[0005] Kuigi "klassikalise" PKU puhul saab väikese fenüülalaniinisisaldusega toiduga vähendada Phe taset plasmas alla 0,3 mM ja leevendada ravimata PKU-ga kaasnevat vaimset alaarengut, muutub toidupiiranguga nõustumine problemaatiliseks, kui PKU patsiendid jõuavad noorukiikka, Phe tase plasmas tõuseb ja kutsus esile nii arukuse kadumise kui valgeaine muutused ajus. Piiratud Phe-sisaldusega toit võib põhjustada ka puudulikku toitumist. Seega tuleb välja töötada alternatiivsed ravid. Näiteks selleks, et saada üle oletatavast neurotransmitterite dopamiini ja serotoniini puudusest, tuleks PKU patsiente ravida neurotransmitterite eelühendite türosiini ja trüptofaaniga (Lou, "Large Doses of Tryptophan and Tyrosine as Potential Therapeutic Alternative to Dietary Phenylalanine Restriction in Phenylketonuria," *Lancet*, 2: 150-151 (1983)). Et vähendada Phe sissevoolu ajusse, manustati vanematele PKU patsientidele lisaks hargnenud ahelaga neutraalseid aminohappeid, mis hõlmavad valiini, isoleutsiini ja leutsiini, sisaldavat toidulisandit (Berry et al, "Valine, Isoleucine and Leucine. A New Treatment for Phenylketonuria," *Am. J. Dis. Child.*, 144: 539-543 (1990) ("Berry")), millega teatati käitumishäirte olulisest paranemisest. Kaufmani teoses pakuti, et neurotransmitterite eelühendite türosiini ja trüptofaani lisamine Berry toidulisandile peaks andma täiendava paranemise. Kuid ravi efektiivsus nende aminohappeliste toidulisanditega on olnud vaieldav.

[0006] Türosineemia on teine näide haigusseisundist, mis osutab teatud aminohapete metabolismihäirele. Täpsemalt, türosineemia on häire, mis on põhjustatud türosiini metabolismiraja otsmise ensüümi veast, mis viib fumarüülatsetoatsetooni ladestumiseni, mis muutub omakorda suktsinüülatsetooni, mis ladestub ja on toksiline maksale. Türosineemiat seostatakse maksakahjustuse, maksahaiguste ja hepatokartsinoomiga. Maksa transplantatsioon võib taastada türosiini metabolismirajas ensüümi normaalse aktiivsuse ja seda kasutatakse kaugelearenenud juhtudel. Kuid see on keeruline ja kulukas ravi. Teine käesoleval ajal kasutatav türosineemia ravi hõlmab kaheetapilist lähenemist: (i) türosiinhüdrosülaasi uue inhi-

biitori NTBC ((2-(2-nitro-4-trifluorometüülbensoül)-1,3-tsükloheksaandiooni) kasutamine, mis takistab suktsinüülatsetooni moodustumist, ja (ii) vähese türosiini- ja fenüülalaniinisaldusega toidu kasutamine, et saada hakkama metaboliseerimist nõudva türosiini kogusega. Kuid tänaseni on vastuseta küsimus NTBC ohutusest ning türosiini- ja fenüülalaniinipiirang toidus sõltub patsiendi teadlikkusest ja nõusolekust, mis võib olla problemaatiline, eriti noorukite ja täiskasvanute puhul, nagu on mainitud eespool.

[0007] Alkaptonuuria on veel üks näide haigusseisundist, mis osutab teatud aminohapete metabolismihäirele. Praegu kasutatavad ravid hõlmavad toiduga saadava fenüülalaniini ja türosiini piiramist, et vähendada metaboliidi, homogentisiinhappe ladestumist. Mõned patsiendid võtavad NTBC-d ja C-vitamiini, et vähendada homogentisiinhappe agregeerumist. Kuid tänaseni on vastuseta küsimus NTBC ohutusest ja türosiini- ja fenüülalaniinipiirang toidus sõltub patsiendi teadlikkusest ja nõusolekust, mis võib olla problemaatiline, eriti noorukite ja täiskasvanute puhul, nagu on mainitud eespool.

[0008] Homotsüstinuuria on veel üks näide haigusseisundist, mis osutab teatud aminohapete metabolismihäirele. Selle haigusseisundiga patsiendid järgivad sageli piiratud metioniinisaldusega dieeti. Kuid toiduga kaasnev metioniinipiirang sõltub patsiendi teadlikkusest ja nõusolekust, mis võib olla problemaatiline, nagu on mainitud eespool.

[0009] Hulk haigusseisundeid osutavad metabolismihäiretele, mis on mõjutatud hargnenud ahelaga aminohapete (*branched chain amino acids*, "BCAA-d"), nagu leutsiin, isoleutsiin ja valiin, metaboliseerumise poolt. Leutsiin, isoleutsiin ja valiin on asendamatud aminohapped, mida peab saama toiduvalguna. Viga mitmeetapilise metabolismiraja ühes etapis, kus BCAA-d muudetakse energiaks, põhjustab BCAA vahepealse metaboliidi toksilisel tasemel ladestumise, mis põhjustab haigestumise. See on suur rühm haigusi, mis hõlmab näiteks vahtrasiirupuriini haigust (*maple syrup urine disease*, "MSUD"), isovaleroatsideemiat, metüülmaloonatsideemiat ja propioonatsideemiat. Neid haigusi ravitakse spetsiaalsete toidulisanditega, milles on vähe metaboliseerumisvigu tekitavaid BCAA-sid. Kuid nagu on mainitud eespool, sõltub selliste haiguste ja haigusseisundite edukas ravi teatud aminohapete või aminohapete kogumi piiratud sisaldusega toidu abil patsiendi teadlikkusest ja nõusolekust, mis võib olla problemaatiline.

