



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **121022** (13) **C2**
(51) МПК (2020.01)
A61K 38/05 (2006.01)
A61P 31/00

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2016 03054**
(22) Дата подання заявки: **01.09.2014**
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **25.03.2020**
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **2013140758**
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **03.09.2013**
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **RU**
(41) Публікація відомостей про заявку: **25.04.2016, Бюл.№ 8**
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **25.03.2020, Бюл.№ 6**
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: **PCT/RU2014/000656, 01.09.2014**

Винахідник(и):

(72) **Небольсін Владімір Євгенєвич (RU),
Єгоров Андрій Юрійович (RU)**

Власник(и):

**ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ
ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ
"ФАРМИТЕРПРАЙСЕЗ",**

Территория Сколково Инновационного
центра, бул. Большой, дом 42, строение 1,
офис 771-772, г. Москва, 121205, Россия,
(RU)

Представник:

**Бочаров Максим Анатолійович, реєстр.
№367**

(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
КОНСТАНТИНОВ Д.Ю. и др. Применение дикарбамина в лечении больных хроническим гепатитом С. Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии, 2011, № 5, стр. 58-63
НОСИК Н.Н. и др. Противовирусная и антистрессорная активность гамма-L-глутамилгистамина и его аналогов. Вопросы вирусологии, 2003, т. 48, № 1, с. 38-42
JUAN QIAN ET AL., "Pathogen Recognition Receptor Signaling Accelerates Phosphorylation-Dependent Degradation of IFNARI .", PLOS PATHOG., vol. 7, no. 6, page E1002065, XP055330613
RU 2141483 C1, 20.11.1999.
WO 2010/134851 A1, 25.11.2010
WEI-CHUN HUANGFU ET AL., "Cigarette smoking products suppress anti-viral affects of Type I interferon via phosphorylation-dependent downregulation of its receptor.", FEBS LETT (2008), vol. 582, no. 21-22, pages 3206-3210, XP025409120
YOUNG-HWA CHUNG, "Hepatitis B virus X protein inhibits extracellular IFN-[alpha]-mediated signal transduction by downregulation of type I IFN receptor", INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE, GR (20120103), doi:10.3892/ijmm.2012.879, ISSN 1107-3756, XP055361721 [A] 1-15 * results, discussion *
VLADIMIR V. ZARUBAEV ET AL., "Activity of Ingavirin (6-[2-(1H-Imidazol-4-yl)ethylamino]-5-oxo-hexanoic Acid) Against Human Respiratory Viruses in in Vivo Experiments", PHARMACEUTICALS (20111125), vol. 4, no. 12, doi:10.3390/ph4121518, pages 1518-1534, XP055361765 [A] 1-15 * results *
EP 2 604 264 A1, 19.06.2013

(54) СПОСІБ ПРОФІЛАКТИКИ АБО ЛІКУВАННЯ ЗАХВОРЮВАНЬ, ПОВ'ЯЗАНИХ ЗІ ЗНИЖЕНОЮ ГУСТИНОЮ ІНТЕРФЕРОНОВИХ РЕЦЕПТОРІВ**(57) Реферат:**

Винахід стосується медицини, зокрема способу профілактики і/або лікування захворювань, пов'язаних зі зниженою густиною інтерферонових рецепторів, що включає введення ефективної кількості глутарилгістаміну або його фармацевтично прийнятної солі. Вказане захворювання

UA 121022 C2

може являти собою гепатит В, герпес, папіломавірусну інфекцію або розсіяний склероз. Винахід також стосується фармацевтичної композиції для профілактики і/або лікування захворювань, пов'язаних зі зниженою густиною інтерферонових рецепторів, що містить ефективну кількість глутарилгістаміну або його фармацевтично прийнятної солі. Даний винахід вирішує задачу надання нового засобу, ефективного для подолання резистентності до терапії інтерферонами при захворюваннях, вибраних з групи, що включає гепатит В, герпес і папіломавірусну інфекцію.

Галузь техніки

Даний винахід стосується медицини, зокрема, застосування глутарилгістаміну або його фармацевтично прийнятної солі для профілактики або лікування захворювань, пов'язаних зі зниженою густиною інтерферонових рецепторів.

5 Рівень техніки

Інтерферони першого типу, які включають інтерферон α (IFN α) і інтерферон β (IFN β), є найважливішими факторами вродженого імунітету, які визначають захист організму від вірусної інфекції і пухлинного росту. Ці цитокіни несуть свою сигнальну функцію, взаємодіючи з одним рецептором на поверхні клітин. Рецептор являє собою гетеродимер, який складається з двох ланцюгів IFNAR1 і IFNAR2. Взаємодія інтерферонів з рецептором приводить до активації біохімічних ланцюгів, які починаються активацією Janus-кіназ Tyk2 і Jak1, які забезпечують фосфорилювання молекул-трансдукторів сигналу і активаторів транскрипції Stat1 і Stat2. Останні забезпечують транскрипцію інтерфероностимульованих генів, які кодують білки ефектори протівірусного захисту.

15 Сигнали інтерферонів є потужними стимулами, які змінюють гомеостаз, функцію і ділення різноманітних клітин організму, які мають інтерферонові рецептори. Неконтрольована взаємодія молекул інтерферону з рецепторами може мати токсичну, ушкоджуючу дію, як на клітини імунної системи, так і на весь організм. Наприклад, порушення регуляції інтерферонових сигналів приводить до розвитку такої патології, як системний червоний вовчак. У зв'язку з цим, інтенсивність інтерферонових сигналів суворо регулюється за рахунок різноманітних механізмів, але передусім, за рахунок модуляції/зниження густини інтерферонових рецепторів на поверхні клітин (Coccia EM, Uze G, Pellegrini S (2006) Negative regulation of type I interferon signaling: facts and mechanisms. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 52: 77-87). Цей фізіологічний механізм включає фосфорилювання, убіквітинування, ендоцитоз і подальшу деградацію субодиниці IFNAR1 рецептора в протеосомах клітини (Kumar KG, Krolewski JJ, Fuchs SY (2004) Phosphorylation and specific ubiquitin acceptor sites are required for ubiquitination and degradation of the IFNAR1 subunit of type I interferon receptor. *J Biol Chem* 279: 46614-46620).

