

(12) МЕЖДУНАРОДНАЯ ЗАЯВКА, ОПУБЛИКОВАННАЯ В СООТВЕТСТВИИ С
ДОГОВОРом О ПАТЕНТНОЙ КООПЕРАЦИИ (РСТ)

(19) Всемирная Организация
Интеллектуальной Собственности
Международное бюро



(43) Дата международной публикации
12 марта 2009 (12.03.2009)

РСТ

(10) Номер международной публикации
WO 2009/031918 A1

- (51) Международная патентная классификация:
A61K 38/21 (2006.01) A61P 31/12 (2006.01)
A61K 38/40 (2006.01)
- (21) Номер международной заявки: РСТ/RU2008/000109
- (22) Дата международной подачи:
27 февраля 2008 (27.02.2008)
- (25) Язык подачи: Русский
- (26) Язык публикации: Русский
- (30) Данные о приоритете:
60/970,159 5 сентября 2007 (05.09.2007) US
- (71) Заявитель и
(72) Изобретатель: ШАТУНОВСКИЙ, Николай
Евгеньевич (SHATUNOVSKY, Nikolai Evgenievich)
[RU/RU]; ул. Усиевича, д. 8, кв. 48, Москва, 125319,
Moscow (RU).
- (74) Агент: ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ
ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "СОЮЗПАТЕНТ"
(OBSHESTVO S OGRANICHENNOI OTVET-
STVENNOSTJU "SOJUZPATENT"); ул. Ильинка, д.
5/2, Москва, 103735, Moscow (RU).
- (81) Указанные государства (если не указано иначе, для
каждого вида национальной охраны): AE, AG, AL,
AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY,
BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR,
KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME,
MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ,
OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK,
SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Указанные государства (если не указано иначе, для
каждого вида региональной охраны): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), евразийский (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), европейский патент (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU,
LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).

[продолжение на следующей странице]

(54) Title: APOLACTOFERRIN COMPOSITIONS AND METHODS OF THE USE THEREOF FOR TREATING VIRAL HEPATITIS C

(54) Название изобретения: КОМПОЗИЦИИ АПОЛАКТОФЕРРИНА И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ В ЛЕЧЕНИИ ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА С

(57) Abstract: The invention relates to medicine, in particular to hepatology and virology, and can be used for treating, even until the absolute recovery, patients suffering from viral hepatitis C, including the chronic form thereof. Said invention provides an agent for treating viral hepatitis C in the form of a monomeric lactoferrin apoprotein. The invention also relates to a pharmaceutical composition for treating viral hepatitis C which contains the effective amount of monomeric lactoferrin apoprotein and a pharmaceutically acceptable carrier, filler or excipient. The invention also relates to a method for treating viral hepatitis C, consisting in administering the monomeric lactoferrin apoprotein, and to the use of said monomeric lactoferrin apoprotein for producing a medicinal agent for treating viral hepatitis C. The inventive method makes it possible to totally prevent viremia during two-three week treatment, to prevent viral hepatitis C-infected hepatocytes from being destroyed associated with the emission of additional viruses to the blood system and to bring to the end the existence of apoptosis virus-infected hepatocytes, thereby preventing the development of hepatitis, cirrhosis and oncological liver infection which are the terminal stage of the main disease development.

(57) Реферат: Изобретение относится к медицине, в частности к гепатологии и вирусологии, и может быть использовано для лечения, в том числе для полного излечения больных вирусным гепатитом С, включая хроническую форму. Настоящее изобретение обеспечивает средство для лечения вирусного гепатита С, представляющее собой апобелок лактоферрина в мономерной форме. Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции для лечения вирусного гепатита С, содержащей терапевтически эффективное количество апобелка лактоферрина в мономерной форме и фармацевтически приемлемый носитель, наполнитель или эксципиент. Настоящее изобретение также относится к способу лечения вирусного гепатита С, включающему введение апобелка лактоферрина в мономерной форме, и к применению апобелка лактоферрина в мономерной форме для изготовления лекарственного средства для лечения вирусного гепатита С. Способ лечения настоящего изобретения позволяет полностью предотвратить вимию в результате двух - трех недельного курса лечения, предотвратить разрушение пораженных вирусом гепатита С гепатоцитов с выбросом дополнительного количества вирусов в кровеносное русло и завершить существование пораженных вирусом гепатоцитов апоптозом, предотвратить таким образом развитие гепатоза, цирроза и онкологического поражения печени, являющихся терминальной стадией развития основного заболевания.

WO 2009/031918 A1



Опубликована:

— с отчётом о международном поиске

Композиции аполактоферрина и способы их применения в лечении вирусного гепатита С

Область техники

Настоящее изобретение относится к области медицины, в частности к гепатологии и вирусологии, и касается применения лактоферрина для лечения хронической инфекции, вызванной вирусом гепатита С (ВГС). Еще более конкретно изобретение обеспечивает фармацевтические композиции, содержащие аполактоферрин и интерферон, и способы применения композиций в лечении хронической инфекции, вызванной вирусом гепатита С.

Предшествующий уровень техники

ВГС относится к семейству РНК-содержащих вирусов Flaviviridae и вызывает у людей инфекционный процесс, наиболее часто встречаемым осложнением которого является гепатит, перерастающий в цирроз печени и гепатокарциному (Surveillance. Hepatitis. CDC Report №61; Younossi Z, Kallman J, Kincaid J. The effects of HCV infection and management on health-related quality of life. Hepatology. 2007 Mar;45(3):806-16). Инфекция ВГС поразила более чем 170 миллионов человек на Земле, и число инфицированных продолжает увеличиваться. По всему миру насчитывается порядка 1,5 млн. случаев гепатокарциномы, вызванной инфекцией ВГС. Потери, связанные с этим заболеванием только в Соединенных Штатах, оцениваются в 200 миллионов долларов ежегодно.

В большинстве случаев инфицированные ВГС не испытывают серьезных проблем со здоровьем или у них очень слабые симптомы. Однако при длительном развитии инфекции часто возникает гепатит, характеризующийся болями и нарушением функций печени. У людей, которые были инфицированы, появляются анти-ВГС антитела, а спустя некоторое время и вирусная РНК в крови. В значительном проценте случаев вирусная РНК в крови не определяется.

ВГС обладает как мощной способностью подавления иммунной системы человека, так и способностью её обхода за счёт «адаптивных» мутаций. В настоящее время не существует ни одной коммерчески доступной вакцины против заражения ВГС.

Способы лечения ВГС были и остаются основанными на применении интерферона, вводимого в мегадозах, в частности препаратов генно-инженерного интерферона (Shepherd J, Jones J, Hartwell D, Davidson P, Price A, Waugh N. Interferon alfa (pegylated and non-pegylated) and ribavirin for the treatment of mild chronic hepatitis C: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess.* 2007 Mar;11(11):1-224; Younossi Z, Kallman J, Kincaid J. The effects of HCV infection and management on health-related quality of life. *Hepatology.* 2007 Mar;45(3):806-16). Однако подходы к лечению, основанные на генно-инженерных интерферонах, имеют сравнительно низкую эффективность, которая по разным данным составляет 8-25%. Длительность лечения может достигать нескольких лет, а частота рецидивирования составляет 70-80%. Кроме того, применение генно-инженерных интерферонов имеет тяжёлые побочные эффекты, включающие нарушения кроветворения, желудочно-кишечные расстройства, выпадение волос, депрессию и бессонницу.

Распространённой современной тенденцией в лечении ВГС является применение комплексной терапии, добавляющей к генно-инженерному интерферону коктейль, содержащий как общие противовирусные препараты, так и один или два ингибитора размножения ВГС (ингибиторы специфической протеазы-геликазы и/или РНК-полимеразы) (Toniutto P, Fabris C, Bitetto D, Fornasiere E, Rapetti R, Pirisi M. Valopicitabine dihydrochloride: a specific polymerase inhibitor of hepatitis C virus. *Curr Opin Investig Drugs.* 2007 Feb;8(2):150-8; Johnson CL, Owen DM, Gale M Jr. Functional and therapeutic analysis of hepatitis C virus NS3.4A protease control of antiviral immune defense. *J Biol Chem.* 2007 Apr; 282(14):10792-803). Подобные коктейли повышают процент излечения, однако неминуемо ведут к селекции адаптивных мутантов ВГС, устойчивых к данным ингибиторам. Подобные клинические проблемы ярко проявились в ходе борьбы с вирусом иммунодефицита человека, и всё указывает на то, что они будут как минимум столь же актуальны для ВГС.

В связи с недостатками терапии, основанной на рекомбинантных интерферонах и ингибиторах вирусных ферментов, поиск препаратов, эффективно действующих против ВГС, был и продолжает оставаться важной задачей. Перспективной в этом отношении представляется разработка новых комбинированных способов терапии на основе интерферонов в сочетании с иными противовирусными препаратами.