[0010] Ülaltoodu valguses on vaja haigusseisundite, nagu fenüülketonuuria, mis osutab teatavate aminohapete metabolismihäirele, raviks meetodeid ja materjale ning käesolev leiutis on osaliselt suunatud nende vajaduste rahuldamisele.

LEIUTISE KOKKUVÕTE

[0011] Käesolevas leiutises käsitletakse LNAA toidulisandi kasutamist fenüülketonuuria ja/või fenüülalaneemia all kannatava isiku raviks. Täpsemalt käsitletakse LNAA toidulisandi, mis sisaldab 600 mg LNAA toidulisandi kohta:

ligikaudu 100 mg kuni 290 mg Tyr;

ligikaudu 30 mg kuni 90 mg Trp;

ligikaudu 25 mg kuni 75 mg Met;

ligikaudu 15 mg kuni 45 mg iLeu;

ligikaudu 15 mg kuni 50 mg Threo;

ligikaudu 15 mg kuni 50 mg Val;

ligikaudu 40 mg kuni 200 mg Leu;

ligikaudu 15 mg kuni 45 mg His;

ligikaudu 15 mg kuni 50 mg Arg; ja

ligikaudu 5 mg kuni 200 mg Lys,

kusjuures see toidulisand on lisaks praktiliselt fenüülalaniinivaba, kasutamist ravimi valmistamiseks fenüülketonuuria ja/või fenüülalaneemia all kannatava isiku raviks parenteraalse manustamise teel, surudes isikul maha Phe transpordi GI-traktist verre, kusjuures toidulisand manustatakse ühekordse peroraalse annusena 100 kuni 10000 mg isiku kehamassi kilogrammi kohta.

LEIUTISE ÜKSIKASJALIK KIRJELDUS

[0012] Siin kasutatuna tähendab "LNAA toidulisand" mis tahes kompositsiooni, mis sisaldab minimaalselt ühte või enamat suurt neutraalset aminohapet, nagu Phe, Leu, Tyr, Trp, Met, iLeu, Val ja Threo. LNAA toidulisand võib vajadusel sisaldada teisi komponente, nagu aluselised aminohapped (nt Arg, His, Lys, jne), ja/või teisi aminohappeid, vitamiine, mineraale, sideaineid, lahjendeid, dispergeerivaid aineid ja teisi abiaineid. Näitena võib LNAA toiduli-

sand sisaldada üks, kaks, kolm, neli, viis, kuus või enam kui kuus suurt neutraalset aminohapet.

[0013] LNAA toidulisand võib olla praktiliselt vaba ühest või enamast konkreetsest aminohappest, nagu on näiteks LNAA toidulisandi puhul, mis on praktiliselt vaba aminohappest fenüülalaniin. Selles leiutises kasutatuna peaks LNAA toidulisand olema praktiliselt vaba aminohappest Z, kui aminohapet Z on koguses, mis on massi järgi väiksem kui 10% (nt väiksem kui ligikaudu 9%, väiksem kui ligikaudu 8%, väiksem kui ligikaudu 7%, väiksem kui ligikaudu 6%, väiksem kui ligikaudu 5%, väiksem kui ligikaudu 4%, väiksem kui ligikaudu 3%, väiksem kui ligikaudu 2% ja/või väiksem kui ligikaudu 1%) suurte neutraalsete aminohapete kogumassist LNAA toidulisandis.

[0014] "Ravi" tähendab siin kasutatuna haigusseisundi otsese või kaudse põhjuse ravi, haigusseisundi sümptomite ravi või mõlemat.

[0015] "Isik" tähendab siin kasutatuna mis tahes looma, näiteks mis tahes imetajat, näiteks hiiri, rotte, kasse, küülikuid, koeri, sigu, hobuseid, lehmi ja primaate nagu inimesed. Siin kasutatuna hõlmavad näiteisikud väikelapsi, lapsi, noorukeid, täiskasvanuid, mehi, naisi, see-ga inimesi, kes on alla ligikaudu 2 aastat vanad, inimesi, kes on ligikaudu 2 aastat kuni 5 aastat vanad, inimesi, kes on ligikaudu 5 aastat kuni 10 aastat vanad, inimesi, kes on ligikaudu 10 aastat kuni 18 aastat vanad, inimesi, kes on ligikaudu 18 aastat kuni 30 aastat vanad, inimesi, kes on ligikaudu 30 aastat kuni 40 aastat vanad, inimesi, kes on ligikaudu 40 aastat kuni 50 aastat vanad, inimesi, kes on ligikaudu 50 aastat kuni 60 aastat vanad, inimesi, kes on ligikaudu üle 60 aasta vanad, inimesi, kes kannatavad fenüülketonuuria ja/või fenüülalaneemia all.