Віруси використовують цей фізіологічний механізм в своїх інтересах, знижуючи інтенсивність проходження інтерферонового сигналу, в тому числі, за рахунок деградації інтерферонових рецепторів. Вплив патогенів може включати цілеспрямоване придушення інтерферонових рецепторів вірусними білками. Наприклад, вірус гепатиту В знижує густину інтерферонових рецепторів за допомогою білка X (Cho IR, Oh M, Koh SS, Malilas W, Srisuttee R, Jhun BH, Pellegrini S, Fuchs SY, Chung YH. Hepatitis B virus X protein inhibits extracellular IFN- γ -mediated signal transduction by downregulation of type I IFN receptor. *Int J Mol Med*. 2012 Apr; 29(4):581-6. doi: 10.3892/ijmm.2012.879. Epub 2012 Jan 3). Інші віруси, в число яких входять віруси герпесу, досягають ефекту зниження густини інтерферонових рецепторів через індукцію вірусами клітинного стресу (Liu J, HuangFu WC, Kumar KG et al. Virus-induced unfolded protein response attenuates antiviral defenses via phosphorylation-dependent degradation of the type I interferon receptor. *Cell Host Microbe* 2009; 5:72-83). Наприклад, віруси простого герпесу здатні ефективно знижувати густину інтерферонових рецепторів за рахунок деградації їх першої субодиниці - IFNAR1. (Qian J, Zheng H, Huang Fu WC, Liu J, Carbone CJ, Leu NA, Baker DP, Fuchs SY. Pathogen recognition receptor signaling accelerates phosphorylation-dependent degradation of IFNAR1. *PLoS Pathog*. 2011 Jun;7(6):e1002065. doi: 10.1371/journal.ppat.1002065. Epub 2011 Jun 9). Відомо, що сімейство вірусів герпесу представлене вісьмома типами вірусів герпесу, які викликають різні по тяжкості процеси захворювання у людей. Характерною особливістю захворювань є знаходження вірусів в організмі людини в латентному стані.

Схожість структури генома різних герпесвірусів зумовлює наявність загальних механізмів блокування передачі інтерферонових сигналів.

Іншим прикладом вірусної модуляції інтерферонових рецепторів при вірусній інфекції є порушення балансу субодиниць інтерферонового рецептора при папіломавірусному онкогенезі у жінок (Tirone NR, Peghini BC, Barcelos AC, Murta EF, Michelin MA. Local expression of interferon-alpha and interferon receptors in cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer Immunol Immunother*. 2009 Dec;58(12):2003-10. doi:10.1007/s00262-009-0707-6. Epub 2009 Apr 18. PubMed PMID: 19381629.)

Таким чином, гострі і хронічні вірусні інфекції супроводжуються придушенням системи інтерферону, в тому числі за рахунок прискореної деградації інтерферонових рецепторів (Qian J, Zheng H, Huang Fu WC, Liu J, Carbone CJ, Leu NA, Baker DP, Fuchs SY. Pathogen recognition receptor signaling accelerates phosphorylation-dependent degradation of IFNAR1. *PLoS Pathog*. 2011 Jun;7(6):e1002065. doi: 10.1371/journal.ppat.1002065. Epub 2011 Jun 9; 2008 Jun 15;197(1):54-62).

Хронічні інтоксикації організму, наприклад тютюнопаління, приводять до зниження густини інтерферонових рецепторів в клітинах респіраторного тракту, що приводить до підвищеної захворюваності курців вірусними захворюваннями і, можливо, ризику розвитку раку легень (Huang Fu WC, Liu J, Harty RN, Fuchs SY. Cigarette smoking products suppress anti-viral effects of Type I interferon via phosphorylation-dependent downregulation of its receptor. *FEBS Lett.* 2008 Sep 22;582(21-22):3206-10; Picaud S, Bardot B, De Maeyer E, Seif I. Enhanced tumor development in mice lacking a functional type I interferon receptor. *J Interferon Cytokine Res.* 2002 Apr;22(4):457-62).

У цей час лікування захворювань, які супроводжуються придушення системи інтерферону, проводиться за допомогою препаратів рекомбінантного (екзогенного) інтерферону. При цьому знижена чутливість уражених клітин до екзогенного інтерферону компенсується високими дозами препарату. Це приводить до токсичних ефектів інтерферонотерапії, зокрема, з розвитком депресивних синдромів (Patten SB. Psychiatric side effects of interferon treatment. *Curr Drug Saf.* 2006 May;1(2):143-50. Review. PubMed PMID: 18690925). У значній мірі, резистентність до терапії визначається зниженням рівня експресії інтерферонових рецепторів. Наприклад, при розсіяному склерозі спостерігається зниження рівня синтезу мРНК субодиниці інтерферонового рецептора IFNAR1, що приводить до зниження ефективності терапії інтерфероном β (Serana F, Sottini A, Ghidini C., Zanotti C., Capra R., Cordioli C., Caimi L., Imberti L. Modulation of IFNAR1 mRNA expression in multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol.* 2008 Jun 15;197(1):54-62).

