

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201992788 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.08.03

(22) Дата подачи заявки
2018.05.24

(51) Int. Cl. *A61K 31/00* (2006.01)
A61K 38/43 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01)

(54) ПРИМЕНЕНИЕ ГЛУТАМИНСИНТЕТАЗЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ГИПЕРАММОНИЕМИИ

(31) 1708288.4; 1800867.2
(32) 2017.05.24; 2018.01.19
(33) GB
(86) PCT/GB2018/051415
(87) WO 2018/215780 2018.11.29
(71) Заявитель:
ТОЭРИС ГМБХ (AT)

(72) Изобретатель:
Николсон Тамара (GB)
(74) Представитель:
Строкова О.В., Глухарёва А.О., Лыу
Т.Н., Угрюмов В.М., Христофоров
А.А., Гизатуллина Е.М., Гизатуллин
Ш.Ф., Костюшенкова М.Ю., Лебедев
В.В., Парамонова К.В. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к применению глутаминсинтетазы в качестве белкового терапевтического средства (такого как белковое средство для ферментозаместительной терапии) для лечения гипераммониемии. В частности, настоящее изобретение относится к системному введению глутаминсинтетазы. Глутаминсинтетаза может быть обеспечена в конъюгированной форме или в форме гибридного белка для повышения ее периода полужизни в кровотоке. Также предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая глутаминсинтетазу. Настоящее изобретение также относится к применениям, способам и композициям, включающим комбинацию белка глутаминсинтетазы и средства, снижающего уровень аммиака, такого как акцептор азота.

A1

201992788

201992788

A1

ПРИМЕНЕНИЕ ГЛУТАМИН-СИНТЕТАЗЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ

ГИПЕРАММОНИЕМии

ОПИСАНИЕ

Настоящее изобретение относится к применению глутамин-синтетазы в качестве белкового терапевтического средства (такого как белковое средство для ферментозаместительной терапии) для лечения гипераммониемии и, в частности, к системному введению глутамин-синтетазы. Таким образом, глутамин-синтетазу вводят в виде белка или полипептида с целью повышения уровней циркулирующей в крови глутамин-синтетазы. Глутамин-синтетаза может быть обеспечена в конъюгированной форме или в форме гибридного белка для повышения ее периода полужизни в кровотоке. Также предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая глутамин-синтетазу. Настоящее изобретение также относится к применениям, способам и композициям, включающим комбинацию белка глутамин-синтетазы и средства, снижающего уровень аммиака, такого как акцептор азота.

Гипераммониемия представляет собой метаболическое состояние, характеризующееся повышенным или избыточным содержанием аммиака в крови. Это опасное состояние, в первую очередь по той причине, что оно может приводить к повышенному поступлению аммиака в головной мозг, что, в свою очередь, вызывает неврологические нарушения и психоневрологические аномалии, которые могут быть очень тяжелыми, приводя, *inter alia*, к повреждению головного мозга, судорожным припадкам, задержке психического развития, коматозному состоянию и даже смерти. Действительно, энцефалопатия является распространенным и опасным осложнением гипераммониемии. Несмотря на то что точные механизмы энцефалопатии/повреждения головного мозга еще не понятны, полагают, что осмотический стресс астроцитов, вызванный повышенным содержанием аммиака, играет некоторую роль, приводя к отеку головного мозга и повышенному внутричерепному давлению. Гипераммониемия может быть врожденной или приобретенной и может быть первичной или вторичной.

Первичная (врожденная) гипераммониемия возникает в результате различных врожденных дефектов метаболизма, характеризующихся пониженной активностью любого из ферментов или белков-переносчиков в цикле мочевины. Действительно, такие врожденные дефекты метаболизма формируют группу заболеваний, называемых нарушениями цикла мочевины (UCD). Аммиак (NH_3), который может сосуществовать в организме со своей заряженной формой аммония (NH_4^+) в зависимости от pH, представляет

собой продукт катаболизма белков и других азотистых соединений. Он превращается ферментами в цикле мочевины в менее токсичное вещество, мочевины, перед выведением в мочу почками. Цикл мочевины, который также функционирует в качестве единственного источника выработки определенных аминокислот (аргинина, цитруллина и орнитина) в организме, содержит 6 ферментов, пять каталитических ферментов: карбамоилфосфат-синтетазу I (CPS1), орнитин-транскарбамилазу (OTC), или синтетазу аргинин-янтарной кислоты (ASS1), лиазу аргинин-янтарной кислоты (ASL) и аргиназу (ARG), а также продуцирующую кофактор N-ацетилглутамат-синтетазу (NAGS), и 2 белка-переносчика: орнитин-транслоказу (ORNT1) и цитрин. Дефект может встречаться в любом одном или нескольких из этих 8 белков. Тяжелая недостаточность или полное отсутствие активности любого из первых четырех ферментов или NAGS приводит в результате к накоплению аммиака и других метаболитов-предшественников в течение первых нескольких дней жизни. Младенцы с тяжелым UCD являются нормальными на момент рождения, но у них быстро развивается отек головного мозга и связанные симптомы в виде летаргии, анорексии, гипер- или гиповентиляции, гипертермии, судорожных припадков, неврологических позотонических реакций и коматозного состояния. На тяжесть UCD оказывает влияние положение дефектного фермента в пути и тяжесть дефекта фермента. При быстрой идентификации и современных стратегиях лечения выживаемость новорожденных с гипераммониемией резко выросла за последние несколько десятилетий, но умственные способности, как правило, ухудшены. При более легких или частичных недостаточностях этих ферментов и при недостаточности ARG накопление аммиака может запускаться болезнью или стрессом практически в любой момент жизни. При этих нарушениях повышения концентрации аммиака в плазме крови и симптомы часто являются более малозаметными, чем при проявлении UCD в неонатальный период, и первый распознаваемый клинический эпизод может не возникать в течение месяцев или десятилетий.

Вторичная гипераммониемия вызвана врожденными дефектами промежуточного метаболизма, характеризующимися пониженной активностью у ферментов/белков, которые не являются частью цикла мочевины, например, пропионовая ацидемия, метилмалоновая ацидемия, галактоземия, нарушения окисления жирных кислот и митохондриальные нарушения, или дисфункцией клеток (например, печени), которые вносят основной вклад в метаболизм аммиака и/или метаболизм азота в более широком смысле.

Приобретенную гипераммониемию обычно вызывают заболевания печени, в том числе как острая, так и хроническая печеночная недостаточность, как например, при

вирусном гепатите или чрезмерном употреблении алкоголя. Нарушенное функционирование печени или шунтирование сосудов печени, приводящее в результате к уменьшенной фильтрации крови в печени, ведет к гипераммониемии. Печеночная энцефалопатия, обусловленная гипераммониемией, является распространенным осложнением заболевания печени.

Гипераммониемия также может возникать по другим причинам, в том числе по причине почечной дисфункции, например, почечной дисфункции и/или недостаточности, токсичности лекарственного средства, например, обусловленной вальпроевой кислотой или циклофосфамидом, идиопатического гипераммониемического синдрома после иммуносупрессии или терапии цитотоксическими средствами, уреолита при застое мочи и инфекциях мочевых путей или из-за незаменимых аминокислот при полном парентеральном питании.

Современные методы лечения гипераммониемии предназначены для снижения уровней аммиака в крови и/или головном мозге, например, с помощью гемодиализа (как правило, применяемого у новорожденных) или посредством введения соединений, которые повышают удаление отходов азота, например, невсасывающихся дисахаридов (например, лактулозы) или антибиотиков (например, рифаксамина), или соединений, которые превращают азот в продукты, отличные от мочевины, которые затем выводятся, например, такие соединения, как бензоат натрия, аргинин, карглумовая кислота, фенилацетат или, в последнее время, фенилбутират, или L-орнитин-L-аспартат (LOLA), или L-орнитинфенилацетат (OP).

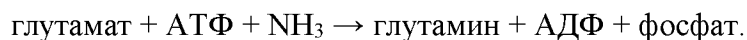
Тактика лечения состояния также может включать в себя контроль рациона для ограничения потребления белка и обеспечения достаточного потребления питательных веществ, в том числе контроль потребления белка и/или азота и парентеральное потребление калорий.

Тем не менее, несмотря на улучшения в лечении и контроле состояния современные терапевтические средства являются неспецифическими и не всегда достигают успеха в контроле состояния. В особенности, в случае UCD современные терапевтические средства могут не предупреждать многие эпизоды повышенных уровней аммиака, и пациентов с тяжелыми формами заболевания часто подвергают оценке в отношении трансплантации печени в возрасте около 5 лет. Таким образом, продолжает существовать потребность в дополнительных или улучшенных терапевтических средствах для гипераммониемии.

Настоящее изобретение стремится удовлетворить эту потребность и основывается на идее применения глутамин-синтетазы для обезвреживания аммиака посредством его превращения в нетоксичный продукт глутамин. В частности, настоящим изобретением

предложено системное введение глутамин-синтетазы в качестве белкового терапевтического средства для снижения уровней аммиака в крови.

Глутамин-синтетаза (GS) катализирует реакцию:



Синтез глутамина происходит в ряде органов в организме, и он может играть роль в азотном балансе органа и всего организма. Совсем недавно была предложена генная терапия, основанная на сверхэкспрессии GS в скелетных мышцах, для лечения острой гипераммониемии (Torres-Vega et al, Gene Therapy 2015, 22, 58-64), логическим обоснованием для этой терапии является замещение или дополнение GS, которой обычно недостаточно в мышцах пациентов с заболеванием печени, тем самым стремясь повысить выведение аммиака этим ферментом в мышце. Тем не менее, генную терапию оказалось сложно применять в клинической практике, и она подходит не всех пациентов (например, детей, за исключением методов генной терапии на основе стволовых клеток), или пациенты могут быть невосприимчивы к генной терапии (например, по причинам, связанным с иммунной системой). Кроме того, такая терапия будет давать преимущественно локализованный эффект в мышце. Соответственно, все еще остается потребность в более широко применимой терапии.

Введение GS системно в виде белка может служить для достижения такого более общего эффекта. Авторы настоящего изобретения продемонстрировали, что GS, в особенности, человеческую GS, можно успешно экспрессировать и очищать, и она может сохранять или демонстрировать активность GS как в немодифицированной, так и модифицированной форме, конъюгированной с полимерным партнером, таким как полиэтиленгликоль. Кроме того, в исследованиях на животных было показано, что высокие уровни GS, циркулирующей в крови, могут быть достигнуты при системном введении, и что как модифицированная, так и немодифицированная GS, вводимая животному, сохраняет активность в крови и других тканях (например, печени). Таким образом, терапевтические уровни GS могут быть достигнуты при системном (например, парентеральном) введении белка GS.

Кроме того, авторы настоящего изобретения также неожиданно обнаружили, что комбинированное применение белка GS и средства, снижающего уровень аммиака, (такого как акцептор азота, например, фармацевтически приемлемая соль фенилуксусной кислоты, такая как фенилацетат натрия) оказывает синергический эффект и может дополнительно повышать способность белка GS к лечению или предупреждению гипераммониемии.

Соответственно, в соответствии с одним аспектом настоящее изобретение относится к белку глутамин-синтетазы (GS) для применения в лечении или предупреждении гипераммониемии посредством системного неперорального введения субъекту.

В соответствии с подходящим вариантом осуществления белок GS для применения в лечении или предупреждении гипераммониемии может быть предназначен для применения в комбинации со средством, снижающим уровень аммиака.

В соответствии с еще одним аспектом настоящее изобретение относится к средству, снижающему уровень аммиака, для применения в комбинации с белком GS для применения в лечении или предупреждении гипераммониемии.

Связанный аспект настоящего изобретения также относится к применению белка GS для производства композиции (например, фармацевтической или пищевой композиции, например, лекарственного препарата или добавки) для лечения или предупреждения гипераммониемии при системном непероральном введении субъекту.

В соответствии с подходящим вариантом осуществления композиция может быть предназначена для применения в комбинации со средством, снижающим уровень аммиака.

Дополнительный аспект настоящего изобретения также относится к применению средства, снижающего уровень аммиака, для производства композиции для применения в комбинации с белком GS для лечения или предупреждения гипераммониемии.

В соответствии с дополнительным аспектом настоящее изобретение относится к применению белка GS и средства, снижающего уровень аммиака, для производства композиции для применения в лечении или предупреждении гипераммониемии.

В соответствии с дополнительным аспектом настоящее изобретение относится к способу лечения или предупреждения гипераммониемии у субъекта, причем указанный способ предусматривает системное и непероральное введение белка GS указанному субъекту (более конкретно, субъекту, нуждающемуся в этом). В соответствии с подходящим вариантом осуществления способ дополнительно предусматривает введение средства, снижающего уровень аммиака.

Также предусмотрена композиция, содержащая белок GS, для применения в лечении или предупреждении гипераммониемии при системном непероральном введении субъекту.

Соответственно, композиция, содержащая белок GS, может представлять собой фармацевтическую или пищевую композицию, например, лекарственный препарат или добавку. Соответственно, композиция может дополнительно содержать средство, снижающее уровень аммиака.

Настоящее изобретение также относится к композиции, содержащей средство, снижающее уровень аммиака, для применения в лечении или предупреждении

гипераммониемии. Соответственно, композиция, содержащая средство, снижающее уровень аммиака, может представлять собой фармацевтическую или пищевую композицию, например, лекарственный препарат или добавку.

Настоящее изобретение также относится к композиции, содержащей белок GS и средство, снижающее уровень аммиака.

Соответственно, композиция может представлять собой фармацевтическую или пищевую композицию. Соответственно, композиция может быть предназначена для применения в лечении или предупреждении гипераммониемии.

В качестве альтернативы, термин «белок GS» может быть выражен как «белок, имеющий активность глутамин-синтетазы (GS)». Термин «белок», используемый в данном документе, в широком смысле включает в себя любую белковую молекулу, в том числе пептиды и полипептиды, а также фрагменты белков или полипептидов; белок GS не обязательно должен представлять собой полноразмерный фермент GS, который присутствует в природе (например, нативную GS или GS дикого типа), или соответствовать ему, и включены усеченные или другие варианты, которые описаны ниже более подробно. Также включены конъюгаты или гибридные молекулы белка GS с другими молекулами, которые также описаны ниже более подробно.

Термин «гипераммониемия» включает в себя любое состояние, при котором уровень аммиака в крови (который измеряют или определяют в любом полученном из крови продукте или образце, например, в плазме крови) является повышенным по сравнению с уровнем аммиака у субъекта без состояния, например, у здорового субъекта или субъекта без первопричинного патологического состояния, которое приводит гипераммониемии или вызывает ее. У здоровых субъектов транспорт и метаболизм аммиака четко регулируются для поддержания низкой концентрации в плазме/крови (нормальный диапазон 10-40 мкмоль/л). Таким образом, концентрацию аммиака в плазме крови (или крови) >40, 60, или 70, или 80 мкмоль/л или больше, например, 41, 42, 45, 50, 55, 60, 70 или 80 мкмоль/л или больше, можно рассматривать как показатель гипераммониемии. Например, концентрация аммиака в плазме крови >100 мкмоль/л и, в особенности, 150 мкмоль/л или выше в случае, когда она ассоциирована с нормальным анионным интервалом и нормальной концентрацией глюкозы в плазме крови, может являться показателем гипераммониемии или, более конкретно, указывает на наличие UCD.

Гипераммониемия может возникать в результате любой из причин или состояний, обсуждаемых выше, т.е. она может являться врожденной или приобретенной, первичной или вторичной, как обсуждалось выше. Таким образом, в соответствии с одним вариантом осуществления гипераммониемия может возникать вследствие нарушения цикла мочевины

(UCD) (или может быть ассоциирована с ним). Как обсуждается выше, UCD может возникать в результате дефекта в любом одном или нескольких из белков в цикле мочевины, который может инактивировать или снижать активность белка.

В соответствии с дополнительным вариантом осуществления гипераммониемия может возникать вследствие врожденного дефекта метаболизма, затрагивающего белок (например, фермент), который не является частью цикла мочевины, но который влияет на метаболизм азота и/или азотный баланс в организме и приводит к увеличению количества аммиака в крови. Соответственно, такой врожденный дефект метаболизма может представлять собой недостаточность глутамин-синтетазы.

В соответствии с дополнительными вариантами осуществления гипераммониемия может быть приобретенной и может возникать в результате заболевания или повреждения органа или ткани организма, которые вовлечены в метаболизм азота и/или азотный баланс, например, в катаболизм и/или выведение азотсодержащих молекул или веществ, например, печени или почки.

Таким образом, к гипераммониемии может приводить любой вид повреждения или заболевания печени, в том числе хроническая или острая печеночная недостаточность, например, повреждение печени вследствие чрезмерного потребления алкоголя или вследствие воздействия наркотических средств (либо рекреационных, либо медицинских), цирроз печени вследствие любой причины, неалкогольная жировая болезнь печени, инфекция печени или травма печени.

Аналогично, к гипераммониемии также может приводить любой вид повреждения или заболевания почки, которые описаны выше для печени. Таким образом, любое состояние, воздействующее на несколько органов в организме (например, полиорганная недостаточность), такое как, например, сепсис, поражение органа в результате повреждения (или внешнего повреждения, например, травмы, или внутреннего повреждения, например, в результате аутоиммунных нарушений), или любая системная инфекция, может являться источником гипераммониемии.

Гипераммониемию можно выявить или диагностировать на основании клинических, биохимических и/или молекулярно-генетических данных в зависимости от первопричины. Следовательно, например, ее можно выявить посредством оценки или мониторинга уровней аммиака в крови (например, в плазме или сыворотке крови или любом полученном из крови образце) в соответствии с методиками, хорошо известными и применяемыми в данной области техники. Анализ аминокислот, присутствующих в крови (плазме или сыворотке и т.д.), и/или их концентраций (например, аргинина или цитруллина) или концентраций других метаболитов в крови или других жидкостях или тканях организма

(например, оротовой кислоты в моче) также может помочь идентифицировать, что присутствует UCD, и/или определит его точную природу (т.е. присутствующий дефект конкретного белка/фермента). Такие определения и анализы можно объединять с клиническими анализами, например, неврологическими и психоневрологическими анализами, включающими в себя и физические анализы (например, МРТ или другие методики визуализации), и/или поведенческие тесты/тесты со стимуляцией и т.д., функциональными тестами печени и/или почки или другого органа и т.д. В случае подозрения на UCD также можно предпринимать исследования семейного анамнеза, и/или молекулярно-генетические тесты, и/или анализы ферментативной активности ферментов цикла мочевины.

В контексте данного документа ссылка на глутамин-синтетазу или белок GS для применения согласно настоящему изобретению включает в себя ссылку на все формы ферментативно активной GS, в том числе на человеческую GS и GS из животных, отличных от человека (таких как мышь, корова, кролик, крыса, обезьяна, шимпанзе и собака и т.д.), или из других источников, в том числе, например, из грибов, растений или бактерий, а также ферментативно активные варианты. Таким образом, типичные белки GS включают в себя те, последовательность которых является по меньшей мере на 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичной полипептиду GS, изложенному в SEQ ID NO:1, или 2, или 4 (человеческая GS, форма-предшественник, зрелая форма и имеющая метку N-конце форма, соответственно), или полипептиду GS, изложенному в SEQ ID NO. 6 (GS из *Lactobacillus acididophilus* штамма 30SC) или SEQ ID NO. 7 (GS из кукурузы, *Zea Mays*), или их ферментативно активный фрагмент. Например, ссылка на GS также может включать усеченные на N- и/или C-конце полипептиды или белок с модифицированными аминокислотами (например, посттрансляционные модификации, такие как аденилирование, или другие модификации, такие как аминокислотные полиморфизмы, которые могут воздействовать на структуру или активность белка). Он также может включать в себя мультимеры белка. Таким образом, термин «GS» включает в себя все нативные формы ферментов или полипептидов GS, а также их ферментативно активные фрагменты или варианты, в том числе полученные с помощью синтеза и модифицированные полипептиды, имеющие одну или несколько аминокислотных замен, добавлений (в том числе вставок и удлинений) или делеций, которые сохраняют ферментативную активность GS.

Таким образом, GS может представлять собой любой фермент, соответствующий индексу классификации ферментов EC 6.3.1.2, или может быть получен из него. Она может представлять собой любой полипептид или пептид, характеризующийся активностью GS.

