SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**

ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(22) Dátum podania: 16.09.1998

(31) Číslo prioritnej prihlášky: 08/938 033, 08/935 123

(32) Dátum priority: 21.09.1997, 22.09.1997

(33) Krajina priority: US, US

(40) Dátum zverejnenia: 09.10.2000

(86) Číslo PCT: PCT/US98/18488, 16.09.1998

(21) Číslo dokumentu:

392-2000

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.[7]:

A 61K 38/21
// (A 61K 38/21
A 61K 31:70)

(71) Prihlasovateľ: SCHERING CORPORATION, Kenilworth, NJ, US;

(72) Pôvodca vynálezu: Albrecht Janice K., Winter Park, FL, US;

(74) Zástupca: Patentservis Bratislava, a. s., Bratislava, SK;

(54) Názov prihlášky vynálezu: **Použitie ribavirínu na výrobu farmaceutických prostriedkov, použitie interferónu alfa na výrobu farmaceutických prostriedkov a farmaceutické výrobky**

(57) Anotácia:
Je opísané použitie ribavirínu a interferónu alfa na výrobu farmaceutických prostriedkov na liečenie pacientov s chronickou infekciou hepatitídou C s cieľom odstrániť detegovateľnú HCV-RNA. Kombinácia ribavirínu a interferónu alfa je vhodná na liečenie pacientov s chronickou infekciou hepatitídou C, ktorá je rezistentná na liečenie interferónom alfa.

Použitie ribavirínu na výrobu farmaceutických prostriedkov, použitie interferónu alfa na výrobu farmaceutických prostriedkov a farmaceutické výrobky

Oblasť techniky

Chronická infekcia vírusom hepatitídy C je zákerná a pomaly postupujúca choroba, ktorá má významný dopad na kvalitu života. Môže nakoniec vyústiť do cirhózy pečene, dekompenzácii pečene alebo hepatocelulárneho karcinómu.

Doterajší stav techniky

Na liečenie chronickej infekcie hepatitídou C je obyčajne používaná monoterapia interferónom alfa. Avšak toto liečenie nie je vždy efektívne a niekedy má za následok neznesiteľné vedľajšie účinky úmerné dávke a času trvania liečenia. Na liečenie chronickej infekcie hepatitídou C bola navrhnutá monoterapia ribavirínom (Thomas a kol., AASLD Abstracts, Hepatology zv. 20, č.4, časť 2, str. 440, 1994). Avšak bolo zistené, že táto monoterapia bola obvykle relatívne neúčinná a mala vlastné nežiadúce vedľajšie účinky. Bola navrhnutá kombinovaná terapia interferónom alfa a ribavirínom (Lai a kol., Symposium to the 9th Biennial Scientific Meeting Asian Pacific Association for the Study of the Liver, 1994). Predbežné výsledky naznačujú, že kombinovaná terapia môže byť účinnejšia ako ktorákoľvek z obidvoch monoterapií. Hayden FG, Schlepuskin AN. Interferón – 2a, hydrochlorid rimantadínu a ribavirín spoločne inhibujú replikáciu chrípkového vírusu *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother. 1984;25:53-57.* Schvarcz R, Ando Y, S´nneborg A, Weiland O. Kombinovaná terapia chronickej hepatitídy C interferónom alfa-2b a ribavirínom pacientov, u ktorých nebola dosiahnutá trvalá odpoveď na samotný interferón : švédska skúsenosť. *J. Hepatology*, 1995;232 (dopl. 2):17-21. Brouwer JT, Nevens F, Michielsen P. a kol. Aké sú možnosti, keď hepatitída C neodpovedá na interferón ? Placebom kontrolovaný test porovnávajúci monoterapiu ribavirínom s jeho kombináciou i interferónom, urobený v multicentre v Beneluxe. *J. Hepatol.*

1994;212 (dopl. 1):S17. Abstrakt WP2/08. Chemello L, Cavalletto L, Bernardinello E a kol. Odpoveď na ribavirín, na interferón a na ich kombináciu u pacientov s chronickou hepatitídou C a jej vzťah ku genotypom HCV. *J. Hepatol.* 1994;212 (dopl. 1):S12.Abstrakt GS5/29. Nikto však nepopísal metódy, ktoré používajú interferón alfa a ribavirín a sú schopné odstrániť HCV-RNA efektívnym spôsobom s dlhodobým účinkom.

Existuje výrazná potreba nájsť spôsob liečenia chronickej infekcie hepatitídou C s kombináciou interferónu alfa a ribavirínu, ktorý je schopný odstrániť efektívne a dlhodobo HCV-RNA.

Podstata vynálezu

Z jedného hľadiska vynález poskytuje metódu použitia ribavirínu na výrobu farmaceutických prípravkov na liečenie pacientov s chronickou infekciou hepatitídou C a odstránenie detekovateľnej HCV-RNA takou metódou, ktorá pozostáva z podania účinného množstva interferónu alfa pacientovi, ktorý neodpovedal na skorší priebeh liečby interferónom alfa.

Z iného hľadiska vynález poskytuje metódu použitia interferónu alfa na výrobu farmaceutických prípravkov na liečenie pacientov s chronickou infekciou hepatitídy C a odstránenie detekovateľnej HCV-RNA takou metódou, ktorá pozostáva z podania účinného množstva interferónu alfa v spojení s účinným množstvom ribavirínu pacientovi, ktorý neodpovedal na skorší priebeh liečby interferónom alfa.

Vynález ďalej poskytuje metódu použitia ako ribavirínu tak interferónu alfa na výrobu farmaceutických prípravkov na liečenie pacientov s chronickou infekciou hepatitídou C a odstránenie detekovateľnej HCV-RNA takou metódou, ktorá pozostáva z podania účinného množstva ribavirínu v spojení s účinným množstvom interferónu alfa pacientovi, ktorý neodpovedal na skorší priebeh liečby interferónom alfa.

Farmaceutické prípravky sú obzvlášť užitočné na liečenie pacienta s chronickou hepatitídou C a odstránenie detekovateľnej HCV-RNA takou metódou, ktorá pozostáva z podania účinného množstva ribavirínu a účinného množstva interferónu alfa počas 20 až 30 týždňov tak, že najmenej 30% pacientov nemá detekovateľnú HCV-RNA na konci uvedeného 20 až 30 týždenného obdobia, taktiež

nemajú detekovateľnú HCV-RNA najmenej 24 týždňov po konci podávania uvedených liekov.

Je výhodné, keď najmenej 40% pacientov, ktorí nemajú detekovateľnú HCV-RNA na konci uvedeného 20 až 30 týždenného obdobia, taktiež nemá detekovateľnú HCV-RNA najmenej 24 týždňov po konci podávania uvedených liekov.

V inom uskutočnení môžu byť použitá na liečenie pacienta s chronickou infekciou hepatitídou C a odstránenie detekovateľnej HCV-RNA taká metóda, ktorá pozostáva z podania účinného množstva ribavirínu a účinného množstva interferónu alfa počas 40 až 50 týždňov tak, že prinajmešom 40% pacientov, ktorí nemajú detekovateľnú HCV-RNA na konci uvedeného 40 až 50 týždenného obdobia, taktiež nemá detekovateľnú HCV-RNA najmenej 24 týždňov po konci podávania uvedených liekov.