[0016] Siin kasutatuna tähendab aine "parenteraalne manustamine" mis tahes manustamist, millega aine toimetatakse ühe või enama portsjonina seedetrakti ("GI"), näiteks makku, peensoolde ja jämesoolde. Parenteraalne manustamine võib toimuda näiteks peroraalselt, neelates alla näiteks tableti, kapsli või muu tahke ravimvormi või neelates alla vedela lahuse või suspensiooni. Lisaks või alternatiivselt võib parenteraalne manustamine toimuda toidutoru, sondi või muu tavalise parenteraalse manustamismeetodi abil.

[0017] Leiutise kohaselt hõlmab kasutamine isikule LNAA toidulisandi, mis sisaldab 600 mg LNAA toidulisandi kohta:

ligikaudu 100 mg kuni 290 mg Tyr;

ligikaudu 30 mg kuni 90 mg Trp;
ligikaudu 25 mg kuni 75 mg Met;
ligikaudu 15 mg kuni 45 mg iLeu;
ligikaudu 15 mg kuni 50 mg Threo;
ligikaudu 15 mg kuni 50 mg Val;
ligikaudu 40 mg kuni 200 mg Leu;
ligikaudu 15 mg kuni 45 mg His;
ligikaudu 15 mg kuni 50 mg Arg, ja
ligikaudu 5 mg kuni 200 mg Lys, parenteraalset manustamist.

Nagu eriala asjatundjad mõistavad, võib iga selles LNAA toidulisandis sisalduva aminohappe kogus varieeruda määratud piirides. Peale selle, nagu eriala asjatundjad samuti mõistavad, võib leiutise selle eripära kohane LNAA toidulisand vajadusel sisaldada ühte või enam teist aminohapet, mida eespool ei ole mainitud, või leiutise selle eripära kohane LNAA toidulisand võib olla praktiliselt vaba ühest või enamast teisest aminohapest, mida eespool ei ole mainitud.

[0018] Eespool arutletud leiutisekohane kasutamine võib toimuda isikule LNAA toidulisandi parenteraalse manustamise mis tahes sobivas vormis. On mõistetav, et leiutise kohaselt manustatava LNAA toidulisandi tegelik eelistatav kogus varieerub vastavalt LNAA toidulisandis sisalduvale konkreetsele suurele neutraalsele aminohappele või hapetele, LNAA toidulisandis sisalduvatele teistele komponentide olemusele ja parenteraalse manustamise vormile. Eriala asjatundjad võivad võtta arvesse paljusid tegureid, mis modifitseerivad LNAA toidulisandi toimet (nt kehamassi, sugu, toitumist, manustamisaega, manustamisviisi, eritumiskii- rust, isiku seisundit, ravimikombinatsiooni ja reaktsiooni ning selle raskust). Manustamine võib toimuda pidevalt või perioodiliselt maksimaalse talutava annuse piires. Eriala asjatundjad saavad määrata antud haigusseisundite kogumi puhul optimaalsed manustamismäärad annuste manustamise tavapäraste testide abil, nagu need, mida kirjeldatakse järgnevates näidetes. Lühidalt, annus võib põhineda fenüülalaniini tasemel plasmas. Annus võib põhineda näiteks fenüülalaniini tasemel plasmas 0, 3 ja/või 6 tundi pärast LNAA toidulisandi manustamist.

[0019] Leiutise kohaselt võib LNAA toidulisandit manustada ühekordse peroraalse annusena ligikaudu 0,1 g kuni 10 g isiku kehamassi kilogrammi kohta söögiga praktiliselt ühel ajal.

Siin kasutatuna tähendab "söögiga praktiliselt ühel ajal" ajaperioodi ligikaudu 4 tundi enne söögiaega kuni ligikaudu 1 tund pärast söögiaega, näiteks ligikaudu 4 tundi enne söögiaega kuni ligikaudu söögi ajal, ligikaudu 3 tundi enne söögiaega kuni ligikaudu söögi ajal, ligikaudu 2 tundi enne söögiaega kuni ligikaudu söögi ajal, ligikaudu 1 tund enne söögiaega kuni ligikaudu söögi ajal ja/või ligikaudu 0,5 tundi enne söögiaega kuni ligikaudu söögi ajal. LNAA toidulisandit võib manustada näiteks söögiga praktiliselt ühel ajal ühekordse peroraalse annusena ligikaudu 0,2 g kuni 5 g/kg, näiteks ligikaudu 0,3 g kuni 3 g/kg, ligikaudu 0,4 g kuni 2 g/kg, ligikaudu 0,5 g kuni 1 g/kg isiku kehamassi kohta. Alternatiivselt võib LNAA toidulisandit manustada näiteks mitmekordsete peroraalsete annustena päeva jooksul (nt manustades iga 2-6 tunni järel). LNAA toidulisand võib vajadusel olla valmistatud nii, et see tagab LNAA-de pideva vabanemise aja jooksul.

[0020] Eespool arutletud leiutisekohane kasutamine võib hõlmata lisaetappe. Leiutisekohane kasutamine võib näiteks lisaks hõlmata isikul toiduga saadava fenüülalaniini piiramist. Leiutise eesmärkide kohaselt peaks isikul toiduga saadav fenüülalaniin olema piiratud, kui isiku toit (i) on täielikult või osaliselt valitud fenüülalaniini sisalduse järgi, või (ii) kui isiku toit sisaldab toiduga saadavat fenüülalaniini päevases üldkoguses, mis on oluliselt väiksem (nt enam kui 50% väiksem), kui on toiduga saadava fenüülalaniini päevane üldkogus kogu populatsioonis. Leiutisekohane kasutamine võib alternatiivselt hõlmata isikul toiduga saadava fenüülalaniini mittepiiramist. Leiutise eesmärkide kohaselt peaks isikul toiduga saadav fenüülalaniin olema mitte piiratud, kui isiku toit sisaldab toiduga saadavat fenüülalaniini päevases üldkoguses, mis on praktiliselt samasugune (nt pluss või miinus alla 50%), kui on toiduga saadava fenüülalaniini päevane üldkogus kogu populatsioonis.