Активность GS можно определить как способность к превращению глутамата и аммиака в глутамин, например, согласно схеме реакции, размещенной выше. Активность GS можно оценивать или определить с применением анализов или тестов (например, анализа функциональной активности), которые известны в уровне техники и описаны в литературе. Например, анализы активности фермента GS описаны в Listrom *et al*, Biochem. J. 1997, 328, 159-163. Анализ в отношении активности GS также описан в разделе Примеры ниже (см. примеры 2 и 4).

Термин также включает в себя пролекарство для GS, представляющее собой форму, которая сама не проявляет активность GS, но которая может превращаться в активную GS после введения субъекту.

Таким образом, в контексте данного документа «ферментативно активный» применительно к белку GS или полипептиду относится к белку или полипептиду GS, который может катализировать превращение глутамата и аммиака в глутамин. Как правило, ферментативно активный белок или полипептид GS проявляет по меньшей мере или около 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% ферментативной активности полипептида GS, который изложен в SEQ ID NO:1, 2, 4, 6 или 7.

Термин «субъект» в контексте данного документа включает в себя любого человека или животного, отличного от человека, и, в частности, относится к млекопитающим, в том числе, например, к людям, приматам, сельскохозяйственным животным (например, овцам, свиньям, крупному рогатому скоту, лошадям, ослам), лабораторным животным (например, мышам, кроликам, крысам, морским свинкам), домашним животным (например, собакам, кошкам) и содержащимся в неволе диким животным (например, лисам, кенгуру, оленю). Предпочтительно, млекопитающее представляет собой человека или лабораторное животное. Еще более предпочтительно, млекопитающее представляет собой человека.

В контексте данного документа термины «осуществление лечения», «лечение», «осуществление предупреждения» и «предупреждение» относятся к любым и всем применениям, которые каким бы то ни было образом устраняют или ослабляют состояние или симптомы, предупреждают появление состояния или заболевания или иным образом предупреждают, затрудняют, замедляют, снижают или обращают развитие состояния, или заболевания, или других нежелательных симптомов. Таким образом, термины «лечение» и «предупреждение» и т.п. следует рассматривать в их наиболее широком контексте. Например, лечение не обязательно предполагает, что пациент получает лечение до полного выздоровления, но включает в себя любое улучшение или ослабление состояния пациента или субъекта или симптома заболевания или состояния. Таким образом, например, в случае UCD лечение в соответствии с настоящим изобретением, разумеется, лечит не

первопричину генетического нарушения, а, скорее, возникающее в результате клиническое состояние гипераммониемии. При состояниях, которые проявляют или характеризуются несколькими симптомами, лечение или предупреждение не обязательно устраняет, ослабляет, предупреждает, затрудняет, замедляет, снижает или обращает развитие всех из указанных симптомов, но может устранять, ослаблять, предупреждать, затруднять, замедлять, снижать или обращать развитие одного или нескольких из указанных симптомов. В соответствии с подходящим вариантом осуществления «лечение» согласно настоящему изобретению представляет собой снижение уровней аммиака в крови, например, до нормальных или здоровых уровней, например, до диапазона 10-40 мкмоль/л. Таким образом, лечение включает в себя восстановление нормальных или здоровых уровней аммиака. Аналогично, предупреждение согласно настоящему изобретению может включать в себя поддержание уровней аммиака в плазме/крови в любом нормальном или здоровом диапазоне, который указан выше.

В соответствии с подходящим вариантом осуществления «лечение» согласно настоящему изобретению может включать в себя повышение уровней и/или активности глутамин-синтетазы в ткани субъекта, например, до нормальных или здоровых уровней. Такое повышение может происходить в любой подходящей ткани (например, печени и/или мышце). Повышение уровней и/или активности глутамин-синтетазы можно определить, например, посредством измерения уровней глутамина, уровней глутамата и/или определения соотношения между уровнями глутамина и уровнями глутамата у субъекта. Будет понятно, что нормальные или здоровые уровни глутамина и/или глутамата могут варьировать в зависимости от образца, в котором их измеряют. Также будет понятно, что нормальные или здоровые уровни глутамина и/или глутамата могут быть специфическими для субъекта и зависеть от таких факторов, как масса, рацион, пол и возраст субъекта. Нормальные или здоровые уровни глутамина и/или глутамата будут известны специалистам в данной области техники.

В соответствии с подходящим вариантом осуществления «лечение» согласно настоящему изобретению может включать в себя уменьшение отека. Термин «отек» в контексте данного документа относится к аномальному накоплению серозной жидкости у субъекта. В соответствии с подходящим вариантом осуществления отек может представлять собой отек головного мозга, отек легких, периферический отек и/или макулярный отек. Соответственно, в контексте настоящего изобретения «лечение» может относиться к уменьшению отека головного мозга, например, в префронтальной коре. В качестве примера, отек можно оценивать с помощью КТ-сканирования, МРТ и/или рентгенографии. Другие способы оценки отека будут известны специалистам в данной

области техники.

В соответствии с подходящим вариантом осуществления «лечение» согласно настоящему изобретению может включать в себя улучшение нейропсихологической, психоневрологической и нейрокогнитивной функции. Термин «нейропсихологическая, психоневрологическая и нейрокогнитивная функция» относится к функции головного мозга, которая контролирует, например, память, внимание, познание, психомоторную активность, координацию и настроение. Применения, способы и композиции согласно настоящему изобретению, которые включают комбинацию белка GS и средства, снижающего уровень аммиака, могут быть особенно полезными в таком варианте осуществления. Различные способы для оценки функции нервной системы будут известны специалистам в данной области техники. Функциональное состояние нервной системы можно оценивать с применением электроэнцефалографии, компьютерных тестов, теста типа «бумага-карандаш» и обследований нейропсихологом.

В соответствии с подходящим вариантом осуществления «лечение» согласно настоящему изобретению может включать в себя улучшение саркопении и физической функции. Термин «саркопения» относится к пониженной мышечной массе. Термин «физическая функция» относится к силе субъекта, в частности, к мышечной силе. Тяжесть саркопении можно определить с применением клинических инструментов, диетологических инструментов, измерения состава тканей тела или визуализации. Физическую функцию можно оценить, например, посредством оценки доставки и потребления кислорода, теста на физическую нагрузку и теста мышечной силы кисти при помощи динамометра, и/или по улучшению уровней усталости, и/или по функционированию иммунной системы.

В контексте данного документа «ослабление» относится к уменьшению тяжести по меньшей мере одного показателя или симптома состояния или заболевания. В соответствии с определенными вариантами осуществления ослабление включает в себя задержку или замедление прогрессирования одного или нескольких показателей состояния или заболевания. Тяжесть показателей можно определить по субъективным или объективным измеряемым показателям, которые являются известными специалистам в данной области техники.

Используемый в данном документе термин «ассоциированный с» при использовании в контексте заболевания или состояния, «ассоциированного с» повышенными уровнями аммиака, означает, что заболевание или состояние может возникать в результате повышенных уровней аммиака, приводить в результате к повышенным уровням аммиака, характеризоваться повышенными уровнями аммиака или

может быть иным образом ассоциировано с повышенными уровнями аммиака. Таким образом, связь между заболеванием или состоянием и повышенными уровнями аммиака может быть прямой или косвенной и может быть разделенной во времени.

Подходящие образцы для определения уровней аммиака включают в себя любой подходящий или желательный образец, в котором может встречаться аммиак. Подобным образом, подходящие образцы для определения уровней глутамин-синтетазы и/или активности глутамин-синтетазы включают в себя любой подходящий или желательный образец, в котором может присутствовать глутамин-синтетаза, глутамин и/или глутамат. Они могут представлять собой любой подходящий или желаемый образец ткани или жидкости организма. Примером подходящей ткани является ткань печени и/или мышечная ткань. Соответственно, образец может представлять собой любой образец жидкости организма и, как правило, будет представлять собой кровь или любой полученный из крови образец, например, плазму или сыворотку крови и т.д., но он может представлять собой образец любой другой жидкости организма, например, мочи, спинномозговой жидкости или кала, или образец ткани и т.д., например, биоптат или образец лаважа или образец смывов и т.д. Разумеется, он может зависеть от точной природы состояния, подлежащего лечению, и т.д.

В контексте данного документа термин «эффективное количество» включает в свое значение нетоксичное, но достаточное количество или дозу белка GS и/или средства, снижающего уровень аммиака, в зависимости от контекста для обеспечения желаемого эффекта. Будет понятно, что эффективное количество белка и/или средства, снижающего уровень аммиака, может отличаться. Иллюстративные терапевтически эффективные количества определены в других местах в этом описании.

Точное требуемое количество или доза будет варьировать от субъекта к субъекту в зависимости от таких факторов, как вид организма, получающего лечение, возраст и общее состояние здоровья субъекта, тяжести состояния, лечение которого осуществляют, конкретного вводимого FMO3, а также способа введения и так далее. Таким образом, определение точного «эффективного количества» не является уместным. Тем не менее, для любого конкретного случая подходящее «эффективное количество» может быть определено средним специалистом в данной области техники с применением только стандартного экспериментирования.

Человеческая GS экспрессируется в виде полипептида из 373 аминокислот (который представлен в SEQ ID NO. 1). Она представляет собой экспрессируемый полный белок «предшественник», который затем подвергается дополнительному процессингу в зрелую форму, имеющую аминокислоты 2-373 (удален только N-концевой метионин с

образованием на выходе зрелого белка из 372 аминокислот *in vivo*, который представлен в SEQ ID NO. 2. Иллюстративный полинуклеотид, изложенный в SEQ ID NO.3, представляет собой кДНК, кодирующую полипептид SEQ ID NO. 1. SEQ ID NO. 4 представляет собой модифицированный белок человеческой GS, содержащий полипептид GS с SEQ ID NO. 1, снабженный N-концевой His-меткой и линкерной последовательностью, которую получили и применяли в примерах ниже. SEQ ID NO. 5 представляет собой последовательность кДНК, кодирующую полипептид с SEQ ID NO. 4, оптимизированную по кодону для экспрессии в бактериях, которую применяли в примерах ниже.

Человеческая GS была хорошо охарактеризована (см., например, Listrom *et al.*, 1997, выше). Также были идентифицированы ферменты GS от других организмов, в том числе растений и бактерий, и последовательности нуклеиновой кислоты и аминокислотные последовательности таких других ферментов GS являются хорошо известными в уровне техники и обеспечены в общедоступных базах данных, таких как, например, базы данных нуклеотидных последовательностей (ncbi.nlm.nih.gov/nuccore) и последовательностей белков (ncbi.nlm.nih.gov/белок) в Национальном центре биотехнологической информации (NCBI). Несмотря на то что идентичность последовательности между ферментами GS растений или бактерий и человеческой GS может быть низкой, структурное и функциональное сходство является высоким. Соответственно, можно применять растительную или бактериальную GS или даже GS из других организмов или варианты ее аминокислотной последовательности. В качестве иллюстративного примера в SEQ ID NO.6 изложена аминокислотная последовательность GS из *Lactobacillus acidophilus* штамма 30SC, которая характеризуется 23,8% идентичностью последовательности с человеческой GS и 61,9% идентичностью последовательности с GS из *Lactobacillus casei*, и в SEQ ID NO. 7 изложена аминокислотная последовательность GS из кукурузы (маиса, *Zea Mays*), которая характеризуется 55,7% идентичностью последовательности с человеческой GS.

GS обычно встречается в виде мультимера, содержащего несколько (т.е. 2 или более) мономерных субъединиц. Аминокислотная последовательность GS, представленная выше, например, представляет собой такую мономерную субъединицу. Человеческую GS наиболее часто описывают как додекамер (12 субъединиц). В контексте данного документа GS может быть обеспечена в виде мономера и/или в виде мультимера. Мультимер может содержать 2 или больше мономерных субъединиц, например, 2-20, 2-16, 2-15, 2-14 или 2-12 субъединиц.

Действительно, неожиданный признак настоящего изобретения заключается в том, что в отличие от сообщений в литературе о 12-субъединичном мультимере, человеческая GS может экспрессироваться и/или она может быть получена в виде смеси нескольких

отличающихся типов мультимеров, включающей в себя также мономерную форму. Было показано, что мономерная форма является активной. Таким образом, в соответствии с настоящим изобретением GS можно применять в виде мономера и/или в виде мультимера, и мультимер может быть обеспечен в виде одной мультимерной формы или в виде смеси различных мономерных форм, которые могут включать в себя мономер или могут не включать в себя мономер. Как описано в примерах ниже, можно получить 4 или более, например, 4-10, например, 5-8 мультимерных форм. Мультимеры могут варьировать по размеру от 2 до 20 субъединиц.

Белок GS, применяемый в способах, которые представлены в данном документе, может быть получен с помощью способа, известного в уровне техники, такого как способы на основе рекомбинации, способы выделения и очистки белка и способы химического синтеза, при условии, что получаемая в результате GS проявляет ферментативную активность. Соответственно, GS может представлять собой рекомбинантную GS, нативную GS, выделенную из ткани, или химически синтезированную GS.

Квалифицированный специалист вполне способен модифицировать полипептид GS, такой как полипептид, изложенный в SEQ ID NO:1, с получением ферментативно активных вариантов GS для применения в способах, представленных в данном документе. Например, квалифицированному специалисту в данной области техники будет понятно, что модификации в положениях, вовлеченных в связывание субстрата, или в активном центре, допускаются с меньшей вероятностью, чем модификации в положениях за пределами этих критически важных участков. Любой полипептид GS можно исследовать с применением способов, хорошо известных в уровне техники, таких как описанные в разделе Примеры ниже, для оценки способности полипептида GS катализировать превращение глутамата и аммиака в глутамин.

В некоторых примерах GS, применяемая согласно настоящему изобретению, в данном документе представляет собой рекомбинантную GS, получаемую с применением прокариотических или эукариотических экспрессионных систем, хорошо известных в уровне техники. Иллюстративные прокариотические экспрессионные системы включают в себя, без ограничения, экспрессионные системы на основе *Escherichia coli*, и иллюстративные эукариотические экспрессионные системы включают в себя, без ограничения, экспрессионные системы на основе дрожжей, клеток насекомого и клеток млекопитающего.

Нуклеиновая кислота, кодирующая GS, может быть получена с помощью любого подходящего способа, в том числе, без ограничения, с помощью RT-PCR (ПЦР с обратной транскрипцией) печеночной РНК и синтеза синтетического нуклеотида. Праймеры для

амплификации могут быть сконструированы на основании известных последовательностей GS, таких как изложенные выше. Последовательности нуклеиновой кислоты и аминокислотные последовательности GS являются хорошо известными в уровне техники и обеспечены в общедоступных базах данных, таких как, например, базы данных нуклеотидных последовательностей (ncbi.nlm.nih.gov/nucscore) и последовательностей белков (ncbi.nlm.nih.gov/белок) в Национальном центре биотехнологической информации (NCBI).

Нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид GS, такую как нуклеиновая кислота, которая имеет последовательность, изложенную в SEQ ID NO.3, можно клонировать в экспрессионный вектор, подходящий для выбранной экспрессионной системы. В некоторых случаях нуклеиновую кислоту оптимизируют по кодону для экспрессии в конкретной системе. Например, нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид GS, может быть оптимизирована по кодону для экспрессии в *E. coli*. В SEQ ID NO 5 изложена иллюстративная оптимизированная по кодону нуклеиновая кислота, кодирующая GS для экспрессии в *E. coli*, которая кодирует полипептид GS, содержащий His-метку, которая прикреплена посредством линкера GGGGS (который изложен в SEQ ID NO.4).

Как правило, нуклеиновую кислоту, кодирующую GS, клонируют в экспрессионный вектор, функционально связанный с регуляторными последовательностями, которые облегчают экспрессию гетерологичной молекулы нуклеиновой кислоты. Многие экспрессионные векторы, подходящие для экспрессии GS, являются доступными и известными специалистам в данной области техники. На выбор экспрессионного вектора оказывает влияние выбор хозяина экспрессионной системы. Такой выбор находится в рамках компетенции квалифицированного специалиста. Обычно экспрессионные векторы могут включать в себя транскрипционные промоторы и, необязательно, энхансеры, трансляционные сигналы и сигналы терминирования транскрипции и трансляции. Экспрессионные векторы, которые применяют для устойчивой трансформации, как правило, имеют селектируемый маркер, который обеспечивает возможность селекции и поддержания трансформированных клеток. В некоторых случаях точку начала репликации можно применять для увеличения числа копий векторов в клетках.

Полипептиды GS также могут экспрессироваться в виде гибридных белков. Например, гибридный белок может быть создан для придания полипептиду дополнительной функциональности. Примеры гибридных белков включают в себя, без ограничения, гибридные белки, содержащие GS и аффинную метку для очистки (например, his-метку, например, his6, MYC, FLAG, HA или GST метку), лидерную последовательность

(такую как лидерная последовательность *pelB*), последовательность для управления секрецией белка, или белок для стабилизации и/или солюбилизации GS (например, мальтоза-связывающий белок (MBP)), или белок для повышения периода полужизни *in vivo* (например, альбумин или Fc-домены или их фрагменты).

Прокариоты, в особенности *E. coli*, обеспечивают систему для продуцирования больших количеств GS. Трансформация *E. coli* является простой и быстрой методикой, хорошо известной специалистам в данной области техники. Экспрессионные векторы для *E. coli* могут содержать индуцируемые промоторы, которые являются пригодными для индукции высоких уровней экспрессии белка и для экспрессии белков, которые проявляют некоторую токсичность в отношении клеток-хозяев. Примеры индуцируемых промоторов включают в себя промотор *lac*, промотор *trp*, гибридный промотор *tac*, промоторы РНК фага T7 и SP6 и регулируемый температурой промотор λ PL.

В других примерах для получения GS применяют эукариотические экспрессионные системы, такие как экспрессионные системы на основе бакуловируса. Как правило, в экспрессионных векторах для высокого уровня экспрессии применяют промотор, такой как полиэдриновый промотор бакуловируса. Широко применяемые бакуловирусные системы включают в себя бакуловирусы, такие как вирус ядерного полиэдроза *Autographa californica* (AcNPV) и вирус ядерного полиэдроза *Bombyx mori* (BmNPV), а также линию клеток насекомого, такую как Sf9, полученную из *Spodoptera frugiperda*, *Pseudaletia unipuncta* (A7S) и *Danaus plexippus* (DpN1). Для высокого уровня экспрессии нуклеотидную последовательность GS встраивают с помощью слияния сразу за инициаторным кодоном полиэдрина в вирусе.

Дрожжи, такие как *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces lactis* и *Pichia pastoris*, также можно применять в качестве хозяев экспрессии для GS. Дрожжи можно трансформировать эписомально реплицирующимися векторами или посредством устойчивой хромосомной интеграции с помощью гомологической рекомбинации. Как правило, для регуляции экспрессии гена применяют индуцируемые промоторы, такие как GAL1, GAL7 и GAL5. Экспрессионные векторы для дрожжей часто включают в себя селектируемый маркер, такой как LEU2, TRP1, HIS3 и URA3, для селекции и сохранения трансформированной ДНК.

Экспрессионные системы для млекопитающих также можно применять для экспрессии GS. Экспрессионные конструкции можно переносить в клетки млекопитающих посредством инфицирования вирусом, таким как аденовирус, или посредством методики прямого переноса ДНК, как например, с использованием липосом, фосфата кальция, DEAE-декстрана, и посредством физических средств, таких как электропорация и микроинъекция.

Экспрессионные векторы для клеток млекопитающих, как правило, включают в себя сайт экпирования мРНК, ТАТА-бокс, последовательность инициации трансляции (консенсусную последовательность Козак) и элементы полиаденилирования. Такие векторы включают в себя пары промотор-энхансер транскрипции для высокого уровня экспрессии, например, пару промотор-энхансер SV40, промотор цитомегаловируса человека (CMV) и длинный концевой повтор вируса саркомы Рауса (RSV). Иллюстративные клеточные линии, доступные для экспрессии у млекопитающих, включают в себя, без ограничения, клетки мыши, крысы, человека, обезьяны, а также курицы и хомяка, такие как клетки ВНК, 293-F, CHO, Balb/3T3, HeLa, MT2, мышинные NSO (несекретирующие) клетки и другие линии клеток миеломы, линии клеток гибридомы и гетерогибридомы, лимфоциты, фибробласты, клетки Sp2/0, COS, NIH3T3, HEK293, 293S, 293T, 2B8 и НКВ.