Je výhodné, keď najmenej 50% pacientov, ktorí nemajú detekovateľnú HCV-RNA na konci uvedeného 40 až 50 týždenného obdobia, taktiež nemá detekovateľnú HCV-RNA najmenej 24 týždňov po konci podávania uvedených liekov.

V inom uskutočnení môžu byť použitá na liečenie pacienta s chronickou infekciou hepatitídou C a odstránenie detekovateľnej HCV-RNA taká metóda, ktorá pozostáva z podania účinného množstva ribavirínu a účinného množstva interferónu alfa počas 60 až 80 týždňov tak, že najmenej 50% pacientov, ktorí nemajú detekovateľnú HCV-RNA na konci uvedeného 60 až 80 týždenného obdobia, taktiež nemá detekovateľnú HCV-RNA najmenej 24 týždňov po konci podávania uvedených liekov.

Je výhodné, keď najmenej 60% pacientov, ktorí nemajú detekovateľnú HCV-RNA na konci uvedeného 60 až 80 týždenného obdobia, taktiež nemá detekovateľnú HCV-RNA najmenej 24 týždňov po konci podávania uvedených liekov.

V inom uskutočnení môžu byť použitá na liečenie pacienta s chronickou infekciou hepatitídou C, ktorej genotyp sa líši od typu 1 a ktorý má vírusové zaťaženie menšie ako alebo rovné 2 miliónom kópií na mililiter séra, merané kvantitatívnou HCV-RNA PCR, a odstránenie detekovateľnej HCV-RNA taká metóda, ktorá pozostáva z podania účinného množstva ribavirínu a účinného množstva interferónu alfa počas 20 až 30 týždňov tak, že najmenej 60% pacientov, ktorí nemajú detekovateľnú HCV-RNA najmenej 24 týždňov po konci podávania uvedených liekov. Je výhodné, keď najmenej 80% pacientov, ktorí nemajú detekovateľnú HCV-RNA na konci uvedeného 20 až 30 týždenného obdobia, taktiež

nemá detekovateľnú HCV-RNA najmenej 24 týždňov po konci podávania uvedených liekov.

V inom uskutočnení môžu byť použitá na liečenie pacienta s chronickou infekciou hepatitídou C, ktorej genotyp sa líši od typu 1 a ktorý má vírusové zaťaženie väčší ako 2 milióny kópií, merané HCV-RNA/qPCR, a odstránenie detekovateľnej HCV-RNA taká metóda, ktorá pozostáva z podania účinného množstva ribavirínu a účinného množstva interferónu alfa počas 20 až 30 týždňov tak, že najmenej 50 % pacientov, ktorí nemajú detekovateľnú HCV-RNA na konci uvedeného 20 až 30 týždenného obdobia, taktiež nemá detekovateľnú HCV-RNA najmenej 24 týždňov po konci podávania uvedených liekov. Je výhodné, keď najmenej 60% pacientov, ktorí nemajú detekovateľnú HCV-RNA na konci uvedeného 20 až 30 týždenného obdobia, taktiež nemá detekovateľnú HCV-RNA najmenej 24 týždňov po konci podávania uvedených liekov.

V inom uskutočnení môžu byť použitá na liečenie pacienta s chronickou infekciou hepatitídou C genotypu 1 a ktorý má vírusové zaťaženie menšie alebo rovné 2 miliónom kópií, merané HCV-RNA/qPCR, a odstránenie detekovateľnej HCV-RNA taká metóda, ktorá pozostáva z podania účinného množstva ribavirínu a účinného množstva interferónu alfa počas 20 až 30 týždňov tak, že najmenej 30% pacientov, ktorí nemajú detekovateľnú HCV-RNA na konci uvedeného 20 až 30 týždenného obdobia, taktiež nemá detekovateľnú HCV-RNA najmenej 24 týždňov po konci podávania uvedených liekov. Je výhodné, keď najmenej 40% pacientov, ktorí nemajú detekovateľnú HCV-RNA na konci uvedeného 20 až 30 týždenného obdobia, taktiež nemá detekovateľnú HCV-RNA najmenej 24 týždňov po konci podávania uvedených liekov.

V inom uskutočnení môžu byť použitá na liečenie pacienta s chronickou infekciou hepatitídou C genotypu 1 a ktorý má vírusové zaťaženie väčšie ako 2 milióny kópií, merané HCV-RNA/qPCR, a odstránenie detekovateľnej HCV-RNA taká metóda, ktorá pozostáva z podania účinného množstva ribavirínu a účinného množstva interferónu alfa počas 20 až 30 týždňov tak, že najmenej 15% pacientov, ktorí nemajú detekovateľnú HCV-RNA na konci uvedeného 20 až 30 týždenného obdobia, taktiež nemá detekovateľnú HCV-RNA najmenej 24 týždňov po konci podávania uvedených liekov. Je výhodné, keď najmenej 20% pacientov, ktorí nemajú detekovateľnú HCV-RNA na konci uvedeného 20 až 30 týždenného obdobia, taktiež

nemá detekovateľnú HCV-RNA najmenej 24 týždňov po konci podávania uvedených liekov.

Je výhodné, keď množstvo podávaného ribavirínu je v rozmedzí od 400 až 1200 mg za deň. Ešte výhodnejšie je, keď množstvo podávaného ribavirínu je v rozmedzí od 800 až 1200 mg za deň.

Je výhodné, keď podávaný interferón-alfa je vybraný zo skupiny interferón alfa-2a, interferón alfa-2b, konsenzuálny interferón-alfa, čistený produkt interferónu alfa alebo pegylovaný („pegylated") interferón alfa. Ešte výhodnejšie je, keď podávaný interferón-alfa je vybraný zo skupiny interferón alfa-2a, interferón alfa-2b alebo čistený produkt interferónu alfa a množstvo podaného interferónu-alfa je od 2 do 10 miliónov IU za týždeň, podávané týždenne, TIW, QOD alebo denne. Vo výhodnom uskutočnení je podávaným interferónom-alfa interferón alfa-2b a množstvo podaného interferónu-alfa je 3 milióny IU TIW.

Inou možnosťou je, že podávaným interferónom-alfa je konsenzuálny interferón a množstvo podaného interferónu-alfa je od 1 do 20 μg za týždeň, podávané týždenne, TIW, QOD alebo denne. V inom uskutočnení je podávaným interferónom-alfa pegylovaný („pegylated") interferón alfa-2b a množstvo podaného interferónu-alfa je od 0,5 do 2,0 μg/kg za týždeň, podávané týždenne, TIW, QOD alebo denne. Inou možnosťou uje, že podávaný interferón-alfa je pegylovaný („pegylated") interferón alfa-2a a množstvo podaného interferónu-alfa je od 20 do 250 μg/kg za týždeň, podávané týždenne, TIW, QOD alebo denne.

