

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **040213**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2022.05.04**

**(21)** Номер заявки  
**201892254**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2017.04.07**

**(51)** Int. Cl. **A61K 36/81** (2006.01)  
**A61K 9/00** (2006.01)  
**A61P 25/34** (2006.01)

---

**(54) ЭКСТРАКТ ТАБАЧНОГО ЛИСТА И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ТАБАЧНОЙ ЗАВИСИМОСТИ**

---

**(31)** 1653079

**(32)** 2016.04.07

**(33)** FR

**(43)** 2019.04.30

**(86)** PCT/EP2017/058398

**(87)** WO 2017/174787 2017.10.12

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**НФЛ БИОСАЙЕНСИЗ (FR)**

**(72)** Изобретатель:  
**Лафон Брюно (FR)**

**(74)** Представитель:  
**Новоселова С.В., Хмара М.В.,  
Липатова И.И., Дощечкина В.В.,  
Осипов К.В., Ильмер Е.Г., Пантелеев  
А.С. (RU)**

**(56)** US-A1-2014343254  
WO-A2-2007128924  
US-A1-2009162403  
US-A1-2011151035  
DATABASE WPI Week 200843 Thomson  
Scientific, London, GB; AN 2008-G72621  
XP002764933, WANG W: "Aqueous solution  
containing nicotine for manufacturing smoking-  
cessation drug, preferably mouthwash, comprises  
tobacco extract.", & CN 101 085 104 A (WANG W)  
12 December 2007 (2007-12-12), abstract  
DATABASE WPI Week 201509 Thomson  
Scientific, London, GB; AN 2015-05622R  
XP002770629, & CN 104 151 140 A (WUHAN INST  
TECHNOLOGY) 19 November 2014 (2014-11-19),  
abstract  
US-A-5770698

---

**(57)** Изобретение относится к экстракту табачного листа, содержащему, в пересчете на общую массу экстракта, по меньшей мере 5 мас.% белков, по существу не содержащих молекул, молекулярная масса которых составляет менее 10 кДа. Изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей такой экстракт, и к ее применению в лечении табачной зависимости.

---

**B1**

**040213**

**040213 B1**

### Область техники

Настоящее изобретение относится к экстракту табачного листа, а также к фармацевтической композиции, содержащей этот экстракт табачного листа, и к ее применению для лечения табачной зависимости.

#### Предшествующий уровень техники

В общем, согласно определению Всемирной Организации Здравоохранения, зависимостью или пристрастием является "синдром, при развитии которого прием вещества приобретает гораздо большее значение, чем остальные занятия, которые ранее считались гораздо более важными. В своей экстремальной форме состояние зависимости характеризуется непреодолимой тягой к веществу, которая заставляет индивидуума, страдающего от зависимости, инстинктивно искать это вещество".

Табачная зависимость приводит к проблемам, связанным со здоровьем населения, вызывая большое количество обусловленных курением заболеваний, таких как рак (легких, гортани, рта, губ и т.д.), сердечно-сосудистые заболевания, хронический бронхит и т.д. Кроме способствования развитию самих заболеваний, курение имеет ряд побочных эффектов (снижение фертильности, изменения эпидермиса, изменения слизистой носоглотки, изменения мозговых артерий, повреждения пищевода и желудка, дефицит витаминов В и С и т.д.).

Существуют три вида табачной зависимости, которые наблюдаются одновременно: физическая зависимость, которая возникает в основном из-за наличия никотина в табаке и которая выражается в виде сильного желания (сильный позыв закурить, раздражительность, нервозность, возбуждение, беспокойство, нарушения сна и т.д.); физиологическая зависимость, которая связана с психотропным действием никотина, выражаемом в доставлении удовольствия и расслабления, в стимуляции интеллектуальной деятельности, снижении тревожности, противодействии депрессии и снижении аппетита; зависимость от окружения или поведенческая зависимость, которая определяется социальным давлением и настоянием друзей. В среднем, физическая зависимость исчезает в течение нескольких недель. Синдром отмены достигает максимальной интенсивности спустя приблизительно от трех до четырех суток после прекращения курения и может длиться несколько недель. Уменьшение физиологической зависимости происходит медленнее и может длиться несколько месяцев.

Табачная зависимость усиливается положительным и отрицательным подкреплением (условного рефлекса). Никотин вызывает высвобождение дофамина, нейромедиатора цепи удовольствия ("вознаграждения"). Курильщик курит как для воспроизведения ощущения удовольствия, вызываемого высвобождением дофамина (это положительное подкрепление влияния сигареты), так и для устранения синдрома отмены, когда уровень дофамина становится слишком низким (это отрицательное подкрепление влияния сигареты).

Существуют три основных способа фармакологического лечения табачной зависимости. Первый направлен на полное прекращение курения, начиная с заранее заданной даты, и в случае применения заменителей никотина фармакологическое лечение начинают после этой заранее назначенной даты прекращения курения, и в случае применения бупропиона или варениклина лечение начинают за неделю до этой даты (для достижения достаточной концентрации препарата в плазме крови на момент заранее заданной даты прекращения курения). Второй способ состоит в снижении потребляемого табака до начала прекращения курения, и при этом фаза уменьшения соответствует предварительной терапии, во время которой назначают фармакологическое лечение. Третий способ состоит в профилактике рецидива после успешного прекращения курения. К этим трем способам может быть добавлено постепенное сокращение без попыток остановки.

Эффективность каждого из этих способов усиливается фазой подготовки курильщика, который должен убедить себя в необходимости бросить курить, во время которой усиливается его мотивация. Таким образом, в указаниях по применению препаратов для фармакологического лечения табачной зависимости должно быть указано, что терапия при бросании курить с большей вероятностью будет успешной, если пациенты имеют мотивацию для прекращения курения.

В настоящее время имеется четыре основных типа лечения от табачной зависимости (которые не включают поведенческую психотерапию, акупунктуру и гипноз), а именно: применение заменителей никотина, применение бупропиона, применение варениклина и гомеопатия. Принцип действия каждого из этих четырех способов основан на том факте, что никотин представляет собой молекулу, определяющую механизм табачной зависимости.

Заменители никотина могут быть введены различными путями: трансдермально (через кожу) в виде пластырей, перорально в виде жевательной резинки, пастилок или подъязычных таблеток или через легкие в виде ингаляционных препаратов. Введение заменителей никотина в основном позволяет уменьшить отрицательное подкрепление, получаемое от сигареты, за счет максимального предотвращения у курильщика синдрома отмены, связанного с бросанием курить, за счет того, что никотин, содержащийся в заменителях, компенсирует никотин, содержащийся в сигаретах. Эффективность заменителей никотина зависит от применяемого способа, и обычно доля бросивших курить составляет от 15 до 20%. Заменители никотина применяют при попытках бросить курить сразу, а также при предварительном лечении перед попыткой бросить курить - они помогают курильщикам снизить потребление сигарет при постепен-

ном прекращении курения (снижение потребления до полного прекращения). Они также могут быть использованы с единственной целью снижения потребления табака. Их эффективность в профилактике рецидива до сих пор не была подтверждена.

Бупропион, коммерчески предоставляемый GlaxoSmithKline Laboratories (под торговым наименованием Zyban®), действует на определенные нейромедиаторы мозга, такие как катехоламины, норадреналин и дофамин. Бупропион представляет собой селективный ингибитор обратного захвата катехоламина, что придает ему свойства антидепрессанта. Его эффективность эквивалентна эффективности применения никотиновых пластырей (доля бросивших курить приблизительно 20%). Его прописывают реже, чем заменители никотина, поскольку он имеет меньшее отношение польза/риск при сравнимой эффективности. Действительно, его прием может приводить к попыткам суицида.