После экспрессии GS может быть очищена с применением любого способа, известного специалистам в данной области техники, в том числе, без ограничения, SDS-PAGE (электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия), хроматографии с распределением фракций по размеру и гель-хроматографии, осаждения с сульфатом аммония, хелатной хроматографии, ионообменной хроматографии и аффинной хроматографии. Методики аффинной очистки можно применять для улучшения эффективности и чистоты препаратов. Например, в аффинной очистке можно применять антитела и другие молекулы, которые связывают GS. Как обсуждалось выше, экспрессионные конструкции могут быть сконструированы для добавления аффинной метки, такой как his, мус, FLAG или HA метка, или GST-фрагмента к GS, которую затем можно подвергать аффинной очистке с использованием Ni-смолы, антитела к мус, антитела к HA, антитела к FLAG или смолы с глутатионом, соответственно. Чистоту можно оценивать с помощью любого способа, известного в уровне техники, в том числе электрофореза в геле и окрашивания и с помощью спектрофотометрических методик, таких как SDS-PAGE и гель-хроматография (SEC).

Для применения согласно настоящему изобретению аффинная метка (например, his-метка и т.д.) может быть удалена, но это не является обязательным, и полипептид GS можно применять с прикрепленной меткой.

Метка или другой партнер для слияния могут быть прикреплены к GS посредством линкера, который может представлять собой любой подходящий линкер, согласно принципам, хорошо известным в уровне техники. Такой линкер типично и в подходящем случае может представлять собой короткий (например, 2-10, 2-8 или 2-6 мономерный) пептид. В качестве примера может быть упомянут линкер GGSG, но он может состоять из

любых подходящих аминокислот. Аминокислотные линкеры обеспечивают возможность получения гибридного белка с помощью методов на основе рекомбинации, но также можно применять линкеры на основе молекул, отличных от аминокислот, согласно все тем же принципам и методикам, хорошо известным в уровне техники и описанной в литературе. Линкер может быть расщепляемым (например, ферментативно) или нерасщепляемым.

Полипептиды GS можно получать в виде «голых» полипептидных цепей или в виде модифицированных полипептидов, которые модифицированы посредством присоединения или конъюгирования с дополнительным фрагментом, или химической группой, или веществом. Иллюстративные модификации включают в себя, без ограничения, пегилирование, альбуминирование или другие известные модификации. Например, в некоторых случаях полипептиды GS для применения в описанных способах подвергают пегилированию с применением стандартных способов, хорошо известных в уровне техники. Он может служить, например, для улучшения периода полужизни белка GS в кровотоке. Таким образом, в соответствии с предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения белок GS может быть обеспечен в виде конъюгата с полимером, таким как полиэтиленгликоль (PEG) или поли- или олигосахарид. Особенно предпочтительными являются конъюгаты с PEG. Как указано выше, получение таких конъюгатов является хорошо известным в уровне техники и описано в литературе. Таким образом, для получения конъюгатов можно применять PEG различных размеров, например, в диапазоне от 100 дальтон до 100 кДа, а чаще от 5 кДа до 100 кДа, например, от 12 или 15 кДа до 60 или 80 кДа, как например, 15-50, 15-40 или 15-30 кДа. Кроме того, PEG может быть прикреплен белку GS или связан с ним различными способами, и более чем один PEG может быть прикреплен к каждому отдельному белку. Он может быть связан напрямую или опосредовано, например, посредством линкера, который был описан для гибридных белков выше, или с помощью любой молекулярной или химической группы, которая может обеспечивать функцию линкера. Таким образом, PEG может быть связан на одном или обоих из N- или C-концов или внутри в молекуле GS, например, на аминокислотной группе одного или нескольких лизиновых остатков в молекуле белка GS или на любом другом химическом фрагменте или остатке в молекуле белка. Способы присоединения к белкам или конъюгирования с ними полимеров, таких как PEG, являются хорошо известными в уровне техники и описаны в литературе (см., например, Roberts *et al.* 2012, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64 (дополнение) 116-127; и Veronese 2001, *Biomaterials* 22, 405-417). Данные, представленные в разделе Примеры ниже, показывают, что конъюгаты с PEG, полученные посредством связывания PEG с N-концом, является особенно эффективным, например, в анализах активности лизатов печени от животных, которым вводили различные конъюгаты.

Соответственно, конъюгат с PEG, который содержит PEG, связанный с N-концом белка GS, представляет собой один предпочтительный вариант осуществления настоящего изобретения. Белок GS может подвергаться пегилированию в мономерной и/или мультимерной форме. Таким образом, для удобства пегилированию можно подвергать препарат, содержащий как мономерные, так и различные мультимерные формы GS.

GS может быть составлена в виде фармацевтической композиции для введения субъекту. GS может быть составлена любым традиционным способом посредством смешивания выбранного количества GS с одним или несколькими физиологически или фармацевтически приемлемыми носителями или вспомогательными средствами.

Соответственно, дополнительный аспект настоящего изобретения относится к фармацевтической композиции, содержащей белок GS и один или несколько фармацевтически приемлемых носителей или вспомогательных средств, причем композиция предназначена для неперорального системного введения.

Выбор носителя или вспомогательного средства находится в рамках квалификации специалиста, осуществляющего введение, и может зависеть от ряда параметров, таких как способ введения. В некоторых примерах GS обеспечивают в виде жидкости. В других случаях GS обеспечивают в высушенной форме, как например, в обезвоженной или лиофилизированной форме. Такие высушенные формы могут быть регидратированы перед введением посредством добавления подходящего раствора, такого как вода, буфер, солевой раствор или другой подходящий раствор. GS, представленную в данном документе, может быть составлена для непосредственного введения, или ее можно составлять для разведения или другой модификации. Соответственно, GS может быть составлена в виде лекарственных форм с однократной дозой (или стандартных лекарственных форм) или лекарственных форм с многократными дозами. Примеры лекарственных форм с однократной дозой включают в себя ампулы и шприцы. Примеры лекарственных форм с многократными дозами включают в себя пузырьки и бутылки, которые содержат несколько стандартных доз.

Концентрации GS в составах являются эффективными для доставки количества GS, которое при введении является эффективным для превращения аммиака в глутамин в присутствии глутамата. Концентрации и количества будут зависеть от нескольких факторов, в том числе от уровней субстратов у субъекта, а также способа введения, и могут быть определены эмпирически. Иллюстративные концентрации GS в композициях, представленных в данном документе, включают в себя, без ограничения, концентрации, составляющие или около составляющие 0,1, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 1000, 2000, 3000, 4000 или 5000 мг/мл GS или больше.

Для составления композиции с GS в соответствии с одним вариантом осуществления массовую долю GS растворяют, суспендируют, диспергируют или иным образом размешивают в выбранной среде в желаемой концентрации. Полученные в результате смеси представляют собой растворы, суспензии, эмульсии и другие такие смеси и могут быть составлены в виде неводной или водной смеси, в том числе, без ограничения, в виде раствора, суспензии, пасты, геля, аэрозоля, распыляемого раствора или любого другого состава, подходящего для системного введения.

Обычно композицию с GS готовят с учетом одобрения от регуляторного органа, или в ином случае ее готовят в соответствии с общепризнанной фармакопеей для применения у животных и у людей. Композиция с GS может включать в себя носители, такие как разбавитель, вспомогательное средство или среда. Такие фармацевтические носители могут представлять собой стерильные жидкости, такие как вода и масла. Солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерина также можно использовать в качестве жидких носителей, в особенности, для инъекционных растворов. Композиции могут содержать вместе с активным ингредиентом: разбавитель, такой как лактоза, сахароза, фосфат дикальция или карбоксиметилцеллюлоза; смазывающее средство, такое как стеарат магния, стеарат кальция и тальк; и связующее средство, такое как крахмал, натуральные камеди, такие как аравийская камедь, желатин, глюкоза, меласса, поливинилпирролидин, целлюлозы и их производные, повидон, кросповидоны и другие такие связующие средства, известные специалисту в данной области техники. Подходящие фармацевтические вспомогательные средства включают в себя крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, глицеринмоностеарат, тальк, хлорид натрия, высушенное обезжиренное молоко, глицерин, пропилен, гликоль, воду и этанол. Композиция с GS при необходимости также может содержать незначительные количества смачивающих или эмульгирующих средств или буферных средств для стабилизации pH, например, ацетат, цитрат натрия, производные циклодекстрина, сорбитан-монолаурат, триэтаноламин ацетат натрия, триэтаноламин-олеат и другие такие средства. Примеры подходящих фармацевтических носителей описаны в "Remington's Pharmaceutical Sciences" за авторством E. W. Martin.

В качестве фармацевтически приемлемых носителей подходящими также могут являться суспензии липосом, в том числе нацеленные на определенную ткань липосомы. Их можно получать в соответствии со способами, известными специалистам в данной области техники. Доставка с помощью липосом также может включать в себя составы с замедленным высвобождением, в том числе фармацевтические матрицы, такие как коллагеновые гели, и липосомы, модифицированные фибронектином.

Также как и в фармацевтических композициях, GS также можно составлять или вводить другими способами, например, в пищевой композиции, такой как пищевая добавка, например, в композиции для парентерального питания (например, отдельно или совместно с другими ингредиентами добавки). Ее можно включать в такие пищевые продукты в виде полипептида (например, очищенного фермента) или в виде части клетки- или организма-хозяина экспрессии. Таким образом, например, микробные клетки-хозяева (например, клетки дрожжей, или бактерий, или грибов) или растения (в том числе клетки растений) можно подвергнуть воздействию методов генной инженерии для экспрессии GS и можно вводить сами по себе, например, цельные клетки, или экстракты, или другие обработанные продукты (в которых может сохраняться ферментативная активность), или их можно включать в пищевые композиции. Таким образом, например, клетки бактерий или дрожжей, подходящие для потребления человеком или животным, отличным от человека, могут быть подвергнуты воздействию методов генной инженерии для экспрессии GS (а именно, посредством введения молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, которая кодирует GS). В качестве альтернативы, растения могут быть подвергнуты воздействию методов генной инженерии аналогичным образом, и соответствующие части растений и т.д. (например, семена, листья, клубни и т.д.) могут быть обеспечены для введения. В уровне техники известно, какие микроорганизмы (например, дрожжи, бактерии, водоросли или грибы) являются подходящими для потребления человеком или другими животными, и многие такие организмы применяют в настоящее время, например, в пробиотических составах. Можно применять любые такие пробиотические организмы или составы, например, на основе молочнокислых бактерий, таких как *Bifidobacterium* или *Lactobacillus* sp. (например, например, *L. acidophilus*) и т.д. Таким образом, в соответствии с настоящим изобретением такие организмы или препараты могут быть составлены для введения в GI (желудочно-кишечный) тракт, и их можно вводить непосредственно в GI тракт, например, посредством инъекции, или инфузии, или клизмы, или ректального введения и т.д. Точное количество или доза GS, вводимой субъекту, зависит от активности GS, пути введения, заболевания или состояния, лечение которого осуществляют, количества вводимых доз и других факторов, таких как масса, возраст и общее состояние здоровья субъекта. Конкретные дозировки и протоколы введения могут быть определены эмпирически или экстраполированы, например, на основании исследований в моделях на животных. Иллюстративные терапевтически эффективные дозы GS включают в себя, без ограничения, от или около от 0,1 мкг/кг массы тела в сутки до или около до 10000 мкг/кг массы тела в сутки, в том числе от или около от 1 мкг/кг до или около до 1000 мкг/кг массы тела в сутки или от или около от 10 мкг/кг до

или около до 100 мкг/кг массы тела в сутки. Таким образом, например, субъекту можно вводить 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 400, 600, 800, 1000, 2000, 4000, 6000, 8000, 10000 или 20000 мкг GS или больше на кг массы тела в сутки.

Признаком настоящего изобретения является то, что GS вводят системно, но не перорально. Под термином «перорально» подразумевают пероральную доставку. Соответственно, непероральный означает, что белок GS не вводят посредством приема внутрь через рот. Несмотря на то что могут быть включены другие средства введения, которые доставляют белок GS в кишечник или, в более общем смысле, в желудочно-кишечный (GI) тракт (например, ректально, или с помощью клизмы, или непосредственное введение в GI тракт), в соответствии с определенными вариантами осуществления они могут быть исключены. Соответственно, в соответствии с определенным вариантом осуществления настоящее изобретение включает в себя энтеральное введение, но в соответствии с другим вариантом осуществления оно не включает в себя энтеральное введение. В соответствии с дополнительным вариантом осуществления настоящее изобретение не включает в себя введение в мышцу, в частности, в скелетную мышцу. Таким образом, в соответствии с таким вариантом осуществления введение не направлено на мышцу, т.е. представляет собой терапию, направленную на ткани, отличные от мышцы.

Соответственно, GS можно вводить посредством любого способа и пути, который доставляет белок GS системно в организм, но не включает пероральное введение. В соответствии с определенными вариантами осуществления белок GS можно вводить парентерально. Квалифицированный специалист легко поймет и будет способен выбрать подходящие способы введения или доставки, в том числе, без ограничения, внутривенное, внутримышечное, интрадермальное, трансдермальное, подкожное или внутрибрюшинное введение, а также введение посредством любой комбинации любых двух или более из них, а также получить состав способом, подходящим для каждого пути введения. В некоторых случаях композиции с GS, описанные в данном документе, вводят подкожно. В других случаях композиции с GS можно вводить внутривенно. Например, композиции с GS можно вводить внутривенно посредством инъекции или инфузии, как например, посредством внутривенного струйного введения.

Белок GS также можно вводить совместно или в комбинации с другими терапевтическими или активными средствами, в частности, второе или дополнительное терапевтическое средство, которое может лечить (например, улучшать) гипераммониемию. Второе или дополнительное терапевтическое средство, которое является активным для лечения гипераммониемии, может быть альтернативно определено как антигипераммониемическое средство или как средство против гипераммониемии. Второе

или дополнительное средство, как правило, может представлять собой средство, снижающее уровень аммиака, такое как акцептор азота (или акцептор аммиака), или заменяющую аминокислоту, или промежуточное соединение в цикле мочевины или их аналог. Такое средство, следовательно, может включать в себя аминокислоту, например, аргинин, глутамат, цитруллин и/или орнитин и/или N-ацетилглутамат и/или молекулу-аналог карбамил-глутамат (Carbaglu®). В более подходящем случае второе или дополнительное средство представляет собой средство, снижающее уровень аммиака, в более подходящем случае, акцептор азота. Такой вариант осуществления имеет результатом определенные аспекты настоящего изобретения.

Термин «средство, снижающее уровень аммиака,» относится к соединению, которое удаляет аммиак и/или снижает или ингибирует выработку аммиака. Средство, снижающее уровень аммиака, может быть выбрано из группы, состоящей из акцептора азота, ионообменной смолы (например, Relapsa), поглотителя аммиака (такого как поглотитель аммиака на основе липосом, например, Versantis), сконструированного микробиома, который удаляет аммиак (например, Synlogic), рифаксимины и лактулозы.

Термин «акцептор азота» в контексте данного документа относится к соединению, которое снижает уровни азота и/или аммиака у субъекта посредством удаления аммиака. В соответствии с подходящим вариантом осуществления акцептор азота снижает количество азота и/или аммиака у субъекта, метаболизируясь в фенилацетилглутамин, который может затем выводиться в моче.

В соответствии с подходящим вариантом осуществления акцептор азота может быть выбран из группы, состоящей из фармацевтически приемлемой соли фенилуксусной кислоты (также называемой в данном документе фенилацетатом), фармацевтически приемлемой соли фенилмасляной кислоты (также называемой в данном документе фенилбутиратом), глицерин-фенилбутирата, фармацевтически приемлемой соли бензойной кислоты, фармацевтически приемлемой соли их пролекарства и связывающей аммиак смолы. Другие акцепторы азота будут хорошо известны специалистам в данной области техники.

В контексте данного документа термин «фармацевтически приемлемая соль» включает в себя, например, соль присоединения кислоты фенилуксусной кислоты, которая является достаточной основной, например, соль присоединения кислоты, например, с неорганической или органической кислотой, например, соляной, бромистоводородной, серной, фосфорной, трифторуксусной, муравьиной, лимонной, метансульфоновой или яблочной кислоты. Кроме того, подходящая фармацевтически приемлемая соль фенилуксусной кислоты, которая является достаточно кислотной, представляет собой соль

щелочного металла, например, натриевую или калиевую соль, соль щелочно-земельного металла, например, соль кальция или магния, соль аммония или соль с органическим основанием, которая дает фармацевтически приемлемый катион, например, соль с метиламином, диметиламином, триметиламином, пиперидином, морфолином или трис-(2-гидроксиэтил)амином.

В соответствии с подходящим вариантом осуществления фармацевтически приемлемая соль фенилуксусной кислоты может быть выбрана из группы, состоящей из фенилацетата натрия, фенилацетата калия, фенилацетата орнитина.

В соответствии с подходящим вариантом осуществления фармацевтически приемлемая соль фенилмасляной кислоты может быть выбрана из группы, состоящей из фенилбутирата натрия и фенилбутирата калия.

В соответствии с подходящим вариантом осуществления фармацевтически приемлемая соль бензойной кислоты может быть выбрана из группы, состоящей из бензоата натрия и бензоата калия.

Будет понятно, что средство, снижающее уровень аммиака, может существовать в сольватированных, а также в несольватированных формах, таких как, например, гидратированные формы. Следует понимать, что в контекст настоящего изобретения включены все такие сольватированные и несольватированные формы.

Термин «пролекарство» в контексте данного документа относится к средству, которое делают менее активным с помощью химического или биологического фрагмента, чем средство, снижающее уровень аммиака, (такое как акцептор азота), но которое метаболизируется в средство, снижающее уровень аммиака, или подвергается гидролизу *in vivo* с образованием средства, снижающего уровень аммиака.

В частности, предпочтительными являются такие средства, как соединения фенилацетата или фенилбутирата, действие которых заключается в удалении глутамина из кровотока (глутамин удаляется под действием GS). Второе или дополнительное средство, такое как средство, снижающее уровень аммиака, можно вводить отдельно, последовательно или одновременно с белком GS, в том числе в том же составе или композиции или в отдельной композиции или составе.

Соответственно, в соответствии с дополнительным аспектом настоящее изобретение относится к продукту, содержащему белок GS для системного неперорального введения и дополнительное терапевтическое средство, в виде комбинированного препарата для отдельного, одновременного или последовательного применения в лечении или предупреждении гипераммониемии.

Второе или дополнительное средство можно вводить посредством того же пути

введения или посредством отличающегося пути введения, в том числе перорально. Таким образом, в соответствии с одним вариантом осуществления второе или дополнительное средство, такое как средство, снижающее уровень аммиака, также можно вводить перорально или посредством других системных способов, и GS можно вводить посредством непероральных системных способов.

Средства, снижающие уровень аммиака, такие как акцепторы азота (в том числе фенилацетат натрия, фенилацетат орнитина, фенилбутират натрия или бензоат натрия), можно вводить посредством внутривенной инфузии, например, в случае оказания неотложной помощи, и/или перорально, например, в случае длительного поддержания. Внутривенную (i.v.) инфузию можно осуществлять в периферические вены, но предпочтительной является i.v. инфузия в центральные вены. Аналогично, аминокислоты, такие как аргинин, можно вводить перорально или i.v., например, посредством i.v. инфузии в центральные вены.

Соответственно, еще один дополнительный аспект настоящего изобретения относится к продукту (например, комбинированному продукту), содержащему белок GS для системного неперорального введения и дополнительное терапевтическое средство, в виде комбинированного препарата для отдельного, одновременного или последовательного применения в лечении или предупреждении гипераммониемии. В соответствии с подходящим вариантом осуществления такое дополнительное терапевтическое средство может представлять собой средство, снижающее уровень аммиака. В более подходящем случае, средство, снижающее уровень аммиака, может представлять собой акцептор азота. В более подходящем случае, акцептор азота может представлять собой фармацевтически приемлемую соль фенилуксусной кислоты, в более подходящем случае, фенилацетат натрия.

При альтернативном рассмотрении этот аспект настоящего изобретения также относится к набору, содержащему (a) белок GS для системного неперорального введения и (b) дополнительное терапевтическое средство. Соответственно, дополнительное терапевтическое средство может быть эффективным против гипераммониемии. Соответственно, дополнительное терапевтическое средство представляет собой средство, снижающее уровень аммиака, в более подходящем случае, акцептор азота.

Соответственно, в дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к набору, содержащему (a) белок GS для системного неперорального введения и (b) акцептор азота. Соответственно, акцептор азота может представлять собой фармацевтически приемлемую соль фенилуксусной кислоты, в более подходящем случае, фенилацетат натрия.