V rámci predloženého vynálezu bolo prekvapivo zistené, že v porovnaní s liečením samotným interferónom-alfa alebo samotným ribavirínom, liečba pomocou kombinácie liečebnej účinnej dávky ribavirínu a liečebnej dávky interferónu-alfa počas najmenej 20 až 30 týždňov má za následok 10 krát viac pacientov, u ktorých nie je detekovateľná HCV-RNA v ich sére najmenej 24 týždňov po konci liečenia, v porovnaní s akoukoľvek z obidvoch monoterapií.

Detailný popis

Termín „interferón-alfa" je tu použitý na označenie skupiny vysoko homologických, druhovo špecifických proteínov, ktoré inhibujú vírusovú replikáciu, množenie buniek a upravujú imunitnú odpoveď. Typickými vhodnými interferónmi-alfa sú okrem iného rekombinatný interferón alfa-2b, ako je interferón Intron-A, ktorý je

možné získať od Schering Corporation, Kenilworth, N.J., rekombinantný interferón alfa-2a, ako je interferón Roferon, ktorý je možno získať od Hoffmann-La Roche, Nutley, N.J., rekombinantný interferón alfa-2C, ako je interferón Berofor alfa 2, ktorý je možné získať od Boehringer Ingelheim Pharmaceutical, Inc., Ridgefield, CT., interferón alfa-n1, čistená zmes prirodzených alfa interferónov, ako je Sumiferon, ktorý je možné získať od Sumitomo, Japonsko, alebo ako je Wellferon interferón alfa-n1 (INS), ktorý je možné získať od Glaxo-Wellcome Ltd., Londýn, Veľká Británia alebo konsenzuálny interferón alfa, ako je popísané v U.S. patentoch č. 4 897 471 a 4 695 623 (obzvlášť ich príklady 7, 8 a 9) a špecifický produkt, ktorý je možné získať od Amgen, Inc., Newbury Park, CA, alebo interferón alfa-n3, zmes prirodzených alfa interferónov alfa, vyrábaných v Interferon Sciences a ktorý je možné získať od Purdue Frederick Co., Norwalk, CT., pod obchodným menom Alferon. Dáva sa prednosť používaniu interferónov alfa-2a alebo alfa-2b. Pretože interferón alfa 2b má zo všetkých interferónov vo svete najširší súhlas na použitie chronickej infekcie hepatitídou C, dáva sa mu najväčšia prednosť. Príprava interferónu alfa 2b je popísaná v U.S. patente č. 4 530 901.

Ribavirín, 1- -D-ribofuranozyl-1H-1,2,4-triazol-3-karboxamid, ktorý je možné získať od ICN Pharmaceuticals, Inc., Costa Mesa, Kalifornia, je popísaný v deviatom vydaní firmy Merck ako zlúčenina č. 8199. Jeho výroba a príprava je popísaná v U.S. patente č. 4 211 771.

Termínom „neodpovedal na predchádzajúci priebeh liečby" je tu mienené, že pacient buď naprosto neodpovedal na predchádzajúci priebeh liečby (v odbore všeobecne označované ako „osoba nereagujúca") alebo že pacient síce odpovedal na prechádzajúci priebeh liečby, ale následne sa dostavila recidíva (v odbore všeobecne označované ako „osoba, u ktorej reakcia nebola trvalá").

Termínom „obtiažne liečiteľný pacient" sa myslí pacient, ktorý bol skôr klasifikovaný ako osoba, ktorá neľahko odpovedá na liečbu; napríklad pretože má vysokú vírusovú záťaž, alebo preto, že jeho infekcia HCV má genotyp, ktorého liečba je obtiažna, ako je typ 1, napríklad typ 1b. Ďalšie podrobnosti, týkajúce sa klasifikácie HCV na jednotlivé genotypy, pozri napríklad „Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region", Simmonds, P. a kol., Gen. Virol., (1993), 74, 2391-2399 a „A Proposed System for the Nomenclature of Hepatitis C Viral Genotypes", Simmonds, P. a kol., Hepatology, 19(5)(1994), 1321-1323.

Osoba trpiaca chronickou infekciou hepatitídou C môže vykazovať jeden alebo viac nasledujúcich známok alebo príznakov :

(a) zvýšenú ALT,

(b) pozitívny test na anti-HCV protilátky,

(c) prítomnosť HCV, preukázanú pozitívnym testom na HCV-RNA,

(d) klinické znaky chronickej choroby pečene,

(e) hepatocelulárne poškodenie.

Pri praktickom vykonaní vynálezu sú interferón alfa (tu α-INF) a ribavirín podávané pacientovi, ktorý vykazuje jeden alebo viacej z vyššie uvedených známok alebo príznakov, v množstvách postačujúcich na elimináciu alebo aspoň zmiernenie jednej alebo viacerých z vyššie uvedených známok alebo príznakov. Vo výhodnom uskutočnení je kombinovaná terapia podľa vynálezu uplatňovaná u pacienta, ktorý sa po monoterapii interferónom alfa nezbavil detekovateľnej HCV-RNA.

Ribavirín je podávaný pacientovi spolu s α-IFN, tj. dávka α-IFN je podávaná v tom istom čase, keď pacient dostáva dávky ribavirínu. Väčšina prípravkov, obsahujúcich α-IFN nie je účinná pri orálnom podávaní, z toho dôvodu sa dáva prednosť parenterálnemu podávaniu α-IFN, výhodne subkutánne, IV a IM injekcie. Ribavirín môže byť podávaný orálne vo forme kapsúl alebo tabliet v spojení s parenterálnym podávaním α-IFN. Počíta sa aj s inými typmi podávania obidvoch liečív, pokiaľ sa stanú dostupné, ako sú napríklad nosný sprej, transdermálne, pomocou čipiek, pomocou spôsobu priebežného uvoľňovania dávky lieku atď. Akákoľvek forma podávania bude účinná tak dlho, pokiaľ budú podávané vhodné dávky bez toho, že by došlo k zničeniu aktívnych zložiek.

Detekovateľná HCV-RNA v rámci predkladaného vynálezu znamená, že v 1 ml pacientovho séra je prítomné menej ako 100 ich kópií, merané metódou kvantitatívnej PCR pomocou reverznej transkriptázy. HCV-RNA je v predkladanom vynáleze prednostne meraná postupom, ktorý je popísaný nižšie. Tento postup je tu označovaný ako HCV-RNA/qPCR.

RNA je zo séra pacienta extrahovaná pomocou zmesi guanidium izotiokyanát-fenol-chloroform a potom zrazená pomocou etanolu v prítomnosti octanu amonného. Vyzrážaná RNA je centrifugovaná a výsledný sediment sušený v zariadení Centrivap (Labconco, Kansas City, Mo.). Suchý sediment je resuspendovaný v 30 µl zmesi Rnasinu (Promega Corp., Madison, WI), ditiotreitolu a vody ošetrenej

dietylpyrokarbonátom. Vzorky boli uložené pri teplote –20 °C alebo nižšej až do urobenia rezervnej transkripcie RNA (RT) a PCR.