Варениклин, коммерчески предоставляемый Pfizer Laboratories (под торговым наименованием Chantix® или Champix®), является частичным агонистом никотиновых холинорецепторов. Варениклин связывается с этими рецепторами посредством двойного воздействия: как частичный агонист  $\alpha 4\beta 2$  рецептора он создает реакцию, аналогичную реакции, вызываемой никотином, но с меньшей интенсивностью (и, таким образом, уменьшает сильное желание при отмене); и в начале лечения, когда курильщик получает терапию, но при этом иногда курит, он подавляет нейрохимическую стимуляцию в присутствии никотина (частичный антагонист  $\alpha 4\beta 2$  рецептора). Таким образом, варениклин уменьшает отрицательное (эффект отмены) и положительное (позыв к курению) подкрепление от выкуривания сигарет. На практике варениклин уменьшает удовольствие от курения, что было бы критерием будущего успеха бросания курить. Его эффективность превышает эффективность заменителей никотина (доля бросивших курить составляет приблизительно 28%). Варениклин применяют при попытках резко бросить курить, а также при предварительной терапии в течение нескольких недель перед попыткой бросить курить, поскольку он помогает курильщикам снизить потребление сигарет, что частично помогает постепенно бросить курить (постепенное снижение потребления до нуля). В первом исследовании (NCT00789074) 35% курильщиков смогли уменьшить потребление сигарет по меньшей мере на 50% спустя 3 недели после начала предварительного лечения варениклином. Во втором исследовании (NCT00835900) процентное снижение количества выкуренных сигарет на момент времени 4 недели от начала предварительного лечения варениклином составило 42%. В третьем исследовании (NCT01370356) 47% курильщиков смогли снизить потребление сигарет по меньшей мере на 50% на момент времени 4 недели от начала предварительного лечения варениклином. Его эффективность в профилактике рецидива до сих пор не была подтверждена. Однако потребление варениклина часто приводит к возникновению побочных эффектов (тошнота) и может быть причиной проблем с сердцем или попыток суицида. Такие побочные эффекты означают, что, несмотря на эффективность, превышающую эффективность заменителей никотина, варениклин часто прописывают только в качестве вторичного лечения, после неудачи при использовании заменителей никотина.

Четвертый способ бросить курить - это гомеопатическая терапия, которая основана на применении чрезвычайно малых доз вещества, вызывающего симптомы, которые хотелось бы контролировать. Для того чтобы бросить курить, часто применяют экстракт растения "табак". Можно отметить, что в ирландской патентной заявке IE 960511 раскрыто применение гомеопатических разбавлений табачного экстракта для изготовления медицинского продукта, предназначенного для восстановления нейронных функций и облегчения синдрома отмены никотина. Как и другие нетрадиционные методики бросания курить, эта методика малоэффективна при лечении заядлых курильщиков.

Несмотря на интенсивные исследования в этой области, все еще имеется необходимость обнаружения новых способов лечения или усовершенствования существующих способов лечения от табачной зависимости.

В патентной заявке PCT/FR2007/000786 заявитель обнаружил, что инъекция водного раствора экстракта табачных листьев курильщику позволяет лечить табачную зависимость у этого курильщика. Такое открытие является абсолютно неожиданным, поскольку заявитель смог определить, что в этом водном экстракте табачного листа содержатся небольшие количества никотина. Таким образом, механизм действия при лечении табачной зависимости с помощью такого водного экстракта табачного листа не включает доставку никотина курильщику.

Однако тот факт, что указанный водный экстракт табачного листа содержит небольшие количества никотина, не дает информации о составе экстракта и способе его получения. Действительно, содержание никотина в водных экстрактах табачного листа может существенно варьироваться в зависимости от множества факторов.

Содержание никотина в табачных листьях основных типов выращиваемого табака может составлять от 0,5 до 8% (Davis и др., "Production, Chemistry, and Technology (Получение, химия и технология)", ISBN-13: 978-0632047918, Глава 8, стр. 275).

Табак Берлей содержит приблизительно в два раза больше никотина, чем табак Мэриленд, и в два раза больше никотина, чем табак восточной группы (Leffingwell, "Chemical constituents of tobacco leaf and differences among tobacco types (Химические составляющие табачного листа и различия между типами

табака)", *Leffingwell Reports*, том 1 (No. 2), февраль 2001).

Применение азотных удобрений влияет на содержание никотина в табачных листьях, и содержание никотина в верхних листьях превышает его содержание в средних листьях, которое, в свою очередь, превышает его содержание в нижних листьях (Xiao-Tang и др., "Yield and nicotine content of flue-cured tobacco as affected by soil nitrogen mineralization (Выход и содержание никотина в табаке дымовой сушки в зависимости от содержания азота в почве)", *Pedosphere* 18(2): 227-235, 2008, ISSN 1002-0160/CN 32-1315/P).

Чередование культур влияет на содержание никотина в табачных листьях (Butoras и др., "The Effect of Tobacco Monoculture and Crop Rotations on Tobacco Leaf Composition (Влияние монокультуры табака и чередования культур на состав табачных листьев)", *Agriculturae Conspectus Scientificus*, т. 69 (2004) No. 4 (95-101)).

На химический состав и содержание никотина в табачных листьях влияет ультрафиолетовое излучение и интенсивность освещения (Andersen и др., "Chemical composition of tobacco leaves altered by near-ultraviolet and intensity of visible light (Изменение химического состава табачных листьев под влиянием близкого ультрафиолета и интенсивности видимого света)", *Plant Physiol.* (1973) 51, 723-726).

Способы получения экстракта также влияют на содержание никотина, в особенности продолжительность и условия мацерации (вымачивания), способы стерилизации и физического и химического разделения.

Табачный экстракт, такой как экстракт, рассмотренный в патентной заявке PCT/FR2007/000786, включает молекулы с низкой молекулярной массой, т.е. с молекулярной массой менее 10 кДа. Такие низкомолекулярные молекулы включают табак-специфичные N-нитрозамины (англ. tobacco-specific N-nitrosamines, сокращенно TSNA) и N-нитрозаминокислоты, получаемые из нелетучих алкалоидов, летучих альдегидов, многоядерных ароматических углеводородов (таких как бензо[а]пирен), лактонов, уретанов или металлов, таких как, например, кадмий (см.: Wagner и др., *Plant Physiol.* 1986, 82, 274-279 и IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human (Монографии IARC по оценке риска развития рака у людей), т. 49). Эти соединения могут быть канцерогенными, мутагенными или токсичными и могут вызывать рак, а также поражения почек и костей. Таким образом, эти соединения вредны для здоровья пациента, которому была введена композиция, содержащая такие соединения.

Такой табачный экстракт включает множество белков с различными молекулярными массами. Например, в базе данных Swiss-Prot описано 759 табачных белков. Только один белок RuBisCO может составлять от 30 до 50% растворимых белков. Полный белок RuBisCO обычно содержит восемь субъединиц, образующих белковый комплекс массой приблизительно 540 кДа. Токсичность этих белков при подкожном введении в виде раствора неизвестна, и при этом не имеется указаний о том, что все они или их часть могут оказывать какое-либо терапевтическое действие.