Такие наборы могут быть обеспечены для применения в лечении или предупреждении гипераммониемии. Составляющие набора могут быть обеспечены в виде отдельных фармацевтических композиций, содержащих обсуждаемое(обсуждаемые) средство(средства) вместе с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями или вспомогательными средствами. Композиция(композиции) согласно настоящему изобретению можно вводить один раз или более чем один раз. Если композицию(композиции) вводят более чем один раз, их можно вводить через регулярные интервалы или по мере необходимости, например, как определено практикующим врачом. Регулярные интервалы могут включать в себя, например, примерно раз в сутки, раз в неделю, раз в две недели, раз в месяц или любой другой интервал. Выбор протокола лечения находится в рамках компетенции квалифицированного специалиста. Например, протокол можно определить на основании исследований в моделях на животных. В другом примере субъекту можно вводить повторные дозы композиции(композиций), если уровень аммиака в крови превышает определенный выше уровень.

Применение белка GS или применение средства, снижающего уровень аммиака, в комбинации с белком GS согласно настоящему изобретению является преимущественным для лечения субъектов, для которых генная терапия не является подходящей или соответствующей, например, детей или субъектов, которые невосприимчивы к генной терапии. Такие невосприимчивые субъекты могут включать в себя, например, тех, которые ранее подверглись воздействию вирусного вектора, применяемого для доставки средства для генной терапии, или имели иммунную реакцию на него.

Предпочтительно, применение белка в качестве терапевтического средства обеспечивает возможность доставки субъекту более высоких доз активного белка и коррекции доз в зависимости от субъекта и потребности. Более того, по сравнению с генной терапией белок обеспечивает возможность намного более быстрого ответа, и, следовательно, является более подходящим для применения в экстренных ситуациях.

Как упоминалось, один аспект настоящего изобретения относится к фармацевтической композиции, содержащей средство, снижающее уровень аммиака, для применения в комбинации с белком GS для применения в лечении или предупреждении гипераммониемии. Средство, снижающее уровень аммиака, может быть составлено в виде фармацевтической композиции для введения субъекту. Средство, снижающее уровень аммиака, может быть составлено любым традиционным способом посредством смешивания выбранного количества акцептора азота с одним или несколькими физиологически или фармацевтически приемлемыми носителями или вспомогательными средствами. Соответственно, композиция может быть предназначена для неперорального

системного введения или перорального введения. Будет понятно, что фармацевтическая композиция также может содержать белок GS. В соответствии с таким вариантом осуществления композиция будет составлена для неперорального системного введения.

Выбор носителя или вспомогательного средства находится в рамках квалификации специалиста, осуществляющего введение, и может зависеть от ряда параметров, таких как способ введения. В некоторых примерах средство, снижающее уровень аммиака, обеспечивают в виде жидкости. В других случаях средство, снижающее уровень аммиака, обеспечивают в высушенной форме. Такая высушенная форма может быть регидратирована перед введением посредством добавления подходящего раствора, такого как вода, буфер, солевой раствор или другой подходящий раствор. Средство, снижающее уровень аммиака, представленное в данном документе, может быть составлено для непосредственного введения, или его можно составлять для разведения или другой модификации. Соответственно, средство, снижающее уровень аммиака, может быть составлено в виде лекарственных форм с однократной дозой (или стандартных лекарственных форм) или лекарственных форм с многократными дозами. Примеры лекарственных форм с однократной дозой включают в себя ампулы и шприцы. Примеры лекарственных форм с многократными дозами включают в себя пузырьки и бутылки, которые содержат несколько стандартных доз.

Концентрации средства, снижающего уровень аммиака, в составах являются эффективными для доставки количества средства, снижающего уровень аммиака, которое после введения является эффективным для удаления азота и/или аммония из кровотока или снижения или ингибирования выработки аммиака. Концентрации и количества будут зависеть от нескольких факторов, в том числе от уровней субстратов у субъекта, а также способа введения, и могут быть определены эмпирически. Иллюстративные концентрации средства, снижающего уровень аммиака, в композициях, представленных в данном документе, включают в себя, без ограничения, концентрации, составляющие или около составляющие 0,1, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 1000, 2000, 3000, 4000 или 5000 мг/мл средства, снижающего уровень аммиака, или больше.

Для составления композиции со средством, снижающим уровень аммиака, в соответствии с одним вариантом осуществления массовую долю средства, снижающего уровень аммиака, растворяют, суспендируют, диспергируют или иным образом размешивают в выбранной среде в желаемой концентрации. Полученные в результате смеси представляют собой растворы, суспензии, эмульсии и другие такие смеси и могут быть составлены в виде неводной или водной смеси, в том числе, без ограничения, в виде

раствора, суспензии, пасты, геля, аэрозоля, распыляемого раствора или любого другого состава, подходящего для системного введения.

Обычно композицию со средством, снижающим уровень аммиака, готовят с учетом одобрения от регуляторного органа, или в ином случае ее готовят в соответствии с общепризнанной фармакопеей для применения у животных и у людей. Композиция может включать в себя носители, такие как разбавитель, вспомогательное средство или среда. Такие фармацевтические носители могут представлять собой стерильные жидкости, такие как вода и масла. Солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерина также можно использовать в качестве жидких носителей, в особенности, для инъекционных растворов. Композиции могут содержать вместе с активным ингредиентом: разбавитель, такой как лактоза, сахароза, фосфат дикальция или карбоксиметилцеллюлоза; смазывающее средство, такое как стеарат магния, стеарат кальция и тальк; и связующее средство, такое как крахмал, натуральные камеди, такие как аравийская камедь, желатин, глюкоза, меласса, поливинилпирролидин, целлюлозы и их производные, повидон, кросповидоны и другие такие связующие средства, известные специалисту в данной области техники. Подходящие фармацевтические вспомогательные средства включают в себя крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, глицеринмоностеарат, тальк, хлорид натрия, высушенное обезжиренное молоко, глицерин, пропилен, гликоль, воду и этанол. Композиция с фенилуксусной кислотой или ее фармацевтически приемлемой солью при необходимости также может содержать незначительные количества смачивающих или эмульгирующих средств или буферных средств для стабилизации pH, например, ацетат, цитрат натрия, производные циклодекстрина, сорбитан-монолаурат, триэтаноламин ацетат натрия, триэтаноламин-олеат и другие такие средства. Другие примеры подходящих фармацевтических носителей будут известны специалисту в данной области техники.

Средство, снижающее уровень аммиака, можно вводить с помощью любого способа и пути, который доставляет соединение в организм. В соответствии с определенными вариантами осуществления средство, снижающее уровень аммиака, можно вводить парентерально. Квалифицированный специалист легко поймет и будет способен выбрать подходящие способы введения или доставки, в том числе, без ограничения, пероральное, внутривенное, внутримышечное, интрадермальное, трансдермальное, подкожное или внутрибрюшинное введение, а также введение посредством любой комбинации любых двух или более из них, а также получить состав способом, подходящим для каждого пути введения.

Также как и в фармацевтических композициях, средство, снижающее уровень

аммиака, также можно составлять или вводить другими способами, например, в пищевой композиции, такой как пищевая добавка, например, в композиции для парентерального питания (например, отдельно или совместно с другими ингредиентами добавки). Соответственно, такая композиция может быть предназначена для перорального или неперорального введения.

Как упоминалось, средство, снижающее уровень аммиака, предназначено для введения в комбинации с белком GS. Будет понятно, что средство, снижающее уровень аммиака, можно вводить раздельно, последовательно или одновременно с белком GS, в том числе в том же составе или композиции или в отдельной композиции или составе. Таким образом, в соответствии с одним вариантом осуществления средство, снижающее уровень аммиака, также можно вводить перорально или посредством других системных способов, и GS можно вводить посредством непероральных системных способов.

Иллюстративные терапевтически эффективные дозы средства, снижающего уровень аммиака, включают в себя, без ограничения, около от 1 мг/кг массы тела в сутки до или около до 2000 мг/кг массы тела в сутки, в том числе от или около от 10 мг/кг до или около до 1000 мг/кг массы тела в сутки или от или около от 100 мг/кг до или около до 500 мг/кг массы тела в сутки. Таким образом, например, субъекту можно вводить 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000 или 2000 мг или больше средства, снижающего уровень аммиака, на кг массы тела в сутки. Другие иллюстративные терапевтически эффективные дозы средства, снижающего уровень аммиака, включают в себя, без ограничения, от около 1 г/сутки до около 50 г/сутки. Таким образом, субъекту можно вводить, например, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40 или 50 грамм или больше средства, снижающего уровень аммиака, в сутки. Будет понятно, что эффективная доза может варьировать в зависимости от средства, снижающего уровень аммиака. Композиция с GS, и/или композиция, содержащая средство, снижающее уровень аммиака, или композиция, содержащая дополнительное средство, которое не представляет собой средство, снижающее уровень аммиака, если желательно, может присутствовать в упаковке, в наборе или дозирующем устройстве, таком как шприц с иглой или пузырек и шприц с иглой, которые могут содержать одну или несколько стандартных лекарственных форм. Набор или дозирующее устройство могут сопровождаться инструкциями по введению. В соответствии с вариантом осуществления, в котором композиция с GS и композиция, содержащая средство, снижающее уровень аммиака, являются отдельными, набор может содержать композицию с GS и композицию, содержащую средство, снижающее уровень аммиака. Соответственно, согласно такому варианту осуществления набор может содержать композицию с GS и акцептор азота.

Соответственно, согласно такому варианту осуществления набор может содержать композицию с GS и композицию, содержащую фенилацетат, например, фенилацетат натрия. Композиции могут быть упакованы в виде изделий, содержащих упаковочный материал, композицию и этикетку, на которой указано, что композиция предназначена для введения субъектам для лечения гипераммониемии или заболевания или состояния, ассоциированного с гипераммониемией.

В соответствии с дополнительным аспектом настоящее изобретение относится к экспрессионному вектору, кодирующему глутамин-синтетазу или ее биологически активный фрагмент или вариант, для применения в лечении или предупреждении гипераммониемии, причем вектор предназначен для системного введения.

В соответствии с подходящим вариантом осуществления вектор дополнительно кодирует средство, снижающее уровень аммиака.

В соответствии с еще одним аспектом настоящее изобретение относится к экспрессионному вектору, кодирующему глутамин-синтетазу или ее биологически активный фрагмент или вариант, для применения в комбинации со средством, снижающим уровень аммиака, для применения в лечении или предупреждении гипераммониемии.

В соответствии с еще одним аспектом настоящее изобретение относится к средству, снижающему уровень аммиака, для применения в комбинации с экспрессионным вектором, кодирующим глутамин-синтетазу или ее биологически активный фрагмент или вариант, для применения в лечении или предупреждении гипераммониемии.

В соответствии с еще одним аспектом настоящее изобретение относится к клетке, содержащей экспрессионный вектор, выбранный из группы, состоящей из: экспрессионного вектора, кодирующего глутамин-синтетазу или ее биологически активный фрагмент или вариант, для применения в лечении гипераммониемии, и экспрессионного вектора, кодирующего глутамин-синтетазу или ее биологически активный фрагмент или вариант, для применения в комбинации со средством, снижающим уровень аммиака, для применения в лечении или предупреждении гипераммониемии.

В соответствии с еще одним аспектом настоящее изобретение относится к применению экспрессионного вектора, кодирующего глутамин-синтетазу или ее биологически активный фрагмент или вариант, для производства композиции для лечения или предупреждения гипераммониемии, причем композиция предназначена для системного введения.

В соответствии с еще одним аспектом настоящее изобретение относится к применению экспрессионного вектора, кодирующего глутамин-синтетазу или ее биологически активный фрагмент или вариант, для производства композиции для

применения в комбинации со средством, снижающим уровень аммиака, для лечения или предупреждения гипераммониемии.

В соответствии с еще одним аспектом настоящее изобретение относится к применению средства, снижающего уровень аммиака, для производства композиции для применения в комбинации с экспрессионным вектором, кодирующим глутамин-синтетазу или ее биологически активный фрагмент или вариант, для применения в лечении или предупреждении гипераммониемии.

В соответствии с еще одним аспектом настоящее изобретение относится к способу лечения или предупреждения гипераммониемии у субъекта, причем указанный способ предусматривает системное введение экспрессионного вектора, кодирующего глутамин-синтетазу или ее биологически активный фрагмент или вариант.

В соответствии с еще одним аспектом настоящее изобретение относится к способу лечения или предупреждения гипераммониемии у субъекта, причем указанный способ предусматривает введение экспрессионного вектора, кодирующего глутамин-синтетазу или ее биологически активный фрагмент или вариант, и средства, снижающего уровень аммиака.

В соответствии с еще одним аспектом настоящее изобретение относится к композиции, содержащей экспрессионный вектор, который кодирует глутамин-синтетазу или ее биологически активный фрагмент или вариант, для применения в лечении или предупреждении гипераммониемии, причем композиция предназначена для системного введения.

В соответствии с подходящим вариантом осуществления композиция может дополнительно содержать средство, снижающее уровень аммиака.

В соответствии с еще одним аспектом настоящее изобретение относится к композиции, содержащей экспрессионный вектор, который кодирует глутамин-синтетазу или ее биологически активный фрагмент или вариант, для применения в комбинации со средством, снижающим уровень аммиака, для применения в лечении или предупреждении гипераммониемии.

В соответствии с еще одним аспектом настоящее изобретение относится к композиции, содержащей средство, снижающее уровень аммиака, для применения в комбинации с экспрессионным вектором, кодирующим глутамин-синтетазу или ее биологически активный фрагмент или вариант, для применения в лечении или предупреждении гипераммониемии.

В соответствии с еще одним аспектом настоящее изобретение относится к набору, содержащему экспрессионный вектор, кодирующий глутамин-синтетазу или ее

биологически активный фрагмент или вариант, и дополнительное терапевтическое средство. Соответственно, дополнительное терапевтическое средство может представлять собой средство, которое является эффективным против гипераммониемии. Соответственно, средство, которое является эффективным против гипераммониемии, представляет собой средство, снижающее уровень аммиака, или аминокислоту или ее промежуточное соединение в цикле мочевины.

В соответствии с еще одним аспектом настоящее изобретение относится к продукту, содержащему экспрессионный вектор, который кодирует глутамин-синтетазу или ее биологически активный фрагмент или вариант, и дополнительное терапевтическое средство, в виде комбинированного препарата для отдельного, одновременного или последовательного применения в лечении или предупреждении гипераммониемии. Соответственно, дополнительное терапевтическое средство может представлять собой средство, которое является эффективным против гипераммониемии. Соответственно, средство, которое является эффективным против гипераммониемии, представляет собой средство, снижающее уровень аммиака, или аминокислоту или ее промежуточное соединение в цикле мочевины. В более подходящем случае, дополнительное терапевтическое средство представляет собой акцептор азота.

В соответствии с подходящим вариантом осуществления экспрессионный вектор может быть вирусным или невирусным. В качестве примера подходящий вирусный экспрессионный вектор может быть получен из вируса, выбранного из группы, состоящей из парамиксовируса, ретровируса, аденовируса, лентивируса, поксвируса, альфавируса и вируса герпеса. Другие подходящие вирусные векторы будут известны специалистам в данной области техники.

Подходящие экспрессионные векторы, отличные от вирусных, могут быть выбраны из группы, состоящей из экспрессионных векторов на основе неорганических частиц (таких как фосфат кальция, кремний и золото), экспрессионных векторов на основе липидных частиц (например, катионных липидов, наноэмульсий липидов и твердых липидных наночастиц) и экспрессионных векторов на основе частиц полимеров (например, пептидов, полиэтиленimina, хитозана и дендримеров). Другие подходящие экспрессионные векторы, отличные от вирусных, будут известны специалистам в данной области техники.

Подходящие способы системного введения будут известны специалистам в данной области техники. Например, системного введения можно достигнуть с помощью парентерального пути введения, как например, с помощью внутривенного или подкожного пути. Будет понятно, что «системное введение» обеспечивает возможность экспрессии продукта (такого как глутамин-синтетаза или ее биологически активный фрагмент)

экспрессионного вектора во многих местах у пациента. В контексте настоящего изобретения системное введение не включает в себя внутримышечное введение.

Термин «биологически активный» относится к фрагменту или варианту нуклеиновой кислоты, кодирующей глутамин-синтетазу (SEQ ID NO: 1), который демонстрирует способность к превращению глутамата в глутамин. Белок согласно SEQ ID NO: 1 кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты согласно SEQ ID NO: 2. Таким образом, будет понятно, что вектор может содержать фрагмент или вариант SEQ ID NO:2, который кодирует биологически активный фрагмент или вариант глутамин-синтетазы.

Термин «вариант» в контексте данного документа относится к полипептиду, содержащему изменение в первичной структуре полипептида с SEQ ID NO: 1. Соответственно, вариант может характеризоваться 70% или большей идентичностью с полипептидом с SEQ ID NO: 1; 80% или большей идентичностью с полипептидом с SEQ ID NO: 1; 90% или большей идентичностью с полипептидом с SEQ ID NO: 1; 95% или большей идентичностью с полипептидом с SEQ ID NO: 1; 96% или большей идентичностью с полипептидом с SEQ ID NO: 1; 97% или большей идентичностью с полипептидом с SEQ ID NO: 1; 98% или большей идентичностью с полипептидом с SEQ ID NO: 1 или даже 99% или большей идентичностью с полипептидом с SEQ ID NO: 1. Вариант может отличаться от полипептида с SEQ ID NO: 1 на 1% или более, на 2% или более, на 3% или более, на 4% или более, на 5% или более, на 10% или более, на 20% или более или даже на 30% или более относительно последовательности согласно SEQ ID NO: 1.

Термин «фрагмент» в контексте данного документа относится к полипептиду, содержащему изменение по длине первичной структуры полипептида с SEQ ID NO: 1. Подходящий фрагмент может содержать по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% от полной длины SEQ ID NO: 1. На самом деле подходящий вариант может содержать по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% SEQ ID NO: 1.

Будет понятно, что (за исключением случаев, когда контекст требует иного) варианты осуществления, описанные со ссылкой на белок GS для применения в предупреждении гипераммониемии, белок GS для применения в комбинации со средством, снижающим уровень аммиака, средство, снижающее уровень аммиака, для применения в комбинации с белком GS, их применения, способы лечения, композиции, набор и продукт, обычно будут применимы к остальным аспектам настоящего изобретения.

Далее настоящее изобретение будет дополнительно описано со ссылкой на следующие неограничивающие примеры и фигуры.

На фиг. 1 представлены результаты гель-хроматографии (SEC) на колонке Superose 12 конъюгатов белка человеческой GS, который получен в примере 1, с присоединенной на N-конце 20 кДа альдегидной формой PEG. График показывает, что мультимеры элюировались во фракциях 8 и 9, а мономер - во фракции 10.

На фиг. 2 представлено сравнение активности GS *in vitro* у различных GS-кандидатов: конъюгированные с PEG варианты (Trin GS1, Trin GS2, Trin GS3, Trin GS 4) в сравнении с неконъюгированной GS (GS wt) и отрицательным контролем. Активность глутамин-синтетазы представлена в виде значения OD (оптическая плотность) при длине 570 нм согласно анализу из Acosta *et al.*, 2009, World J. Gastroenterol., 15(23), 2893-2899. Trin GS1 – (мономер с альдегидом на N-конце); Trin GS2 – Nof-20; Trin GS3 – Nof-30, Trin GS4 – мультимер с альдегидом на N-конце.

На фиг. 3 представлены результаты PEG ELISA на плазме крови самцов CD1 мышей дикого типа (wt) до и после введения доз различных конъюгатов в (A) исходном состоянии, (B) через 24 часа после введения дозы и (C) через 72 часа после введения дозы. (Trin1 – мономер GS, конъюгированный на N-конце через альдегидную группу; Trin2 – мультимер GS, конъюгированный с Nof-20; Trin 3 – мультимер GS, конъюгированный с Nof-30; Trin4 – мультимер, конъюгированный с PEG на N-конце через альдегидную группу).

На фиг. 4 представлены результаты активности GS (OD при длине волны 535 нм) в лизатах печени у получавших дозу 2,5 мг/кг wtCD1 мышей через 3 суток после введения дозы, как описано в примере 3.

На фиг. 5A представлены результаты анализа активности GS в печени. На фиг. 5B представлены результаты анализа активности GS в плазме крови. Активность GS как в печени, так и в плазме крови анализировали у крыс с BDL, получавших обработку белком GS и белком GS с акцептором азота.