Лактоферрин представляет собой природный железо-связывающий белок, содержащийся в слезной жидкости, слюне, периферической крови, в частности, в лейкоцитах, материнском молоке, молозиве, секретах железистого эпителия и т.д. Лактоферрин способен связывать два атома железа на молекулу. В научной и патентной литературе в настоящее время нет единого мнения относительно величины молекулярной массы лактоферрина. Так, считается, что лактоферрин имеет молекулярную массу около 80000 Да (см., например EP 0 253 395 B2). В то же время в литературе приводятся такие значения молекулярной массы бычьего лактоферрина, как 76000 Да (Farrell H.M., Jr., et al. Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk – Sixth Revision. J. Dairy Sci. (2004), v. 87, p. 1641-1674), 86000 Да (Kazutomo Imabori and Tamio Yamakawa, Eds., "Dictionary of Biochemistry", 2nd edition, p. 1390, Tokyo Kagaku Dojin Co., 1990) и даже 93000 Да (Weiner R.E. and Szuchet S. The molecular weight of bovine lactoferrin. Biochim. Biophys. Acta (1975), v. 393(1), p. 143-147). Для белка из женского молока приводятся такие значения молекулярной массы, как, например, 76000 Да (Moguilevsky N., et al. Comparison of human lactoferrins from milk and neutrophilic leucocytes. Biochem. J. (1985), v. 229, p. 353-359) и 88000 Да (Kazutomo Imabori and Tamio Yamakawa, Eds., "Dictionary of Biochemistry", 2nd edition, p. 1390, Tokyo Kagaku Dojin Co., 1990). Вариации в приводимых значениях молекулярной массы, по-видимому, обусловлены использованием различных способов анализа, а также, возможно, различной степенью и/или профилем гликозилирования белка.

Лактоферрин и его производные обладают выраженной антиоксидантной, антибактериальной (J. Pediatr., 1979, v. 94, p. 1), иммуномодулирующей и противоопухолевой активностями.

Известны способы лечения вирусных заболеваний, в частности вызываемых вирусом гриппа, вирусом иммунодефицита человека, вирусом гепатита С и другими, с использованием лактоферрина или его фрагментов. Лактоферрин был предложен в качестве усилителя терапевтического эффекта интерферона при лечении хронического гепатита С (патентная заявка EP 1 352 657, 15.10.2003). Несмотря на то, что в данном документе содержится широкое обобщение, позволяющее думать, что для усиления терапевтического эффекта интерферона и, следовательно, для успешного осуществления заявленного способа лечения хронического гепатита С может быть использован лактоферрин в любой форме, в том числе не насыщенный металлом лактоферрин, насыщенный различными металлами лактоферрин и

собственно аполактоферрин, и что введение может осуществляться перорально или в виде инъекций, данный документ содержит экспериментальные сведения, подтверждающие возможность применения исключительно природного лактоферрина, вводимого только пероральным способом. В данном документе продемонстрировано, что пероральное введение высоких доз лактоферрина (по меньшей мере, из расчета 1 мг на кг веса в сутки, в частности 1,8 г в день в течение 6 месяцев) совместно с введением интерферона приводит к благоприятному терапевтическому эффекту. Однако достигаемый результат нельзя признать полностью удовлетворительным в связи с тем, что только в 33,3 % случаев по истечении 6 месяцев с момента окончания терапевтического курса наблюдалась полная элиминация вируса и нормализация функции печени; тогда как в остальных 66,7 % случаев лечение либо вообще было неэффективным, либо вирус вновь появлялся в крови по истечении 6 месяцев с момента окончания терапевтического курса даже несмотря на наблюдавшуюся нормализацию функции печени.

Таким образом, в данной области существует острая потребность в разработке новых лекарственных средств для лечения вирусного гепатита С, а также фармацевтических композиций и способов лечения на их основе, которые бы сочетали в себе высокую эффективность, в частности, возможность полной элиминации вируса и предупреждения рецидива заболевания, низкую стоимость, стабильность при хранении, и возможность достижения терапевтического эффекта в более короткие сроки, чем при применении существующих способов и схем лечения.

Раскрытие изобретения

Настоящее изобретение стало возможным в результате неожиданного обнаружения изобретателем того факта, что применение лактоферрина, по существу не содержащего связанного иона железа (апобелок, т.е. аполактоферрин), является чрезвычайно эффективным при лечении вирусного гепатита С.

Таким образом, в своем первом аспекте настоящее изобретение относится к композиции, включающей лактоферрин человека и интерферон, где указанный лактоферрин по существу не содержит железа, и где указанная композиция по существу не содержит нечеловеческого лактоферрина.

В одном из воплощений композиции настоящего изобретения лактоферрин человека имеет степень насыщения железом менее чем приблизительно 5%.

В еще одном из воплощений композиции согласно настоящему изобретению лактоферрин человека имеет кажущуюся молекулярную массу около 80 кДа.

В одном из воплощений композиции лактоферрин человека присутствует в количестве около 20 мг.

В еще одном воплощении композиция настоящего изобретения пригодна для лечения инфекции ВГС. В одном из воплощений инфекция ВГС представляет собой хроническую инфекцию ВГС. В следующем воплощении ВГС относится к генотипу 1b.

В еще одном из воплощений композиция настоящего изобретения способна элиминировать ВГС из организма пациента на срок более, чем 3 месяца.

В своем следующем аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения пациента, инфицированного ВГС, включающему введение указанному пациенту:

- a. композиции, включающей лактоферрин человека, где указанный лактоферрин по существу не содержит железа, и где указанная композиция по существу не содержит нечеловеческого лактоферрина; и
- b. интерферона.

В одном из воплощений способа настоящего изобретения лактоферрин человека имеет степень насыщения железом менее, чем приблизительно 5%.

В еще одном из воплощений способа настоящего изобретения лактоферрин человека имеет кажущуюся молекулярную массу около 80 кДа.

В следующем воплощении способа лактоферрин человека присутствует в композиции в количестве около 20 мг.

В еще одном из воплощений способа настоящего изобретения предусматривается, что пациент, подвергающийся лечению, хронически инфицирован ВГС. В еще одном из воплощений способа ВГС относится к генотипу 1b.

В следующем воплощении способа настоящего изобретения достигается элиминация ВГС из организма пациента на срок более, чем 3 месяца.

В своем следующем аспекте настоящее изобретение относится к набору для лечения инфекции ВГС, включающему:

а. первый контейнер, содержащий терапевтически эффективное количество лактоферрина человека, где указанный лактоферрин по существу не содержит железа;

б. второй контейнер, содержащий терапевтически эффективное количество интерферона.

В одном из воплощений набора согласно настоящему изобретению первый контейнер по существу не содержит нечеловеческого лактоферрина.

В еще одном из воплощений набора лактоферрин человека имеет степень насыщения железом менее, чем приблизительно 5%.

В следующем воплощении набора лактоферрин человека имеет кажущуюся молекулярную массу около 80 кДа.

В одном из воплощений набора согласно настоящему изобретению лактоферрин человека присутствует в количестве около 20 мг.

В следующем воплощении набор предназначен для лечения инфекции ВГС, представляющей собой хроническую инфекцию.

В следующем воплощении набор предназначен для лечения инфекции ВГС, вызванной вирусом, имеющим генотип 1b.

Заявляемая группа изобретений направлена на решение единой задачи – создание доступного по стоимости препарата, обладающего антивирусным (гепатит С) действием на организм человека в целом.

Клиническое использование в фармацевтической практике заявляемого средства и способа его применения обеспечивает ряд технических, лечебных и экономических результатов:

1. Препарат биосовместим с организмом человека и терапевтически высоко эффективен в лечении хронического вирусного гепатита С, сочетаем с применением интерферонов и химиотерапии.

2. На основе препарата могут быть изготовлены лекарственные средства требуемой концентрации.

3. Препарат удобен в хранении и транспортировке.

4. Лекарственные средства, изготовленные на основе препарата, могут быть введены в организм человека внутривенно.

5. Препарат доступен по цене, его применение в лечебной практике экономически оправданно.

6. Применение препарата в сочетании с интерферонами и химиотерапией при хроническом вирусном гепатите С позволяет достичь стойкого противовирусного эффекта за значительно меньший промежуток времени (в 10-20 раз быстрее), чем при применении известных схем лечения хронического вирусного гепатита С.

7. Препарат значительно усиливает эффективность существующей схемы лечения хронического вирусного гепатита С, сокращая сроки полного излечения до 2-3 недельного курса.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 представляет результаты анализа чистоты различных образцов человеческого лактоферрина методом электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях в присутствии ДДС- Na . Дорожка А – маркер молекулярной массы, дорожка Б – стандартный препарат лактоферрина человека, дорожки 1-3 – образцы человеческого лактоферрина (коммерческий препарат «Лапрот»), дорожки 4-13 – образцы апобелка лактоферрина человека.

Фиг. 2 представляет результаты хроматографического анализа образца человеческого лактоферрина (коммерческий препарат «Лапрот») методом ВЭЖХ.

Фиг. 3 представляет результаты хроматографического анализа образца человеческого лактоферрина методом ВЭЖХ.

Варианты осуществления изобретения

Далее изобретение будет подробно описано со ссылкой на его наиболее предпочтительные воплощения. Хотя описаны предпочтительные воплощения, однако должно быть ясно, что изобретение ими не ограничивается. Напротив, предполагается, что изобретение охватывает альтернативы, модификации и эквиваленты, которые могут быть включены в него с учетом сущности и рамок данного изобретения, которые определяются формулой изобретения.