Задача настоящего изобретения состоит в предоставлении эффективного лечения от табачной зависимости. Предпочтительно применяемая терапия нетоксична, хорошо переносится пациентами и включает ограниченные риски, максимально снижая вероятность введения молекул, токсичность которых неизвестна и которые по существу не обладают терапевтическим действием.

Несмотря на то, что табачные экстракты содержат тысячи соединений, заявителем неожиданно было обнаружено, что белки, содержащиеся в экстракте табачного листа, вызывают специфичную иммунную реакцию IgG, которая способствует бросанию курить. Таким образом, экстракт табачного листа согласно изобретению, имеющий высокое содержание белка и определенный белковый состав, вызывает специфичную иммунную реакцию IgG, которая способствует бросанию курить.

Это открытие тем более удивительно, поскольку водные экстракты табачного листа содержат тысячи соединений, среди которых белки составляют только один из классов соединений. Ранее не было известно, что белки табака оказывают влияние при табачной зависимости и, таким образом, не было причины применять их для того, чтобы бросить курить.

В частности, заявителем было показано, что экстракты табачного листа согласно изобретению имеют высокое содержание белка и определенный белковый состав. Этот определенный белковый состав может быть получен при использовании высушенных (провяленных, англ. cured) табачных листьев. Сушка (провяливание) способствует разрушению белков, например, посредством гидролитических механизмов и повышению содержания свободных аминокислот в табачных листьях (Hamilton & Lowe, 1978; Long & Weybrew, 1981; Burton и др., 1983).

Заявителем неожиданно было обнаружено, что белки, содержащиеся в экстрактах табачного листа согласно изобретению, вызывают выработку специфичных IgG антител, которые способствуют бросанию курить. Заявителем было показано, что введение экстракта табачного листа согласно изобретению вызывает специфичную иммунную реакцию IgG, которая способствует эффективному излечению от табачной зависимости, даже без добавления в экстракт вспомогательного лекарственного вещества, которое может усиливать иммунную реакцию. Заявителем было показано, что специфичная иммунная реакция IgG, лечение табачной зависимости и бросание курить особенно эффективны при использовании экстрактов высушенных табачных листьев.

Это открытие тем более удивительно, поскольку в предшествующем уровне техники не имеется

указаний на то, что IgG антитела, специфичные по отношению к белкам экстракта табачного листа, с большой долей вероятности помогают курильщикам снизить интенсивность курения или бросить курить. До настоящего времени не была описана ни активация специфичной иммунной реакции IgG после введения табачных экстрактов, ни роль табачных экстрактов при бросании курить. До настоящего времени не была описана такая связь между иммунной системой (которая, как известно, вырабатывает специфичные IgG антитела) и нервной системой (которая, как известно, участвует в восприятии акта курения и соответствующего поведения), которая может способствовать бросанию курить.

Предпочтительно лечение табачной зависимости согласно настоящему изобретению требует введения фармацевтической композиции согласно изобретению всего лишь несколько раз, предпочтительно требуется только одно введение, в результате чего подкрепляющий эффект от сигарет перестает чувствоваться пациентом или чувствуется значительно слабее, и, в частности, уменьшается позыв закурить (положительное подкрепление) и привлекательность сигарет.

#### **Сущность изобретения**

Первый аспект настоящего изобретения относится к экстракту табачного листа, содержащему по меньшей мере 5 мас.% белков от общей массы сухого экстракта, где молекулярная масса белков превышает 10 кДа, и белки по существу не содержат молекул, молекулярная масса которых составляет менее 10 кДа. Предпочтительно, белки выбраны из группы, состоящей из следующих семейств белков: лигнинообразующей анионной пероксидазы, глюкан-эндо-1,3-бета-глюкозидазы, эндохитиназы, связанного с патогенезом белка, осмотина и ингибитора протеиназы, а также их смесей.

Изобретение дополнительно относится к фармацевтической композиции, включающей экстракт табачного листа, и к ее применению в лечении табачной зависимости.

Изобретение дополнительно относится к фармацевтической композиции, включающей экстракт табачного листа, и к ее применению при бросании курить.

Изобретение дополнительно относится к способу лечения табачной зависимости, включающему введение экстракта табачного листа субъекту, страдающему табачной зависимостью или пристрастием к табаку.

Изобретение дополнительно относится к способу лечения табачной зависимости, включающему введение фармацевтической композиции, включающей экстракт табачного листа, субъекту, страдающему табачной зависимостью.

В контексте настоящего изобретения лечение табачной зависимости или пристрастия включает все формы потребления табака, а именно: курительного табака, в виде изготовленных или скрученных сигарет, сигарилл или сигар, трубочного табака, а также бездымного табака, такого как нюхательный табак, жевательный табак или снус.

Изобретение также относится к способу получения экстракта табачного листа, содержащего по меньшей мере 5 мас.% белков от общей массы сухого экстракта, где молекулярная масса белков превышает 10 кДа, и белки по существу не содержат молекул, молекулярная масса которых составляет менее 10 кДа, где способ включает следующие этапы:

- a) сушку (проявление) табачных листьев;
- b) размалывание высушенных табачных листьев до получения размолотых высушенных табачных листьев;
- c) экстракцию размолотых высушенных табачных листьев при механическом перемешивании растворителем, например водным растворителем, предпочтительно водным буферным раствором, pH которого составляет от 6,0 до 8,5;
- d) отделение твердых остатков от раствора экстракта размолотого высушенного табачного листа фильтрованием или центрифугированием, в результате чего получают твердый, не содержащий остатка раствор экстракта размолотого высушенного табачного листа;
- e) фильтрование при постоянном объеме раствора, полученного в этапе d, в присутствии растворителя, предпочтительно водного растворителя, взятого в количестве, составляющем от 2 до 12 объемов, предпочтительно от 3 до 10 объемов, предпочтительно от 4 до 8 объемов, предпочтительно 6 объемов, где объем равен объему экстракта, с помощью мембраны с граничным значением пропускания 10 кДа;
- f) необязательную лиофилизацию раствора белка, полученного на этапе e.

Изобретение также относится к набору, включающему фармацевтическую композицию, включающую экстракт табачного листа, содержащий по меньшей мере 5 мас.% белков от общей массы сухого экстракта, где молекулярная масса белков превышает 10 кДа, и белки по существу не содержат молекул, молекулярная масса которых составляет менее 10 кДа.

#### **Краткое описание графических материалов**

На фиг. 1 представлена картина электрофоретического разделения экстракта табачного листа согласно примеру 1: фракционирование на 4-12% геле NuPage в буфере MES (англ. 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid, рус. 2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота) и в присутствии восстановителя.

На фиг. 2 представлено индуцирование IgG после инъекции мышам экстракта табачного листа согласно примеру 1.

На фиг. 3 представлено иммунофенотипирование для получения характеристик активированных

иммунных клеток.

На фиг. 4 представлена активация естественных клеток-киллеров под действием экстракта табачного листа согласно примеру 1.

На фиг. 5 представлено воздействие экстракта табачного листа согласно примеру 1 на Т- и В-лимфоциты.

На фиг. 6 представлено возбуждение цитокинов воспаления и IFN $\gamma$  под действием экстракта табачного листа согласно примеру 1.

На фиг. 7 представлено возбуждение TNF2 цитокинов, хемокинов и гемопозитического фактора роста под действием экстракта табачного листа согласно примеру 1.

На фиг. 8 и 9 представлено изменение потребления табака пациентами, получавшими экстракт табачного листа согласно примеру 1.