На фиг. 6 проиллюстрированы уровни аммиака в крови, измеренные у крыс с BDL, получавших обработку белком GS и белком GS с акцептором азота.

На фиг. 7 проиллюстрирован график, показывающий выраженный в процентах отек в префронтальной коре у крыс с BDL, получавших обработку белком GS или белком GS с акцептором азота.

На фиг. 8 представлены результаты теста способности к удержанию равновесия на вращающемся барабане у крыс с BDL, получавших обработку белком GS или белком GS с акцептором азота.

На фиг. 9 представлен график, показывающий уровни аммиака у ОТС мышей, получавших обработку белком GS или белком GS с акцептором азота (SP- фенилацетат натрия).

На фиг. 10 представлены результаты анализов уровней аммиака в плазме крови и активности GS в печени у ОТС мышей, получавших обработку белком GS или белком DS с акцептором азота (SP - фенилацетат натрия).

ПРИМЕРЫ

Пример 1

Получение и очистка белка GS и конъюгатов белок GS-PEG

Получение человеческой глутамин-синтетазы (GS): вектор pET30a+, содержащий ген для человеческой GS (SEQ ID NO. 5, содержащая 5' последовательность, которая кодирует His-метку и линкер GGGGS на N-конце GS и оптимизирована по кодону для экспрессии у бактерий) применяли в экспрессионной системе E. coli. После конструирования плазмиды осуществляли оценку экспрессии GS с использованием широкого диапазона температур для индукции (IPTG) и экспрессии. Человеческую GS экспрессировали в растворимой форме в конструкции, что выявляли с помощью SDS-PAGE. Буфер для лизиса (50 mM Tris pH 8,0, 10% глицерин, 0,1% Triton X-100, 100 мкг/мл лизоцима, 1 mM PMSF, 3 единицы ДНКазы, 2 mM MgCl) применяли для экстракции растворимого белка из клеток. Растворимый белок экстрагировали после центрифугирования. После исследований экспрессии самые лучшие условия обнаружили при использовании клеток BL21 (DE3), культивируемых и индуцируемых с использованием 0,1 mM IPTG при 25°C в течение 16 часов. Другие исследуемые условия включали применение переменных условий индукции IPTG (0,01 M-0,1 M IPTG), различных температур инкубирования (в диапазоне 16°C-37°C) и периодов времени инкубирования 4-16 часов.

Очистка экспрессируемой GS: первая стадия очистки экспрессируемого белка предусматривала очистку с помощью His-метки с использованием гранул Ni-NTA, промывания 20 mM имидазолом и элюирование с использованием 300 mM имидазола.

Конъюгирование белка с PEG: белок GS конъюгировали в восстановительных условиях (с применением 20 mM цианоборгидрида натрия) на N-конце с 20 кДа альдегидной формой PEG в течение 16 часов (конъюгируемая на N-конце 20 кДа альдегидная форма PEG от Dr Reddy's).

Окончательная очистка: конъюгированный белок подвергали дополнительной очистке с применением SEC хроматографии. Применяли колонку Superose 6 или Superose 12 (см. фиг. 1). Мультимеры обнаруживались во фракциях 8+9. Фракция 10 в Superose 12 содержала (разбавленный) мультимер. В Superose 6 мультимеры обнаруживались во фракциях 8+9, а мономер во фракциях 12/13.

Получали конечный состав GS в PBS, pH 7,4, содержащем трегалозу и сахарозу.

Пример 2

Активность препаратов GS

Различные препараты GS и конъюгаты PEG, полученные согласно примеру 1, исследовали в отношении активности GS с применением анализа из Acosta *et al.*, 2009 (выше), модифицированного из исходного анализа, описанного в Ehrenfeld *et al.*, 1963, J. Biol. Chem. 238(11), 3711-3716.

100 мкг очищенного образца белка добавляли в следующий реакционный буфер: 150 мкл маточный раствор (100 ммоль/л буфера имидазол-HCl [pH 7,1], 40 ммоль/л MgCl₂, 50 ммоль/л β-меркаптоэтанола, 20 ммоль/л АТФ, 100 ммоль/л глутамата и 200 ммоль/л гидроксилamina, доведенные до pH 7,2). Пробирки инкубировали при 37°C в течение 15 мин. Реакцию останавливали посредством добавления 0,6 мл [2-кратная концентрация] реактива на основе хлорида трехвалентного железа (0,37 моль/л FeCl₃, 0,67 моль/л HCl и 0,20 моль/л трихлоруксусной кислоты). Образцы помещали на лед на 5 минут. Осажденные белки удаляли посредством центрифугирования при 10000 g и спектральную поглотительную способность супернатантов считывали при 535-570 нм в сравнении с холостой пробой с реактивом. Результаты представлены на фиг. 2. Trin1 – (мономер с альдегидной формой PEG размером 20 кДа на N-конце, полученным от Dr Reddy's); Trin2 – Nof-20, конъюгированный с белком GS с использованием монофункционального линейного 20 кДа PEG, активного сложного эфира NHS, полученного от корпорации NOF); Trin 3 – Nof-30, конъюгированный с белком GS с использованием монофункционального линейного 30 кДа PEG, активного сложного эфира NHS, полученного от корпорации NOF) Trin4 – мультимеры GS с альдегидом на N-конце). Trin 4 (мультимер с альдегидом на N-конце) демонстрировал наилучшую активность с очень сходным профилем активности по сравнению с GS wt (неконъюгированная), хотя активность других конъюгатов была аналогичной.

Пример 3

Введение доз белка GS мышам: воздействия на уровни конъюгатов белок GS-PEG в плазме крови

Самцам CD1 мышей дикого типа (wt) вводили дозы 2,5 мг/кг при подкожном (s.c) введении доз различных белков GS и конъюгатов с PEG, полученных, как описано в примере 1 (Trin1 – мономер GS, конъюгированный на N-конце с альдегидом; Trin2 – мультимер GS, конъюгированный с Nof-20; Trin 3 – мультимер GS, конъюгированный с Nof-30; Trin4 – мультимер, конъюгированный на N-конце с альдегидной формой PEG). Анализ методом ELISA проводили согласно протоколу, описанному производителем (набор Abcam PEG ELISA, ab133065). Результаты анализа ELISA в плазме крови, которые представлены на фиг. 3, проявляют либо очень низкие, либо невыявляемые уровни в случае неконъюгированной GS wt, как ожидалось во все моменты времени. Спустя 24 часа несколько кандидатов обнаруживались на высоком уровне в плазме крови; тем не менее, через 72 часа после введения дозы Trin-GS 4 (мультимер GS, конъюгированной на N-конце с альдегидной формой PEG) демонстрировал самый высокий уровень присутствия. N=2 животных в каждой группе. Таким образом, этот эксперимент демонстрирует, что системное введение белка GS можно успешно применять для получения высоких уровней конъюгатов GS-PEG, циркулирующих в крови, и, в частности, уровней, которые могут являться терапевтически эффективными или активными.

Пример 4

Введение доз белка GS мышам: уровни активности GS в лизатах печени

Анализ активности осуществляли, как описано в примере 2, за исключением того, что 500 мкг лизата печени (от умерщвленных мышей из эксперимента в примере 3) добавляли в каждую реакционную смесь в случае необходимости. Результаты представлены на фиг. 4. Результаты анализа активности GS в лизатах печени через 3 суток после введения доз демонстрируют, что лучшим кандидатом являлся мультимер GS, конъюгированный на N-конце с альдегидной формой PEG, который был единственным кандидатом, демонстрирующим значительную активность выше исходного уровня по сравнению с контролем со средой (дозированный солевой раствор). N=2 животных в каждой группе.

Пример 5

Модель нарушения цикла мочевины (недостаточность OTC) на Otc^{spf-ash} мышам применяли для демонстрации эффектов GS и GS+SP. Подробную информацию о используемых мышах можно найти в <https://www.jax.org/strain/001811> (B6EiC3Sn a/A-Otc^{spf-}

^{ash}/J). Их кормят нормальным кормом. Возраст варьировал около от 10 недель до 23 недель, при этом обеспечивали соответствие возраста в группах. Все животные представляют собой гемизиготных самцов (поскольку ОТС является сцепленным с X-хромосомой, он присутствует только на X хромосоме самцов, следовательно, мыши являются нокаутными).

Все группы (среда, GS и GS+SP; где GS = глутамин-синтетаза, GS + SP = глутамин-синтетаза + фенилацетат натрия) обрабатывали следующим образом:

Эксперимент проходил со вторника до следующей среды (8 суток).

SP дозировали i.p. (внутрибрюшинно) 350 мг/кг дважды в сутки; дозы GS вводили во всех обрабатываемых группах в течение первых 4 суток (i.p. в дозе 40 мг/кг один раз в сутки), затем следовал перерыв 2 суток [выходные], и еще 3 суток введения GS в дозе 40 мг/кг i.p.

Мышей умерщвляли в День 8 и кровь экстрагировали, центрифугировали для получения плазмы крови и эту плазму использовали для количественного определения аммиака (см. способ ниже).

Генотипирование осуществляют с применением стандартных способов, описанных в литературе.

Материалы и методы

Все эксперименты осуществляли в соответствии с Актом об использовании животных (в научных процедурах) (Animals (Scientific Procedures) Act) от 1986 года, который уточнен в соответствии с Директивой Европейского союза 2010/63/EU. Все животные получали гуманный уход согласно критериям, изложенным в Руководстве по уходу и использованию лабораторных животных (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals) (публикация 86-23 Национальных институтов здравоохранения; редакция от 1985 года). Все животные, используемые в этих экспериментах, представляли собой самцов крыс линии Спраг-Дули (с массой тела 250 г в момент начала экспериментов), которых получали от Charles River Laboratories (Кент, Великобритания) и делили на 5 групп: животные с перевязанными желчными протоками + аммиак + солевой раствор (BDL+HA+SS, n=6), животные с перевязанными желчными протоками + аммиак + фенилацетат натрия (BDL+HA+SP, n=6), животные с перевязанными желчными протоками + аммиак + фенилацетат натрия + глутамин-синтетаза (BDL+HA+SP+GS, n=5), животные с перевязанными желчными протоками + аммиак + глутамин-синтетаза (BDL+HA+GS, n=6), животные с имитацией операции + глутамин-синтетаза (SHAM+GS, n=5). Обработка, включающая SP и GS, может называться «COMBO».

Хирургическая операция по перевязке желчного протока

В условиях общей анестезии (5% изофлурана в 100% кислорода для индукции, 2% изофлурана в воздухе для поддержания) крыс подвергали тройной перевязке желчного протока (доступ посредством малой лапаротомии) для индукции хронического повреждения печени и исследовали через 28 суток после хирургической операции. Разрез по средней линии живота выполняли в условиях анестезии. В группе с BDL общий желчевыносящий проток выделяли, трижды перевязывали шелковой нитью 3-0 и разрезали между лигатурами. В группе, подвергнутой имитирующей операции, осуществляли такую же процедуру без выполнения разреза между лигатурами. После BDL все животные продолжали набирать массу и были сравнимыми с контролями с имитацией операции. Общая смертность в обеих группах составляла менее 10%, и смерть происходила в пределах 36 часов после операции.

Условия с нецирротической гипераммониемией

Двадцати трем крысам вводили гипераммониемический (НА) рацион. Аминокислотная рецептура, используемая для исходного раствора массой приблизительно 100 г, представляла собой: 15 г лейцина, 7,7 г фенилаланина, 7 г глутамата, 10 г аланина, 4,4 г пролина, 5,8 г треонина, 11 г аспартата, 5 г серина, 4,8 г глицина, 3,3 г аргинина, 9,6 г лизина, 8,4 г гистидина, 3 г тирозина, 1,5 г триптофана и 10,6 г валина. 25 г этой смеси (смешанной в соотношении 1:5 со стандартным порошковым кормом для грызунов) заново готовили каждые сутки и крысам предоставляли свободный доступ к ней в течении 5 суток. Рецептура около соответствует аминокислотному составу гемоглобина грызунов, [1] имитируя эффект кровотечения в желудочно-кишечном тракте, которое, как известно, приводит в результате к системной гипераммониемии [2].

Условия с фенилацетатом натрия

Одиннадцати крысам вводили рацион с фенилацетатом натрия (SP). 0,3 г/кг в сутки в течение 5 суток смешивали с порошковым кормом и заново готовили каждые сутки.

Условия с глутамин-синтетазой

Шестнадцати крысам вводили инъекцией GS внутривентрально каждые двое суток (День 1 и День 3). Общий вводимый инъекцией объем составлял 3 мл i.p., что обеспечивает 18-22 мг/кг GS.

Забор образцов и биохимический анализ крови

Образцы плазмы крови забирали из вены на задней лапе в различные моменты времени во всех группах. Моменты времени отсчитывали от момента обработки глутамин-синтетазой следующим образом: 6 часов, 24 часа, 48 часов и 5 суток. Анализы в отношении уровней аммиака в плазме крови осуществляли в каждый момент времени с использованием 200 мкл соответствующей плазмы крови с применением многофункционального анализатор Cobas Integra 400 с соответствующими наборами (Roche-diagnostics, Берджесс-Хилл, Западный Сассекс, Великобритания).

Отек головного мозга

Его измеряли с применением методики сухой массы, которая описана ранее [3, 4]. Вкратце, высушенные в сухожаровом шкафу микропробирки эппендорф взвешивали с использованием чувствительных электронных весов, затем каждое из префронтальной коры, полосатого тела, гиппокампа, мозжечка и коры головного мозга каждого животного помещали в промаркированную соответствующим образом микропробирку эппендорф и повторно взвешивали; все образцы имели отличие в пределах 0,1 мг. Сухую массу определяли после того, как микропробирки эппендорф, загруженные отдельными образцами головного мозга, высушивали в сухожаровом шкафу при 60°C в течение 7 суток. Содержание воды в ткани затем рассчитывали как $\%H_2O = (1 - \text{сухая масса} / \text{влажная масса}) \times 100\%$.

Тест для оценки двигательной активности: тест способности к удержанию равновесия на вращающемся барабане-на барабане, вращающемся с ускорением

Этот тест двигательной активности состоит из приводимого в движение мотором вращающегося барабана, который позволяет оценивать двигательную координацию и устойчивость к усталости (Jones and Roberts 1968). Для крыс использовали вращающийся с ускорением барабан (accelerating rotarod) 7750 от Ugo Basile (Ugo Basile Biological Research Apparatus, Италия). Процедура, которой следовали, имеет две части. В первой части животных помещали в аппарат и скорость поддерживали постоянной при 2 об./мин. в течение 60 с. Во второй части крыс оценивали в течение 5 мин. в сеансе теста способности к удержанию равновесия на барабане, вращающемся с ускорением, в котором скорость вращения постоянно повышалась до тех пор, пока она не достигала 20 об./мин. Значения времени ожидания до падения с барабана и текущую скорость вращения записывали в условиях до и после обработки для всех групп после 1 часа обработки.

Определение аммиака в крови с помощью прямого метода с использованием TCA

Следующий способ, описанный в статье (*Clin Chim Acta. 1968 Oct;22(2)183-86*), использовали для измерения концентрации аммиака в плазме крови.

Принцип

В щелочном растворе ионы аммония реагируют с гипохлоритом с образованием монохлорамина. В присутствии фенола и избытка гипохлорита монохлорамин будет образовывать соединение голубого цвета, йодфенол, когда нитропруссид используют в качестве катализатора. Концентрацию аммония определяют спектрофотометрически при длине волны 630 нм.

Метод

Растворить 3,5 г фенола и 0,04 г нитропруссид натрия в 100 мл дистиллированной воды для приготовления реактива А.

Растворить 1,8 г гидроксида натрия в 48 мл дистиллированной воды и добавить 4 мл 1 М раствора гипохлорита натрия для приготовления реактива В.

Добавить 150 мкл 5% ТСА к 50 мкл каждого образца плазмы крови и центрифугировать при 10000 об./мин. при 4°C в течение 10 минут. Отобрать 50 мкл супернатанта и поместить в 96-луночный планшет, в который добавляют 50 мкл обоих реактивов А и В.

Стандартные концентрации хлорида аммония для калибровочной кривой получают посредством растворения хлорида аммония в дистиллированной воде и последовательного разведения с получением концентраций в диапазоне от 400 мкмоль до 3 мкмоль. Дистиллированную воду используют в качестве холостой пробы.

Луночный планшет закрывают от света и инкубируют при 50°C в течение 60 минут. Спектральную поглощательную способность измеряют при длине волны 630 нм с использованием спектрофотометра для определения концентрации аммиака.

Результаты

Введение доз белка GS мышам: уровни активности GS в печени и крови

Анализ активности осуществляли, как описано в разделе Материалы и методы выше. Результаты представлены на фиг. 5А и В. Результаты в печени крыс, измеренные в День 5, демонстрируют, что активность GS является наилучшей в группе SHAM+GS. Кроме того, на фиг. 5А можно увидеть, что обработка GS и GS+SP повышает активность GS в печени мышей, которые подверглись BDL. При измерении в крови результаты демонстрируют, что активность GS является лучшей в группе BDL+GS. Кроме того, на фиг. 5В можно увидеть,

что активность GS в крови является постоянной со временем даже через 24 часа и 48 часов после введения доз.

Введение доз белка GS мышам: концентрации аммиака у крыс с BDL

Как видно на фиг. 6, уровни аммиака являются наиболее высокими у крыс с BDL. Каждая из обработки GS, GS+SP и SP приводила в результате к существенному снижению уровней аммиака в крови. GS снижала уровни аммиака после 2 доз. Обработка GS+SP снижала уровни аммиака наиболее значительно, что говорит о синергическом эффекте.

Введение доз белка GS мышам: набухание головного мозга у крыс с BDL

Отек головного мозга измеряли в префронтальной коре. Оказалось, что обработка GS уменьшает отек головного мозга наиболее существенно по сравнению с обработкой SP и даже обработкой SP+GC (фиг. 7). Обработка SP не уменьшала набухание статистически значимо по сравнению с контролем (т.е. мышами с BDL без обработки).

Введение доз белка GS мышам: функционирование головного мозга и физическое функционирование у крыс с BDL

На фиг. 8 представлены результаты теста способности к удержанию равновесия на вращающемся барабане. Неожиданно оказалось, что введение доз GS улучшало характеристики во всех исследуемых группах мышей. Обработка только SP не приводила к статистически значимым эффектам, но обработка GS+SP демонстрирует наилучшее улучшение, что говорит о синергическом эффекте.

Обработка мышей с недостаточностью ОТС

Как показано на фиг. 9, уровень аммиака очень существенно снижался в группах, получавших обработку.

На фиг. 10 видно, что у ОТС мышей, получавших обработку GS или GS и SP, активность GS в плазме крови повышалась с 0,2 в группе, получавшей среду, до 0,8 в группе, получавшей только GS, и ~1,1 в группе, получавшей GS и SP. Активность GS в печени повышалась с ~0,175 в группе, получавшей среду, до ~2,8 в группе, получавшей только GS, и ~2,5 в группе, получавшей GS и SP.

Краткое изложение результатов

Подводя итоги, следует отметить, что вводимая GS является биологически совместимой, безопасной и улучшает активность GS в крови и печени. Она также приводит

к снижению уровней аммиака и отека головного мозга, а также улучшает нейрокогнитивную и/или физическую функцию. Кроме того, данные говорят о том, что обработка SP и GS может характеризоваться синергическим эффектом.

Библиография

- [1] Riggs A. The amino acid composition of some mammalian hemoglobins: mouse, guinea pig, and elephant. J Biol Chem 1963;238:2983-2987.
- [2] Balata S, Olde Damink SW, Ferguson K, Marshall I, Hayes PC, Deutz NE, Williams R, Wardlaw J, Jalan R. Induced hyperammonemia alters neuropsychology, brain MR spectroscopy and magnetization transfer in cirrhosis. Hepatology 2003;37:931-939.
- [3] Stewart-Wallace AM. A biochemical study of cerebral tissue, and of changes in cerebral oedema. Brain 1939; 62: 426-38.
- [4] Traber PG, Ganger DR, Blei AT. Brain edema in rabbits with galactosamine-induced fulminant hepatitis. Regional differences and effects on intracranial pressure. Gastroenterology 1986; 91: 1347-56.