Схожа ситуація спостерігається при інтерферонотерапії хронічних вірусних захворювань. Клітини, заражені вірусами, втрачаючи певну кількість інтерферонових рецепторів, стають нечутливими до інтерферонотерапії. Наприклад, ефект терапії інтерфероном-альфа при гепатиті В часто нетривалий, і захворювання переходить в стадію загострення, що супроводжується зростанням кількості копій вірусного генома в крові пацієнтів. Це означає, що частина вірус-інфікованих клітин в організмі не відповідала на терапію інтерфероном. З цієї ж причини препарати інтерферону не приводять до лікування організму від хронічної інфекції, що викликається різноманітними вірусами герпесу (Kroeker AL, Coombs KM. Systems biology unravels interferon responses to respiratory virus infections. *World J Biol Chem.* 2014 Feb 26;5(1):12-25. doi: 10.4331/wjbc.v5.i1.12. Review. PubMed PMID: 24600511; PubMed Central PMCID: PMC3942539); (Eron LJ, Toy C., Salsitz B, Scheer RR, Wood DL, Nadler PI. Therapy of genital herpes with topically applied interferon. *Antimicrob Agents Chemother.* 1987 Jul;31(7):1137-9. PubMed PMID: 3310870; PubMed Central PMCID: PMC174885).

Авторами винаходу несподівано виявлено, що ефективним способом лікування захворювань, що супроводжуються зниженням чутливості клітин до інтерферону, є терапія, спрямована на збільшення густини інтерферонових рецепторів на поверхні клітин. У цьому випадку, сенсibilізація клітин до сигналів енодогенного інтерферону може приводити до терапевтичного ефекту без застосування препаратів рекомбінантного інтерферону, або сприяти зниженню його терапевтичних доз.

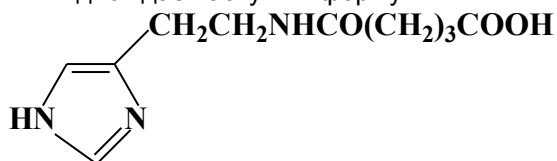
У цей час не існує засобу, здатного відновлювати або збільшувати густину інтерферонових рецепторів у разі їх деградації при різних патологічних станах. Автори даного винаходу несподівано виявили, що глутарилгістамін приводить до наростання синтезу матричних РНК інтерферонових рецепторів і збільшення густини самих рецепторів на поверхні клітин. Таким чином, глутарилгістамін здатний відновлювати і/або збільшувати густину інтерферонових рецепторів на поверхні клітин, що робить даний засіб перспективним для профілактики або лікування ряду захворювань. Засіб може застосовуватися як монотерапія вірусних захворювань, при якій досягається ефект збільшення чутливості клітин до низького рівня енодогенного інтерферону, за рахунок зростання густини інтерферонових рецепторів на поверхні клітин. Також, глутарилгістамін може застосовуватися в складі комплексної терапії з препаратами інтерферону, підвищуючи відповідь імуносупресованих клітин на екзогенний інтерферон.

Розкриття винаходу

Як показано авторами даного винаходу в експериментах, глутарилгістамін може застосовуватися при лікуванні і профілактиці захворювань, пов'язаних із зниженою густиною інтерферонових рецепторів. Такі захворювання являють собою, зокрема, гепатит В, герпес, папіломавірусну інфекцію і розсіяний склероз. При введенні глутарилгістаміну, за рахунок збільшення густини інтерферонових рецепторів на поверхні клітин, забезпечується посилення чутливості клітин до дії енодогенного інтерферону, що сприяє подоланню вірус-індукованої імуносупресії і забезпечує лікувальний ефект при вірусних інфекціях, таких як герпес 1-8 типів, гепатит В, папіломавірусна інфекція, а також при розсіяному склерозі. Крім того, долається резистентність до терапії інтерфероном при вищенаведених захворюваннях.

Встановлено, що терапевтичний ефект глутарилгістаміну не супроводжується токсичними реакціями і іншими побічними ефектами. Крім цього, глутарилгістамін, будучи речовиною низькомолекулярної природи, не може приводити до утворення нейтралізуючих антитіл.

З урахуванням викладеного, даний винахід стосується засобу для профілактики і/або лікування захворювань, пов'язаних зі зниженою густиною інтерферонових рецепторів, що являє собою глутарилгістамін, який відповідає наступній формулі



Винахід також включає спосіб профілактики або лікування захворювань, пов'язаних зі зниженою густиною інтерферонових рецепторів, що включає введення ефективної кількості глутарилгістаміну або його фармацевтично прийнятної солі.

Профілактика вказаних захворювань включає профілактику їх рецидиву або загострення.

Далі, винахід стосується фармацевтичної композиції для профілактики або лікування захворювань, пов'язаних зі зниженою густиною інтерферонових рецепторів, яка містить ефективну кількість глутарилгістаміну або його фармацевтично прийнятної солі.

Крім того, винахід включає набір для профілактики або лікування захворювань, пов'язаних зі зниженою густиною інтерферонових рецепторів, що включає вищевизначену композицію і інструкції по її застосуванню.

Далі, винахід стосується застосування глутарилгістаміну або його фармацевтично прийнятної солі для профілактики або лікування захворювань, пов'язаних зі зниженою густиною інтерферонових рецепторів.

Додатково, винахід включає застосування глутарилгістаміну або його фармацевтично прийнятної солі для виробництва фармацевтичної композиції для профілактики або лікування захворювань, пов'язаних зі зниженою густиною інтерферонових рецепторів.

Переважно, захворювання можуть бути вибрані з групи, яка включає гепатит В, герпес (зокрема, викликаний вірусами герпесу 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 або 8 типів), папіломавірусну інфекцію і розсіяний склероз.

Вищезгадані профілактика або лікування здійснюються за допомогою компенсації зниження рівня експресії інтерферонових рецепторів при тривалій терапії інтерферонами. Вказана профілактика або лікування можуть здійснюватися за допомогою подолання резистентності до терапії інтерферонами при захворюваннях, вибраних з групи, що включає гепатит В, герпес, папіломавірусну інфекцію і розсіяний склероз.