### **Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения**

#### **Экстракт табачного листа**

Настоящее изобретение относится к экстракту табачного листа, содержащему, в пересчете на общую массу сухого экстракта, по меньшей мере 5 мас.%, предпочтительно по меньшей мере 10 мас.%, предпочтительно по меньшей мере 15 мас.%, предпочтительно приблизительно 20 мас.% белков, молекулярная масса которых превышает 10 кДа, которые по существу не содержат молекул, молекулярная масса которых составляет менее 10 кДа.

Сухой экстракт предпочтительно получен до проведения лиофилизации экстракта табачного листа согласно изобретению, затем помещен под вакуумный колокол, предпочтительно в присутствии P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, до достижения постоянной массы экстракта.

Предпочтительно, содержание молекул, молекулярная масса которых составляет менее 10 кДа, составляет менее 5 мас.% от общей массы экстракта, предпочтительно менее 2,5 мас.% и более предпочтительно менее 1 мас.%.

Согласно настоящему изобретению, "приблизительно" означает плюс или минус 1% и обусловлено неточностью измерений.

Содержание белков, молекулярная масса которых превышает 10 кДа, обычно определяемых в экстрактах табачного листа, составляет приблизительно 1%. Таким образом, экстракт табачного листа согласно настоящему изобретению имеет гораздо более высокое содержание белков, молекулярная масса которых превышает 10 кДа, чем в уже известных экстрактах.

Предпочтительно, белки, присутствующие в экстракте согласно настоящему изобретению, выбраны из группы, состоящей из следующих семейств белков: лигнинообразующей анионной пероксидазы, глюкан-эндо-1,3-бета-глюкозидазы, эндохитиназы, связанного с патогенезом белка, осмотина и ингибитора протеиназы, а также их смесей.

Наименования белков, присутствующих в экстракте согласно настоящему изобретению, соответствуют их наименованиям в базе данных Swiss-Prot, которая представляет собой биологическую базу данных, в которой приведены последовательности белков.

Согласно одному из примеров осуществления экстракт табачного листа согласно изобретению включает по меньшей мере один белок, принадлежащий семейству глюкан-эндо-1,3-бета-глюкозидаз и предпочтительно выбранный из кислотной изоформы PR-Q' бета-1,3-эндоглюканазы (PR36401 согласно базе данных UniProt), из основной вакуолярной изоформы GLB бета-1,3-эндоглюканазы (P27666 согласно базе данных UniProt) и их смесей.

Согласно одному из примеров осуществления экстракт табачного листа согласно изобретению включает по меньшей мере один белок, принадлежащий семейству эндохитиназ и предпочтительно выбранный из кислотной эндохитиназы P (P17513 согласно базе данных UniProt), кислотной эндохитиназы Q (P17514 согласно базе данных UniProt), эндохитиназы B (P24091 согласно базе данных UniProt) и их смесей.

Согласно одному из примеров осуществления экстракт табачного листа согласно изобретению включает по меньшей мере осмотин (P14170 согласно базе данных UniProt).

Согласно одному из примеров осуществления экстракт табачного листа согласно изобретению включает по меньшей мере одну лигнинообразующую анионную пероксидазу (P11965 согласно базе данных UniProt).

Согласно одному из примеров осуществления экстракт табачного листа согласно изобретению включает по меньшей мере один связанный с патогенезом белок, предпочтительно выбранный из связанного с патогенезом белка R (P13046 согласно базе данных UniProt), связанного с патогенезом белка PR-4A (PR29062 согласно базе данных UniProt), связанного с патогенезом белка PR-4B (PR29063 согласно базе данных UniProt) и их смесей.

Согласно одному из примеров осуществления экстракт табачного листа согласно настоящему изобретению включает по меньшей мере один белок, принадлежащий семейству ингибиторов протеиназы и предпочтительно выбранный из ингибитора протеиназы I-B (Q03199 согласно базе данных UniProt), ингибитора протеиназы I-A (Q03198 согласно базе данных UniProt) и их смесей.

Согласно одному из примеров осуществления экстракт табачного листа также включает полисахарид

риды, молекулярная масса которых превышает 10 кДа, которые предпочтительно растворимы в воде.

Предпочтительно, экстракт табачного листа согласно настоящему изобретению включает, в пересчете на общую массу сухого экстракта, по меньшей мере 5 мас.% предпочтительно по меньшей мере 10 мас.%, предпочтительно по меньшей мере 15 мас.%, предпочтительно приблизительно 20 мас.% белков, выбранных из группы, состоящей из следующих семейств белков: лигнинообразующей анионной пероксидазы, глюкан-эндо-1,3-бета-глюкозидазы, эндохитиназы, связанного с патогенезом белка, осмотина и ингибитора протеиназы, а также их смесей.

Согласно одному из примеров осуществления экстракт табачного листа согласно настоящему изобретению по существу не содержит высокомолекулярных белков.

Согласно настоящему изобретению термин "высокомолекулярный белок" относится к белку, молекулярная масса которого превышает 500 кДа, предпочтительно молекулярная масса которого превышает 400 кДа, предпочтительнее молекулярная масса которого превышает 300 кДа, более предпочтительно молекулярная масса которого превышает 200 кДа, еще более предпочтительно молекулярная масса которого превышает 150 кДа, и еще более предпочтительно молекулярная масса которого превышает 100 кДа.

Согласно одному из примеров осуществления экстракт табачного листа согласно настоящему изобретению по существу не содержит белков, молекулярная масса которых превышает 50 кДа.

Согласно настоящему изобретению фраза "по существу не содержит" означает, что содержание молекул составляет менее 15 мас.% от общей массы белков в экстракте, предпочтительно содержание молекул составляет менее 10 мас.% от общей массы белков в экстракте, более предпочтительно менее 7,5 мас.% от общей массы белков в экстракте, более предпочтительно менее 5 мас.% от общей массы белков в экстракте, предпочтительно менее 2,5 мас.% от общей массы белков в экстракте, более предпочтительно менее 1 мас.% от общей массы белков в экстракте и еще более предпочтительно менее 0,5 мас.% от общей массы белков в экстракте.

Предпочтительно, содержание высокомолекулярных белков составляет менее 15 мас.% от общей массы белков в экстракте, предпочтительно менее 10 мас.% от общей массы белков в экстракте, более предпочтительно менее 7,5 мас.% от общей массы белков в экстракте, более предпочтительно менее 5 мас.% от общей массы белков в экстракте, более предпочтительно менее 2,5 мас.% от общей массы белков в экстракте, более предпочтительно менее 1 мас.% от общей массы белков в экстракте и еще более предпочтительно менее 0,5 мас.% от общей массы белков в экстракте.

Согласно одному из примеров осуществления экстракт табачного листа согласно настоящему изобретению по существу не содержит белков RuBisCO.

Согласно одному из примеров осуществления листовой табак относится к виду *Nicotiana Tabacum* или к виду *Nicotiana Rustica*. Листья табака могут быть получены из коричневого или светлого табака, и табак может быть выбран из виргинского табака, табака Берлей, табака восточного типа, табака Латакия, черного табака из Луизианы, табака Мэриленд, табака Кентукки, калифорнийского табака, техасско-мексиканского табака и их смесей.

Разумеется, экстракт не обязательно состоит из чистого экстракта табачных листьев, и для лечения табачной зависимости и зависимости от марихуаны могут быть добавлены белки, экстрагированные из марихуаны.