Определения

Выражение «по существу не содержащий железа» относится к композиции лактоферрина, имеющей уровень насыщения железом, который меньше, чем приблизительно 5%, однако изобретение также предусматривает более высокие

уровни насыщения железом, включая диапазон от 5% до 20%, но не ограничиваясь ими.

Выражение «меньше, чем приблизительно 5%» относится к композиции лактоферрина, имеющей содержание железа, которое не превышает 6%, такое как, например, 5,9%.

Выражение «присутствует в количестве около _____ мг/мкг» относится к количеству аполактоферрина, которое является эффективным для лечения ВГС. Это количество включает (но не ограничивается им) количество, которое больше или меньше, чем, указанное в мг/мкг, на величину вплоть до 15%.

Препарат настоящего изобретения предпочтительно вводится, будучи включенным в фармацевтическую композицию, содержащую в качестве активного ингредиента терапевтически эффективное количество лактоферрина по существу в форме апобелка с молекулярной массой около 80000 дальтон и фармацевтически приемлемый носитель, наполнитель или эксципиент. Как используется в настоящем описании, выражение «около 80000 дальтон» относится к массе, которая меньше или больше 80000 дальтон на вплоть до 15%. Под «фармацевтически приемлемым носителем, наполнителем или эксципиентом» понимается такой носитель, наполнитель или эксципиент, который не вызывает никаких нежелательных побочных эффектов у пациента, которому он вводится. Такие фармацевтически приемлемые носители, наполнители или эксципиенты хорошо известны в данной области (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, A.R.Gennaro, Ed., Mack Publishing Company, 1990; Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins, S.Frokjaer and L. Hovgaard, Eds., Taylor and Francis, 2000; и Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd edition, A. Kibbe, Ed., Pharmaceutical Press, 2000).

Примеры фармацевтически приемлемых носителей, наполнителей или эксципиентов включают (но не ограничиваются ими) буферные агенты, агенты для поддержания изотоничности, консерванты, поверхностно-активные вещества (ионные и неионные), наполнители, стабилизаторы и т.д.

Апобелок лактоферрина может быть заключен в фармацевтическую композицию настоящего изобретения хорошо известными способами. Подходящие способы заключения в композицию описаны, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th edition (Mack Publ. Co., Philadelphia, PA, 1985).

Композиции аполактоферрина изобретения могут вводиться сами по себе или в сочетании с одним или более другими терапевтическими средствами. Эти средства могут быть включены в ту же композицию, что и аполактоферрин, или они могут присутствовать в отдельной композиции, как, например, в наборе.

В некоторых воплощениях композиция настоящего изобретения включает терапевтически эффективное количество аполактоферрина в комбинации с интерфероном. Интерферон, пригодный для использования в настоящем изобретении, может находиться в любой форме, которая обеспечивает терапевтический эффект при введении в соответствии, например, со способами, раскрытыми в настоящем изобретении. В одном неограничивающем воплощении настоящего изобретения композиции аполактоферрина настоящего изобретения могут быть составлены вместе с или могут вводиться в сочетании с интерфероном альфа-2а.

Фармацевтическая композиция настоящего изобретения может быть составлена в виде множества готовых форм, например в виде раствора, эмульсии, лиофилизированного порошка для растворения *ex tempore*. В частности, фармацевтическая композиция аполактоферрина настоящего изобретения может представлять собой лиофилизированную или стабилизированную растворенную форму. Лيوфилизированная форма может быть приготовлена путем использования множества методик, известных в данной области. Такая форма, как известно специалистам, обеспечивает стабильность композиции в течение продолжительного периода времени. Преимущество получения жидкой стабилизированной композиции состоит в простоте применения и, в случае экстренной ситуации, в более быстром действии, что потенциально может сохранить жизнь больному. Жидкая композиция может также находиться в замороженном виде, что предполагает ее оттаивание непосредственно перед введением пациенту.

Специалист в данной области, в частности лечащий врач сможет назначить дополнительную лекарственную или немедикаментозную терапию, руководствуясь состоянием больного, наличием сопутствующих заболеваний, клинической целесообразностью, с учетом известных сведений о совместимости лекарственных препаратов.

Композиции аполактоферрина настоящего изобретения могут вводиться любым из путей, который обеспечивает терапевтический эффект при лечении инфекции ВГС, включая хроническую инфекцию ВГС. Например, композиции могут

вводиться парентерально, например внутривенно, внутриартериально, внутриперитонеально, внутримышечно или посредством любых комбинаций вышеперечисленного. В предпочтительных воплощениях фармацевтическую композицию вводят внутривенно. Такая композиция для внутривенного введения может представлять собой раствор, суспензию, эмульсию типа масло-в-воде, вода-в-масле, или липосомную суспензию. В качестве растворителей для приготовления раствора для внутривенного введения могут быть использованы такие известные фармацевтически приемлемые растворители, как, например, изотонический 0,9% солевой раствор (физиологический раствор), раствор 5% глюкозы (декстрозы), раствор маннита и т.д. При необходимости раствор может дополнительно содержать вспомогательные компоненты, например стабилизаторы, поверхностно-активные вещества, противомикробные агенты (консерванты) и т.д.

Способы получения стерильных апирогенных растворов для парентерального введения хорошо известны специалистам в данной области и предусматривают использование стерильной апирогенной воды и стерилизацию полученного раствора, например путем фильтрования через стерилизующий фильтр, например с размером пор 0,4 мкм.

В одном из неограничивающих примеров изобретения аполактоферрин человека вводят внутривенно при лечении хронического ВГС. Композицию вводят в дозе 20 мг каждые 2 часа в первые и вторые сутки терапевтической схемы. Со дня 3 по день 7 схемы композицию аполактоферрина вводят в суточной дозе 20 мг. Со дня 3 по день 7 также вводят гипердозы интерферона (например, интерферон альфа-2а) под прикрытием экстракорпоральных методов детоксикации.

Экспериментальные и клинические данные указывают на существование предельных доз лактоферрина человека (как разовых, так и курсовых), ниже которых препараты на его основе неэффективны, а выше – могут вызвать серьезные побочные реакции. Заявлены разовые и курсовые дозы лекарственного средства для внутривенного введения, изготовленного на основе препарата, содержащего аполактоферрин человека, которые целесообразно применять при лечении хронического вирусного гепатита С.

Без намерения быть ограниченными какими-либо научными теориями или доктринами, изобретатели связывают наблюдаемый при применении аполактоферрина при лечении вирусного гепатита С выраженный

гепатопротекторный эффект с тем, что клетки, инфицированные вирусом гепатита С, под действием аполактоферрина заканчивают свою жизнь апоптозом, а не некрозом, что препятствует выбросу новых и новых порций вируса в системный кровоток.

Предпочтительный путь введения апобелка лактоферрина – внутривенный – обеспечивает быструю и целенаправленную доставку аполактоферрина в неизменном виде к органу-мишени (печени), что обеспечивает максимальное накопление в печени активного начала.

В контексте данного описания термин “терапевтически эффективное количество” обозначает количество лекарственного средства, которое будет обеспечивать желательный эффект по отношению к заболеванию, которое подвергается лечению. В частности, терапевтически эффективное количество должно быть способно предупреждать, уменьшать тяжесть или распространение болезни, которая подвергается лечению. Желательный эффект может состоять в снижении титра вирусных частиц в крови пациента или в полном удалении вируса из кровотока, в гепатопротекторной функции и т.д. Наиболее желательным результатом лечения является полная элиминация возбудителя вирусного гепатита С из организма пациента.

Терапевтически эффективные дозы могут быть определены специалистом в данной области индивидуально с учетом таких переменных, как вес и возраст пациента, общее состояние здоровья, тяжесть основного заболевания, наличие сопутствующих заболеваний и т.д. Схема введения, включая дозировку компонентов лекарственной терапии настоящего изобретения, способ введения, кратность приема, продолжительность курса лечения также могут быть определены специалистом в данной области рутинным образом и при необходимости могут быть скорректированы в ходе лечения с учетом данных лабораторных исследований, клинического наблюдения, динамики симптомов и т.д.

Лактоферрин человека может быть выделен из женского молозива, переходного молока или молока и другого биологического материала человека, а также получен генно-инженерным или трансгенным способами. Лактоферрин может быть получен из сыворотки женского молока путем высаливания и катионнообменной хроматографии, как описано в патенте СССР № 1709606 01.03.1990. Также известен способ получения лактоферрина из человеческого молока путем диафильтрации-ультрафильтрации (международная публикация заявки WO

89/11226, 30.11.1989). Описан способ одностадийной очистки лактоферрина из женского молока путем аффинной хроматографии на колонке с иммобилизованными моноклональными антителами против человеческого лактоферрина (патент JP60100019, 29.08.1985). Все из перечисленных способов, а также другие способы могут быть с успехом использованы для обеспечения нативного лактоферрина (в форме холобелка, содержащего связанное железо).