Aby bola v RT reakcii celá RNA sekvencia prevedená do cDNA, sú na syntézu prvého cDNA reťazca ako primery použité náhodné hexadeoxyribonukleotidy (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). Z resuspendovanej vzorky boli dva odbery s objemom 3µl náhodných primerov s koncentráciou 100 ng/l, denaturované pri 70 °C, potom reverzne transkribované pri 40 °C počas 1 hodiny pomocou reverznej transkriptázy M-MLV (USB, Cleveland, OH) v štandardnom pufri, ktorý obsahoval 5 mM $MgCl_2$. Konečný reakčný objem RT je 26 l. PCR je začatá bezprostredne po reverznej transkripcii.

Pozmenená verzia PCR metódy pre amplikáciu cDNA sa robí pomocou tepelne stabilnej Taq polymerázy. 75 µl PCR je pridané k celému reakčnému objemu RT (26 l) do celkovej konečnej koncentrácie $MgCl_2$ 1,5 mM v celkovom objeme 101 l. Každá 101 l vzorka je potom rozdelená na 50,5 l a na povrch je umiestnená vrstva minerálneho oleja, aby sa zabránilo vyparovaniu.

Cyklus PCR sa skladá z teplotnej hybridizácie počas 90 sekúnd pri 55 °C, predlžovacej fázy počas 90 sekúnd pri 74 °C a denaturačná fáza počas 90 sekúnd pri 94 °C. V termocyklovaných vzorkách prebehne záverečná predlžovacia fáza počas 7 minút pri teplote 74 °C. Sú použité štyri rôzne súbory cyklov. Nanesením vzoriek v dvojakom uskutočnení a rozdelením týchto vzoriek po RT, sú z každej vzorky získané štyri skúmavky. Každá z týchto štyroch skúmaviek prekonala iný počet cyklov, čo zvyšuje citlivosť a presnosť v kvantifikačnom procese. Účinnosť termocyklovania bude hodnotená podľa uspokojivej amplikácie známeho počtu kópií štandardnej RNA, ktorá je obsiahnutá v každom súbore 60 skúmaviek. Pre amplifikáciu sú použité dva súbory primerov, obidva z 5´- neprekladanej oblasti genómu HCV. Obidva tieto dva súbory primerov sú vysoko konzervatívne a detekujú všetky známe subtypy HCV. Súbor primérov č.1: proti smeru expresie 5´-GTG GTC TGC GGA ACC GGT GAG T-3´, v smere expresie 5´- TGC ACG GTC TAC GAG ACC TC-3´, ktorý tvorí produkt dlhý 190 párov bázy. Súbor primerov č.2: proti smeru expresie 5´-CTG TGA GGA ACT ACT GTC TTC-3´, v smere expresie 5´-CCC TAT CAG GCA GTA CCA CAA-3´, ktorý tvorí produkt dlhý 256 párov bázy.

S amplifikovanou cDNA je potom urobená elektroforéza v 3% agarózovom géli a je prenesená na nylonovú membránu. Cieľová DNA je detekovaná pomocou

metódy Southern blotting a imunologickým farbením pomocou nerádioaktívnej DNA sondy, označenej digoxigenínom. Tieto postupy sú robené pomocou automatických prístrojov pre PCR termacyklovanie, agarózovou gélovou elektroforézou, vákuový prenos pre Southern blot, hybridizácia a imunologické farbenie. Každá membrána obsahuje známy počet kópií sériovo riedených štandardov, ktoré sú použité pri konštrukcii kriviek na kvantitatívne meranie zón vzoriek. Pôvodné štandardné krivky sú vytvorené zo starostlivo riadených HCV-RNA z transkribovaných klonov. U transkriptov sú urobené štúdie inkorporácie rádioaktivity, elektroforéza v géli a meranie OD 260, aby sa určilo, či majú očakávanú dĺžku. Po produkcii RNA transkriptov kvantifikovaných štandardných klonov sú vytvorené „zmesné" štandardy, ktoré lepšie reprezentujú heterogénnu podstatu HCV, ktorú je možné v prípade prirodzenej infekcie očakávať. Tieto zmesi sú utvorené spojením všetkých množstiev séra alebo plazmy zo známych infikovaných jedincov. Zmesi séra alebo plazmy sú pomocou PCR kalibrované a to proti transkriptom z klonov a potom sú zriedené v tekutine, o ktorej je známe, že je v PCR negatívna. Na záver sú tieto zmesné vzorky, ktoré majú vysoký počet kópií, kontrolované súpravou cDNA Quantiplex nucleic acid detection system od Chiron Inc. (Emeryville, CA). Tieto „dvojité kvantifikované" zmesi boli rozdelené na alikvoty a uložebé pri –70 °C. V každom pokuse sú použité riedenia 5 000 000, 1 000 000, 500 000, 100 000, 10 000 a 1000 kópií/ml.

Každá membrána pre Southern blot je naskenovaná do počítača pomocou automatického skenera spojeného s denzitometrom v intervaloch počas vyvíjania, aby bolo možné určiť, kedy je štandardná krivka najviac lineárna. Výsledné elektronické obrázky sú potom merané a zisťované oblasti zón a priemerná hustota zón. Všetky odpočítané hodnoty sú štandardizované k integrovanej hustote zón a porovnané so štandardnou krivkou, aby sa získala číselná hodnota počtu vírusových kópií v každej zóne.

Boli urobené nasledujúce klinické protokoly :

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad 1 :

Všeobecne usporiadanie a plán štúdie

Tento pokus bol prospektívny, urobený v mnohých centrách, náhodný, dvojitý slepý a s paralelnými skupinami. Štúdia porovnávala liečbu kombinácií INTRON® A plus ribavirín s liečbou kombináciou INTRON® A plus placebo počas 24 mesiacov u pacientov s kompenzovanou chronickou infekciou hepatitídy C, ktorí odpovedali na predchádzajúcu liečbu jedným alebo dvoma cyklami interferónu alfa (INTRON® A, Roferon®-A alebo Wellferon®)(minimálne 3 MU až maximálne 6 MU QOD alebo TIW počas minimálne 20 týždňov až maximálne 18 mesiacov) a u ktorých sa dostavila recidíva po poslednom cykle liečby interferónom alfa. Vhodní pacienti mali chronickú hepatitídu C potvrdenú sérom pozitívnym na HCV-RNA, pečeňovou biopsiou a laboratórnymi testami.

Pacienti boli náhodne rozdelení na skupiny liečené kombináciou INTRON® A plus ribavirín a kombináciou INTRON® A plus placebo. Dávka INTRON® A bola 3 MU SC TIW; dávka ribavirínu 1000 alebo 1200 mg PO denne (v závislosti od hmotnosti) bola rozdelená do dvoch dávok. Určenie liečebných skupín bolo urobené v rovnakých pomeroch v Centre pre náhodné rozdelenie. Postup náhodného rozdelenia vzoriek bol navrhnutý tak, aby sa v liečebných skupinách udržala rovnováha s ohľadom na prítomnosť alebo neprítomnosť cirhózy v pečeňových biopsiách, odobraných pred liečbou, hladina zistenú HCV-RNA/qPCR a genotyp HCV.