Согласно одному из конкретных примеров осуществления экстракт табачного листа получают из смеси 1/1/1 коричневого табака, виргинского табака и табака Берлей, взятых в отношении 1/1/1.

Согласно одному из конкретных примеров осуществления экстракт табачного листа получают из табака Берлей.

Согласно одному из примеров осуществления экстракт табачного листа получают из высушенных (проявленных) табачных листьев.

Согласно одному из конкретных примеров осуществления экстракт табачного листа получают из табачных листьев, высушенных на воздухе (табачных листьев воздушной сушки).

Согласно одному из конкретных примеров осуществления экстракт табачного листа получают из табачных листьев воздушной сушки, высушенных в течение времени, подходящего для местных климатических условий, предпочтительно в течение минимального времени, составляющего один месяц.

Согласно настоящему изобретению "воздушная сушка (проявление)" или "сушка в естественных условиях" означает сушку, проводимую в присутствии обычного уличного воздуха или воздуха в помещении. Воздушная сушка может быть проведена в открытой или закрытой конструкции, имеющей или не имеющей навес. Воздушная сушка может, например, быть проведена в сарае для естественной сушки. В этом случае свежесобранные или предварительно подвяленные табачные листья оставляют сушиться под воздействием окружающего воздуха. Табачные листья можно, например, развесить в вентилируемых неотопливаемых сараях. Табачные листья можно, например, оставить сушиться в естественной среде до тех пор, пока они не станут коричневыми. На этом этапе в листе практически не остается сахаров. Предпочтительно, сушку проводят в течение времени, подходящего для местных климатических условий, предпочтительно в течение минимального времени, составляющего один месяц. Например, при сборе урожая в центральной Франции сушка может быть проведена в период времени между сентябрем и де-

кабром. В период сушки табачные листья можно переворачивать или аэрировать один или более раз, что обеспечивает равномерную сушку и позволяет избежать образования конденсата и подгнивания или разрушения листьев. Способ воздушной сушки может быть применен, например, для сушки табака сорта Берлей.

Согласно одному из конкретных примеров осуществления экстракта табачных листьев получают из табачных листьев, высушенных в сарае для естественной сушки.

Согласно другому конкретному примеру осуществления экстракта табачного листа получают из табачных листьев, высушенных в отопляемом сарае для сушки. В этом случае сушка может быть проведена в сарае или конструкции, нагреваемой до подходящей температуры.

Согласно другому конкретному примеру осуществления экстракта табачного листа получают из табачных листьев дымовой сушки. В этом случае сушка может быть проведена в конструкции или сарае, нагреваемом до подходящей температуры. Тепло может быть подведено к конструкции или сараю с помощью трубопроводов, соединенных с внешним источником тепла. В результате такого регулируемого нагревания получают желто-оранжевые листья. Получаемые таким образом листья имеют высокое содержание сахаров. Этим способом может быть высушен, например, виргинский табак.

Согласно другому конкретному примеру осуществления экстракта табачного листа получают из высушенных на солнце табачных листьев. В этом случае табачные листья могут быть разложены на подставках и выставлены на солнце в течение периода, составляющего от 12 до 30 суток. Под действием прямого солнечного света и тепла листья приобретают желтый или оранжевый цвет и сохраняют высокое содержание сахаров. Этим способом обычно сушат табачные листья восточного типа.

Согласно другому конкретному примеру осуществления экстракта табачного листа получают из табачных листьев огневой сушки. В этом случае под табачными листьями могут быть расположены небольшие кусочки горячей древесины, и в результате такой сушки листья приобретают "дымный" аромат.

Экстракт табачного листа согласно настоящему изобретению предпочтительно представляет собой водный экстракт.

Экстракт табачного листа согласно настоящему изобретению предпочтительно представляет собой водный экстракт коричневого цвета.

Предпочтительно, экстракт табачного листа может быть получен способом, включающим экстракцию растворителем, например водным растворителем, размолотых и высушенных табачных листьев, последующее отделение твердых остатков от раствора экстракта размолотого высушенного табачного листа, затем диафильтрацией при постоянном объеме раствора экстракта размолотого высушенного табачного листа, не содержащего твердых остатков, где диафильтрацию выполняют с помощью мембраны с граничным значением пропускания 10 кДа в присутствии водного растворителя, взятого в количестве, составляющем от 2 до 12 объемов, предпочтительно от 3 до 10 объемов, предпочтительно от 4 до 8 объемов, предпочтительно 6 объемов, где объем равен объему экстракта.

Разумеется, для проведения экстракции экстракта табачного листа могут быть выбраны другие типы растворителей. Экстракция, выполняемая на этапе с, может быть проведена с помощью органического или неорганического растворителя или с помощью смеси органических и/или неорганических растворителей.

Для обеспечения высокой эффективности и выхода экстракции и для получения высококачественного экстракта, имеющего требуемую чистоту и состав, специалист в данной области техники может с легкостью выбрать подходящий растворитель (растворители) с учетом следующих критериев:

- полярности растворителя или смеси растворителей (полярных или неполярных);
- физического состояния растворителя или смеси растворителей (например, жидкого, твердого, сверхкритического или газообразного);
- химической природы растворителя или смеси растворителей (например, органического или неорганического);
- заряда растворителя или смеси растворителей (например, ионных или неионных);
- происхождения растворителя или смеси растворителей;
- смесимости растворителя или смеси растворителей;
- растворимости растворителя или смеси растворителей.

На основании требуемого выхода экстракции, а также чистоты и состава экстракта специалист в данной области техники сможет определить методику подбора растворителя (растворителей), соответствующего названным критериям.

Предпочтительно, экстракт табачного листа согласно настоящему изобретению получают способом подготовки табачного листа, рассмотренным ниже.

#### Фармацевтическая композиция

Второй аспект настоящего изобретения относится к фармацевтической композиции, включающей в качестве действующего вещества экстракт табачного листа, рассмотренный выше.

Фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению дополнительно включает по меньшей мере одно фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, такое как фармацевтически приемлемые растворители, например, воду.



Предпочтительно, фармацевтическая композиция включает белки, присутствующие в экстракте табачного листа согласно изобретению, содержание которых составляет от 1 до 1000 мкг/мл, предпочтительно от 10 до 500 мкг/мл, предпочтительно от 50 до 300 мкг/мл, предпочтительно от 60 до 200 мкг/мл, предпочтительно от 80 до 150 мкг/мл.

Фармацевтическая композиция согласно изобретению предпочтительно представляет собой водную композицию.

Согласно одному из конкретных примеров осуществления фармацевтическая композиция может дополнительно включать активный компонент, усиливающий отрицательное подкрепление, такой как, например, заменитель никотина, варениклин или бупропион.

Согласно одному из примеров осуществления фармацевтическая композиция дополнительно включает вспомогательное средство. Примеры вспомогательных средств включают вещества, способствующие набуханию, такие как, например, сахар, такой как лактоза, сахароза, трегалоза, сорбит, глюкоза, раффиноза, маннит, предпочтительно лактозу, сахарозу, трегалозу, глюкозу или маннит, аминокислоту, такую как аргинин, глицин или гистидин, предпочтительно глицин, или полимеры типа декстрана или полиэтиленгликоля, или смеси перечисленных веществ. Согласно этому примеру осуществления фармацевтическая композиция включает от 50 до 99 мас.% вспомогательных средств, предпочтительно от 80 до 97 мас.% от общей массы фармацевтической композиции.

Согласно одному из конкретных примеров осуществления фармацевтическая композиция может дополнительно включать белки, экстрагированные из марихуаны.