У конкретному варіанті здійснення, профілактика або лікування здійснюються за допомогою підвищення густини інтерферонових рецепторів при розсіяному склерозі при терапії інтерфероном β . Крім того, винахід включає профілактику імуносупресії при курінні тютюну, пов'язаної з деградацією інтерферонових рецепторів у курців, при цьому вказане лікування може бути направлене на подолання резистентності до інтерференової терапії у курців. Інтерферонові рецептори, відповідно до винаходу, являють собою рецептори інтерферону α (IFN α) і інтерферону β (IFN β).

Переважно, глутарилгістамін вводиться в твердій лікарській формі.

Глутарилгістамін або його солі можуть бути введені пацієнту в дозах, що складають від 0,1 до 100 мг/кг маси тіла людини на день, переважно в дозах від 0,1 до 30 мг/кг, більш переважно - в дозах від 0,3 до 10 мг/кг при прийомі один або більше разів на день. При цьому разова доза глутарилгістаміну може становити 100 мг. Тривалість прийому глутарилгістаміну може складати від 5 днів до 12 місяців.

Як фармацевтично прийнятні солі глутарилгістаміну в даному винаході можуть бути використані його солі з лужними і лужноземельними металами, переважно натрієва, калієва, літієва солі.

Глутарилгістамін або його солі вводять в ефективній кількості, яка забезпечує бажаний терапевтичний результат.

При цьому потрібно зазначити, що конкретна доза для кожного конкретного пацієнта буде залежати від багатьох чинників, таких як вік, вага тіла, стать, загальний стан здоров'я і режим харчування пацієнта, час і спосіб введення лікарського засобу, швидкість його виведення з організму, а також тяжкість захворювання у даного індивіда, що піддається лікуванню.

Фармацевтичні композиції за даним винаходом містять глутарилгістамін або його фармацевтично прийнятну сіль в кількості, ефективній для досягнення бажаного результату, і

можуть бути приготовані у вигляді стандартних лікарських форм (наприклад, в твердій, напівтвердій або рідкій формах), які містять глутарилгістамін або його сіль як активний інгредієнт в суміші з носієм або наповнювачем, придатним для внутрішньом'язового, внутрішньовенного, перорального, сублінгвального, інгаляційного, інтраназального, інтраректального і трансдермального застосування. Активний інгредієнт може бути включений в композицію разом зі звичайно використовуваними нетоксичними фармацевтично прийнятними носіями, придатними для виготовлення розчинів, таблеток, пілюль, капсул, драже, супозиторіїв, емульсій, суспензій, мазей, гелів, пластирів і будь-яких інших лікарських форм.

Як наповнювачі можуть бути використані різні речовини, такі як сахариди, наприклад глюкоза, лактоза або сахароза, маніт або сорбіт, похідні целюлози і/або фосфати кальцію, наприклад, трикальцій фосфат або кислий фосфат кальцію; як зв'язувальний компонент можуть бути використані такі, як крохмальна паста, наприклад, кукурудзяний, пшеничний, рисовий, картопляний крохмаль, желатин, трагакант, метилцелюлоза, гідроксипропілметилцелюлоза, натрій карбоксиметилцелюлоза і/або полівінілпіролідон. При необхідності можуть бути використані розпушувальні агенти, такі як вищезазначений крохмаль і карбоксиметилкрохмаль, поперечно зшитий полівінілпіролідон, агар або альгінова кислота або її сіль, така як альгінат натрію.

Можуть бути використані необов'язкові добавки, такі як агенти, які регулюють текучість, і мастильні агенти, такі як діоксид кремнію, тальк, стеаринова кислота і її солі, така як стеарат магнію або стеарат кальцію, і/або пропіленгліколь.

Як добавки можуть бути також використані стабілізатори, загусники, барвники і віддушки.

Як мацева основа можуть бути використані вуглеводневі мазеві основи, такі як вазелін білий і жовтий (Vaselinum album, Vaselinum flavum), вазелінове масло (Oleum Vaselini), мазь біла і рідка (Unguentum album, Unguentum flavum), а як добавки для надання більш густої консистенції - такі як твердий парафін і віск; абсорбтивні мазеві основи, такі як гідрофільний вазелін (Vaselinum hydrophylicum), ланолін (Lanolinum), кольдкрем (Unguentum leniens); мазеві основи, що змиваються водою, такі як гідрофільна мазь (Unguentum hydrophylum); водорозчинні мазеві основи, такі як поліетиленгліколева мазь (Unguentum Glycolis Polyaethyleni), бентонітові основи і інші.

Як основа для гелів можуть бути використані метилцелюлоза, натрієва сіль карбоксиметилцелюлози, оксипропілцелюлоза, поліетиленгліколь або поліетиленоксид, карбопол.

Як основа для супозиторію можуть бути використані основи, не розчинні у воді, такі як масло какао; основи, розчинні у воді або змішувані з водою, такі як желатино-гліцеринові або поліетиленоксидні; комбіновані основи - мильно-гліцеринові.

При приготуванні стандартної лікарської форми кількість активного інгредієнта, що використовується в комбінації з носієм, може варіюватися залежно від реципієнта, який піддається лікуванню, від конкретного способу введення лікарського засобу.

Так, наприклад, при використанні глутарилгістаміну або його солей у вигляді розчинів для ін'єкцій, вміст активного агента в них становить 0,1-5 %. Як розріджувачі можуть бути використані 0,9 % розчин хлориду натрію, дистильована вода, розчин новокаїну для ін'єкцій, розчин Рінгера, розчин глюкози, специфічні добавки для розчинення. При введенні в організм глутарилгістаміну або його солей у вигляді таблеток і супозиторіїв їх кількість становить 10-300 мг на стандартну лікарську форму.