Экспрессия гена, кодирующего лактоферрин человека, наблюдается не только в молочной железе, но и в других тканях. Так, например, описана последовательность мРНК из семенных пузырьков, кодирующая лактоферрин (GenBank Acc. No. AAN75578). Из костного мозга человека был клонирован ген лактоферрина, представляющий собой вариант альтернативного сплайсинга (GenBank Acc. No. AAR12276). Также опубликован целый ряд нуклеотидных последовательностей гена лактоферрина человека из молочной железы и соответствующих им аминокислотных последовательностей, которые обладают некоторыми различиями по отдельным аминокислотным остаткам (см., например, GenBank Acc. Nos. AAA59511, AAB60324, AAG48753). Кроме того, описан ряд полиморфизмов, например точковый нуклеотидный полиморфизм в экзоне 1 гена лактоферрина человека, приводящий к полиморфизму Lys/Arg в положении 29 N-концевого участка лактоферрина (см. Velliyagounder K., et al. *Infect. Immun.*, 2003, 71(11):6141-6147). Таким образом, полезным в рамках настоящего изобретения является лактоферрин человека, обладающий, по меньшей мере, 80%, более предпочтительно, по меньшей мере, 90%, еще более предпочтительно, по меньшей мере, 95%, и наиболее предпочтительно, по меньшей мере, 99% гомологии аминокислотной последовательности с последовательностью лактоферрина человека, представленной, например, последовательностью, депонированной в GenBank под кодом доступа Acc. No. AAA59511.

Учитывая то обстоятельство, что получение природного человеческого лактоферрина в промышленном масштабе затруднительно, при осуществлении данного изобретения полезным является рекомбинантный человеческий лактоферрин. Последовательность гена лактоферрина человека известна, например из международной публикации заявки WO 92/21752 (10.12.1992), а также см. депонированные в GenBank последовательности, упомянутые выше. Описаны способы экспрессии рекомбинантного человеческого лактоферрина и плазмидные

конструкции для этих целей (например, патент US 6,277,817, 21.08.2001). Чрезвычайно привлекательными способами получения рекомбинантного человеческого лактоферрина являются способы экспрессии в культуре клеток растений (заявка US 2004040062) или в клетках метилотрофных дрожжей *Pichia pastoris* (международная публикация заявки WO 01/32895, 10.05.2001). Также в рамках настоящего изобретения предусматривается использование человеческого лактоферрина, полученного из молока трансгенных животных, например молочных коров. Описан высокоэффективный способ получения человеческого лактоферрина путем экспрессии в молочной железе коз, которым интрадуктально инъецировали рекомбинантный дефектный по репликации аденовирус (Han Z.S., et al. High-level expression of human lactoferrin in the milk of goats by using replication-defective adenoviral vectors. *Protein Expr. Purif.* (2007), v. 53(1), p. 225-231).

Основным существенным отличием заявляемого препарата от всех ранее известных лекарственных средств, содержащих лактоферрин, является то, что за счет высокой степени очистки лактоферрина, входящего в состав препарата, достигается максимальная концентрация одной изоформы аполактоферрина (с кажущейся молекулярной массой около 80 кДа), наиболее активной в противовирусном плане, что обеспечивает надежность и безопасность его применения в лечебном процессе.

Заявляемая концентрация лактоферрина в препарате позволяет длительно сохранять лактоферрин в нативном состоянии, то есть в состоянии максимальной физиологической активности.

Следующие далее примеры раскрывают наиболее предпочтительные воплощения данного изобретения и приведены исключительно с целью лучшего пояснения его сущности. Специалисту в данной области будет понятно, что можно осуществить множество модификаций как в отношении используемых материалов, так и в отношении используемых способов без отступления за рамки изобретения.

Пример 1. Сравнительный анализ различных препаратов лактоферрина человека.

Каждый образец оценивали по следующим параметрам:

- 1). Содержание белка лактоферрина человека
- 2). Степень насыщения лактоферрина железом
- 3). Способность лактоферрина связывать железо

4). Чистота лактоферрина человека оценивалась при помощи денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДДС-Na)

5). Чистота лактоферрина человека оценивалась при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Образцы:

Номер образца	Препарат
1-3	Коммерческий препарат лиофилизированного лактоферрина человека «Лапрот»
4-13	Аполактоферрин человека с концентрацией 20 мг/мл

Содержание белка лактоферрина в образцах

Препарат «Лапрот» был получен из Московского научно-исследовательского онкологического института им. П.А. Герцена. Содержание белка лактоферрина в препарате «Лапрот» (образцы 1-3) варьировало в диапазоне от 2,7 до 3,3 мг на 10 мг лиофилизированного препарата.

Белок аполактоферрина (образцы 4-13) был получен из сыворотки женского молока путем высаливания сернокислым аммонием и катионообменной хроматографии в соответствии с описанным ранее способом (патент СССР № 1709606 01.03.1990) с некоторыми модификациями. Катионообменную хроматографию проводили на колонке диаметром 25 мм при объеме катионообменника 50 мл. В качестве катионообменника использовали Toyoperl CM-650S (TosoHaas Part#43253). Скорость протока 30 мл/час, перистальтический насос Microprepex (Pharmacia). Детекцию белка в элюате проводили при помощи детектора Uvicord SII (Pharmacia), фракции собирали при помощи коллектора фракций Multirak (Pharmacia).

Определение концентрации лактоферрина в растворах проводили с помощью набора реагентов для иммуноферментного определения лактоферрина в сыворотке крови «Лактоферрин-ИФА-Бест» Д-4156 (ЗАО «Вектор-Бест») по инструкции, прилагаемой к набору. Обсчет результатов проводили по программе Excel, используя полиномиальную аппроксимацию второй степени.

Кроме того, концентрацию лактоферрина оценивали спектрофотометрически на спектрофотометре Ultrospec 11 кювете с длиной оптического пути 1 см. Концентрацию лактоферрина в препаратах определяли по формуле $A_{280}/1,27 =$ концентрация мг/мл, как описано в EP 0 253 395 B2.

Содержание белка аполактоферрина в образцах 4-13 варьировало в диапазоне от 15,2 до 20,0 мг на мл раствора.

Степень насыщения лактоферрина человека железом

Содержание железа в препаратах лактоферрина определяли спектрофотометрическим методом по соотношению A_{465}/A_{280} . В Табл. 1 приведена степень насыщения железом (%) для всех исследованных образцов.

Таблица 1. Степень насыщения железом лактоферрина человека в различных образцах.

Образец	% насыщения железом
1	25
2	32
3	39
4	3,7
5	3,6
6	3,4
7	3,9
8	5,1
9	3,5
10	3,9
11	4,2
12	4,6
13	3,5

Таким образом, в коммерческом препарате «Лапрот» (образцы 1-3) степень насыщения лактоферрина железом варьировала в широком диапазоне от 25 до 39%. Такой уровень насыщения железом соответствует среднему уровню насыщения природного лактоферрина человека.

Напротив, препарат аполактоферрина человека показал, что степень насыщения железом варьировала от 3,4 до 5,1%.

Сродство лактоферрина человека к железу

При добавлении ионов железа в виде концентрированного раствора сульфата аммония-железа все образцы, содержавшие лактоферрин человека в разных количествах, демонстрировали 100% насыщение лактоферрина ионами железа.

Оценка чистоты препаратов лактоферрина человека способом денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ)

Анализ образцов проводили путем электрофореза в ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия (ДДС-Na) в системе, описанной Laemmli U.K. (Cleavage of the structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. Nature (1970), v. 227, p. 680-685). Для проведения анализа на дорожку наносили 20 мкг лактоферрина человека из образцов №№ 1-3 («Лапрот») и 10 мкг лактоферрина человека из образцов №№ 4-13.

Большие количества лактоферрина человека, используемые для проведения анализа, были необходимы для оценки предполагаемых продуктов распада лактоферрина человека, главным образом для лиофилизированных образцов, в которых была показана гораздо меньшая концентрация лактоферрина человека, чем предполагалось.

Полученные данные представлены на Фиг. 1. Все образцы имели четко выраженную мажорную полосу, соответствующую кажущемуся молекулярному весу около 80000 Да. В частности, для всех образцов №№4-13 было показано наличие белка с кажущимся молекулярным весом около 80000 Да, а также незначительное количество других белков, по всей видимости являющихся продуктами распада лактоферрина человека.

С другой стороны, в образцах №№ 1-3 (коммерческий препарат «Лапрот») было показано наличие одной мажорной полосы, соответствующей кажущемуся молекулярному весу около 80000 Да, а также наличие еще двух минорных полос, соответствующих приблизительно 75000 и 70000 Да. Одна из этих двух полос также присутствовала в лактоферрине, используемом в качестве стандартного образца.

Оценка чистоты препаратов лактоферрина человека способом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ)

Для определения чистоты белков, а также для выявления возможных примесей 50 микрограмм лактоферрина человека из каждого образца анализировали при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Для всех образцов №№ 1-3 наблюдали аналогичные хроматограммы. Типичная хроматограмма, полученная для образца № 1, показана на Фиг. 2.

Для всех образцов №№ 4-13 в виде растворов наблюдали аналогичные хроматограммы. Типичная хроматограмма, полученная для образца 13, показана на Фиг. 3.

По результатам анализа образцов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии продукты распада лактоферрина человека обнаружены не были ни в одном из образцов №№ 1-13.