Согласно одному из примеров осуществления фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению выполнена в форме, подходящей для подкожного введения.

Согласно другому примеру осуществления фармацевтическая композиция выполнена в форме, подходящей для введения с помощью адгезионной (клеякой или наклеиваемой) трансдермальной терапевтической системы. Предпочтительно, фармацевтическая композиция выполнена в форме пластыря.

Согласно другому примеру осуществления фармацевтическая композиция выполнена в форме, подходящей для введения распылением или выпариванием. Предпочтительно, фармацевтическая композиция выполнена в форме распылителя (пульверизатора), парового ингалятора или аэрозоля.

Фармацевтическая композиция согласно изобретению предпочтительно получена способом получения фармацевтической композиции, включающей экстракт табачного листа, который рассмотрен ниже.

#### Применение фармацевтической композиции

Третий аспект настоящего изобретения относится к применению фармацевтической композиции для лечения табачной зависимости.

Согласно настоящему изобретению "лечение табачной зависимости" или "лечение пристрастия к табаку" более конкретно означает уменьшение подкрепления, получаемого от сигареты, которое вызывает привыкание. Введение фармацевтической композиции согласно изобретению значительно снижает положительное подкрепление от сигареты и, в частности, позыв к курению.

Настоящее изобретение также относится к композиции, включающей экстракт табачного листа, раскрытый выше, для применения при лечении табачной зависимости.

Иными словами, настоящее изобретение также относится к способу лечения табачной зависимости или пристрастия, включающему введение композиции, включающей экстракт табачного листа, раскрытый выше.

Предпочтительно, введение композиции согласно изобретению позволяет пациенту бросить курить, снизить потребление табака или предотвратить рецидив после бросания за счет ослабления положительного подкрепления от табака и значительно снизить позыв к курению, что таким образом облегчает бросание курить. Предпочтительно, введение композиции позволит курильщику любого типа, т.е. включая заядлых курильщиков, бросить курить и снизить потребление табака или предотвратить рецидив после бросания.

Предпочтительно, введение композиции согласно изобретению, дополнительно включающей белки, экстрагированные из марихуаны, позволяет одновременно лечить зависимость или пристрастие к табаку и марихуане.

Согласно одному из примеров осуществления композицию согласно настоящему изобретению вводят посредством подкожной инъекции. Согласно этому примеру осуществления фармацевтическая композиция выполнена в форме, подходящей для подкожного введения.

Согласно одному из примеров осуществления фармацевтическая композиция выполнена в лекарственной форме объемом от 0,03 до 10 мл, предпочтительно от 0,1 до 5 мл, предпочтительно от 0,5 до 2 мл. Таким образом, фармацевтическую композицию предпочтительно вводят посредством подкожной инъекции в количестве, составляющем от 0,03 до 10 мл, предпочтительно от 0,1 до 5 мл, предпочтительно от 0,5 до 2 мл.

Согласно одному из примеров осуществления композицию согласно настоящему изобретению вводят с помощью адгезионной (клеякой) трансдермальной терапевтической системы, содержащей экстракт табачного листа, раскрытый выше. Согласно этому примеру осуществления, фармацевтическая композиция выполнена в форме, подходящей для введения с помощью адгезионной трансдермальной терапевти-

ческой системы. Предпочтительно, фармацевтическая композиция выполнена в форме пластыря.

Пластырь может быть выполнен в виде пластыря резервуарного типа, содержащего одно или более отделений, или пластыря матричного типа. Практическое воплощение пластырей может быть определено специалистом в данной области техники на основании его общих знаний в данной области с целью достижения контролируемого и продолжительного системного введения экстракта табачного листа в течение всего периода ношения пластыря, например в течение времени, составляющего от приблизительно 2 до 24 ч.

Пластырь резервуарного типа включает один или более отдельных резервуаров, содержащих действующее вещество (вещества) (включая экстракт табачного листа) в растворе или суспендированное в полимерной матрице, которое контактирует с кожным покровом через полупроницаемую полимерную мембрану, что позволяет регулировать скорость высвобождения действующего вещества (веществ).

Пластырь матричного типа включает полимерную массу, внутри которой в подходящих пропорциях растворено или диспергировано действующее вещество (вещества). Такие действующие вещества высвобождаются, диффундируя через полимерные цепочки матрицы.

В одном из конкретных примеров осуществления пластыря этого типа клеящее вещество покрывает всю высвобождающую поверхность матрицы и представляет собой ее неотъемлемую часть. Таким образом, этот пластырь представляет собой пластырь с клеящим веществом активного типа, хорошо известный специалистам в данной области техники, изготовление которого отличается упрощенной схемой и позволяет получать тонкие, достаточно гибкие пластыри, комфортно размещаемые на коже пациента.

Для обеспечения хорошего проникновения названных действующих веществ под кожу или в кровоток с подходящей дозировкой, с подходящей скоростью диффузии и в течение подходящего периода времени специалист в данной области техники может установить следующие параметры:

- отношение площадей поверхности и объемов каждого из отделений пластыря;
- необязательное добавление одной или более гидрофильных добавок;
- необязательное добавление одного или более активаторов или ингибиторов диффузии;
- необязательное добавление одного или более солибилизаторов;
- необязательное добавление одного или более стабилизаторов;
- необязательное добавление одного или более стимуляторов абсорбции; и

в более общем случае добавление всех типов добавок, хорошо известных специалистам в данной области техники, которые позволяют успешно регулировать поток и стабильность экстракта табачного листа.

Специалист в данной области техники должен уметь выбирать методику для установления перечисленных выше параметров в зависимости от требуемой растворимости и стабильности.

Различные параметры способа изготовления пластыря могут быть легко адаптированы специалистом в данной области техники для получения требуемой дозировки.

Как известно в данной области техники, такой пластырь включает съемную защитную пленку, которая предназначена для защиты клеящей стороны, накладываемой на кожный покров, после изготовления пластыря и в течение периода его хранения. Как известно в данной области техники, специалист может, например, применять пленки из сложного полиэфира, одна из сторон которых может быть обработана кремнийорганическими полимерами, препятствующими склеиванию.

Согласно другому примеру осуществления композицию согласно настоящему изобретению вводят с помощью системы для распыления или выпаривания, содержащей экстракт табачного листа, раскрытый выше. Согласно этому примеру осуществления фармацевтическая композиция выполнена в форме, подходящей для введения распылением или выпариванием. Предпочтительно, фармацевтическая композиция выполнена в форме распылителя (пульверизатора), парового ингалятора или контейнера для аэрозоля.

Распылитель, паровой ингалятор или контейнер для аэрозоля может быть изготовлен в виде распылителя, парового ингалятора или контейнера для аэрозоля, имеющего резервуар, включающий одно или более отделений. Практическое воплощение распылителей, паровых ингаляторов или контейнеров для аэрозоля может быть определено специалистом в данной области техники на основании его общих знаний в данной области с целью достижения контролируемого и продолжительного системного введения экстракта табачного листа.

Распылитель, паровой ингалятор или контейнер для аэрозоля имеет один или более отдельных резервуаров, содержащих действующее вещество (вещества) (включающее экстракт табачного листа) в растворе или суспензии. Действующее вещество (вещества) вводят распылением или выпариванием на обрабатываемый участок тела. Распыление или выпаривание может быть произведено, например, на кожный покров. Действующее вещество (вещества) может быть введено распылением или выпариванием на слизистые оболочки.