Лікарські форми даного винаходу отримують по стандартних методиках, таких як, наприклад, процеси змішування, гранулювання, формування драже, розчинення і ліофілізації.

Потрібно зазначити, що при тривалому застосуванні глутарилгістаміну або його солей в терапевтичних дозах і в дозах, які на порядок перевищують терапевтичні, не виявлено негативних побічних дій.

Короткий опис фігур

Фіг. 1 - діаграма, яка ілюструє підвищення синтезу мРНК субодиниць інтерферонових рецепторів під впливом глутарилгістаміну в епітеліальних клітинах A549.

Фіг. 2 - діаграма, яка показує збільшення кількості білка субодиниць інтерферонових рецепторів під впливом глутарилгістаміну на поверхні первинної культури макрофагів людини.

Фіг. 3 - фотографія імуноблоту, яка демонструє ефект сенсibiлізації клітин до низьких концентрацій інтерферону при їх обробці глутарилгістаміном.

Здійснення винаходу

Далі приведений детальний опис експериментальних прикладів, які підтверджують ефективність глутарилгістаміну для профілактики і лікування захворювань відповідно до даного винаходу, де приведені приклади не призначені для обмеження об'єму винаходу.

Приклад 1

Рівень синтезу мРНК інтерферонових рецепторів під впливом глутарилгістаміну

Перетравлювана клітинна лінія A-549 була піддана обробці глутарилгістаміном в концентрації 100 нг/мл. Кількісне визначення копій матричної РНК інтерферонових рецепторів проводилося за допомогою ПЛР реального часу через 16 годин після обробки. Ізоляція РНК була проведена за допомогою набору RNeasy Kit (Quiagen). Препарат РНК оброблявся ДНКазою (RNase-free DNaseI (Ambion)). Зворотна транскрипція проводилася з використанням Thermoscript RT-PCR System (Invitrogen). Кількісна ПЛР проводилася з використанням праймерів: Ifnar1(forward) 5' CACTGACTGTATATTGTGTGAAAGCCAGAG 3', (reverse) 5' CATCTATACTGGAAGAAGGTTTAAGTGATG 3'; Ifnar2 (forward) 5' ATTTCCGGTCCATCTTATCAT 3', (reverse) 5'ACTGAACAACGTTGTGTTCC 3'.

Результати. Як видно з графіка (фігура 1), обробка клітин глутарилгістаміном приводила щонайменше до двократного збільшення синтезу мРНК субодиниці IFNAR1 і трикратного зростання кількості мРНК субодиниці IFNAR2 рецептора до інтерферону першого типу.

Приклад 2

Вплив глутарилгістаміну на густину інтерферонових рецепторів на поверхні первинних людських макрофагів

10-денна первинна культура людських макрофагів в 96-ямкових панелях інкубувалась протягом 24 годин в присутності глутарилгістаміну в концентраціях: 0,1, 1,0, 10 або 100 нг/мл або без нього. Потім клітини фіксували розчином параформальдегіду (без пермеабілізації), фіксовані клітини промивали фосфатним буферним розчином з детергентом (PBS-Tween), блокували розчином бичачого сироваткового альбуміну і інкубували з антитілами до субодиниць інтерферонового рецептора IFNAR1 або IFNAR2. Візуалізацію проводили шляхом фарбування препарату вторинними антитілами, міченими пероксидазою хрину і додаванням субстрату. Оптичну густину визначали за допомогою ELISA спектрофотометра.

Як видно з прикладу (фігура 2), обробка макрофагів глутарилгістаміном збільшувала густину обох ланцюгів інтерферонового рецептора на поверхні клітин, що відбивається в помітному підвищенні рівня сигналу при фарбуванні антитілами, специфічними до IFNAR2 і IFNAR1.

Приклад 3

Вплив глутарилгістаміну на чутливість клітин до інтерферону

Збільшення густини інтерферонових рецепторів на поверхні клітин повинно приводити до підвищення їх чутливості до слабких сигналів ендогенного інтерферону в умовах придушення його сигналіну при вірусній інфекції. Для демонстрації ефекту сенсibiliзації клітин до інтерферонових сигналів клітини A-549 обробляли глутарилгістаміном в концентрації 100 нг/мл і інкубували протягом 8 або 24 годин до проведення клітинного лізису в присутності або відсутності 1 МО інтерферону-альфа (IFN α : Roferon-A3®, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim). Клітинні лізати піддавали стандартній процедурі імуоблоту (вестерн-блот), використовуючи моноклональні антитіла проти MxA білка (sc-50509, Santa Cruz Biotechnology) для фарбування мембрани методом хемілюмінесценції, використовуючи субстрат (chemiluminescent reagent Super Signal West Femto Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific). Білок MxA був вибраний як індикаторний продукт, що свідчить про експресію інтерферон-стимульованих генів (ISGs) при обробці клітин інтерфероном.

Як видно з прикладу (фігура 3), за відсутності обробки інтерфероном, глутарилгістамін не спричиняв накопичення в клітинах противірусного білка MxA (доріжка 1,2,3). Інтерферон, в низькій концентрації 1 МО також не індукував синтез MxA білка (доріжка 4). У той же час клітини, одночасно оброблені глутарилгістаміном і інтерфероном, демонстрували збільшення синтезу MxA білка вже через 8 годин інкубації (доріжка 5), а також через 24 години після початку обробки клітин (доріжка 6). Таким чином, обробка клітин глутарилгістаміном приводила до посилення сигналіну інтерферону і, як наслідок, збільшення біосинтезу молекул ефекторів противірусного захисту.