[0021] Leiutisekohase LNAA toidulisandi näited on sellised, mida on kirjeldatud siin eespool viidetega nende leiutisekohasele kasutamisele. Neid LNAA toidulisandeid võib valmistada, kasutades looduslikest allikatest pärit aminohappeid, või aminohappeid võib valmistada sünteetiliselt eriala asjatundjatele tehnika tasemest hästi tuntud meetodite kohaselt. Need võivad olla mis tahes sobivas ravimvormis, nagu need, mille üle on arutletud eespool, ja mis sobivad parenteraalseks manustamiseks, ning need võivad sisaldada lisaks suurtele neutraalsetele aminohapetele ja teistele aminohapetele vitamiine, mineraale, abiaineid ja muud sarnast. Peroraalseks manustamiseks sobivad ravimvormid on näiteks tabletid, dispergeeritavad pulbrid, graanulid, kapslid, suspensioonid, siirupid ja eliksiirid. Tablettides kasutatavad inertsed lahjendid ja kandjad on näiteks kaltsiumkarbonaat, naatriumkarbonaat, laktoos ja talk.

Tabletid võivad sisaldada ka granuleerimist ja disperseerimist hõlbustavaid aineid, nagu tärklis ja algiinhape, sideaineid, nagu tärklis, želatiin ja akaatsia, ja libiaineid, nagu magneesiumstearaat, stearhape ja talk. Tabletid võivad olla katmata või kaetud tuntud meetodite kohaselt, et viivitada nende lagunemist ja imendumist. Inertseteks lahjenditeks ja kandjateks, mida võib kasutada kapslites, on näiteks kaltsiumkarbonaat, kaltsiumfosfaat ja kaoliin. Üldmainitud kapslid või tabletid võib vajadusel valmistada sellistena, et tagada LNAA-de pidev vabanemine aja jooksul. Suspensioonid, siupid ja eliksiirid võivad sisaldada tavapäraseid abiaineid, näiteks metüülselluloosi, tragakanti, naatriumalginaati, mürgavaid aineid, nagu letsitiin ja polüoksüetüleenstearaat, ja säilitusaineid nagu etüül-*p*-hüdroksübensoaat.

NÄITED

Näide 1 - hüpotees

[0022] Aminohapete kättesaadavuse ajus määrab (i) aminohapete varu plasmas ja (ii) plasmas olevate aminohapete varu konkureerimine aminohapete tavalistele seondumiskohtadele BBB neutraalsete aminohapete transpordisüsteemi kandevalgul. On esitatud hüpotees, et konkureerimine neutraalsete aminohapete kandja tavalistele seondumiskohtadele on füsioloogilistes tingimustes kesknärvisüsteemi unikaalne omadus (Pardridge, mis on siia liidetud viitena) ja et selline konkureerimine on aluseks BBB-kaudse transpordi ja aju mõjutavate kliiniliste häirete (nt PKU) korrelatsioonile. Eelnevad PKU-ga seotud uuringud on keskendunud Phe-st erinevate LNAA-de konkureerivale transpordile läbi vere-aju barjääri, et suruda maha Phe sisenemist ajju, nendes on ignoreeritud LNAA-de transporti seedetraktist verre, mis võib olla peamine tegur aminohapete varu määramisel plasmas.

[0023] BBB-s on tuvastatud üheksa erinevat transpordisüsteemi (Oldendorf, "Measurement of Brain Uptake of Radiolabelled Substances Using a Tritiated Water Internal Standard," Brain Res., 24 (2): 372-376 (1970), mis on siia liidetud viitena). Antud substraadi transporti läbi BBB iseloomustatakse selle afiinsuskonstandiga K_m . Madalam K_m -väärtus vastab suuremale afiinsusele kandevalgule seondumiskoha suhtes. BBB iga transpordisüsteem vahendab rühma substraatide läbivoolu kapillaaridest. Üks transpordisüsteem vahendab näiteks LNAA transporti, teine vahendab heksooside ülekannet, jne.

[0024] Kolm BBB transpordisüsteemi vahendavad tavaliste aminohapete transporti, eraldi kandevalgud on LNAA-dele, aluselistele aminohapetele ja happelistele aminohapetele. Michaelise konstandi K_m väärtused tavaliste aminohapete kolmele klassile on toodud allpool tabelis 1 (Pardridge, mis on siia liidetud viitena).

TABEL 1

Süsteem	Vastav aminohape või muu substraat	K_m (mM)
neutraalsed aminohapped	Phe	0,12
aluselised aminohapped	Lys	0,10
happelised aminohapped	Glu	0,04
heksoosid	glükoos	9
kilpnäärmehormoon	T3	0,0011

[0025] Kuigi BBB transpordisüsteemide kohta on saadud palju kvantitatiivset teavet, on suhteliselt vähe teada kandevalkude moduleerimisest. Võiks oodata, et transpordisüsteemi aktiivsuse arengust tingitud või haiguslik esilekutsumine või mahasurumine mõjutab sügavalt aju metabolismiradasid, mida piirab eelühendi kättesaadavus.