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ**SEQ ID NO. 1** [полный человеческий белок]

MTTSASSHLNKGIKQVYMSLPQGEKVQAMYIWIDGTGEGLRCKTRTLDSEPKCVEELPE
 WNF DGSSSTLQSEGSNSDMYLVPAAMFRDPFRKDPNKLVLCEVFKYNRRPAETNLRHTC
 KRIMDMVSNQHPWFGMEQEYTLMGTDGHPFGWPSNGFPGPQGPYYCGVGADRAYGR
 DIVEAHYRACLYAGVKIAGTNAEVMPAQWFEQIGPCEGISMGDHLWVARFILHRVCED
 FGVIATFDPKPIPGNWNGAGCHTNFSTKAMREENGLKYIEEAIEKLSKRHQYHIRAYDPK
 GGLDNARRLTGFHETSNINDFSAGVANRSASIRIPRTVGQEKKGYFEDRRPSANCDPFSV
 TEALIRTCLLNETGDEPFQYKN

SEQ ID. NO. 2 (ТОЛЬКО метионин отщепляется для образования зрелого белка *in vivo*)

TTSASSHLNKGIKQVYMSLPQGEKVQAMYIWIDGTGEGLRCKTRTLDSEPKCVEELPEW
 NFDGSSTLQSEGSNSDMYLVPAAMFRDPFRKDPNKLVLCEVFKYNRRPAETNLRHTCK
 RIMDMVSNQHPWFGMEQEYTLMGTDGHPFGWPSNGFPGPQGPYYCGVGADRAYGRDI
 VEAHYRACLYAGVKIAGTNAEVMPAQWFEQIGPCEGISMGDHLWVARFILHRVCEDFG
 VIATFDPKPIPGNWNGAGCHTNFSTKAMREENGLKYIEEAIEKLSKRHQYHIRAYDPKG
 GLDNARRLTGFHETSNINDFSAGVANRSASIRIPRTVGQEKKGYFEDRRPSANCDPFSVT
 EALIRTCLLNETGDEPFQYKN

SEQ ID NO. 3 кДНК

CGAGAGTGGGAGAAGAGCGGAGCGTGTGAGCAGTACTGCGGCCTCCTCTCCTCTCCTAAC
 CTGCTCTCGCGGCCTACCTTTACCCGCCCGCCTGCTCGGCGACCAGAACACCTTCCACCA
 TGACCACCTCAGCAAGTTCCCACTTAAATAAAGGCATCAAGCAGGTGTACATGTCCCTGC
 CTCAGGGTGAGAAAGTCCAGGCCATGTATATCTGGATCGATGGTACTGGAGAAGGACTGC
 GCTGCAAGACCCGGACCCTGGACAGTGAGCCCAAGTGTGTGGAAGAGTTGCCTGAGTGGA
 ATTTTCGATGGCTCCAGTACTTTACAGTCTGAGGGTTCCAACAGTGACATGTATCTCGTGC
 CTGCTGCCATGTTTCGGGACCCCTTCCGTAAGGACCCTAACAAAGCTGGTGTATGTGAAG
 TTTTCAAGTACAATCGAAGGCCTGCAGAGACCAATTTGAGGCACACCTGTAAACGGATAA
 TGGACATGGTGAGCAACCAGCACCCCTGGTTTGGCATGGAGCAGGAGTATACCCCTCATGG
 GGACAGATGGGCACCCCTTTGGTTGGCCTTCCAACGGCTTCCCAGGGCCCCAGGGTCCAT
 ATTACTGTGGTGTGGGAGCAGACAGAGCCTATGGCAGGGACATCGTGGAGGCCCATACC
 GGGCCTGCTTGTATGCTGGAGTCAAGATTGCGGGGACTAATGCCGAGGTCATGCCTGCCC
 AGTGGGAATTTTCAGATTGGACCTTGTGAAGGAATCAGCATGGGAGATCATCTCTGGGTGG
 CCCGTTTTCATCTTGCATCGTGTGTGTGAAGACTTTGGAGTGATAGCAACCTTTGATCCTA
 AGCCCATTCCTGGGAAGTGAATGGTGCAGGCTGCCATACCAACTTCAGCACCAAGGCCA
 TGCGGGAGGAGAATGGTCTGAAGTACATCGAGGAGGCCATTGAGAACTAAGCAAGCGGC
 ACCAGTACCACATCCGTGCCTATGATCCCAAGGGAGGCCTGGACAATGCCCGACGTCTAA
 CTGGATTCCATGAAACCTCCAACATCAACGACTTTTCTGGTGGTGTAGCCAATCGTAGCG
 CCAGCATACGCATTCCCCGGAAGTGTGGCCAGGAGAAGAAGGGTTACTTTGAAGATCGTC
 GCCCCTCTGCCAACTGCGACCCCTTTTCGGTGACAGAAGCCCTCATCCGCACGTGTCTTC
 TCAATGAAACCGGCATGAGCCCTTCCAGTACAAAATTAAGTGGACTAGACCTCCAGCT
 GTTGAGCCCTCCTAGTTCTTCATCCCACTCCAACCTCTCCCCCTCTCCAGTTGTCCCG
 ATTGTAACCTCAAAGGTGGAATATCAAGGTCGTTTTTTTTTCATTCC

SEQ ID NO. 4: Белок GS, выращенный в бактерии, применяемый в примере 1

MGSSHHHHHHGGGGSMTTSSASSHLNKGIKQVYMSLPQGEKVQAMYIWIDGTGEGRLC
 KTRTLDSEPKCVEELPEWNFDGSSTLQSEGSNSDMYLVPAAMFRDPFRKDPNKLVLCEV
 FKYNRRPAETNLRHTCKRIMDMVSNQHPWFGMEQEYTLMGTDGHPFGWPSNGFPGPQ
 GPYYCGVGADRAYGRDIVEAHYRACLYAGVKIAGTNAEVMMPAQWFEFQIGPCEGISMG
 DHLWVARFILHRVCEDFGVIATFDPKPIPGNWNGAGCHTNFSTKAMREENGLKYIEEAI
 EKLSKRHQYHIRAYDPKGGLDNARRLTG FHETSNINDFSAGVANRSASIRIPRTVGQEKK
 GYFEDRRPSANCDPFSVTEALIRTCLLNETGDEPFQYKN

SEQ ID NO. 5 кДНК (оптимизированная для экспрессии в бактериях кДНК,
 применяемая в примере 1).

ATGGGCAGCAGCCACCACCATCACCACCACGGCGGGCGGGCGGTAGCATGACCACCTC
 GGCAAGCAGCCACCTGAATAAAGGCATCAAACAGGTGTATATGTCTCTGCCGCAGG
 GTGAAAAAGTTCAAGCCATGTACATTTGGATCGATGGCACCGGTGAAGGCCTGCGT
 TGCAAAACCCGCACGCTGGACTCAGAACCGAAATGTGTGGAAGAACTGCCGGAATG
 GAACTTTGATGGTAGCTCTACGCTGCAGTCGGAAGGCAGTAATTCCGACATGTATCT
 GGTTCGGCGGCCATGTTTCGTGATCCGTTCCGCAAAGACCCGAACAACTGGTGCT
 GTGCGAAGTTTTTAAATACAACCGTCGCCCCGGCGGAAACCAATCTGCGTCATACGTG
 TAAACGCATTATGGATATGGTCAGCAACCAGCACCCGTGGTTCGGTATGGAACAAG
 AATATACCCTGATGGGTACGGATGGCCATCCGTTTGGTTGGCCGAGCAATGGTTTCC
 CGGGTCCGCAGGGTCCGTATTACTGCGGTGTCGGCGCAGATCGTGCTTACGGTCGCG
 ACATTGTGGAAGCACACTATCGTGCTTGTCTGTACGCGGGTGTTAAAATCGCCGGCA
 CCAATGCAGAAGTCATGCCGGCTCAGTGGGAATTTCAAATTGGCCCCGTGCGAAGGT
 ATCAGCATGGGCGATCATCTGTGGGTGCTCGTTTCATCCTGCACCGCGTCTGTGAA
 GATTTTGGTGTGATTGCGACCTTCGACCCGAAACCGATCCCGGGCAACTGGAATGGT
 GCTGGCTGCCATACCAACTTTAGCACGAAAGCGATGCGTGAAGAAAATGGCCTGAA
 ATACATCGAAGAAGCAATCGAAAAACTGTCTAAACGTCATCAGTATCACATTCGCG
 CCTACGATCCGAAAGGCGGTCTGGACAACGCACGTCGCCTGACCGGTTTTACGAA
 ACGAGCAACATCAATGATTTCTCTGCGGGCGTTGCCAATCGCTCAGCCTCGATTCTG
 ATCCCGCGCACCGTCGGTCAAGAGAAAAAAGGCTATTTTGAAGATCGTCGCCCCGAG
 TGCAAACCTGTGACCCGTTCTCCGTGACGGAAGCCCTGATCCGCACCTGTCTGCTGAA
 TGAAACCGGCGATGAACCGTTCCAATACAAAAAT

SEQ ID NO. 6 [Lactobacillus acidophilus штамм 30SC GS]

>tr|F0TG87|F0TG87_LACA3 глутамин-синтетаза OS=Lactobacillus acidophilus
(штамм 30SC)

MSKQYTTEEIRKEVADKDVRFLRLCFTDINGTEKAVEVPTSQLDKVLTNDIRFDGSSIDG
FVRLEESDMVLYPDFSTWSVLPWGDEHGGKIGRLICSVHMTDGKPFAGDPRNNLKRVL
GEMKEAGFDTFDIGFEMEFHLFKLDENGNWTTTEVPDHASYFDMTSDDEGARCRREIVE
TLEEIGFEVEAAHHEVGDGQQEIDFRFDDALTTADRCQTFKMVARHIARKHGLFATFMA
KPVEGQAGNGMHNNMSLFKNKHNVFYDKDGEFHLSENTALYFLNGILEHARAITAIGNP
TVNSYKRLIPGFEAPVYIAWAAKNRSPLVRIPSAGEINTRLEMRSADPTANPYLLLAACL
TAGLKGIKEQKMPMKPVEENIFEMTEEERAHEHGKPLPTTLHNAIKAFKEDDLIKSALGE
HLTHSFIESKELEWSKYSQSVSDWERQRYMNW

SEQ ID NO. 7 [GS Zea Mays] (GS кукурузы/маиса)

>tr|B4G1P1|B4G1P1_глутамин-синтетаза маиса

MACLTDLVNLNLSDNTEKIIAEYIWIGGSGMDLRSKARTLSGPVTDPSKLPKWNVDGSS
TGQAPGEDSEVILYPQAIKDPFRRGNILVMCDCYTPAGEPIPTNKRYNAAKIFSSPEVA
AEEPWYGIEQEYTLQKDTNWPLGWPIGGFPGPQGPYYCGIGAEEKSFGRDIVDAHAKAC
LYAGINISGINGEVMPGQWEFQVGPSVGISSGDQVWVARYILERITEIAGVVVTFDPKPIP
GDWNGAGAHTNYSTESMRKEGGYEVIAAIEKLKLHREHIAAYGEGNERRLTGRHET
ADINTFSWGVANRGASVRVGRETEQNGKGYFEDRRPASNMDPYVVTSMIAETTIIWKP

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Белок глутамин-синтетазы (GS) для применения в лечении или предупреждении гипераммониемии посредством системного неперорального введения субъекту.

2. Белок для применения по п. 1, причем белок предназначен для применения в комбинации со средством, снижающим уровень аммиака.

3. Средство, снижающее уровень аммиака, для применения в комбинации с белком GS для применения в лечении или предупреждении гипераммониемии.

4. Белок или средство, снижающее уровень аммиака, для применения по любому из пп. 1-3, причем гипераммониемия возникает вследствие нарушения цикла мочевины (UCD) и/или недостаточности глутамин-синтетазы.

5. Белок или средство, снижающее уровень аммиака, для применения по любому из пп. 1-4, причем гипераммониемия ассоциирована с недостаточностью органа.

6. Белок или средство, снижающее уровень аммиака, для применения по любому из пп. 1-5, причем гипераммониемия возникает вследствие неалкогольной жировой болезни печени.

7. Белок или средство, снижающее уровень аммиака, для применения по пп. 1-5, причем гипераммониемия возникает вследствие острой печеночной недостаточности, цирроза печени и/или почечной дисфункции и/или недостаточности.

8. Белок или средство, снижающее уровень аммиака, для применения по любому предыдущему пункту, причем белок GS содержит аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 50% идентичной аминокислотной последовательности, изложенной в SEQ ID NO. 1, или представляет собой ее ферментативно активный фрагмент.

9. Белок или средство, снижающее уровень аммиака, для применения по любому предыдущему пункту, причем белок GS вводится в форме фармацевтической композиции.

10. Белок или средство, снижающее уровень аммиака, для применения по любому предыдущему пункту, причем белок GS вводится в форме композиции для парентерального питания.

11. Белок или средство, снижающее уровень аммиака, для применения по любому предыдущему пункту, причем белок GS является связанным с фрагментом.

12. Белок или средство, снижающее уровень аммиака, для применения по любому предыдущему пункту, причем фрагмент является выбранным из белка, пептида, небелкового полимера или аффинной метки.

13. Белок или средство, снижающее уровень аммиака, для применения по любому предыдущему пункту, причем фрагмент представляет собой полиэтиленгликоль (PEG).

14. Белок или средство, снижающее уровень аммиака, для применения по любому предыдущему пункту, причем PEG связан с белком GS на N-конце белка.

15. Белок или средство, снижающее уровень аммиака, для применения по любому предыдущему пункту, причем белок GS связан с фрагментом посредством пептидного линкера или химической связи.

16. Белок или средство, снижающее уровень аммиака, для применения по любому предыдущему пункту, для применения по любому из пп. 8-12, причем белок GS связан с фрагментом посредством ковалентной связи.

17. Белок или средство, снижающее уровень аммиака, для применения по любому предыдущему пункту, причем белок GS присутствует в форме, подходящей для парентерального введения субъекту.

18. Белок или средство, снижающее уровень аммиака, для применения по любому предыдущему пункту, причем белок GS присутствует в форме, подходящей для подкожного введения субъекту.

19. Белок или средство, снижающее уровень аммиака, для применения по любому предыдущему пункту, причем белок GS обеспечен в виде препарата, содержащего мультимерные формы белка.

20. Белок или средство, снижающее уровень аммиака, для применения по любому предыдущему пункту, причем белок GS обеспечен в мономерной форме.

21. Белок или средство, снижающее уровень аммиака, для применения по любому из пп. 2-20, причем средство, снижающее уровень аммиака, является выбранным из группы, состоящей из акцептора азота, ионообменной смолы (например, Relapsa), поглотитель аммиака (такого как поглотитель аммиака на основе липосом, например, Versantis), сконструированного микробиома, который удаляет аммиак (например, Synlogic), рифаксимины и лактулозы.

22. Белок или акцептор азота для применения по п. 21, причем акцептор азота является выбранным из группы, состоящей из: фармацевтически приемлемой соли фенилуксусной кислоты или ее фармацевтически приемлемого пролекарства, фармацевтически приемлемой соли фенилмасляной кислоты ее фармацевтически приемлемого пролекарства, ее фармацевтически приемлемого пролекарства глицерин-фенилбутирата, фармацевтически приемлемой соли бензойной кислоты или ее фармацевтически приемлемого пролекарства и связывающей аммиак смолы.

23. Белок или акцептор азота для применения по п. 22, причем фармацевтически приемлемая соль фенилуксусной кислоты представляет собой фенилацетат натрия.

24. Применение белка GS для производства композиции для лечения или предупреждения гипераммониемии при системном непероральном введении субъекту.

25. Применение средства, снижающего уровень аммиака, для производства композиции для применения в комбинации с белком GS для лечения или предупреждения гипераммониемии.

26. Применение белка GS и средства, снижающего уровень аммиака, для производства композиции для применения в лечении или предупреждении гипераммониемии.

27. Применение белка GS и/или средства, снижающего уровень аммиака, по п. 24 или п. 26, причем гипераммониемия является такой, как определено в пп. 4-7.

28. Применение белка GS и/или средства, снижающего уровень аммиака, по любому из пп. 24-27, причем белок GS является таким, как определено в пп. 8-20.

29. Применение белка GS и/или средства, снижающего уровень аммиака, по любому из пп. 24-28, причем средство, снижающее уровень аммиака, является выбранным из группы, состоящей из акцептора азота, ионообменной смолы (например, Relapsa), поглотителя аммиака (такого как поглотитель аммиака на основе липосом, например, Versantis), сконструированного микробиома, который удаляет аммиак (например, Synlogic), рифаксимины и лактулозы.

30. Применение белка GS и/или средства, снижающего уровень аммиака, по любому из пп. 24-29, причем акцептор азота является таким, как определено в п. 22 или п. 23.

31. Способ лечения или предупреждения гипераммониемии у субъекта, причем указанный способ предусматривает системное и непероральное введение белка GS указанному субъекту.

32. Способ по п. 31, дополнительно предусматривающий введение средства, снижающего уровень аммиака.

33. Способ по п. 31 или п. 32, причем гипераммониемия является такой, как определено в пп. 4-7.

34. Способ по пп. 31-33, причем белок GS является таким, как определено в пп. 8-20.

35. Способ по пп. 32-34, причем средство, снижающее уровень аммиака, является выбранным из группы, состоящей из акцептора азота, ионообменной смолы (например, Relapsa), поглотителя аммиака (такого как поглотитель аммиака на основе липосом, например, Versantis), сконструированного микробиома, который удаляет аммиак (например, Synlogic), рифаксимины и лактулозы.

36. Способ по п. 35, причем акцептор азота является таким, как определено в п. 22 или п. 23.

37. Композиция, содержащая белок GS, для применения в лечении или предупреждении гипераммониемии, причем композиция присутствует в форме, подходящей для системного неперорального введения.

38. Композиция, содержащая средство, снижающее уровень аммиака, для применения в комбинации с белком GS для применения в лечении или предупреждении гипераммониемии.

39. Композиция, содержащая белок GS и средство, снижающее уровень аммиака.

40. Композиция по п. 39, причем композиция предназначена для применения в лечении или предупреждении гипераммониемии.

41. Композиция по любому из пп. 37-40, причем композиция представляет собой фармацевтическую или пищевую композицию.

42. Композиция по любому из пп. 37-41, причем композиция содержит по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное средство.

43. Композиция по любому из пп. 38-42, причем композиция присутствует в форме, подходящей для системного неперорального введения.

44. Композиция по любому из пп. 37-43, причем композиция присутствует в форме, подходящей для подкожного введения.

45. Композиция по любому из пп. 37-44, причем композиция содержит дополнительное терапевтическое средство.

46. Композиция по любому из пп. 37-45, причем гипераммониемия является такой, как определено в пп. 4-7.

47. Композиция по любому из пп. 37-46, причем белок GS является таким, как определено в пп. 8-20.

48. Композиция по любому из пп. 38-47, причем средство, снижающее уровень аммиака, является выбранным из группы, состоящей из акцептора азота, ионообменной смолы (например, Relapsa), поглотителя аммиака (такого как поглотитель аммиака на основе липосом, например, Versantis), сконструированного микробиома, который удаляет аммиак (например, Synlogic), рифаксимины и лактулозы.

49. Композиция по п. 48, причем акцептор азота является таким, как определено в п. 22 или п. 23.

50. Набор, содержащий белок GS для системного неперорального введения и дополнительное терапевтическое средство.

51. Набор по п. 50, в котором дополнительное терапевтическое средство является эффективным против гипераммониемии.

52. Набор по п. 50 или п. 51, причем дополнительное терапевтическое средство представляет собой средство, снижающее уровень аммиака, или аминокислоту или ее промежуточное соединение в цикле мочевины или аналог.

53. Набор по п. 52, причем средство, снижающее уровень аммиака, является выбранным из группы, состоящей из акцептора азота, ионообменной смолы (например, Relapsa), поглотителя аммиака (такого как поглотитель аммиака на основе липосом, например, Versantis), сконструированного микробиома, который удаляет аммиак (например, Synlogic), рифаксимины и лактулозы.

54. Набор по п. 53, причем акцептор азота является таким, как определено в п. 22 или п. 23.

55. Набор по любому из пп. 50-54, причем гипераммониемия является такой, как определено в пп. 4-7.

56. Набор по любому из пп. 50-55, причем белок GS является таким, как определено в пп. 8-20.

57. Продукт, содержащий белок GS для системного неперорального введения и дополнительное терапевтическое средство, в виде комбинированного препарата для раздельного, одновременного или последовательного применения в лечении или предупреждении гипераммониемии.