Приклад 4

Терапевтична ефективність глутарилгістаміну на моделі герпетичного менінгоенцефаліту мишей

Мишей заражали вірусами простого герпесу ВПГ-1/КЛ і ВПГ-2/ВН інтрацеребрально в об'ємі 30 мкл, що містить 10 LD₅₀.

Вивчення лікувальної дії глутарилгістаміну здійснювали шляхом перорального введення препарату зараженим тваринам 1 раз на день в об'ємі 200 мкл в дозі 30 мг/кг, через 24, 48, 72, 96 і 120 год. після інфікування тварин вірусом. Мишам контрольної групи вводили в тих же умовах плацебо (200 мкл фізіологічного розчину). За тваринами спостерігали протягом 14 діб після зараження, враховуючи загибель мишей від герпетичного менінгоенцефаліту в групах

лікованих тварин і в контролі. Активність препарату оцінювали, порівнюючи летальність тварин, що приймали глутарилгістамін, з контрольною групою. Зниження летальності лікованих тварин відносно контролю виражали в процентах.

Показники захисту від смертності і тривалості життя лікованих, контрольних (інфікованих тварин, які не отримували глутарилгістамін) і інтактних мишей (негативний контроль) представлені в таблиці 1.

При лікуванні ВПГ-1/КЛ вірусної інфекції глутарилгістаміном відмічалася достовірне ($p=0,02$) зниження летальності з 95 % до 65 % і збільшення середньої тривалості життя з 4,8 до 8,1 діб. Аналогічно, лікування мишей, інфікованих вірусом ВПГ-2/ВН глутарилгістаміном приводило до статистично достовірного ($p=0,008$) зниження летальності вірусу з 85 % до 45 % зі збільшенням середньої тривалості життя з 6,1 до 10,2 діб. Для оцінки достовірності застосовувала тест Log-rank Mantel-Cox. Таким чином, було показано, що глутарилгістамін має лікувальну ефективність при терапії герметичної інфекції у мишей.

Експериментальна група	Летальність, %	Показник захисту, %	Тривалість життя, доба
			M ± σ
ВPG-1, штам КЛ			
Глутарилгістамін (30 мг/мл)	65,0*	31,6	8,1 ± 4,9
Контроль ВPG-1/КЛ	95,0	0,0	4,8 ± 3,1
ВPG-2, штам ВН			
Глутарилгістамін (30 мг/мл)	45,0**	47,1	10,2 ± 4,8
Контроль ВPG-2/ВН	85,0	0,0	6,1 ± 4,3
Негативний контроль	0,0	100,0	14 ± 0,0

* $P=0,02$

** $P=0,008$

Приклад 5

Виготовлення лікарських форм глутарилгістаміну

Лікарські форми глутарилгістаміну для використання відповідно до даного винаходу отримують по стандартних методиках, таких як, наприклад, процеси змішування, гранулювання, формування драже, розчинення і ліофілізація.

Таблетована форма

Таблетовану форму отримують, використовуючи приведені нижче інгредієнти:

Глутарилгістамін або його

фармацевтично прийнятна сіль 1-100 мг

Крохмаль картопляний 20-50 мг

Магнію стеарат 3 мг

Аеросил 1 мг

Лактоза до 300 мг

Компоненти змішують і пресують для утворення таблеток вагою 300 мг кожна.

Желатинові капсули

Глутарилгістамін або його сіль - 90 мг,

Лактоза (цукор молочний), крохмаль картопляний, кремнію діоксид колоїдний (аеросил), магнію стеарат - до отримання маси вмісту капсули 220 мг.

Вказані вище інгредієнти змішують, гранулюють, гранули вміщують в тверді желатинові капсули в кількості 220 мг.

Супозиторії

Приклад складу супозиторію:

Глутарилгістамін або його

фармацевтично прийнятна сіль 1-100 мг

Масло какао кількість, необхідна для

отримання супозиторію

При необхідності можливе виготовлення ректальних, вагінальних і уретральних супозиторіїв з відповідними наповнювачами.

Розчин для ін'єкцій

Приклад складу розчину для ін'єкцій:

Глутарилгістамін або його

фармацевтично прийнятна сіль 1-100 мг

Вода для ін'єкцій

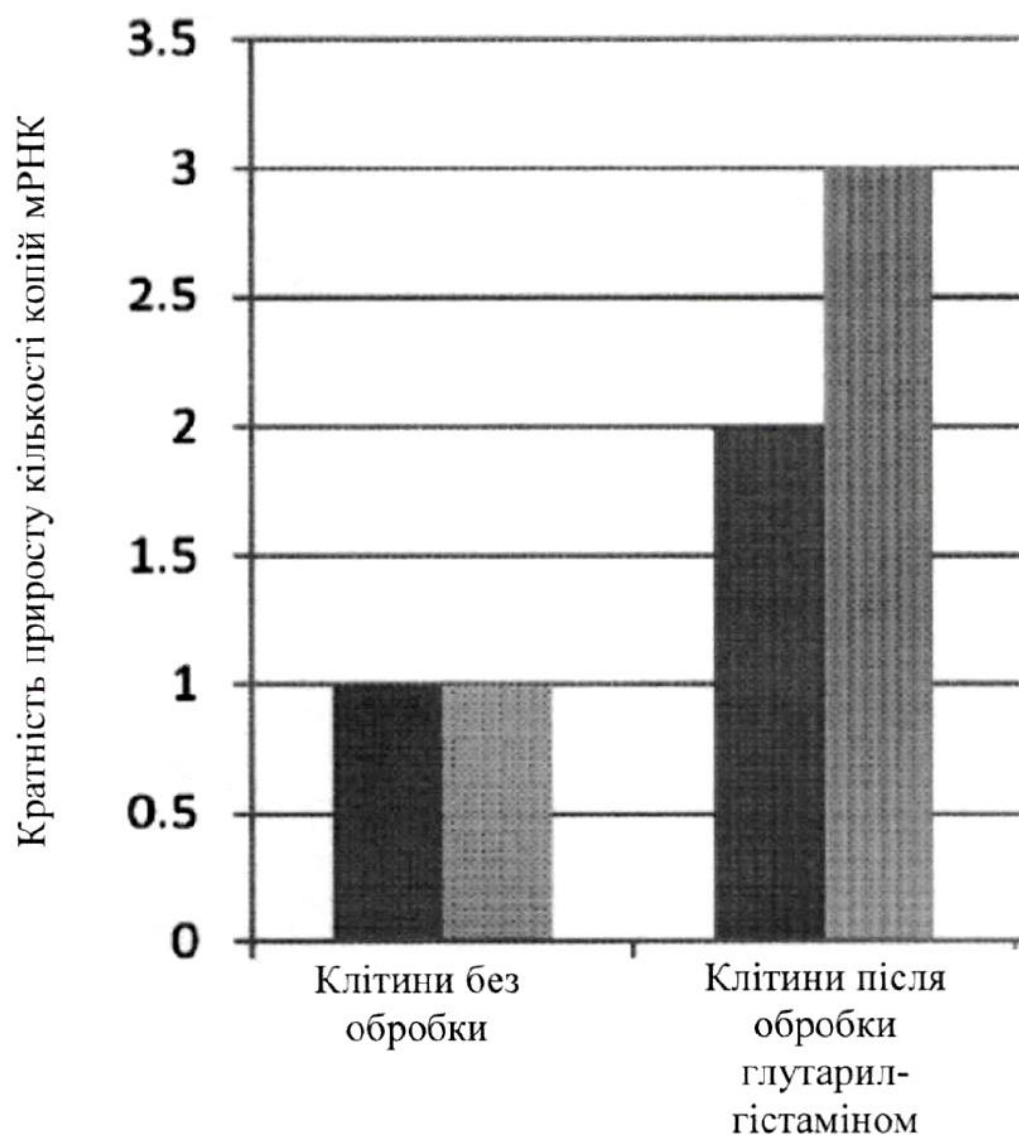
2 мл

Як розчинник при приготуванні розчину для ін'єкцій можуть бути використані - 0,9 % розчин натрію хлориду, дистильована вода, розчин новокаїну. Форма випуску - ампули, флакони, шприц-тюбики, "insert".