Пример 2. Клинический опыт внутривенного применения препарата человеческого лактоферрина

Препарат лактоферрина человека вводили как в режиме монотерапии, так и в комбинации с интерфероном, пролонгированным интерфероном, рибавирином и цитостатиками в сочетании с экстракорпоральными методами детоксикации

Клинический случай 1

Больной Г.А.Л., муж, возраст 30 лет. Диагноз - смешанный гепатит В+С (генотип 1 b). По данным ПЦР исходная вирусемия HCV высокая (>100000 МЕ/мл). Длительность заболевания составляла 5 лет по документально подтвержденным данным. Однако по данным анамнеза можно предположить, что реальная длительность заболевания была около 14 лет.

Больной лечился в условиях стационара. Проводились попытки введения пульсовых доз по 500 мг аполактоферрина на фоне лечения рефероном по 3 млн. ЕД. через день. При таком способе введения не было отмечено изменений ни в уровне вирусемии, ни в биохимических показателях. Через 7-9 дней от начала лечения наблюдалось обострение простудного заболевания. Эти катаральные проявления протекали в стертой форме и проходили самопроизвольно, не мешая процессу лечения основного заболевания.

В дальнейшем была применена двухчасовая схема введения по 20 мг каждые 2 часа в течение 10 часов. В результате проведения такой методики в течение двух дней подряд, на фоне предварительного длительного лечения рефероном, произошла элиминация вируса гепатита С. Одновременно с этим однократно не

определился вирус гепатита В, однако уже через неделю он снова стал определяться на прежнем уровне виремии. Вирус гепатита С не определялся ни на фоне лечения реафероном в последующие три месяца, ни после прекращения этого лечения на протяжении последующих 9, 18, 27 и 36 месяцев, что подтверждено контрольными анализами. Лечение гепатита В проводилось по стандартной схеме и завершилось успешно только по истечении года.

Клинический случай 2

Больной К.В.А, муж, возраст 21 Диагноз - гепатит С с генотипом вируса 1В. По данным ПЦР исходная виремия высокая (>100000 МЕ/мл). Длительность заболевания составляла 3 года по документально подтвержденным данным. Однако по данным анамнеза можно предположить, что реальная длительность заболевания была в 2 раза больше.

Лечение проводилось по схеме с недельной цикличностью, причем во время введения аполактоферрина на первой неделе не вводился реаферон, в недельный промежуток между введением аполактоферрина реаферон применялся дважды по 3 млн. ЕД. Через 7-9 дней от начала лечения наблюдалось обострение простудного заболевания. Эти катаральные проявления протекали в стертой форме и проходили самопроизвольно, не мешая процессу лечения основного заболевания.

Элиминация вируса произошла на третьей неделе комплексного лечения (аполактоферрин, реаферон, ГДФ). Лабораторные сведения о стойком отсутствии вируса в крови этого пациента получены при контрольных анализах через 6, 16, 23 и 30 месяцев после завершения лечения.

Клинический случай 3

Больной Ш.А.А, муж, возраст 29 лет. Диагноз гепатит С, генотип 2а, обнаружен случайно при профилактическом обследовании в титре $3 \cdot 10^4$ МЕ/мл. Длительность заболевания по документально подтвержденным данным составила 2 месяца, однако, анамнез с клиническими проявлениями гепатита около 2 лет.

Лечение стационарное, препарат апобелка лактоферрина человека вводился по семидневной схеме в сочетании с реафероном и экстракорпоральными методами детоксикации. С момента начала лечения биохимических нарушений в крови не выявлено, билирубин и печеночные ферменты оставались в пределах нормы.

Элиминация вируса в конце третьей недели комплексного лечения. При контрольных исследованиях через 6, 12, 24 и 33 месяца было зафиксировано отсутствие вируса в крови.

Клинический случай 4

Больной С.Л.Ж., муж, возраст 37 лет. Диагноз гепатит С, генотип 1b обнаружен в титре 428000 МЕ/мл при профилактическом обследовании. Длительность заболевания составила 1 год. Клинических признаков гепатита нет. Жалоб не предъявлял. Биохимические анализы в норме. Комплексное лечение человеческим аполактоферрином в сочетании с реафероном, рибавирином, ламивудином и экстракорпоральными методами детоксикации по семидневной схеме проводилось в два этапа. По завершении третьей недели первого этапа отмечено снижение титра HCV до 500 МЕ/мл. При этом значительно повысились выше нормы печеночные ферменты и билирубин в крови, появились признаки иммуносупрессии. В этой связи после недельного перерыва лечения проведен второй этап комплексной терапии по той же схеме со снижением доз рибавирина и ламивудина. Элиминация вируса наступила уже к концу первой недели второго этапа лечения. Контрольные исследования на протяжении последующих 13 месяцев не указывают на наличие вируса в крови. Биохимические показатели также стабилизировались.

Клинический случай 5

Больной С.С.В., муж, возраст 47. Диагноз - гепатит С, вызванный вирусом генотипа 2А. Виремия высокая $2,2 \cdot 10^5$ МЕ/мл. Было отмечено десятикратное увеличение ферментов в биохимических анализах крови при умеренном повышении билирубина до верхних границ нормы. Длительность заболевания составляла 0,5 года по документально подтвержденным данным. Однако по данным анамнеза можно предположить, что реальная длительность заболевания была намного больше, около трех лет.

Лечение проходило амбулаторно. Препарат апобелка лактоферрина человека вводился ежедневно по 40 мг в течение трех дней, потом четыре дня по 20 мг. Далее проводилась недельная пауза в лечении, после чего проводился второй курс лечения аполактоферрином ежедневно по 40 мг. Такая схема лечения была выбрана, исходя из предположения о том, что препарат оказывает иммуносупрессивное действие. Учитывая то, что цикл развития иммунных клеток составляет примерно 7 дней, было

принято решение о чередовании семидневных циклов введения препарата аполактоферрина без использования интерферонов.

Монотерапия аполактоферрином привела к частичной элиминации вируса: произошло снижение вирусемии с высокой до средней $3 \cdot 10^4$ МЕ/мл. Монотерапия аполактоферрина человека в данном случае обеспечила лишь частичную элиминацию вируса гепатита С.

Обращает на себя внимание, что на 2 и 3 неделе монотерапии произошло нарастание ферментемии при сохранении среднего уровня вирусемии. Отмечено, что у больного через 7-9 дней от начала лечения наблюдалось обострение простудных заболеваний. Эти катаральные проявления протекали в стертой форме и проходили самопроизвольно, не мешая процессу лечения основного заболевания.

Следующим этапом лечения больного после применения монотерапии аполактоферрином было комплексное лечение с использованием препаратов интерферона. Курс лечения был начат с проведения пульсового введения по 20 мг аполактоферрина каждые 2 часа до достижения дозы 100 мг. Далее препарат аполактоферрина вводили ежедневно по 40 мг без соблюдения недельной цикличности. Начиная с 5 дня введения аполактоферрина, параллельно применялся препарат интерферона Альфа 2А (Реаферон) по 3 млн ЕД, через день. Такое решение было принято из-за высокого исходного уровня АЛАТ (SGPT) и АсАТ (SGOT) для осуществления гепатопротекции. У этого больного в течение суток после проведения двухчасовой схемы введения аполактоферрина произошло более чем трехкратное падение уровня ферментов АЛАТ (SGPT) и АсАТ (SGOT) при сохранении средней вирусемии. Значительно снизился уровень билирубина, что говорит о выраженном гепатопротективном действии двухчасовой схемы. Спустя неделю после начала введения реаферона произошла элиминация вируса, после чего введение аполактоферрина было прекращено, а лечение реафероном продолжено в прежнем объеме. В дальнейшем были получены еще два отрицательных анализа ПЦР в течение двух недель, после чего введение реаферона было прекращено.

Через месяц после прекращения лечения произошёл рецидив. Вирусемия поднялась до среднего уровня, сопровождаясь высокой ферментемией. К началу лечения вирусемия уже составляла $5 \cdot 10^6$ МЕ/мл, ферментемия была высокой, хотя вдвое ниже исходного уровня. Далее проводилась комплексная терапия с применением аполактоферрина по двухчасовой схеме два дня подряд, затем

ежедневно по 20 мг с соблюдением недельной цикличности для профилактики возможного возникновения устойчивости вируса к препарату. Реаферон заменен на Интрон А по 5 млн. ЕД через день, к лечению добавлен рибавирин по 1200 мг в день.

Этот этап лечения было решено начать с введения Интрона, предполагая, что аполактоферрин производит «маркировку» вируса, связываясь с его эпитопом E2, тем самым делая его «видимым» для иммунной системы, а также затрудняя его проникновение в гепатоцит. В последующем в течение двух дней после первой инъекции Интрона была проведена двухчасовая схема введения аполактоферрина по 20 мг каждые 2 часа до достижения дозы 100 мг, далее введение аполактоферрина было продолжено по 20 мг ежедневно.

По результатам анализов после двух дней введения аполактоферрина было выявлено снижение уровня вирусемии с 5 000 000 до 400 000 МЕ/мл, а также двукратное снижение уровня ферментов. Обращал на себя внимание низкий уровень антивирусного IgM, не соответствующий выраженности процесса. После начала лечения его уровень немного возрос, однако трудно сказать в результате действия Интрона или аполактоферрина. К концу первой недели комплексного лечения уровень вирусемии снизился до низкого, а к концу второй недели курса, т.е. без введения аполактоферрина, до минимального (630 МЕ/мл при пороге чувствительности 600 МЕ/мл). Все изменения уровня вирусемии коррелировали со снижением уровня ферментемии, в первую очередь АлАТ (SGPT) и АсАТ(SGOT). К концу третьей недели курса лечения вирус в крови не определялся, биохимические анализы в пределах нормы. Больной переведен на противорецидивный курс лечения препаратом Пегасис по 135 мкг в неделю. Динамическое наблюдение 4, 13 и 24 месяца. Рецидива нет.