[0026] Neutraalsete aminohapete absoluutsed ja näivad K_m -väärtused BBB-s on määratud eksperimentaalselt (Pardridge, mis on siia liidetud viitena). K_m absoluutne väärtus on K_m -väärtus, kui puudub teiste neutraalsete aminohapete konkurents LNAA seondumiskohtadele kandevalgul. "Näiv K_m " on K_m -väärtus teiste LNAA-de juuresolekul, mis konkureerivad LNAA seondumiskohtadele kandevalgul. Antud aminohappe näiv (*apparent*) K_m (" $K_m(\text{app})$ ") väärtus arvutatakse absoluutse K_m -väärtuse ja iga LNAA taseme plasmas, jagatuna selle K_m -väärtusega, suhete summa abil, nagu on näidatud allpool võrrandiga 1.

$$K_m(\text{app}) = K_m (1 + \sum [aa] / K_m) \quad (\text{Eq. 1})$$

[0027] $K_m(\text{app})$ eksperimentaalsed väärtused LNAA transpordisüsteemile BBB-s on toodud allpool tabelis 2 (Pardridge, mis on siia liidetud viitena).

TABEL 2

Aminohape	Tüüpiline tase plasmas (mM)	Km (mM)	Km(app) (mM)
LNAA-d			
Phe	0,05	0,12	0,45
Leu	0,10	0,15	0,53
Tyr	0,09	0,16	0,58
Trp	0,10	0,19	0,71
Met	0,04	0,19	0,77
iLeu	0,07	0,33	1,3
Val	0,14	0,63	2,5
Threo	0,19	0,73	3,0
Aluselised aminohapped			
His	0,05	0,28	1,1
Arg	0,10	0,09	0,40
Lys	0,30	0,10	0,25

Võrrand 1 ennustab, et kui LNAA tase plasmas on palju väiksem kui selle Km-väärtus, siis see aminohape ei konkureeri efektiivselt seondumiskohale kandevalgul. LNAA-de Km seondumisel kandevalkudele teistes elundites kui aju on 5-10 mM (vt tabelit 3), see on 50-100 korda suurem kui LNAA-de kontsentratsioon füsioloogilises plasmas. Võrrand 1 ennustab, et normaalsetes füsioloogilistes tingimustes *in vivo* ei esine LNAA-del märgatavat konkurentsi teistes kudedes kui ajukoos. Siiski on näidatud *in vitro* konkurentsi perifeersetes kudedes aminohapete kontsentratsioonidel plasmas 5-50 M. Nendest tähelepanekutest lähtudes on leiutise autor esitanud hüpoteesi, et Phe-st erinevate aminohapete kõrge taseme puhul võiks olla mõeldav Phe konkureerimine GI-trakti transpordisüsteemis.

[0028] Km eksperimentaalsed väärtused transpordil sooleepiteelis on toodud allpool tabelis 3 (Pardridge, mis on siia liidetud viitena).

TABEL 3

Aminohape	Km (mM) sooleepiteelis
Phe	1

Aminohape	Km (mM) sooleepiteelis
Leu	2
Met	5
His	6
Val	3

Kuna LNAA-sid seostatakse paljude kliiniliste häiretega ja kuna LNAA-d sisenevad ajusse LNAA-de BBB transpordisüsteemi kaudu, on nende aminohapete eemaldamine ülalmainitud konkurentsitoime eesmärgiks. Kuna Phe-l on suhteliselt kõrge afiinsus LNAA transpordisüsteemi suhtes (tabel 1) ja kuna fenüülketonuuria puhul on Phe tase plasmas märgatavalt tõusnud, tekib PKU puhul BBB kandevalgu seondumiskohtades Phe-ga küllastumine, seega Phe kõrge tase ajus ja teiste LNAA-de tase ajus on maha surutud (Pardridge, "Blood-Brain Barrier Carrier-Mediated Transport and Brain Metabolism of Amino Acids," *Neurochem. Res.*, 23: 635-644 (1998), mis on siia liidetud viitena).

[0029] Seega on esitatud hüpotees, et Phe-st erinev LNAA toidulisand võiks konkureerida efektiivselt Phe-ga BBB transpordisüsteemis, vähendades Phe transporti ajju ja suurendades teiste LNAA-de transporti ning nõrgendades nii PKU sümptomeid (Andersen et al., "Lowering Brain Phe Levels by Giving Other LNAAs," *Arch. Neurol.*, 33 (10): 684-686 (1976) ja Kaufman, "Phenylketonuria: Biochemical Mechanisms", 1-132, Agranoff et al., toim., *Advances in Neurochemistry*, New York: Plenum Press (1977), mis on siia liidetud viitena). Et vähendada Phe sissevoolu ajju, manustati vanematele PKU patsientidele toidulisandit, mis sisaldas hargnenud ahelaga neutraalseid aminohappeid, nagu valiin, isoleutsiin ja leutsiin (Berry, mis on siia liidetud viitena), mille puhul teatati käitumishäirte olulisest paranemisest. Kaufmani teoses pakuti, et neurotransmitterite eelühendite türosiini ja trüptofaani lisamine Berry toidulisandile peaks andma täiendava paranemise (Kaufman, mis on siia liidetud viitena).