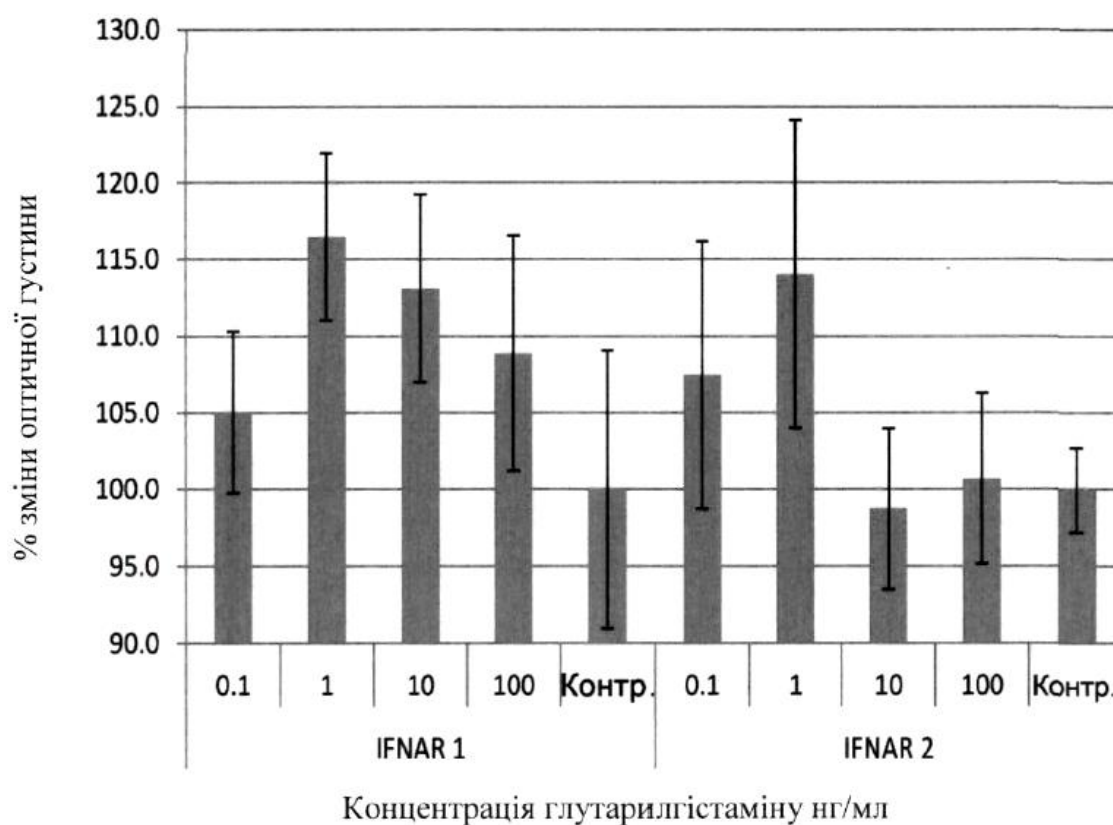
5

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

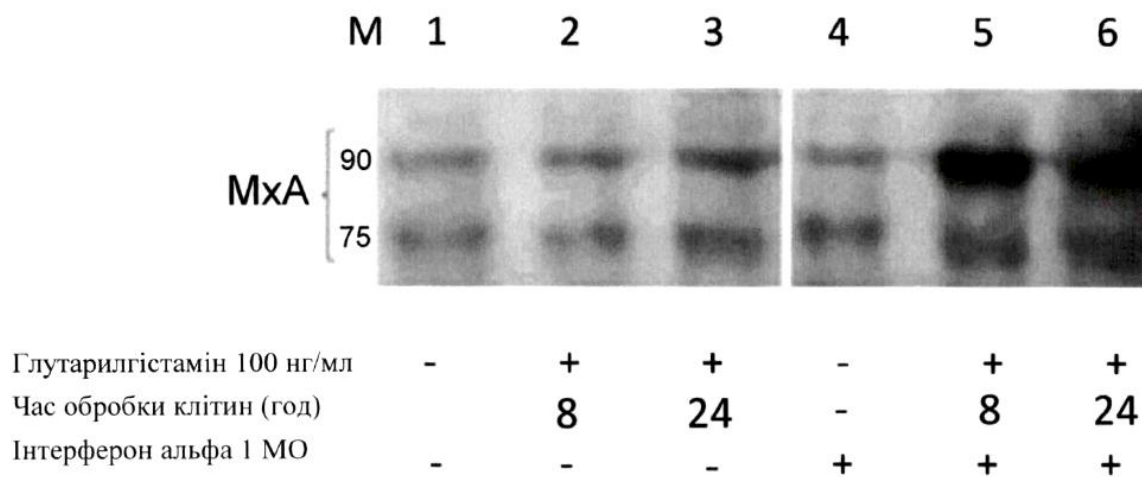
1. Спосіб збільшення густини інтерферонових рецепторів при профілактиці і/або лікуванні захворювання, пов'язаного зі зниженою густиною інтерферонових рецепторів, що включає введення ефективної кількості глутарилгістаміну або його фармацевтично прийнятної солі.
- 10 2. Спосіб за п. 1, в якому захворювання вибране з групи, що включає гепатит В, герпес, папіломавірусну інфекцію і розсіяний склероз.
3. Спосіб за п. 1, де вказане збільшення густини інтерферонових рецепторів долає резистентність до терапії інтерфероном і/або компенсує зниження рівня експресії інтерферонових рецепторів при тривалій терапії інтерфероном.
- 15 4. Спосіб за п. 1, де захворювання являє собою імуносупресію при курінні тютюну, пов'язану з деградацією інтерферонових рецепторів у курців.
5. Спосіб за п. 1, де інтерферонові рецептори являють собою рецептори інтерферону α (IFN α) і/або інтерферону β (IFN β).
- 20 6. Спосіб за п. 1, де глутарилгістамін вводиться в твердій лікарській формі, і тривалість прийому глутарилгістаміну складає від 5 днів до 12 місяців.
7. Спосіб за будь-яким з пп. 1-6, де доза глутарилгістаміну або його фармацевтично прийнятної солі складає від 0,1 до 100 мг/кг маси тіла людини на день, переважно від 0,1 до 30 мг/кг, більш переважно від 0,3 до 10 мг/кг при прийомі один або більше разів на день.
8. Спосіб за будь-яким з пп. 1-6, де разова доза глутарилгістаміну становить 100 мг.
- 25 9. Спосіб збільшення густини інтерферонових рецепторів при лікуванні захворювання, вибраного з групи, що включає гепатит В, герпес, папіломавірусну інфекцію і розсіяний склероз, що включає введення ефективної кількості глутарилгістаміну або його фармацевтично прийнятної солі.
10. Спосіб за п. 9, де глутарилгістамін вводиться в твердій лікарській формі, і тривалість прийому глутарилгістаміну складає від 5 днів до 12 місяців.
- 30 11. Спосіб за п. 9 або 10, де доза глутарилгістаміну або його фармацевтично прийнятної солі складає від 0,1 до 100 мг/кг маси тіла людини на день, переважно від 0,1 до 30 мг/кг, більш переважно від 0,3 до 10 мг/кг при прийомі один або більше разів на день.
12. Застосування фармацевтичної композиції, яка містить ефективну кількість глутарилгістаміну або його фармацевтично прийнятної солі, для збільшення густини інтерферонових рецепторів при профілактиці і/або лікуванні захворювання, пов'язаного зі зниженою густиною інтерферонових рецепторів.
- 35 13. Застосування за п. 12, де захворювання вибране з групи, що включає гепатит В, герпес, папіломавірусну інфекцію і розсіяний склероз.
14. Захворювання за п. 12, де вказане збільшення густини інтерферонових рецепторів долає резистентність до терапії інтерфероном і/або компенсує зниження рівня експресії інтерферонових рецепторів при тривалій терапії інтерфероном.
15. Застосування за п. 12, де інтерферонові рецептори являють собою рецептори інтерферону α (IFN α) і/або інтерферону β (IFN β).
- 45 16. Застосування за п. 12, де глутарилгістамін знаходиться в твердій лікарській формі.
17. Застосування за будь-яким з пп. 12-16, де доза глутарилгістаміну або його фармацевтично прийнятної солі складає від 0,1 до 100 мг/кг маси тіла людини на день, переважно від 0,1 до 30 мг/кг, більш переважно від 0,3 до 10 мг/кг при прийомі один або більше разів на день.
18. Застосування набору, який включає композицію, що містить ефективну кількість глутарилгістаміну або його фармацевтично прийнятної солі і інструкції з її застосування, для збільшення густини інтерферонових рецепторів при профілактиці і/або лікуванні захворювання, вибраного з групи, що включає гепатит В, герпес, папіломавірусну інфекцію і розсіяний склероз.
- 50



Фіг. 1



Фіг. 2



Фіг. 3

Комп'ютерна верстка Г. Паяльніков

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601