Клинический случай 6

Больная А.А.Н., жен, возраст 37. Диагноз - гепатит С, вызванный вирусом генотипа 1В. Вирусемия высокая 100000 МЕ/мл. Длительность заболевания составляла 2 года по документально подтвержденным данным.

Лечение проводилось амбулаторно. Препарат аполактоферрина человека вводился ежедневно по 40 мг в течение трех дней, потом четыре дня по 20 мг. Далее проводилась недельная пауза в лечении, после чего проводился второй курс лечения аполактоферрином ежедневно по 40 мг. Такая схема лечения была выбрана, исходя из предположения о том, что препарат оказывает

иммуносупрессивное действие. Учитывая то, что цикл развития иммунных клеток составляет примерно 7 дней, было принято решение о чередовании семидневных циклов введения препарата аполактоферрина.

Монотерапия аполактоферрином привела к частичной элиминации вируса: произошло снижение вирусной нагрузки с высокой до низкой $2 \cdot 10^3$ МЕ/мл.

Отмечалось повышение уровня ферментов, хотя все значения их лежали в пределах нормы. Через 7-9 дней от начала лечения наблюдалось обострение простудного заболевания. Катаральные проявления протекали в стертой форме и проходили самопроизвольно, не мешая процессу лечения основного заболевания.

Следующим этапом лечения больной после частичного успеха с применением монотерапии аполактоферрином было комплексное лечение с использованием препаратов интерферона и экстракорпоральных методов детоксикации. Курс лечения был начат с проведения пульсового введения по 20 мг аполактоферрина каждые 2 часа до достижения дозы 100 мг. Далее препарат аполактоферрина вводили ежедневно по 40 мг без соблюдения недельной цикличности. Параллельно с введением аполактоферрина применялся препарат интерферона Альфа 2А (Реаферон) по 3 млн. ЕД, через день.

Первое введение реаферона предшествовало проведению двухчасовой схемы введения аполактоферрина. Элиминация вируса произошла через пять дней от начала лечения аполактоферрином. Реаферон вводился в такой же дозе 3 млн. ЕД, через день. Следует отметить, что элиминация вируса сопровождалась относительным подъемом уровня АЛТ(АСТ) и АсАТ(АсАТ), тем не менее остающихся в пределах нормы. Вирусная нагрузка до и после проведения двухчасовой схемы осталась на среднем уровне. Учитывая 1В генотип вируса, введение аполактоферрина было продолжено до 8 дней, терапия реафероном продолжалась в прежнем объеме. Однако через неделю после прекращения введения аполактоферрина произошло увеличение вирусной нагрузки до среднего уровня. Был начат повторный курс введения аполактоферрина по 20 мг ежедневно, однако при контрольном исследовании на четвертый день лечения была обнаружена высокая вирусная нагрузка. В применении аполактоферрина был сделан двухнедельный перерыв.

К курсу лечения добавлен рибавирин по 1000 мг/день, реаферон заменен на интерферон альфа-2В (Интрон) по 5 млн. ЕД через день. Введение аполактоферрина начато с зарекомендовавшей себя двухчасовой схемы, далее по 20 мг ежедневно без

соблюдения недельной цикличности. На момент начала лечения вирусная нагрузка была средней. Количество антивирусного иммуноглобулина М было значительным. Интрон применялся с 5 дня от начала введения аполактоферрина. К шестому дню лечения, т.е. к началу применения Интрона, у больной произошло нарастание вирусной нагрузки до 430 тыс. МЕ/мл, коррелирующее с биохимическими показателями в анализах крови. Сохранился высокий уровень антивирусного IgM. После начала введения Интрона произошло быстрое, в течение пяти дней, снижение уровня вирусной нагрузки до низкого, и далее в течение двух недель произошла элиминация вируса. После этого введение аполактоферрина было прекращено, введение Интрона продолжено в прежнем объеме. При контрольных анализах через 5, 12, 19 и 25 месяцев после прекращения введения аполактоферрина вирусная нагрузка не обнаружена.

Клинический случай 7

Больная М.Т.И., жен, 47 лет. Диагноз – гепатит С, генотип 1b. Длительный печеночный анамнез около 6 лет, хронический панкреатит. Диагноз ВГС выявлен лабораторно при профилактическом обследовании. Длительность заболевания 1,5 года по документальным данным. Исходная вирусная нагрузка $1 \cdot 10^7$ МЕ/мл.

Больная лечилась стационарно. Исходные биохимические показатели АЛТ (SGPT), АСТ (SGOT) в пределах нормы, билирубин увеличен в 2 раза, в 10 раз увеличена ALP.

В комплексной терапии в семидневном режиме с использованием двухчасовой схемы применялся нативный лактоферрин (препарат «Лапрот»), реаферон, ламивудин, рибавирин и экстракорпоральные методы детоксикации. В качестве разовой дозы использовалось 50 мг лиофилизированного препарата «Лапрот». К концу третьей недели комплексного лечения отмечено повышение печеночных ферментов почти в 2 раза и уменьшение ALP до нормы. Вирусная нагрузка снизилась до $6,7 \cdot 10^5$ МЕ/мл. После двухнедельного перерыва проведен второй этап комплексной терапии с применением препарата «Лапрот». На протяжении всего второго этапа вирусная нагрузка оставалась в пределах $1,2 \cdot 10^5 - 2,3 \cdot 10^5$ МЕ/мл. В конце 3 недели 2 этапа отмечено снижение вирусной нагрузки меньше 500 МЕ/мл. Учитывая признаки иммуносупрессии, был сделан двухнедельный перерыв комплексной терапии. В течение этих 2 недель использовался только пролонгированный интерферон «Пегасис», применяемый 1 раз в неделю. Контрольное исследование выявило сохранение вирусной нагрузки на уровне 600 МЕ/мл.

В начале третьего этапа лечения по схеме виремия возросла до $3,5 \cdot 10^5$ МЕ/мл и сохранялась на этом уровне до самого конца третьего этапа. Больная переведена на схему длительного приема пролонгированного интерферона. Контрольные исследования спустя 6, 12 и 20 месяцев показывают наличие вирусной нагрузки в пределах $1 \cdot 10^3 - 1 \cdot 10^4$ МЕ/мл.

Клинический случай 8

Больной З.А.А., муж, возраст 18 лет, Диагноз гепатит С, генотип 1b, Длительность заболевания около 5 лет. Исходная виремия 500000 МЕ/мл. Лечение стационарное, комплексное с применением препарата «Лапрот» в три этапа. Каждый этап состоял из трехнедельного цикла в семидневном режиме с двухчасовой схемой. Биохимические показатели на протяжении всех трех этапов, проводимые с перерывами в две недели, практически оставались на исходном уровне в пределах нормы. К концу первого этапа виремия снизилась до 500 МЕ/мл. К началу второго этапа вирус в крови обнаружен не был. Однако уже в середине первой семидневки второго этапа он снова проявился при $2,2 \cdot 10^4$ МЕ/мл. Весь третий этап лечения, т.е. ещё 21 день сопровождался стойкими показателями виремии в пределах $1 \cdot 10^3 - 1,6 \cdot 10^3$ МЕ/мл. С учетом возраста больного и значительной иммуносупрессии к концу 3 этапа решено перевести больного на длительный курс пролонгированного интерферона «Пегасис». Контрольные исследования через 6, 13, 21 и 29 месяцев показывают сохранение виремии практически на исходном уровне.

Клинический случай 9

Больной Н.А.В., муж, 33 года. Диагноз гепатит С, генотип 1b. Длительность заболевания около 10 лет по достоверно подтвержденным документам. В анамнезе неоднократно проводились курсы интерферонотерапии без положительного эффекта. Исходная виремия $2,1 \cdot 10^7$ МЕ/мл. Курс комплексной терапии с препаратом «Лапрот» по двухчасовой схеме, семидневными циклами проводился в два этапа. К этому же времени снизились исходно повышенные в 1,5 раза биохимические показатели. Антивирусный эффект от проводимого лечения практически не получен.

Заключение

Приведенные клинические наблюдения типичны для двух групп больных с применением в одной группе нативного человеческого лактоферрина, содержащегося в препарате «Лапрот» - 9 наблюдений (в одном из них имел место отказ больного от

лечения на первой неделе лечения, причина не установлена); в другой – человеческого аполактоферрина, полученного авторами вышеописанным способом – 51 наблюдение (отказ от лечения в одном случае, больной с нестабильной психикой из-за длительного наркотического анамнеза).

Монотерапия аполактоферрином проводилась 5 больным, но из-за отсутствия противовирусного эффекта переходила в фазу комплексной терапии с применением интерферонов, цитостатиков и методов экстракорпоральной детоксикации.