Для обеспечения хорошего проникновения названных действующих веществ под кожу или в кровоток с подходящей дозировкой, с подходящей скоростью диффузии и в течение подходящего периода времени, специалист в данной области техники может с легкостью установить следующие параметры:

- отношение площадей поверхности и объемов каждого отделения или резервуара распылителя, па-

рового ингалятора или контейнера для аэрозоля;

необязательное добавление одной или более гидрофильных добавок;

необязательное добавление одного или более активаторов или ингибиторов диффузии;

необязательное добавление одного или более солибилизаторов;

необязательное добавление одного или более стабилизаторов;

необязательное добавление одного или более стимуляторов абсорбции; и

в более общем случае, добавление всех типов добавок, хорошо известных специалистам в данной области техники, которые позволяют успешно регулировать поток и стабильность экстракта табачного листа.

Специалист в данной области техники должен уметь выбирать методику для установления перечисленных выше параметров в зависимости от требуемой растворимости и стабильности.

Различные параметры способа изготовления распылителя, парового ингалятора или контейнера для аэрозоля могут быть легко адаптированы специалистом в данной области техники для получения требуемой дозировки.

Согласно первому примеру осуществления фармацевтическая композиция выполнена в форме, предназначенной только для однократного введения. Согласно этому примеру осуществления, фармацевтическую композицию вводят только один раз, осуществляя таким образом снижение или подавление положительного подкрепления от табака и значительно снижая позыв к курению.

Согласно другому примеру осуществления фармацевтическая композиция выполнена в форме, предназначенной для многократного введения, предпочтительно два или три раза. Согласно этому примеру осуществления фармацевтическую композицию предпочтительно вводят в 0 и 10-е сутки или в 0, 10-е и 30-е сутки, осуществляя таким образом снижение или подавление положительного подкрепления от табака и значительно снижая позыв к курению. В этом примере осуществления дозировка, вводимая второй раз и необязательно третий раз, идентична дозировке, введенной первый раз.

Согласно одному из конкретных примеров осуществления фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может быть введена вместе с композицией, включающей активный компонент, усиливающий отрицательное подкрепление, такой как заменитель никотина, варениклин, бупропион или их смеси. Согласно этому примеру осуществления могут рассматриваться несколько специфических вариантов введения:

(i) введение фармацевтической композиции согласно изобретению перед попыткой бросить курить с целью снижения потребления сигарет и последующее введение активного компонента, действующего на отрицательное подкрепление, с целью ограничения действия отрицательного подкрепления и, в частности, синдрома отмены;

(ii) совместное введение фармацевтической композиции согласно изобретению и активного компонента, воздействующего на отрицательное подкрепление, во время попытки бросить курить для того, чтобы немедленно бросить курить;

(iii) введение активного компонента, воздействующего на отрицательное подкрепление, во время попытки бросить курить, например в течение 12 недель с начала попытки бросить курить, и последующее введение фармацевтической композиции согласно изобретению, например в течение 2 недель с окончания введения активного компонента, воздействующего на отрицательное подкрепление, для профилактики рецидивов.

#### Получение экстракта табачного листа

Четвертый аспект настоящего изобретения относится к получению экстракта табачного листа согласно настоящему изобретению.

Предпочтительно, способ получения экстракта табачного листа согласно настоящему изобретению включает следующие этапы:

a) сушку (проявление) табачных листьев,

b) размалывание высушенных табачных листьев до получения размолотых высушенных табачных листьев,

c) экстракцию размолотых высушенных табачных листьев при механическом перемешивании растворителем, например водным растворителем, предпочтительно водным буферным раствором, pH которого составляет от 6,0 до 8,5,

d) отделение твердых остатков от раствора экстракта размолотого высушенного табачного листа фильтрованием или центрифугированием, в результате чего получают твердый, не содержащий остатка раствор экстракта размолотого высушенного табачного листа,

e) фильтрование при постоянном объеме раствора, полученного в этапе d, в присутствии растворителя, предпочтительно водного растворителя, взятого в количестве, составляющем от 2 до 12 объемов, предпочтительно от 3 до 10 объемов, предпочтительно от 4 до 8 объемов, предпочтительно 6 объемов, где объем равен объему экстракта, с помощью мембраны с граничным значением пропускания 10 кДа,

f) необязательную лиофилизацию раствора белка, полученного в этапе e.

Согласно одному из конкретных примеров осуществления сушка этапа a, проводимая на открытом воздухе, называется естественной сушкой. В этом случае сушку проводят в присутствии обычного воз-

духа, на улице или в помещении. Сушка может происходить в открытой или закрытой конструкции, имеющей или не имеющей навес. Воздушная сушка может, например, быть проведена в сарае для естественной сушки. В этом случае свежесобранные или предварительно подвяленные табачные листья остаются сушиться под воздействием окружающего воздуха. Табачные листья можно, например, развесить в вентилируемых неотапливаемых сараях. Табачные листья можно, например, оставить сушиться в естественной среде до тех пор, пока они не станут коричневыми. На этом этапе в листе практически не остается сахаров. Предпочтительно, сушку проводят в течение времени, подходящего для местных климатических условий, предпочтительно в течение минимального времени, составляющего один месяц. Например, при сборе урожая в центральной Франции сушка может быть проведена в период времени между сентябрем и декабрем. В период сушки табачные листья можно переворачивать один или более раз, что обеспечивает равномерную сушку и позволяет избежать образования конденсата и подгнивания или разрушения листьев. Способ воздушной сушки может быть применен, например, для сушки табака сорта Берлей. Согласно одному из конкретных примеров осуществления сушку этапа а проводят в сарае для естественной сушки.

Согласно другому конкретному примеру осуществления, сушку этапа а проводят в нагреваемом сарае для сушки. В этом случае сушка может быть проведена в сарае или конструкции, нагреваемой до подходящей температуры.

Согласно другому конкретному примеру осуществления сушку этапа а выполняют посредством дымовой сушки. В этом случае сушка может быть проведена в конструкции или сарае, нагреваемом до подходящей температуры. Тепло может быть подведено к конструкции или сараю с помощью трубопроводов, соединенных с внешним источником тепла. В результате такого регулируемого нагревания получают желто-оранжевые листья. Получаемые таким образом листья имеют высокое содержание сахаров. Этим способом может быть высушен, например, виргинский табак.

Согласно другому конкретному примеру осуществления сушку этапа а выполняют посредством сушки на солнце. В этом случае табачные листья могут быть разложены на подставках и выставлены на солнце в течение периода, составляющего от 12 до 30 суток. Под действием прямого солнечного света и тепла листья приобретают желтый или оранжевый цвет и сохраняют высокое содержание сахаров. Этим способом обычно сушат табачки восточного типа.

Согласно другому конкретному примеру осуществления сушку этапа а выполняют посредством огневой сушки. В этом случае под табачными листьями могут быть расположены небольшие кусочки горящей древесины, и в результате такой сушки листья приобретают "дымный" аромат.

Предпочтительно, сушка этапа а способствует разрушению высокомолекулярных белков табака, таких как, например, RuBisCO, под действием гидролитических механизмов.

Этапы с-е соответствуют этапам экстракции, фильтрованию и диафильтрации, подобным этапам, рассмотренным в патенте US 5770698 (от колонки 6, строка 47 до колонки 7, строка 7) и в патентной заявке US 2009/0162403 (абзацы с [0032] по [0040]).