Študovaný spôsob liečenia bol robený počas 24 týždňov. Celkový čas štúdie bol 48 týždňov, aby boli zistené dlhodobé účinky liečby.

Počas liečby a času po ňom nasledujúcim bola robená biochemická (ALT), virologická (HCV-RNA) a histologická (pečeňová biopsia) skúmania, aby bolo možné zhodnotiť podstatu a trvanie odpovedi na študované liečby. Prvotne sledovaná premenná, týkajúca sa účinnosti, bola všeobecná odpoveď, definovaná skrátka HCV-RNA/qPCR v sére (<100 kópií/ml) nameraná 24 týždňov po konci liečby, spojená so zlepšením stavu pečeňovej biopsie odobratej po konci liečby a meranej pomocou Knodellovho histologického indexu aktivity (HAI). Ako druhotná premenná, týkajúca sa účinnosti, bola zisťovaná normalizácia ALT. Bezpečnosť študovaných liečení bola hodnotená sledovaním vybraných laboratórnych parametrov a taktiež zaznamenávaním a zhodnotením objavenia sa akejkoľvek nepriaznivej udalosti.

Liečebné režimy

Študované liečebné režimy boli buď :

- INTRON® A 3 MU SC TIW plus ribavirín 1000 alebo 1200 mg/deň PO rozdelený do dvoch dávok počas 24 týždňov ; alebo
- INTRON® A 3 MU SC TIW plus placebo namiesto ribavirínu rozdeleného do dvoch dávok počas 24 týždňov.

Študované liečebné režimy boli aplikované počas 24 týždňov. Štandardný INTRON® A (interferón alfa-2b, rekombinantný) režim pre hepatitídu C bol podávaný v stabilnej dávke 3 MU TIW. Každý pacient dostal návody týkajúce sa prípravy a subkutánneho podávania INTRON® A. Ribavirín bol podávaný dvakrát denne, ráno a večer. Dávka bola určovaná podľa hmotnosti pacienta pri vstupnej prehliadke. Pacienti s hmotnosťou = 75 kg dostali 1000 mg denne ako dve 200 mg kapsule ráno a tri 200 mg kapsule večer. Pacienti s hmotnosťou > 75 kg dostali 1200 mg denne ako tri 200 mg kapsule ráno a večer.

Náhodné rozdelenie pacientov na skupiny bolo navrhnuté tak, aby skupiny boli v rovnováhe s ohľadom na nasledujúce charakteristiky :

A. histológia pečene pred liečbou (cirhóza alebo bez cirhózy),
B. stav HCV-RNA/qPCR v sére (HCV-RNA/qPCR 2 000 000 alebo HCV-RNA/qPCR > 2 000 000 kópií/ml); a
C. HCV genotyp (1 alebo iný). Pacienti so zmiešanými genotypmi (pokiaľ obsahujú typ 1) budú na ciele rovnováhy medzi skupinami klasifikovaní ako typ 1.

Účinnosť

Prvotné z hľadiska účinnosti bolo porovnanie dvoch liečených skupín s ohľadom na všeobecný rozsah odpovede, definované ako pokles HCV-RNA/qPCR v sére v období 24 týždňov po konci liečby na nedetekovateľnú úroveň alebo úroveň < 100 kópií/ml, spoločne so zlepšením stavu pečeňových biopsií v období po konci liečby, ako je definované zápalovým indexom HAI podľa Knodella. Taktiež boli skúmané druhotné známky účinnosti :

Druhotné známky účinnosti na konci testu :

D. podiely pacientov s normalizovanou ALT po 24 týždňoch sledovania ;
E. podiely pacientov so zlepšením stavu biopsií (spojené hodnoty kategórií I + II + III);

F. odchýlky od základnej hodnoty indexov biopsií (spojené hodnoty kategórií I + II + III);

G. rozsahy odpovedí na konci liečenia, založené na HCV-RNA/qPCR;

H. podiel pacientov s normalizovanou ALT na konci liečenia;

I. rozsahy odpovedí po 24 týždňoch sledovania, založené na HCV-RNA/qPCR.

Virológia : Vstupný stav a jeho zmeny

Testovanie séra metódou HCV-RNA/qPCR bolo urobené v centrálnom laboratóriu. Bol požadovaný pozitívny výsledok HCR-RNA testu; pre účasť boli vhodné iba pacienti pozitívni na HCV-RNA. Opakované testy boli naplánované na týždne 4, 12, 24 a na týždne 12 a 24 po skončení liečby.

Odpoveď bola hodnotená tak, ako je definované nižšie :

Osoba reagujúca : Pacient bol klasifikovaný ako osoba reagujúca v danom časovom intervale, pkiaľ HCV-RNA/qPCR bola v tomto čase negatívna (<100 kópií/ml).

Osoba, v ktorej je reakcia trvalá : Pacient bol klasifikovaný ako osoba, v ktorej je reakcia trvalá. pokiaľ bol pacient osoba reagujúca v dobe 24 týždne po skončení liečby.

Všimnite si, že pacienti, ktorí neodpovedali týmto kritériám, vrátane pacientov, ktorí prerušili účasť skôr ako bolo získané požadované hodnotenie HCV-RNA/qPCR, boli klasifikovaní ako osoba nereagujúca.

Osoba celkovo odpovedajúca : Založené ako na teste HCV-RNA/qPCR v sére, tak na zmene histológie pečene, hodnotené zápalovým indexom HAI podľa Knodella. Pacient bol klasifikovaný ako osoba celkovo odpovedajúca na liečenie, pokiaľ on/ona boli osoba, v ktorej je reakcia trvalá a súčasne jeho/jej zápalový index HAI podľa Knodella (súčet kategórií I + II + III) sa v období nasledujúcom po liečbe zlepšil o 2 alebo viacej jednotiek vzhľadom k hodnote zistenej pred liečením.

Histológia pečene

Pečeňové biopsie boli získané v priebehu šiestich mesiacov pred zaradením pacienta do pokusu a v 24. týždni, nasledujúcom po skončení liečby. Hodnotenie biopsií bolo urobené jedným patológom pomocou klasifikácie histologickej aktivity podľa Knodella. Patológovi nebola známa pacientova totožnosť, liečebná skupina a čas odberu biopsie vzhľadom k obdobiu liečby (pred a po liečení). Účinnosť študovaných liečení bola hodnotená porovnávaním stupňa zápalovej aktivity pozorovanej pri základnom vyšetrení so zápalovou aktivitou, prítomnou v 24. týždni, nasledujúcom po skončení liečby.

Výsledky.

V 31 medzinárodnom centre bolo prihlásených 195 pacientov a náhodne rozdelených na liečenie buď kombináciou INTRON® A plus ribavirín (A=98) alebo kombináciou INTRON® A plus placebo (A=97). Traja pacienti, dvaja náhodne pridelení na liečenie kombináciou INTRON® A plus ribavirín a jeden náhodne pridelený na liečenie kombináciou INTRON® A plus placebo liečení neboli; takto všetky liečené skupiny obsahovali 192 pacientov (96 pacientov ako pre kombináciu INTRON® A plus ribavirín, tak pre kombináciu INTRON® A plus placebo). Dvaja z troch pacientov neboli liečení, pretože si neželali pokračovať, tretí preto, lebo neboli splnené kritériá protokolu. Všetky diskusie týkajúce sa účinnosti a bezpečnosti v tejto správe, sú založené na údajoch zo všetkých liečených skupín.