Не желая быть связанными какой-либо научной теорией, изобретатели предполагают, что парентерально введенный аполактоферрин тропен вирусу гепатита С, вступает с ним во взаимодействие, представляя его иммунной системе и препятствуя его проникновению в гепатоцит. Длительное, регулярное применение аполактоферрина приводит к некоторым иммуносупрессивным эффектам, что косвенно характеризуется нарастанием вирусемии при монотерапии, а также появлением у всех больных примерно через неделю от начала лечения катаральных изменений. Однако аллергических реакций отмечено не было ни в одном случае.

Наиболее выраженным эффектом обладает применение аполактоферрина по двухчасовой схеме, 5-6 введений по 20 мг через каждые 2 часа, предварительно начав лечение препаратами интерферона. Возможно, клинически оправданным будет введение препарата дробно, с интервалом 2-3 часа в течение более длительного времени, т.е. нескольких суток, возможно и недель.

Промышленная применимость

Настоящее изобретение касается применения аполактоферрина для лечения инфекций, вызванных вирусом гепатита С (ВГС), в частности хронических инфекций, и обеспечивает способы, композиции и наборы, которые могут быть использованы в здравоохранении.

Все патентные документы, публикации, научные статьи, и другие документы и материалы, цитируемые или упоминаемые здесь, включены в настоящее описание путем отсылки в такой степени, как если бы каждый из этих документов был включен путем отсылки индивидуально или приведен здесь в его полном виде.

Конкретные применения, способы и схемы терапии, фармацевтические композиции, описанные здесь, относятся к предпочтительным вариантам

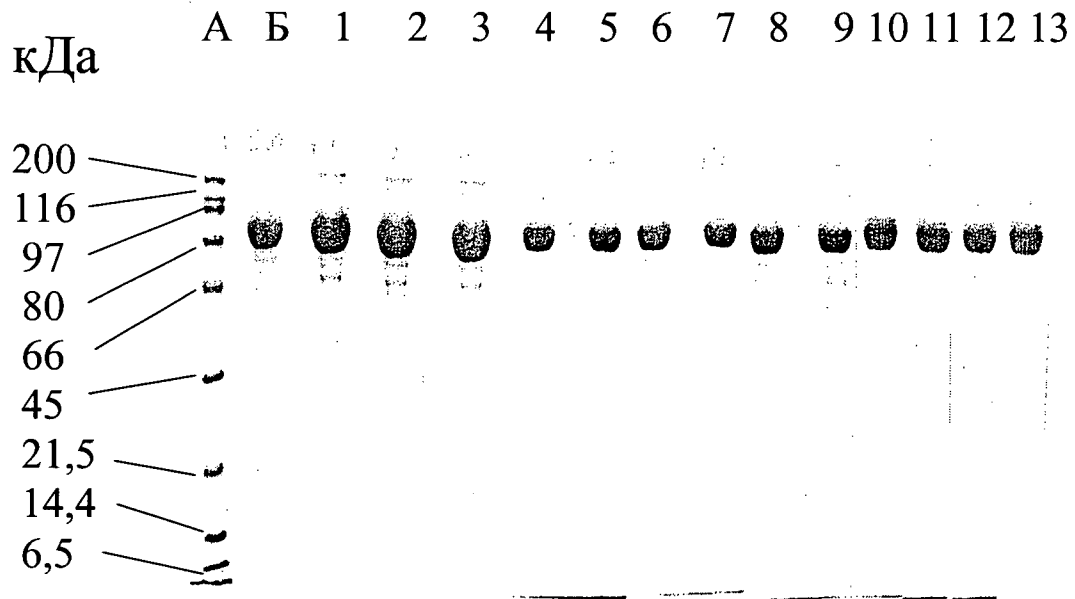
осуществления, приведены в качестве примеров и не предназначены для ограничения объема данного изобретения. При изучении этого описания другие объекты, аспекты и воплощения будут приходить в голову специалистам в данной области, и они охватываются рамками данного изобретения. Специалистам в данной области будет понятно, что различные замены и модификации могут быть произведены в отношении описанного здесь изобретения без отклонения от объема и рамок данного изобретения, определяемых прилагаемой формулой изобретения.

Формула изобретения

1. Композиция, включающая лактоферрин человека и интерферон, где указанный лактоферрин по существу не содержит железа, и где указанная композиция по существу не содержит нечеловеческого лактоферрина.
2. Композиция по п. 1, в которой указанный лактоферрин человека имеет степень насыщения железом менее чем приблизительно 5%.
3. Композиция по п. 2, где указанный лактоферрин человека имеет кажущуюся молекулярную массу около 80 кДа.
4. Композиция по п. 2, в которой указанный лактоферрин человека присутствует в количестве около 20 мг.
5. Композиция по п. 1, пригодная для лечения инфекции ВГС.
6. Композиция по п. 5, где указанная инфекция ВГС представляет собой хроническую инфекцию ВГС.
7. Композиция по п. 5, где указанный ВГС представляет собой ВГС генотипа 1b.
8. Композиция по п. 5, способная элиминировать указанный ВГС из организма пациента на срок более, чем 3 месяца.
9. Способ лечения пациента, инфицированного ВГС, включающий введение указанному пациенту:
 - a. композиции, включающей лактоферрин человека, где указанный лактоферрин по существу не содержит железа, и где указанная композиция по существу не содержит нечеловеческого лактоферрина;
 - и
 - b. интерферона.
10. Способ по п. 9, в котором указанный лактоферрин человека имеет степень насыщения железом менее, чем приблизительно 5%.
11. Способ по п. 10, где указанный лактоферрин человека имеет кажущуюся молекулярную массу около 80 кДа.
12. Способ по п. 10, где указанный лактоферрин человека присутствует в количестве около 20 мг.
13. Способ по п. 10, где указанный пациент хронически инфицирован ВГС.
14. Способ по п. 10, где указанный ВГС представляет собой ВГС генотипа 1b.

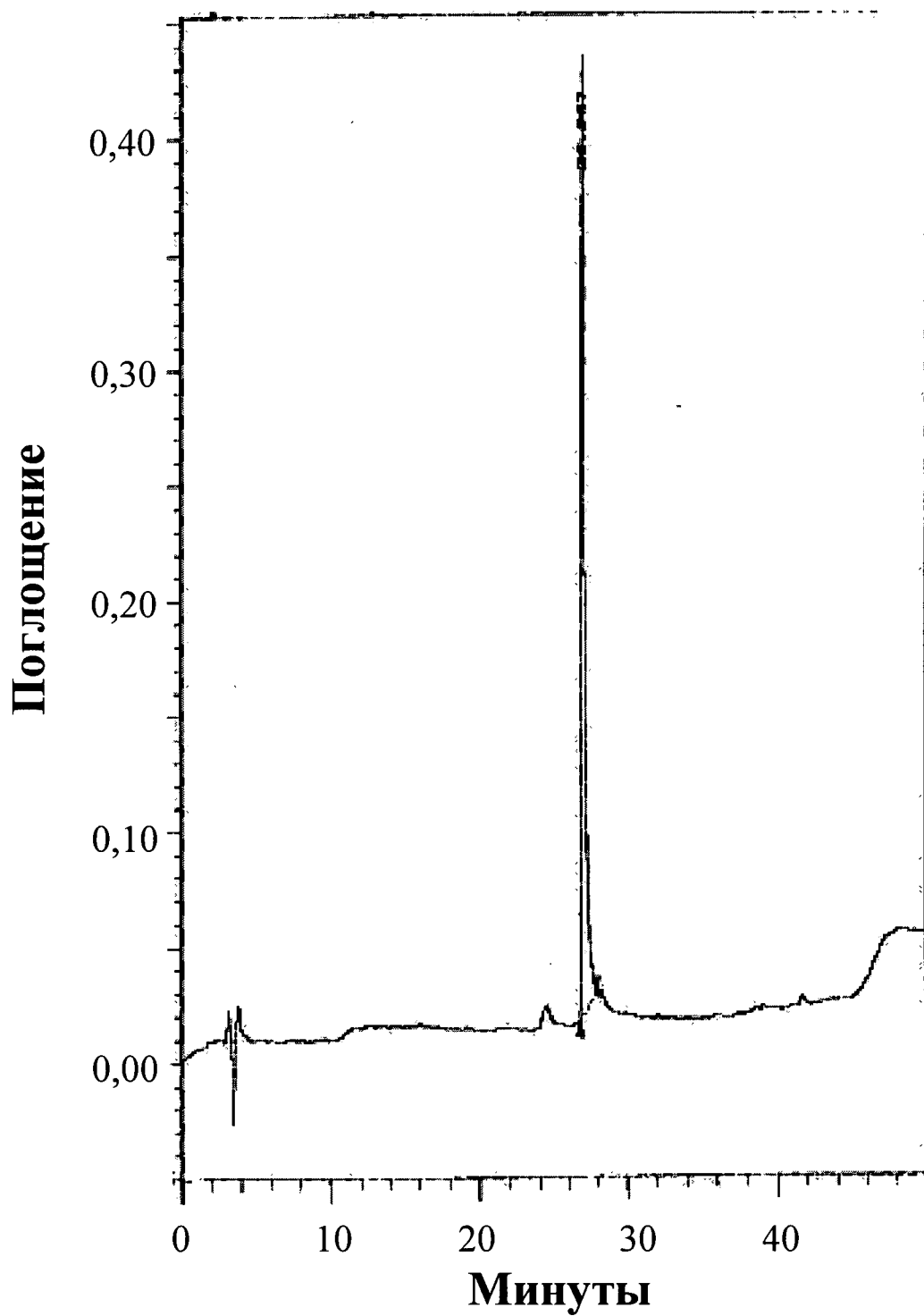
15. Способ по п. 13, где указанное введение элиминирует ВГС из организма указанного пациента на срок более, чем 3 месяца.
16. Набор для лечения инфекции ВГС, включающий:
 - a. первый контейнер, содержащий терапевтически эффективное количество лактоферрина человека, где указанный лактоферрин по существу не содержит железа;
 - b. второй контейнер, содержащий терапевтически эффективное количество интерферона.
17. Набор по п. 16, в котором указанный первый контейнер по существу не содержит нечеловеческого лактоферрина.
18. Набор по п. 17, в котором указанный лактоферрин человека имеет степень насыщения железом менее, чем приблизительно 5%.
19. Набор по п. 18, в котором указанный лактоферрин человека имеет кажущуюся молекулярную массу около 80 кДа.
20. Набор по п. 18, в котором указанный лактоферрин человека присутствует в количестве около 20 мг.
21. Набор по п. 16, где указанная инфекция ВГС представляет собой хроническую инфекцию ВГС.
22. Набор по п. 16, где указанный ВГС представляет собой ВГС генотипа 1b.