58. Продукт по п. 57, причем дополнительное терапевтическое средство представляет собой средство, снижающее уровень аммиака, или аминокислоту или ее промежуточное соединение в цикле мочевины или аналог.

59. Продукт по п. 58, причем средство, снижающее уровень аммиака, является выбранным из группы, состоящей из акцептора азота, ионообменной смолы (например, Relapsa), поглотителя аммиака (такого как поглотитель аммиака на основе липосом, например, Versantis), сконструированного микробиома, который удаляет аммиак (например, Synlogic), рифаксимины и лактулозы.

60. Продукт по п. 59, причем акцептор азота является таким, как определено в п. 22 или п. 23.

61. Продукт по любому из пп. 57-60, причем гипераммониемия является такой, как определено в пп. 4-7.

62. Продукт по любому из пп. 57-61, причем белок GS является таким, как определено в пп. 8-20.

63. Экспрессионный вектор, кодирующий глутамин-синтетазу или ее биологически активный фрагмент или вариант, для применения в лечении или предупреждении гипераммониемии, причем вектор предназначен для системного введения.

64. Экспрессионный вектор для применения по п. 63, дополнительно кодирующий средство, снижающее уровень аммиака.

65. Экспрессионный вектор, кодирующий глутамин-синтетазу или ее биологически активный фрагмент или вариант, для применения в комбинации со средством, снижающим уровень аммиака, для применения в лечении или предупреждении гипераммониемии.

66. Средство, снижающее уровень аммиака, для применения в комбинации с экспрессионным вектором, кодирующим глутамин-синтетазу или ее биологически активный фрагмент или вариант, для применения в лечении или предупреждении гипераммониемии.

67. Клетка, содержащая экспрессионный вектор, для применения, как определено в пп. 63-66.

68. Применение экспрессионного вектора, кодирующего глутамин-синтетазу или ее биологически активный фрагмент или вариант, для производства композиции для лечения или предупреждения гипераммониемии, причем композиция предназначена для системного введения.

69. Применение экспрессионного вектора, кодирующего глутамин-синтетазу или ее биологически активный фрагмент или вариант, для производства композиции для применения в комбинации со средством, снижающим уровень аммиака, для лечения или предупреждения гипераммониемии.

70. Применение средства, снижающего уровень аммиака, для производства композиции для применения в комбинации с экспрессионным вектором, кодирующим глутамин-синтетазу или ее биологически активный фрагмент или вариант, для применения в лечении или предупреждении гипераммониемии.

71. Способ лечения или предупреждения гипераммониемии у субъекта, причем указанный способ предусматривает системное введение экспрессионного вектора, кодирующего глутамин-синтетазу или ее биологически активный фрагмент или вариант.

72. Способ лечения или предупреждения гипераммониемии у субъекта, причем указанный способ предусматривает введение экспрессионного вектора, кодирующего глутамин-синтетазу или ее биологически активный фрагмент или вариант, и средства, снижающего уровень аммиака.

73. Композиция, содержащая экспрессионный вектор, который кодирует глутамин-синтетазу или ее биологически активный фрагмент или вариант, для применения в лечении

или предупреждении гипераммониемии, причем композиция предназначена для системного введения.

74. Композиция по п. 73, причем композиция дополнительно содержит средство, снижающее уровень аммиака.

75. Композиция, содержащая экспрессионный вектор, который кодирует глутамин-синтетазу или ее биологически активный фрагмент или вариант, для применения в комбинации со средством, снижающим уровень аммиака, для применения в лечении или предупреждении гипераммониемии.

76. Композиция, содержащая средство, снижающее уровень аммиака, для применения в комбинации с экспрессионным вектором, кодирующим глутамин-синтетазу или ее биологически активный фрагмент или вариант, для применения в лечении или предупреждении гипераммониемии.

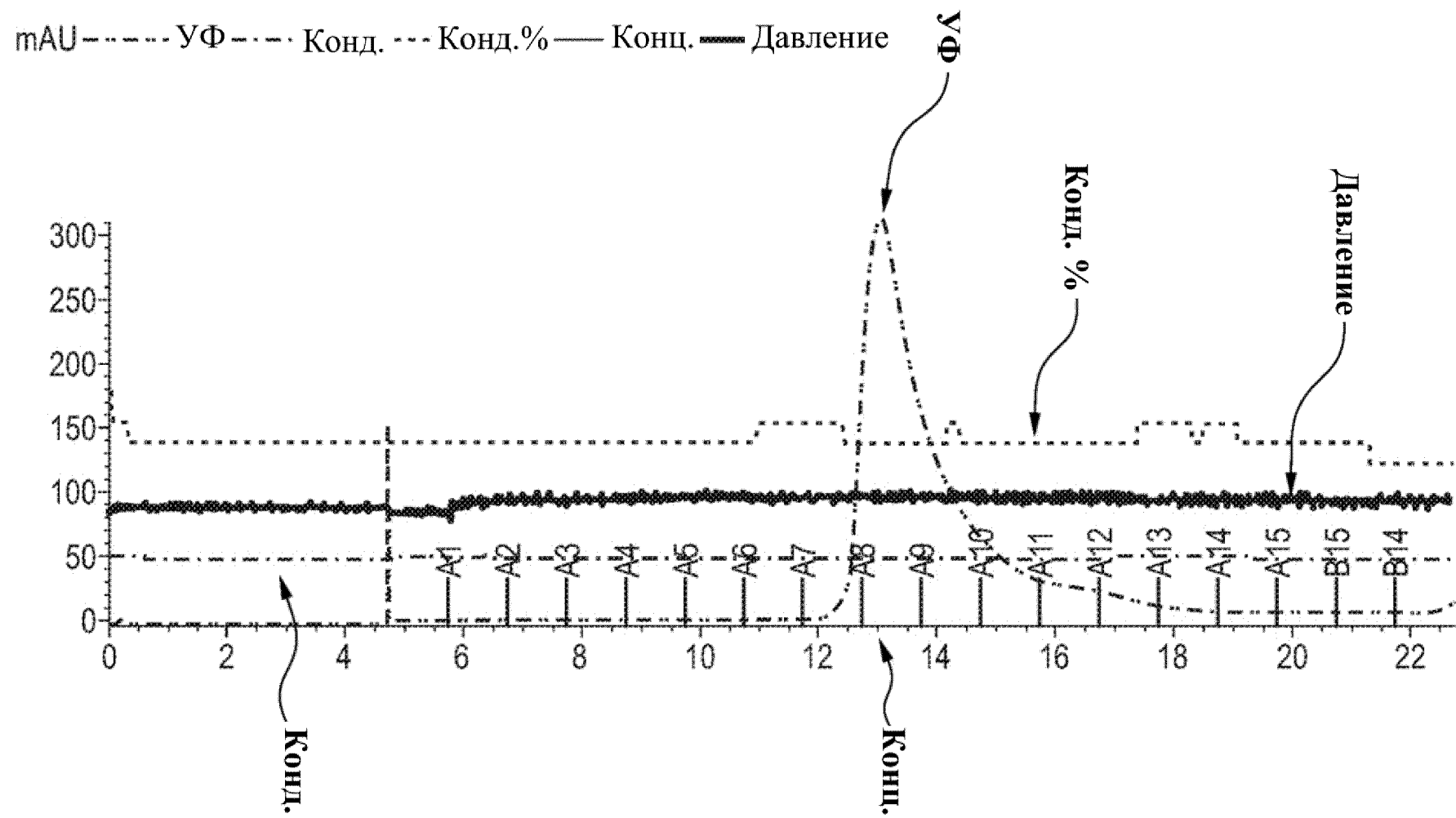
77. Набор, содержащий с экспрессионным вектором, кодирующим глутамин-синтетазу или ее биологически активный фрагмент или вариант, и дополнительное терапевтическое средство.

78. Набор по п. 77, причем дополнительное терапевтическое средство может представлять собой средство, которое является эффективным против гипераммониемии.

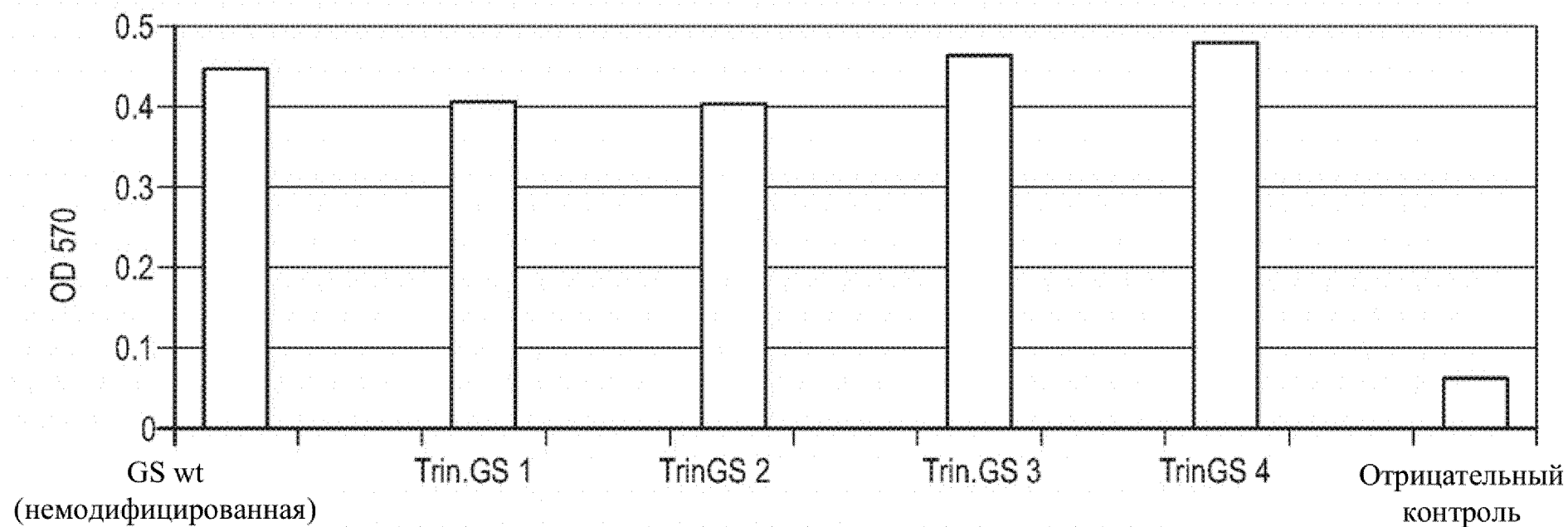
79. Набор по п. 78, причем эффективным против гипераммониемии является средство, снижающее уровень аммиака, или аминокислота или ее промежуточное соединение в цикле мочевины.

80. Продукт, содержащий экспрессионный вектор, который кодирует глутамин-синтетазу или ее биологически активный фрагмент или вариант, и дополнительное терапевтическое средство, в виде комбинированного препарата для отдельного, одновременного или последовательного применения в лечении или предупреждении гипераммониемии.

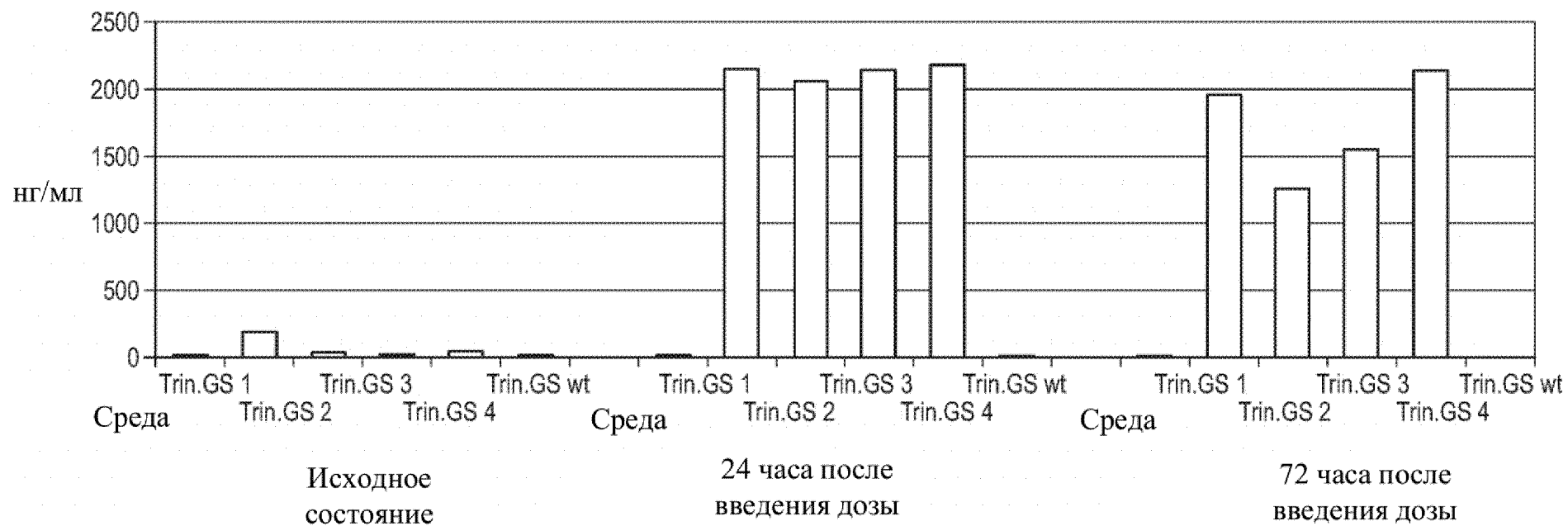
81. Продукт по п. 80, причем дополнительное терапевтическое средство является таким, как определено в п. 78 или п. 79.