Účinnosť

Účelom tejto štúdie bolo porovnať kombináciu INTRON® A plus ribavirín s kombináciou INTRON® A plus placebo s ohľadom na všeobecný rozsah odpovedí a rozsah virologickej odpovedi (založené na HCV-RNA (qPCR). Primárnym hľadiskom účinnosti pre túto štúdiu je všeobecný rozsah odpovede.

Záver, pokiaľ sa týka účinnosti, je nasledujúci :

J. Kombinácia ribavirínu s INTRON® A môže dramaticky zvýšiť podiel pacientov, v ktorých mizne HCV-RNA a majú významné zníženia pečeňového zápalu.

Na konci obdobia nasledujúceho po skončení liečení je všeobecný rozsah odpovede súhrnom straty HCV-RNA(qPCR) v sére a zmeny v histológii pečene koncom obdobia (24 týždňov po skončení liečenia). Pacient bol klasifikovaný ako osoba celkovo odpovedajúca, pokiaľ HCV-RNA(qPCR) bola negatívna v 24. týždni

hodnotenia po skončení a súčasne zápalový index HAI podľa Knodella (súčet kategórií I + II + III) sa v období nasledujúcom po liečbe zlepšil o 2 alebo viacej jednotiek vzhľadom k hodnote zistenej pred liečením. Konečne hodnoty virologickej odpovede na konci obdobia nasledujúceho po skončení liečenia, histologická odpoveď a všeobecné rozsahy odpovede sú súhrnne uvedené v tabuľkách 1, 2 a 3.

Konečné hodnoty HCV-RNA na konci sledovaného obdobia : Trvalá strata HCV-RNA 24 týždňov po skončení liečby.

Podiel pacientov so zmiznutou HCV-RNA v sére 24 týždňov po skončení liečby bol desaťkrát väčší ($p<0,001$) v skupine pacientov liečených kombináciou INTRON® A plus ribavirín v porovnaní s tými, ktorým bol podávaný INTRON® A ako monoterapia. V tabuľke 1 sú súhrnne uvedené odpovede pacientov na konci sledovaného obdobia, ako to ukazuje úroveň HCV-RNA v sére.

Tabuľka 1

Stav HCV-RNA v sére na konci sledovaného obdobia : Podiel pacientov so zmiznutou HCV-RNA v sére 24 týždňov po skončení liečby.

Odpovede pacientov	Počet (%) pacientov		
	INTRON® A plus ribavirín	INTRON® A plus placebo	hodnota p
všetci liečení pacienti	50/96 (52)	5/96(5)	< 0,001
95% interval spoľahlivosti pre každý spôsob liečby :		1% - 10%	
	4%-58%		
pre rozdiely medzi spôsobmi liečby:	42% - 62%		
osoby reagujúce na konci liečby	49/80(61)	5/41(12)	

Biopsie z obdobia pred a po liečení boli dostupné pre 81% pacientov liečených kombináciou INTRON® A plus ribavirín a pre 77% (74/96) pacientov liečených kombináciou INTRON® A plus placebo. Tabuľka 2 uvádza súhrnne účinok liečby na zápal pečene u pacientov s výsledkami pečeňových biopsií ako pred, tak po liečbe. Ako v prípade trvalej straty replikácie HCV-RNA, podiel pacientov so zlepšením stavu zápalu pečene bol významne vyšší ($p<0,001$) u pacientov, ktorí absolvovali kombinovanú liečbu, v porovnaní s tými, ktorí boli liečení monoterapeuticky pomocou INTRON® A.

Tabuľka 2

Stav pečeňovej histológie na konci sledovaného obdobia : Zlepšenie stavu pečeňovej histológie 24 týždňov po skončení liečby, založené na HAI indexe (I + II + III) podľa Kondella.

Stav pacientov	Počet (%) pacientov[b]		
	INTRON A plus ribavirín (n=78)	INTRON A plus placebo (n=74)	hodnota[c] p
Zlepšený stav biopsie[d]	49(51)	30(31)	<0,001

b Pacienti s pečeňovými biopsiami ako pred, tak po liečbe

c Fischerov exaktný test

d Zmeny v Kondelovom histologickom indexe (HAI) v období pred a po liečení (súčet I + II + III), zaradené v prípade, že došlo k zníženiu o 2 alebo viacej jednotiek vzhľadom k hodnote pred liečením.

Celková odpoveď

Keď bola štúdia navrhovaná, bolo zrejmé, že pretože odber pečeňovej biopsie je invazívny postup bude nepravdepodobné získať od všetkých pacientov pečeňovú biopsiu v čase po skončení liečenia. Preto protokol a statická analýza boli plánované tak, že analýza pre celkovú odpoveď je založená na údajoch pre všetkých liečených

pacientov a je hodnotená metódou maximálnej pravdepodobnosti (MLE) u pacientov, ak stav celkovej odpovede nemôže byť zistený, tj. u pacientov s negatívnou HCV-RNA a chýbajúcim vyhodnotením biopsie (z obdobia po skončení liečby). Protokol taktiež stanovil, že dodatočná analýza je robená u pacientov, u ktorých sú k dispozícii výsledky biopsií ako z obdobia pred liečbou, tak z obdobia po skončení liečby (tj. u pacientov s kompletnými údajmi). Celková odpoveď je súhrnne uvedená v tabuľke 3, založené na nasledujúcich analýzach :

K. hodnotenie maximálnej pravdepodobnosti (MLE);

L. pacienti s kompletnými údajmi (výsledky pre biopsie ako z obdobia pred liečbou, tak z obdobia po skončení liečby);

M. pacienti s chýbajúcimi údajmi (chýba niektorý alebo obidva údaje pre HCV/biopsia), uvažované ako neúspešná liečba.

Tabuľka 3 Podiel celkových odpovedí

Analyzované údaje	INTRON® A plus ribavirín	INTRON® A plus placebo	hodnota[b] p
hodnotenie maximálnej pravdepodobnosti	43%	5%	< 0,001
pacienti s kompletnými údajmi[c]	39/78 (50%)	4/74 (5%)	< 0,001
liečby považované za neúspešné	39/96 (41%)	4/96 (4%)	< 0,001

1. MLE založená na logistickej regresii.
1. Fischerov exaktný test.
1. Kompletné údaje = výsledky biopsií ako pred, tak aj po liečbe
1. Pacienti, ktorí nemali buď virologické alebo biotopické údaje alebo obidva, boli považované za neúspešne liečených.

Ako sa mohlo predvídať z jednotlivých výsledkov, týkajúcich sa účinkov liečby na zmiznutie HCV-RNA na konci sledovaného obdobia a zlepšenie stavu zápalu pečene, podiel celkových odpovedí v skupine liečenej kombináciou INTRON® plus ribavirín bol výrazne väčší (< 0,001) spolu s 10 až 14 násobným zlepšením, ako bolo pozorované v skupine INTRON® plus placebo, pri všetkých použitých metódach hodnotenia.