1/3



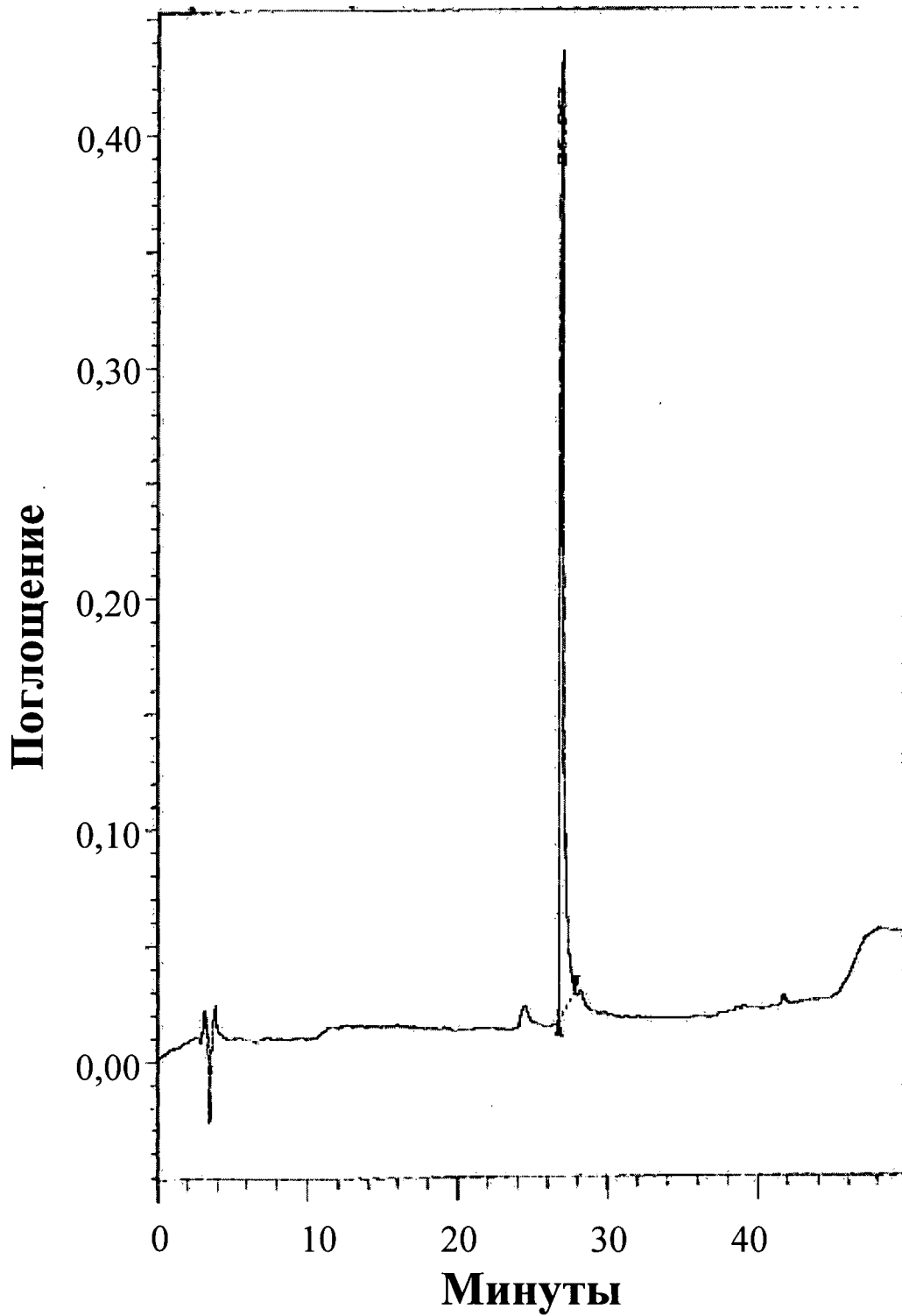
Фиг. 1

2/3



Фиг. 2

3/3



Фиг. 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/RU 2008/000109

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER *A61K 38/21 (2006.01)*
A61K 38/40 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K 38/21, 38/40, A61P 31/12, 31/14

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BD "PubMed" c 1977, Esp@cenet, EAPO

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	EP 1352657 A1 (MORINAGA MILK INDUSTRY CO., LTD) 15.10.2003, [0005], [0010], [0018], [0026], [0039]-[0042], the claims, the abstract	1-15 16-22
Y	WO/2005/016370 A (HOWARD J SMITH & ASSOCIATED PTY LTD) 24.02.2005, the claims	16-22
A	Baker EN et al Molecular structure, binding properties and dynamics of lactoferrin, Cell Mol Life Sci, 2005 Nov; 62(22), p. 2531-9, the abstract	1-22
A	Ishibashi Y et al Randomized placebo-controlled trial of interferon alpha -2b plus riba-irin with and without lactoferrin for chronic hepatitis C, Hepatol Res 2005 Aug;32(4)-218-23, the abstract	1-22

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
 "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 28 May 2008 (28.05.2008)	Date of mailing of the international search report 05 June 2008 (05.06.2008)
Name and mailing address of the ISA/ RU	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

ОТЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ

Международная заявка №
PCT/RU 2008/000109

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ: *A61K 38/21 (2006.01)*
A61K 38/40 (2006.01)
Согласно Международной патентной классификации МПК *A61P 31/12 (2006.01)*

В. ОБЛАСТИ ПОИСКА:

Проверенный минимум документации (система классификации с индексами классификации):
A61K 38/21, 38/40, A61P 31/12, 31/14

Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в поисковые подборки:

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины): базы данных размещенные в Интернете:
БД "PubMed" с 1977, Esp@cenet, ЕАРО

С. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ:

Категория*	Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
X	EP 1352657 A1 (MORINAGA MILK INDUSTRY CO., LTD) 15.10.2003, [0005], [0010], [0018], [0026], [0039]-[0042], формула, реферат	1-15
Y		16-22
Y	WO/2005/016370 A (HOWARD J.SMITH & ASSOCIATED PTY LTD) 24.02.2005, формула	16-22
A	Baker EN et al. Molecular structure, binding properties and dynamics of lactoferrin, Cell Mol Life Sci, 2005 Nov; 62(22), p. 2531-9, реферат	1-22
A	Ishibashi Y. et al. Randomized placebo-controlled trial of interferon alpha -2b plus riba- virin with and without lactoferrin for chronic hepatitis C, Hepatol Res.2005 Aug;32(4): 218-23, реферат	1-22

последующие документы указаны в продолжении графы С.

данные о патентах-аналогах указаны в приложении

* Особые категории ссылочных документов:

A документ, определяющий общий уровень техники и не считающийся особо релевантным

E более ранняя заявка или патент, но опубликованная на дату международной подачи или после нее

L документ, подвергающий сомнению притязание (я) на приоритет, или который приводится с целью установления даты публикации другого ссылочного документа, а также в других целях (как указано)

O документ, относящийся к устному раскрытию, использованно, экспонированию и т.д.

P документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета

T более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или приоритета, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение

X документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает новизной или изобретательским уровнем, в сравнении с документом, взятым в отдельности

Y документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает изобретательским уровнем, когда документ взят в сочетании с одним или несколькими документами той же категории, такая комбинация документов очевидна для специалиста

& документ, являющийся патентом-аналогом

Дата действительного завершения международного поиска: 28 мая 2008 (28.05.2008)

Дата отправки настоящего отчета о международном поиске:
05 июня 2008 (05.06.2008)

Наименование и адрес ISA/RU

ФГУ ФИПС
РФ, 123995, Москва, Г-59, ГСП-5, Бережковская наб.,
30,1
Факс: (499) 243-3337

Уполномоченное лицо:

И. Смирнова

Телефон № (495)730-7675