[0030] Seda hüpoteesi testiti eksperimentaalselt PKU patsientide Phe taseme ajus kvantitatiivse mõõtmisega TMR abil, kui neile manustati peroraalselt Phe (0,1 g/kg) koos täiendavate 0,15 g/kg Phe-st erinevate LNAA-dega või selleta (Pietz et al., "Large Neutral Amino Acids Block Phenylalanine Transport into Brain Tissue in Patients with Phenylketonuria," *J. Clin. Invest.*, 103 (8): 1169-1178 (1999) ("Pietz"), mis on siia liidetud viitena). LNAA toidulisand sisaldas valiini, metioniini, isoleutsiini, leutsiini, türosiini, histidiini ja trüptofaani. Phe alg-tase plasmas oli 1 mM ja Phe tase ajus oli 0,25 mM. LNAA toidulisandita täheldas Pietz, mis

on siia liidetud viitena, et Phe tase ajus suurenes kuni 0,4 mM pärast Phe manustamist, sellega kaasnesid ajuaktiivsuse häired EEG-ga mõõtmisel. Kuid koos LNAA toidulisandiga oli Phe sissevool ajju täielikult blokeeritud ja EEG kohaselt ei esinenud aktiivsuse vähenemist. Need uurimistulemused viisid Nilabi Prekunili, PKU raviks sobiva kaubandusliku LNAA toidulisandi väljatöötamiseni.

Näide 2 - LNAA toidulisandipreparaat

[0031] Nagu on näidatud eespool, esitas leiutise autor hüpoteesi, et LNAA toidulisandit, mis on kavandatud nii konkureerima Phe transpordiga GI-traktist verre kui ka seda maha suruma ja nii konkureerima Phe transpordiga verest läbi BBB ajusse kui ka seda maha suruma, võiks kasutada kui PKU ravimit. Täpsemalt, esitati hüpotees, et LNAA toidulisandi peroraalne manustamine iga söögikorra ajal peaks suruma maha Phe transpordi GI-traktist verre nii, et BBB transpordisüsteem ei oleks üleküllastatud Phe kõrge taseme poolt, nagu on tavaliselt PKU patsientide veres.

[0032] Nagu on näidatud võrrandiga 1, näitab iga aminohappe puhul mõiste [(aa)/Km] aminohappe võimet konkureerida Phe-ga seondumiskohtadele kandevalgul. Nagu on näha tabelist 1, on Leu, Tyr, Trp ja Met LNAA-d, mis saaksid efektiivselt konkureerida Phe-ga BBB kandevalgul.

[0033] Kuigi LNAA-de afiinsuse iseloomustamiseks kandevalgul seondumiskohtade suhtes GI-traktis on tehtud vähe tööd, on Phe transpordi LNAA-ga inhibeerimise *in vitro* mõõtmine inimese sooleepiteeli rakkudes (Hidalgo et al., "Transport of a Large Neutral Amino Acid (Phenylalanine) in a Human Intestinal Epithelial Cell Line: Caco-2," Biochim. Biophys. Acta, 1028: 25-30 (1990) (Hidalgo)), mis on siia liidetud viitena) näidanud, et Leu oli tugev inhibiitor, ja huvitaval kombel, et LNAA-d ja aluselised aminohapped tunduvad soolerakkudes jagavat kandevalgul seondumiskohti, ja Lys on inhibeerib tugevasti Phe transporti. Tabelis 4 on esitatud katsete tulemused Phe transpordi inhibeerimisel aminohapetega Caco-2 rakkudes, monokihtidele kanti iga aminohappe 1 mM kontsentratsiooni juuresolekul 10 μ M Phe puhvris ja Phe transport läbi monokihi loeti suhtena sellest, mis oli konkureeriva aminohappe puudumisel.

TABEL 4

Inhibiitor	Inhibeerimine, %
LNAA-d	
Leu	55%
Tyr	45%
Trp	36%
Aluselised aminohapped	
Lys	50%
His	33%

Tuleb tähele panna, et Hidalgo poolt mõõdetud Phe Km-väärtus soolerakkude transpordisüsteemis, mis on siia liidetud viitena, on 0,56 mM, mis on lähedane väärtusega 1 mM, mis on esitatud Pardridge poolt, mis on siia liidetud viitena. Tuleb tähele panna, et Km varieerumine on erinevate LNAA-de puhul sooleepiteelis (tabelis 3) suurem kui BBB-s. Phe/Leu/Met Km-väärtuste suhe sooleepiteelis on näiteks 1/2/5, samas BBB-s on see 1/1,25/1,58.

[0034] Praegu PKU raviks kasutatav LNAA toidulisand on Prekunil, mille koostis, põhinevana inimese emapiima aminohapetel, on esitatud tabelis 5. Phe transpordi inhibeerimisel Caco-2 rakkudes (Hidalgo, mis on siia liidetud viitena) täheldatu põhjal kavandas käesoleva leiutise autor alternatiivsed toidulisandid (esitatud tabelis 5 kui SuppM1 ja SuppM2), milles suurendati märgatavalt Prekunili Leu ja Lys tasemeid. Arvatakse, et Leu taseme suurendamine surub veelgi maha Phe transporti GI-traktist verre ja verest ajuu. Arvatakse, et Lys taseme suurendamine surub veelgi maha Phe transporti GI-traktist verre.