Logistická regresná analýza bola urobená vo všetkých vstupných demografických premenných a charakteristík choroby. Jediné z východiskových charakteristík, ktoré boli štatisticky významné pre predpoveď trvalej odpovede na konci sledovaného obdobia, boli genotyp iný ako typ 1 a vírusové zaťaženie 2 milióny.

Pre výpočet vírusových kópií (2 milióny, > 2 milióny) boli rozdiely štatisticky významné v prospech vyšších podielov u pacientov s 2 miliónmi kópií (tabuľka 4).

Keď sú kombinované genotyp a východiskové vírusové zaťaženie, je pozorovaná v odpovediach hierarchia. Pacienti s vírusovým genotypom iným ako 1 a východiskovým vírusovým zaťažením 2 miliónmi kópií mali najlepšiu odpoveď na konci sledovaného obdobia; pacienti s vírusovým genotypom 1 a východiskovým vírusovým zaťažením >2 miliónmi kópií mali najslabšiu odpoveď na konci sledovaného obdobia.

Tabuľka 4 Charakteristiky choroby versus trvalá odpoveď : Všetci liečení pacienti

Charakteristiky choroby[b]	Počet (%) pacientov	
	INTRON A plus Ribavirín (n=96)	INTRON A plus placebo (n=96)
HCV-RNA/qPCR		
2 milióny	24/36 (67)	5/29 (17)
2 milióny	26/60 (43)	0/67 (0)
Genotyp HCV		
1	16/53 (30)	2/53 (4)
iný	34/43 (79)	3/19 (7)

genotyp/východiskový HCV-RNA/qPCR		
iný/2 milióny kópií	15/16 (93)	3/14(21)
iný/>2 milióny kópií	18/27 (67)	0/29 (0)
1/2 milióny kópií	8/20 (40)	0/15 (0)
1/>2 milióny kópií	7/23 (21)	0/38 (0)

[b] Pri vstupe boli pacienti rozvrstvení podľa počtu vírusových kópií (2 milióny, > milióny), genotypu (1 alebo iný) a cirhózy (prítomná alebo neprítomná).

Príklad 2.

Druhá štúdia bola robená v podstate pomocou rovnakej metodológie, ktorá bola popísaná vyššie v štúdii 1. Výsledky sú súhrnne uvedené nižšie.

Účinnosť

Celková odpoveď na konci sledovaného obdobia nastáva v prípadoch, kedy dôjde súčasne k zmiznutiu HCV-RNA(qPCR) a ku zmenám v histológii pečene na konci sledovaného obdobia (24 týždňov po konci liečby). Pacient bol klasifikovaný ako osoba s celkovou odpoveďou, pokiaľ HCV-RNA(PCR) bola negatívna pri hodnotení 24 týždňov po skončení liečby a zápalový index HAI podľa Knodella (súčet kategórií I + II + III) sa zlepšil o 2 alebo viacej jednotiek vzhľadom k indexu pred liečbou. Výskyt virologickej odpovede na konci sledovaného obdobia, histologickej odpovede a celkovej odpovede sú súhrnne uvedené v tabuľkách 5, 6 a 7.

HCR-RNA odpoveď na konci sledovaného obdobia : trvalá strata HCV-RNA 24 týždňov počas skončenia liečby.

Podiel pacientov, u ktorých došlo k zmiznutiu HCV-RNA v sére 24 týždňov po skončení liečby bol 10 násobný ($p<0,001$) v skupine pacientov liečených kombináciou INTRON® A plus ribavirín v porovnaní s tými, ktorým bol podávaný INTRON® A ako monoterapia. V tabuľke 5 sú súhrnne uvedené odpovede pacientov na konci sledovaného obdobia, ako to ukazuje úroveň HCV-RNA v sére.

Tabuľka 5

Stav HCV-RNA v sére na konci sledovaného obdobia : Podiel pacientov so zmiznutou HCV-RNA v sére 24 týždňov po skončení liečby.

Odpovede pacientov	Počet (%) pacientov		
	INTRON A plus ribavirín	INTRON A plus placebo	hodnota p
všetci liečení pacienti	34/77 (44)	3/76 (4)	< 0,001
95% interval spoľahlivosti pre každý spôsob liečby :		0% - 8%	
	33 - 56%	28 - 52%	
pre rozdiely medzi spôsobmi liečby:			
Osoby reagujúce Na konci liečby[c]	34854 (63)	3/32 (9)	

Biopsie z obdobia pred a po liečení boli dostupné pre 79% (61/77) pacientov liečených kombináciou INTRON® A plus ribavirín a pre 84% (64/76) pacientov liečených kombináciou INRON® A plus placebo. Tabuľka 6 uvádza súhrnne účinok liečby na zápal pečene u pacientov s výsledkami pečeňových biopsií ako pred, tak po liečbe. Ako v prípade trvalej straty replikácie HCV-RNA, podiel pacientov so zlepšením stavu zápalu pečene bol významne vyšší ($p<0,001$) u pacientov, ktorí mali kombinovanú liečbu, v porovnaní s tými, ktorí boli liečení monoterapeuticky pomocou INTRON® A.

Tabuľka 6

Stav pečeňovej histológie na konci sledovaného obdobia : Zlepšenie stavu pečeňovej histológie 24 týždňov po skončení liečby, založené na HAI indexe (I + II + III) podľa Knodella.

Stav pacientov	Počet (%) pacientov[a]		
	INTRON A plus ribavirín (n=61)	INTRON A plus placebo (n=64)	hodnota[b] p < 0,001
Zlepšený stav biopsie[c]	38(49)	27(36)	< 0,001

2. Pacienti s pečeňovými biopsiami ako pred, tak po liečbe.
2. Fischerov exaktný test.
2. Zmeny v Knodellovom histologickom indexe (HAI) v období pred a po liečení (súčet I + II + III), zaradené v prípade, že došlo k zníženiu o 2 alebo viac jednotiek vzhľadom k hodnote pred liečením.

Celková odpoveď

Celková odpoveď je súhrnne uvedená v tabuľke 7, založenej na nasledujúcich analýzach :

N. hodnotenie maximálnej pravdepodobnosti (MLE);
O. pacienti s komplexnými údajmi (výsledky pre biopsie ako z obdobia pred liečbou, tak z obdobia po skončení liečby);
P. pacienti s chýbajúcimi údajmi; chýba niektorý alebo obidva údaje pre HCV/biopsie), uvažované ako neúspešná liečba.

Tabuľka 7

Podiel celkových odpovedi

Analyzované údaje	INTRON A plus ribavirín	INTRON A plus placebo	hodnota[b] p
ML hodnotenie[a]	36,5 %	2,7 %	<0,001
pacienti s kompletnými údajmi	25/61 (41,0 %)	2/64 (3,1 %)	<0,001
liečby považované za neúspešné	25/77 (32,5 %)	2/76 (2,6 %)	<0,001

1. MLE založená na logistickej regresii
1. Fischerov exaktný test
1. Kompletné údaje = výsledky biopsií ako pred, tak po liečbe
1. Pacienti, ktorí nemali buď virologické alebo bioptické údaje alebo obidva, boli považovaní za neúspešne liečených.