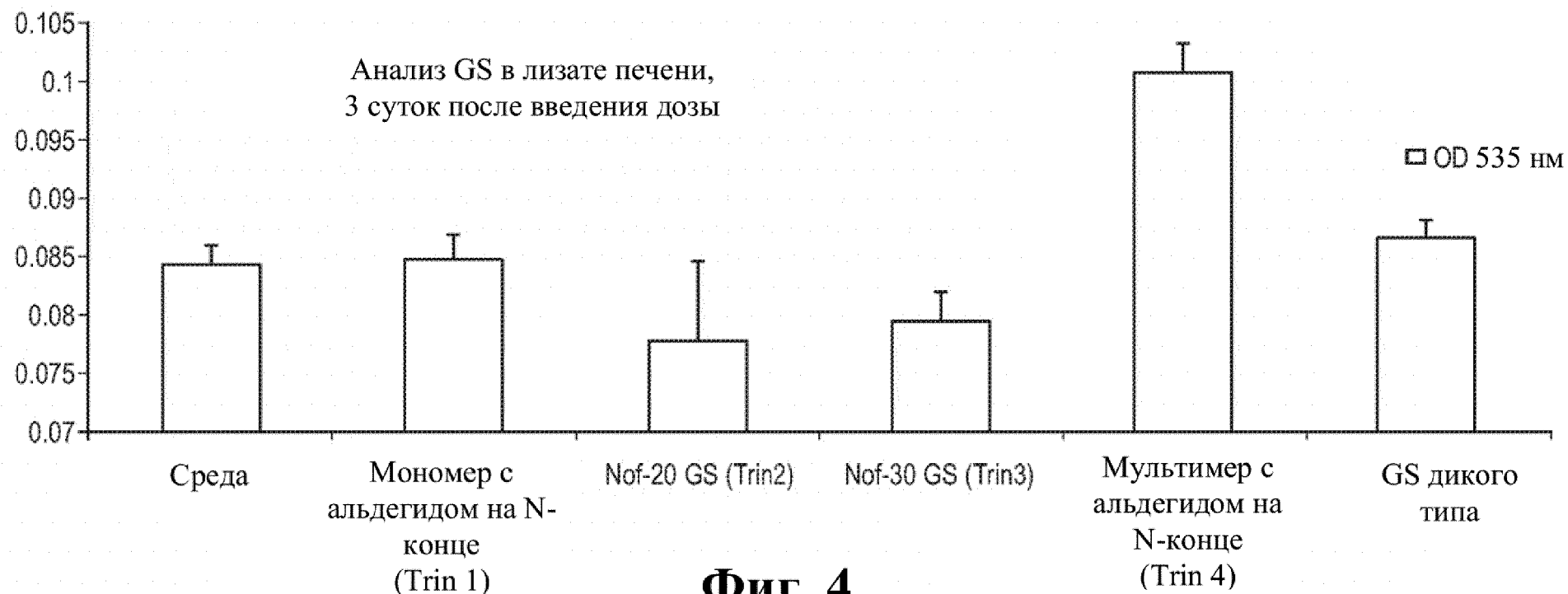
Фиг. 1

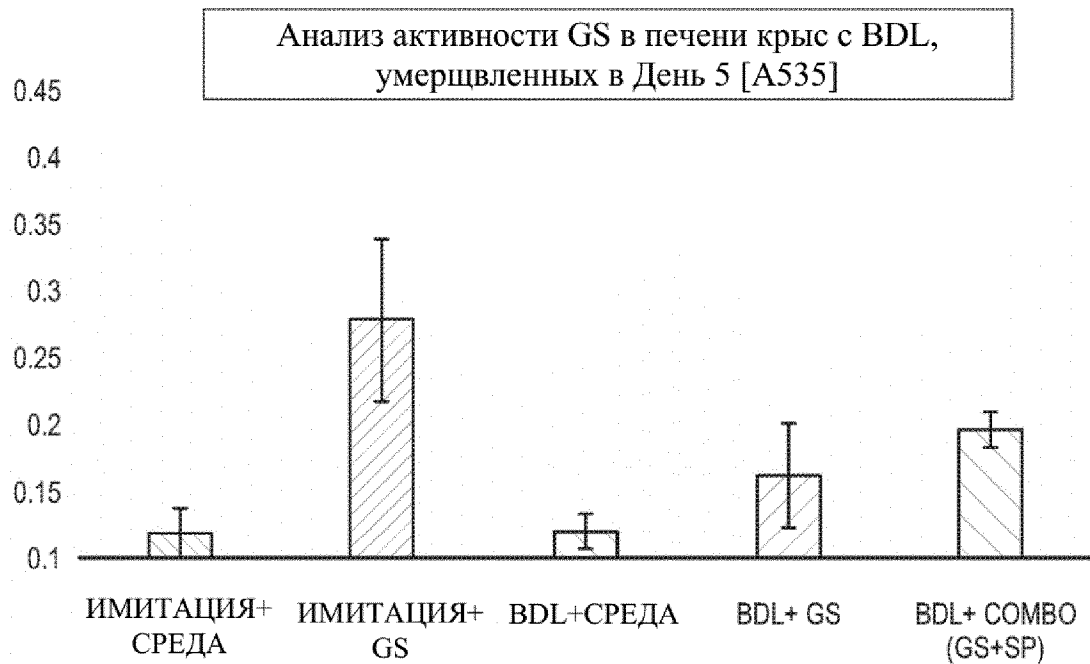


Фиг. 2

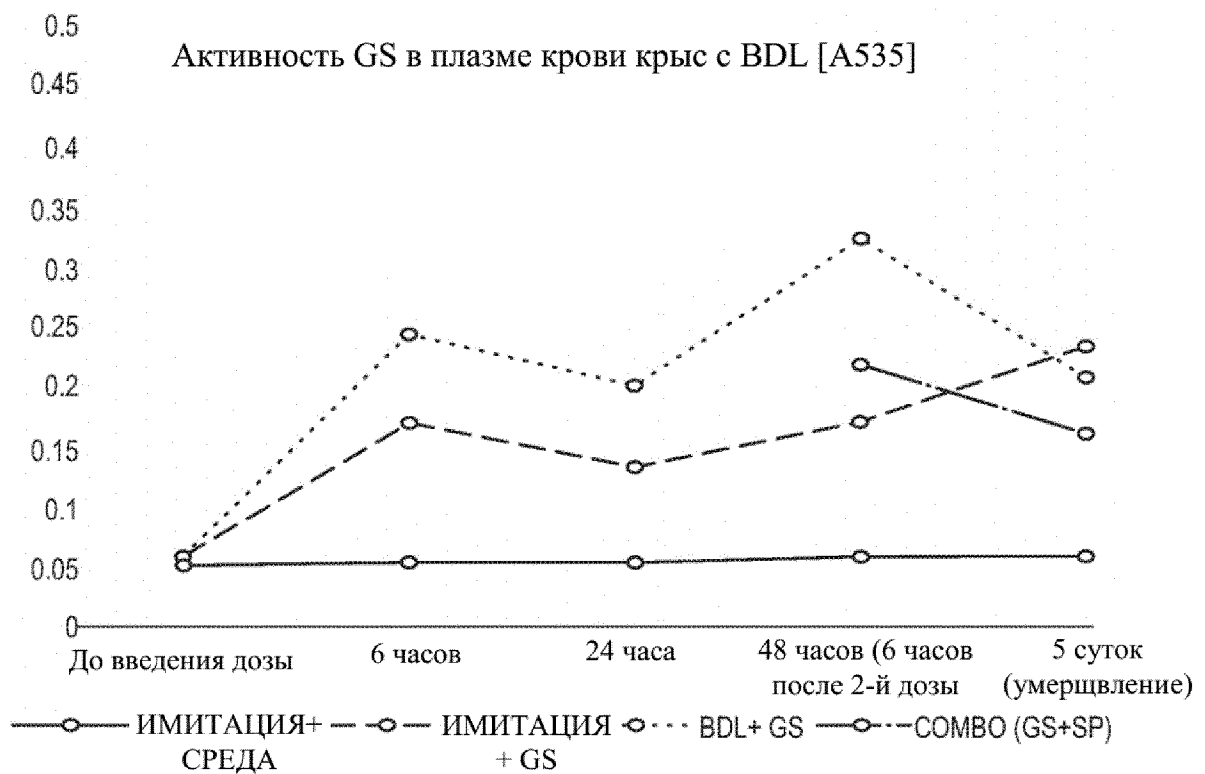


Фиг. 3

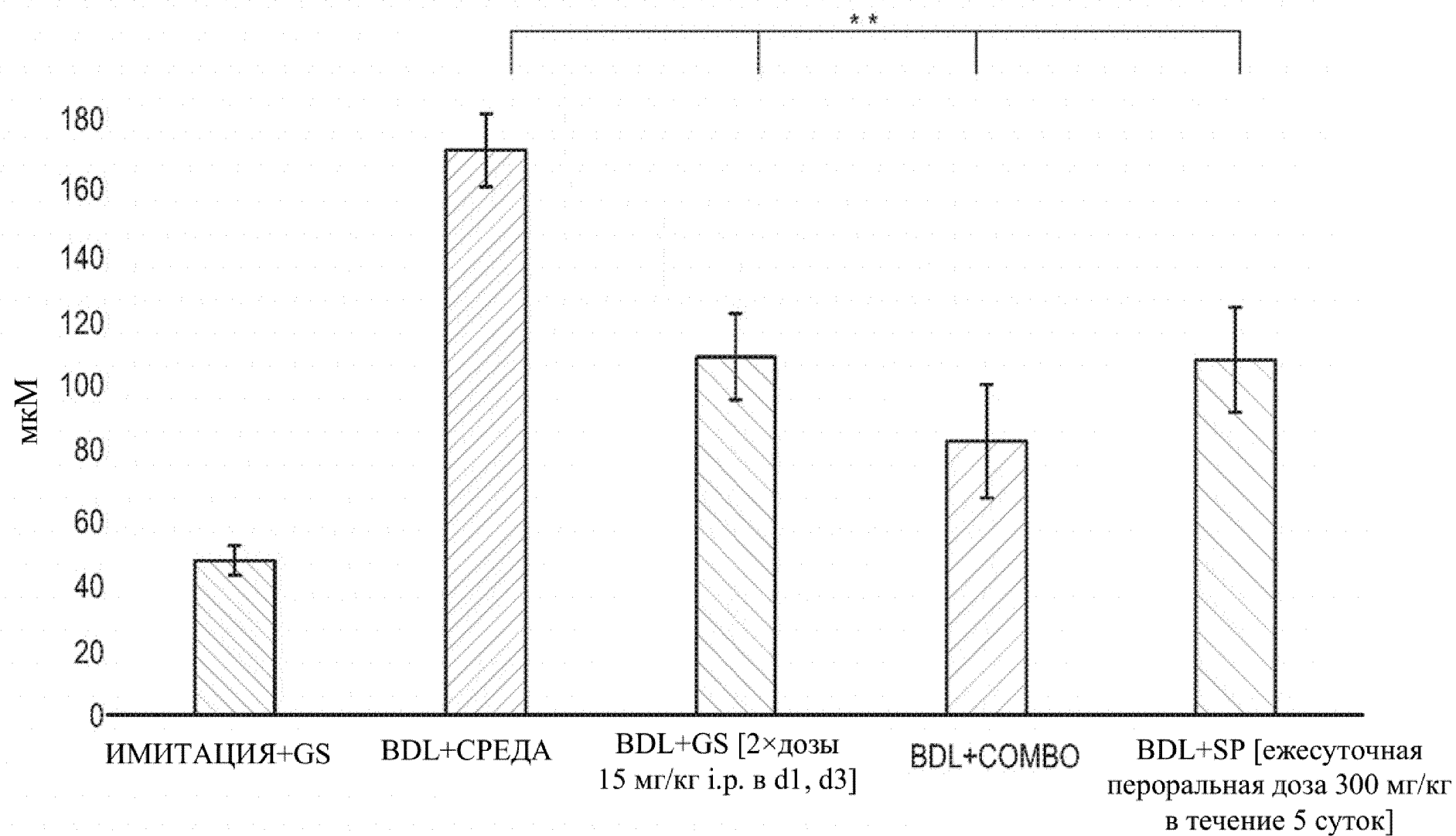




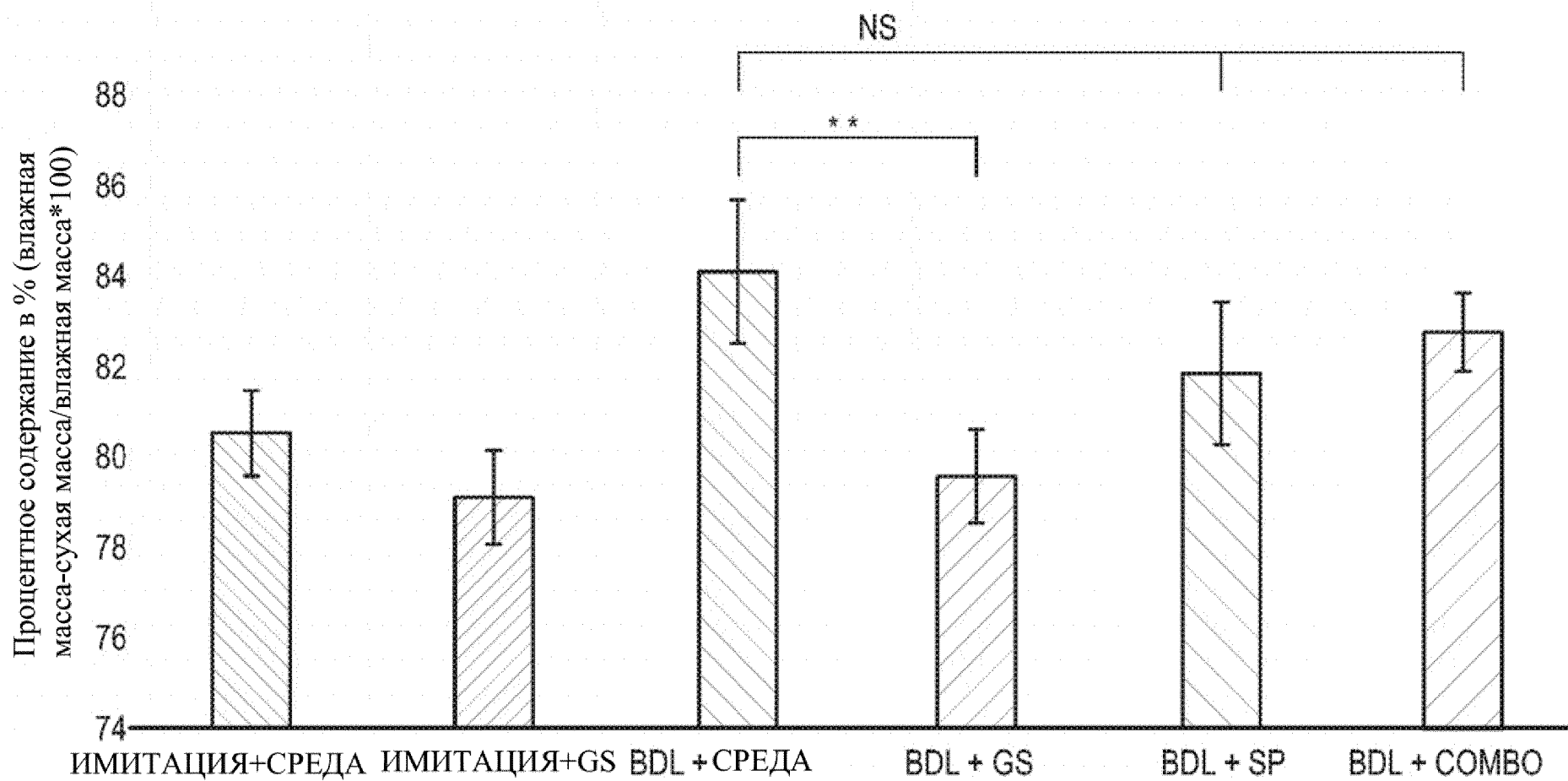
Фиг. 5А



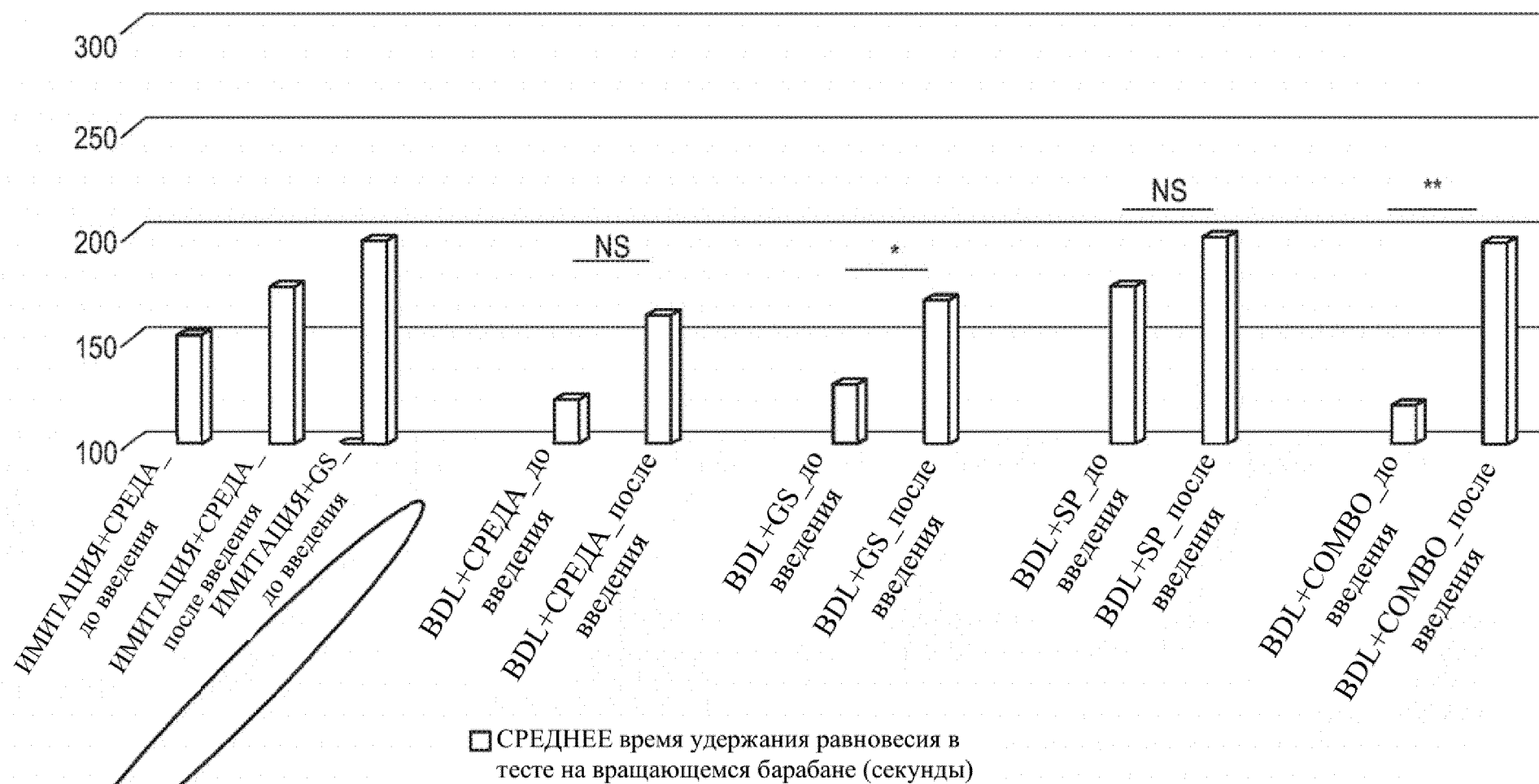
Фиг. 5В



Фиг. 6

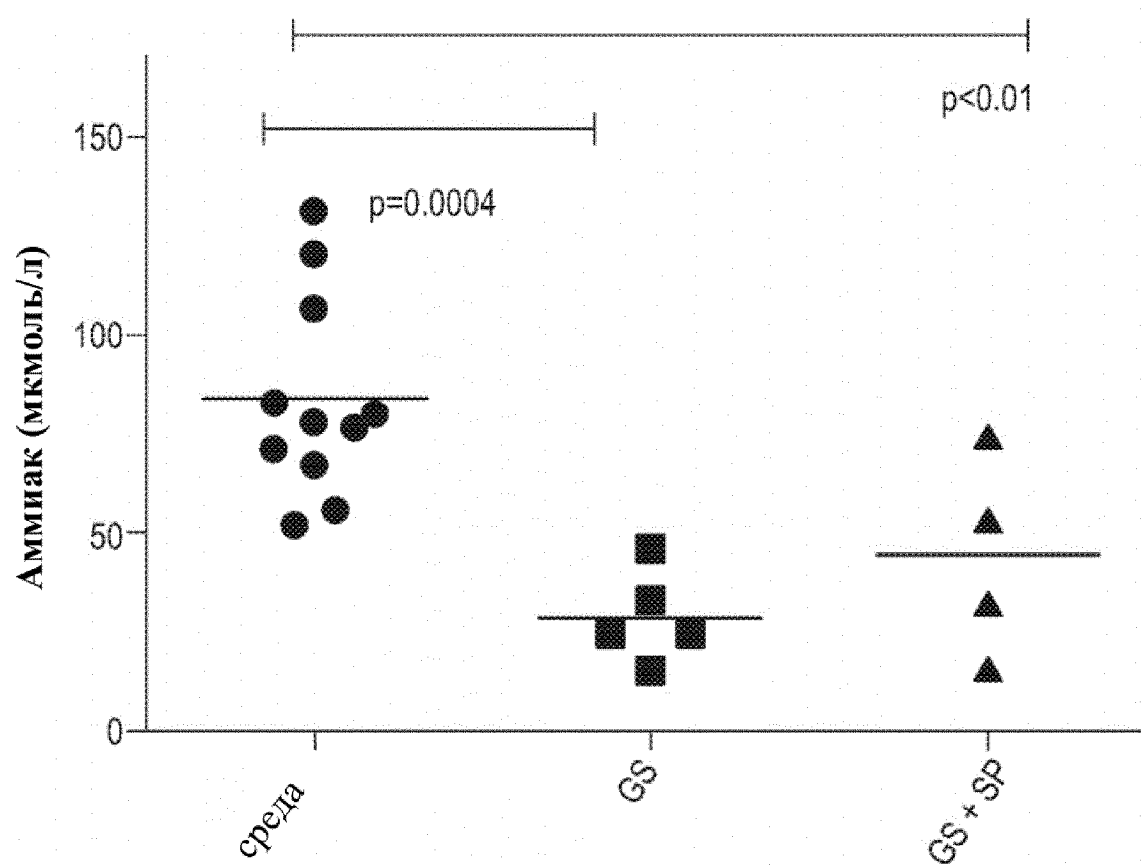


Фиг. 7

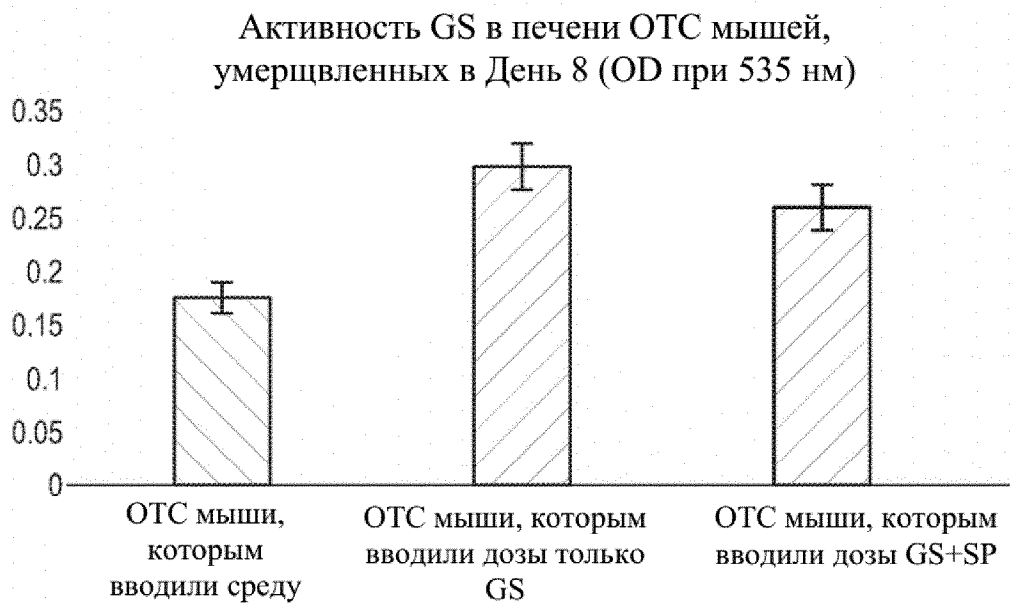
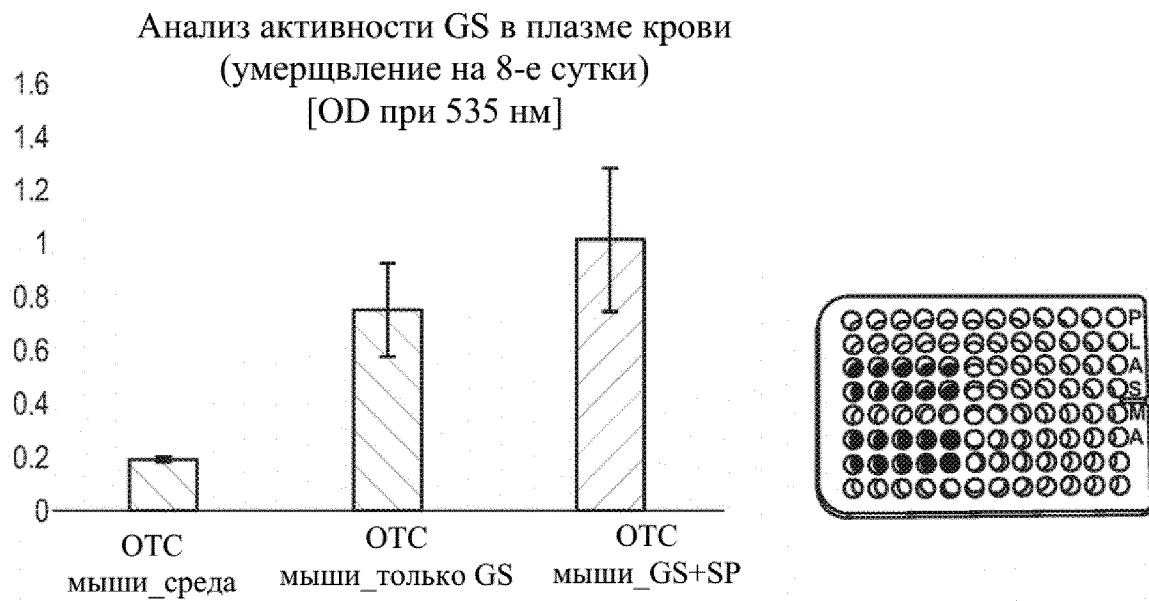


Фиг. 8

Анализ аммиака у ОТС мышей – метод
ТСА, 22.12.2017 (повторный)



Фиг. 9



Фиг. 10