TABEL 5

Aminohape	Prekunil		SuppM1		SuppM2	
	(mg)	(mmol)	(mg)	(mmol)	(mg)	(mmol)
L-Tyr	194,1	1,07	194,1	1,07	195	1,08
L-Trp	61,1	0,30	61,1	0,30	51	0,25
L-Met	49,7	0,33	49,7	0,33	32	0,21
L-iLeu	31,5	0,24	31,5	0,24	35	0,22
L-Threo	32,8	0,28	32,8	0,28	32	0,27

Aminohape	Prekunil		SuppM1		SuppM2	
	(mg)	(mmol)	(mg)	(mmol)	(mg)	(mmol)
L-Val	32	0,27	32	0,27	35	0,30
L-Leu	30	0,24	130	1,00	80	0,61
L-His	31,3	0,20	31,3	0,20	20	0,13
L-Arg	34	0,20	34	0,20	0	0
L-Lys	0	0	0	0	20	0,14
Aminohapete üldkogus	496,5	3,13	596,5	3,89	500	3,21
Phe FOM-Km(app)		18,3		23,4		19,95

[0035] Kuna liige [$\Sigma(aa)$ / iga aa Km] võrrandis 1 väljendab määra, millega toidulisandi iga aminohape konkureerib Phe-ga antud transpordisüsteemis, ja kuna Phe Km-väärtus on mõõdetud BBB transpordisüsteemis, võib Phe näiva Km hüvetegurit iga tabelis 5 toodud toidulisandi aminohappe puhul väljendada toidulisandis sisalduva iga aminohappe millimoolide arvu suhte, jagatuna Km-ga, summeerimisega. See "hüvetegur" (*figure of merit*, siin viidatud ka kui "FOM") on esimest järku lähend määrale, millega toidulisand võib suruda maha Phe ülekande plasmast ajju, ja näitab, et leiutisekohased toidulisandid peaksid olema 28% (SuppM1) ja 9% (SuppM2) efektiivsemad Phe transpordi mahasurumisel plasmast ajju kui Prekunil. Kuid tuleb tähele panna, et toidulisand SuppM2 on kavandatud optimeerima konkureerimist Phe-ga GI-trakti transpordisüsteemis ja annab ainult väikese paranemise FOM-Km(app) väärtuses konkureerimisel Phe-ga BBB transpordisüsteemis.

[0036] Phe-st erinevate LNAA-de Km-väärtusi GI-trakti transpordisüsteemis ei teata kõikide Phe-st erinevate LNAA-de puhul (tabelis 3) ja seega ei saa antud leiutisekohastele toidulisanditele arvutada sarnaseid konkureerimisandmeid. Kuid võttes arvesse käesolevat hüpoteesi, viitavad Hidalgo Caco-2 rakkudega saadud tulemused, mis on siia liidetud viitena, ja esitatud tabelis 4, et Leu ja Lys peaksid olema efektiivsed Phe transpordi mahasurumisel GI-traktist verre. Seega toidulisandi nagu Prekunil suurendamine täiendava leutsiini ja lüsiiniga nagu toidulisandis SuppM2 peaks suurendama konkureerimist Phe-ga GI-trakti transpordisüsteemis, vähendades plasmast pärit Phe varu BBB-s.

Näide 3 - Prekunili, SuppM1 ja SuppM2 toime Phe tasemele hiire plasmas

[0037] Toidulisandeid SuppM1 ja SuppM2 manustati PKU-ga, genotüübiga ENU 2/2 klassikalise PKU tunnustega hiirtele ühekordse peroraalse annusena 0,5 g/kg ja fenüülalaniini taset plasmas jälgiti 0, 3, 6 ning 24 tundi pärast manustamist. Tuleks märkida, et 0,5 g/kg on toidulisandi suhteliselt väike annus, kuna Prekunili manustatakse tavaliselt 1 g/kg. On teada, et LNAA toidulisandid suruvad tavaliselt fenüülalaniini taseme plasmas alla mitmeks tunniks pärast võtmist, seejärel toime väheneb, nii et manustamine võib olla vajalik iga söögikorra ajal. Seetõttu võeti fenüülalaniini väärtus 6 tunni pärast näiduks, milleni fenüülalaniini ladesumine oli alla surutud.

[0038] Allpool tabelis 6 on näidatud andmed ühe hiire (P448) kohta, kes ei saanud mis tahes toidulisandit, ühe hiire (P455), kellele manustati kaubanduslikku toidulisandit Prekunil, ühe hiire (P430), kellele manustati 35 mg Leu-ga täiendatud Prekunili, kahe hiire (P456 ja P259), kellele manustati Prekunili pluss 100 mg Leu (s.t SuppM1), ja kahe hiire (P433 ja P482) kohta, kellele manustati toidulisandit SuppM2. Täpsemalt, tabelis 6 on näidatud Phe tase plasmas (mg/dl) hiirtel, kellele manustati toidulisandeid LNAA (0,5 g/kg, ühekordse annusena), 0, 3, 6 ja 24 tundi pärast manustamist.