Ako mohlo byť predvídané z jednotlivých výsledkov týkajúcich sa účinkov liečby na zmiznutí HCV-RNA na konci sledovaného obdobia a zlepšení stavu zápalu pečene, podiel celkových odpovedí v skupine liečenej kombináciou INTRON® plus ribavirín bol výrazne väčší (< 0,001) so 10 až 14 násobným zlepšením zápalu, ako bolo pozorované v skupine INTRON® plus placebo, pri všetkých použitých metódach hodnotenia.

Logistická regresná analýza bola urobená vo všetkých vstupných demografických premenných a charakteristík chorôb. Jediná východisková charakteristika, ktorá bola štatisticky významná pre predpoveď trvalej odpovede na konci sledovaného obdobia, bol genotyp iný ako typ 1.

Pre výpočet vírusových kópií (2 milióny, > 2 milióny) boli rozdiely štatisticky významné v prospech vyšších podielov odpovedí u pacientov s 2 miliónmi kópií (tabuľka 8). Keď sú kombinované genotyp a východiskové vírusové zaťaženie, je pozorovaná v odpovediach hierarchia. Pacienti s vírusovým genotypom iným ako 1 a východiskovým vírusovým zaťažením 2 milióny kópií mali najlepšiu odpoveď na konci sledovaného obdobia; pacienti s vírusovým genotypom 1 a východiskovým vírusovým zaťažením > milióny kópií mali najslabšiu odpoveď na konci sledovaného obdobia.

Tabuľka 8

Charakteristiky choroby versus trvalá odpoveď : Všetci liečení pacienti

Charakteristiky choroby	Počet (%) pacientov	
	INTRON® A plus Ribavirín (n=77)	INTRON® A plus placebo (n=76)
HCV-RNA/qPCR		
2 milióny	6/9 (67)	1/12 (8)
> 2 milióny	28/68 (41)	2/64 (3)
Genotyp HCV		
1	12/46 (28)	1/42 (2)
iný	21/31 (68)	2/34(6)
Genotyp/východiskový HCV-RNA/qPCR		
Iný/2 milióny kópií	4/4 (100)	0/3 (0)
Iný /> milióny kópií	17/27 (62)	2/31 (6)
1/2 milióna kópií	2/5 (40)	1/9 (11)
1/> 2 milióny kópií	11/39 (28)	0/32(0)

Popísané uskutočnenia boli uvedené iba ako príklad a vynález je obmedzený iba termínmi pripojených patentových nárokov, spolu s plným rozsahom ekvivalentov ku ktorým tieto patentové nároky oprávňujú.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Použitie ribavirínu na výrobu farmaceutických prostriedkov na liečenie pacientov s chronickou infekciou hepatitídou C za účelom odstránenia detekovateľnej HCV-RNA, ktoré spočíva v podávaní účinnej dávky ribavirínu spolu s účinnou dávkou interferónu alfa, pričom ide o pacienta, ktorý nereagoval na predchádzajúci priebeh liečby interferónom alfa.
2. Použitie interferónu alfa na výrobu farmaceutických prostriedkov na liečenie pacientov s chronickou infekciou hepatitídou C za účelom odstránenia detekovateľnej HCV-RNA, ktoré spočíva v podávaní účinnej dávky interferónu alfa spolu s účinnou dávkou ribavirínu, pričom ide o pacienta, ktorý nereagoval na prechádzajúci priebeh liečby interferónom alfa.
3. Použitie ako ribavirínu tak interferónu alfa na výrobu farmaceutických prostriedkov na liečenie pacientov s chronickou infekciou hepatitídou C za účelom odstránenia detekovateľnej HCV-RN, ktoré spočíva v podávaní účinnej dávky ribavirínu spolu s účinnou dávkou interferónu alfa, pričom ide o pacienta, ktorý nereagoval na predchádzajúci priebeh liečby interferónom alfa.
4. Použitie podľa hociktorého patentového nároku 1 až 3, pričom ide o ťažko liečiteľného pacienta.
5. Použitie podľa patentového nároku 4, pričom ide o pacienta s vírusovou záťažou väčšou ako 2 milióny kópií na mililiter séra, merané pomocou HCV-RNA kvantitatívnej PCR.
6. Použitie podľa patentového nároku 4 alebo 5, pričom ide o pacienta infikovaného HCV s genotypom, ktorého infekcia je ťažko liečiteľná.
7. Použitie podľa patentového nároku 6, pričom ide o infekciu HCV s genotypom typu 1.
8. Použitie podľa hociktorého predchádzajúceho patentového nároku, pričom interferón-alfa je vybraný zo skupiny interferón alfa-2a, interferón alfa-2b, konsenzuálny interferón, čistený vyrobený interferón alfa alebo pegylovaný interferón-alfa.
9. Použitie podľa hociktorého z predchádzajúcich patentových nárokov, pričom použitý interferón alfa je alfa-2b interferón.

10. Použitie podľa hociktorého z predchádzajúcich patentovýh nárokov, pričom množstvo podávaného ribavirínu je 400 až 1200 mg za deň, výhodne 800 až 1200 mg za deň a množstvo podávaného interferónu alfa je 2 až 10 miliónov IU týždenne, podávaného týždenne, TIW, QOD alebo denne, výhodne 3 milióny IU TIW.
11. Použitie podľa patentového nároku 11, pričom podávanie sa uskutočňuje ďalej počas celého časového obdobia 20 až 30 týždňov.
12. Použitie podľa patentového nároku 11, pričom podávania sa uskutočňuje ďalej počas celkového časového obdobia 40 až 50 týždňov.
13. Použitie podľa patentového nároku 11, pričom podávanie sa uskutočňuje ďalej počas celkového časového obdobia 60 až 80 týždňov.
14. Farmaceutické výrobky, ***vyznačujúce sa tým***, že obsahujú ribavirín a interferón alfa vzájomne oddelené, ale priľahlej forme.
15. Farmaceutické výrobky podľa patentového nároku 14, ***vyznačujúce sa tým***, že interferón alfa je vo forme vhodnej na parenterálnu injekciu, výhodne na subkutánnu injekciu a ribavirín je v pevnej dávkovacej forme, výhodne v dávkovacej forme vhodnej na orálne podávanie.
16. Farmaceutické výrobky podľa patentového nároku 14 alebo 15, ***vyznačujúce sa tým,*** že obsahujú množstvo ribavirínu vhodné najmenej pre jednu injekčnú dávku.
17. Farmaceutické výrobky podľa patentového nároku 16, ***vyznačujúce sa tým***, že množstvo ribavirínu je 400 až 1200 mg a množstvo interferónu alfa je 3 milióny alebo najmenej 3 milióny IU.
18. Farmaceutické výrobky podľa hociktorého z patentových nárokov 14 až 17, ***vyznačujúce sa tým***, že sú vo forme súpravy s návodom pre kombinované použitie pri liečení chronických infekcií hepatitídou C.