TABEL 6

Aeg (tundides)	Kontroll	Prekunil	Prekunil + 35 mg Leu	Prekunil + 100 mg Leu (SuppM1)		SuppM2	
	P448	P455	P430	P456	P259	P433	P482
0	33,20	27,14	27,23	25,37	27,22	18,69	21,10
3	30,91	24,23	26,02	23,20	25,57	14,63	16,86
6	28,91	22,17	25,21	17,49	19,02	13,68	15,39
24	30,14	20,89	27,13	20,88	21,42	20,06	23,78

[0039] Toidulisandi Prekunil täiendamine 100 mg Leu-ga (SuppM1), aminohappega, mis peaks efektiivselt konkureerima Phe-ga kandevalguga seondumiskohtadele nii sooleepiteelis kui ka BBB-s, andis seega Phe taseme plasmas märgatava mahasurumise. Kui Prekunil ise andis Phe tasemes 20% vähenemise, siis toidulisand SuppM1 andis Phe tasemes plasmas 6 tundi pärast manustamist 30% vähenemise mõlemal testitud hiirel. Täiendades toidulisandit

nii leutsiini kui ka lüsiiniga, nagu SuppM2 puhul, et suunata see GI transpordisüsteemile, saadi Phe tasemes plasmas 6 tundi pärast manustamist 70% vähenemine mõlemal testitud hiirel. Phe taseme suurepärane mahasurumine toidulisandiga SuppM2 näitab selle võimet konkureerida efektiivsemalt Phe-ga GI transpordisüsteemis kui teised toidulisandid, säilitades samal ajal võime konkureerida sarnaselt BBB transpordisüsteemis.

[0040] Türosiini analüüs hiirte plasmas, kellele manustati SuppM2, näitas 24-tunnise eksperimendi jooksul türosiini stabiilseid tasemeid 0,58-0,50 mg/dl ja 0,44-0,40 mg/dl vastavalt hiirtel P433 ja P482.

[0041] On mõistetav, et SuppM1 ja SuppM2 ei tarvitse olla optimaalsed LNAA toidulisandi kompositsioonid PKU raviks. LNAA toidulisandit võib näiteks modifitseerida nii, et see säilitaks neurotransmitteri eelaminohapete, nagu türosiin ja trüptofaan, nõutava taseme ajus, parandades samal ajal toidulisandi konkureerimist Phe-ga GI-trakti transpordisüsteemis ja säilitades toidulisandi konkureerimise Phe-ga BBB transpordisüsteemis.

Näide 4 - LNAA toidulisandi täiendav preparaat

[0042] Tabelis 7 on esitatud täiendav toidulisandipreparaat, mis nimetati SuppM3-ks. See toidulisandipreparaat selgitab lisaks leiutisekohaseid kompositsioone ja meetodeid.

TABEL 7

Aminohape	SuppM3 (mg)
L-Tyr	195,0
L-Trp	51,0
L-Met	32,0
L-iLeu	35,0
L-Threo	32,0
L-Val	35,0
L-Leu	130,0
L-His	30,0
L-Arg	30,0
L-Lys	30,0
Aminohapete üldkogus	600,0

PATENDINÕUDLUS

1. LNAA toidulisandi, mis sisaldab 600 mg LNAA toidulisandi kohta:

ligikaudu 100 mg kuni 290 mg Tyr;

ligikaudu 30 mg kuni 90 mg Trp;

ligikaudu 25 mg kuni 75 mg Met;

ligikaudu 15 mg kuni 45 mg iLeu;

ligikaudu 15 mg kuni 50 mg Threo;

ligikaudu 15 mg kuni 50 mg Val;

ligikaudu 40 mg kuni 200 mg Leu;

ligikaudu 15 mg kuni 45 mg His;

ligikaudu 15 mg kuni 50 mg Arg ja

ligikaudu 5 mg kuni 200 mg Lys,

kusjuures toidulisand on lisaks praktiliselt fenüülalaniinivaba, kasutamine ravimi valmistamiseks fenüülketonuuria ja/või fenüülalaneemia all kannatava isiku raviks parenteraalse manustamise teel, surudes isikul maha Phe transpordi GI-traktist verre, kusjuures toidulisand manustatakse ühekordse peroraalse annusena 100 kuni 10000 mg isiku kehamassi kilogrammi kohta.

2. Kasutamine vastavalt nõudluspunktile 1, kusjuures toidulisand manustatakse ühekordse peroraalse annusena 200 kuni 10000 mg isiku kehamassi kilogrammi kohta.

3. Kasutamine vastavalt mis tahes nõudluspunktile 1 kuni 2, kusjuures toidulisand manustatakse ühekordse peroraalse annusena 500 kuni 10000 mg isiku kehamassi kilogrammi kohta.

4. Kasutamine vastavalt mis tahes nõudluspunktile 1 kuni 3, kusjuures toidulisand manustatakse ühekordse peroraalse annusena 200 kuni 2000 mg isiku kehamassi kilogrammi kohta.

5. Kasutamine vastavalt mis tahes nõudluspunktile 1 kuni 4, kusjuures toidulisand manustatakse ühekordse peroraalse annusena 500 kuni 1000 mg isiku kehamassi kilogrammi kohta.
6. Kasutamine vastavalt mis tahes nõudluspunktile 1 kuni 5, kusjuures ravim manustatakse söögiga praktiliselt ühel ajal.
7. Kasutamine vastavalt mis tahes nõudluspunktile 1 kuni 6, kusjuures ravim sisaldab vitamiine, mineraale ja abiaineid.
8. Kasutamine vastavalt mis tahes nõudluspunktile 1 kuni 7, kusjuures ravim on peroraalseks manustamiseks sobivas ravimvormis.
9. Kasutamine vastavalt nõudluspunktile 8, kusjuures ravim on tablett, dispergeeritav pulber, graanulid, kapsel, suspensioon, a siirup või eliksiir.