Предпочтительно, экстракцию этапа с выполняют при температуре, составляющей от 4 до 20°C, предпочтительно от 4 до 10°C.

Предпочтительно, экстракцию этапа с выполняют в течение времени, составляющего от 12 до 36 ч, предпочтительно от 22 до 26 ч, предпочтительно в течение 24 ч.

Согласно одному из конкретных примеров осуществления растворитель, применяемый в этапе с, представляет собой водный растворитель. Предпочтительно, водный растворитель, применяемый в этапе с, представляет собой водный буферный раствор бикарбоната аммония, предпочтительно в концентрации, составляющей от 2 до 6 г/л, предпочтительно составляющей 4 г/л.

Разумеется, для проведения экстракции этапа с могут быть применены растворители других типов. Экстракция этапа с может быть выполнена органическим или неорганическим растворителем или смесью органических и/или неорганических растворителей.

Для обеспечения высокой эффективности и высокого выхода экстракции и для получения высококачественного экстракта, имеющего требуемую чистоту и состав, специалист в данной области техники может с легкостью подобрать подходящий растворитель (растворители) на основании следующих критериев:

- полярности растворителя или смеси растворителей (полярных или неполярных);
- физического состояния растворителя или смеси растворителей (например, жидкого, твердого, сверхкритического или газообразного);
- химической природы растворителя или смеси растворителей (например, органических или неорганических);
- заряда растворителя или смеси растворителей (например, ионных или неионных);
- происхождения растворителя или смеси растворителей;
- смесимости растворителя или смеси растворителей;
- растворимости растворителя или смеси растворителей.

На основании требуемого выхода экстракции, а также чистоты и состава экстракта специалист в данной области техники сможет определить методику подбора растворителя (растворителей), соответст-

вующего названным критериям.

Предпочтительно, экстракцию этапа с выполняют суспендированием размолотых и высушенных табачных листьев в буферном растворе; предпочтительно концентрация размолотых и высушенных табачных листьев в буферном растворе составляет от 30 до 70 г/л, предпочтительно от 40 до 60 г/л и более предпочтительно она составляет 50 г/л. Затем для получения размолотых и высушенных табачных листьев, не содержащих твердого остатка, суспендированные твердые остатки удаляют фильтрованием, например фильтрованием на воронке Бюхнера (этап d).

Предпочтительно, водный растворитель, применяемый в этапе d, представляет собой воду для инъекций (сокращенно "вода д/и").

Предпочтительно, в этапе e извлекают более 99% молекул, молекулярная масса которых составляет менее 10 кДа, и, в частности, свободные аминокислоты, белки и пептиды, молекулярная масса которых составляет менее 10 кДа, а также белковые остатки, молекулярная масса которых составляет менее 10 кДа, образующиеся в результате разрушения белков при проведении этапа a.

Предпочтительно, перед проведением этапа f, раствор белка, полученный в этапе e, направляют в этап e' стерилизующей фильтрации.

Экстракт табачного листа согласно изобретению, полученный по завершении рассмотренного выше способа, можно хранить в том виде, в котором он был получен по завершении этапа d' стерилизующей фильтрации, или он может быть подвергнут лиофилизации в результате выполнения этапа f.

Получение фармацевтической композиции, включающей экстракт табачного листа

Пятый аспект настоящего изобретения относится к получению фармацевтической композиции, включающей экстракт табачного листа согласно изобретению.

Фармацевтическая композиция может быть получена способом, который включает следующие этапы:

- a) получение экстракта табачного листа, раскрытого выше;
- b) регулирование концентрации белка с целью достижения концентрации белка, составляющей от 100 до 200 мкг/мл;
- c) добавление фармацевтически приемлемого вспомогательного вещества (веществ); и
- d) необязательное добавление вспомогательного средства (средств) к полученному экстракту, предпочтительно добавление маннита.

Экстракт табачного листа, применяемый в этапе b, может либо представлять собой экстракт, полученный непосредственно после проведения этапа диафильтрации на мембране с граничным значением пропускания 10 кДа, либо экстракт, полученный после проведения этапа стерилизующей диафильтрации, либо экстракт табачного листа, который был лиофилизирован и затем восстановлен, например, в солевом растворе или воде.

Предпочтительно, концентрация в этапе b может быть отрегулирована:

- либо посредством разбавления водой с целью понижения концентрации белка,
- либо диафильтрацией с целью повышения концентрации белка.

Особенно предпочтительным фармацевтически приемлемым вспомогательным веществом в этапе c является вода.

Вспомогательные средства, которые могут быть добавлены на этапе d, могут, в частности, представлять собой вещества, способствующие набуханию, такие как, например, сахар, такой как лактоза, сахароза, трегалоза, сорбит, глюкоза, раффиноза, маннит, предпочтительно лактоза, сахароза, трегалоза, глюкоза или маннит; аминокислоту, такую как аргинин, глицин или гистидин, предпочтительно глицин; или полимеры типа декстрана или полиэтиленгликоля; или смеси перечисленных соединений.

Согласно одному из конкретных примеров осуществления этап d включает по меньшей мере добавление маннита.

Набор, включающий фармацевтическую композицию,  
включающую экстракт табачного листа

Шестой аспект настоящего изобретения относится к набору, включающему дозировку экстракта табачного листа или фармацевтической композиции согласно изобретению.

Согласно первому примеру осуществления набор включает одну или более дозировок экстракта табачного листа, предпочтительно в лиофилизированной форме, а также одну или более дозировок солевого раствора или воды д/и, предназначенной для приготовления фармацевтической композиции согласно изобретению непосредственно перед введением.

Согласно другому примеру осуществления набор включает одну или более дозировок фармацевтической композиции, готовых для введения пациенту.

Набор необязательно может включать один или более шприцев для введения фармацевтической композиции посредством подкожной инъекции.

Набор необязательно может включать один или более пластырей для трансдермального введения фармацевтической композиции.

Ниже приведены примеры для иллюстрации настоящего изобретения.

## Описание примеров осуществления изобретения

Пример 1. Получение экстракта табачного листа согласно изобретению.

Для получения экстракта использовали листья табака Берлей.

Размалывают 100 г листьев табака Берлей, высушенных способом естественной сушки в течение приблизительно трех месяцев (в центральной Франции, в период между сентябрем и декабрем). Размолотые листья суспендируют в течение 24 ч при температуре, составляющей от 4 до 10°C, в 1892 г воды д/и, в которую было добавлено 8 г бикарбоната аммония. Суспендированные твердые остатки затем удаляют фильтрованием с помощью воронки Бюхнера.

Затем выполняют осветляющее фильтрование экстракта на фильтре с размером отверстий 0,2 мкм. Получают экстракт коричневого цвета. Затем экстракт взвешивают для определения объема воды д/и, которую используют в этапе диафильтрации при постоянном объеме; в этом случае масса жидкого экстракта составила 1680 г.

Затем выполняют экстракцию белков полученного экстракта размолотого и высушенного табачного листа, который не содержит твердых остатков: к экстракту размолотого и высушенного табачного листа, который не содержит твердых остатков, добавляют 10080 г воды для инъекций. Затем 11760 г полученного таким образом раствора подвергают диафильтрации при постоянном 6-кратном объеме с помощью мембраны с граничным значением пропускания 10 кДа (MerckMillipore) до тех пор, пока масса ультраконцентрата не снизится до 1680 г.

Полученный после диафильтрации ультраконцентрат представляет собой смесь белков, в которой белки с молекулярной массой менее 10 кДа обнаруживаются в концентрации, на 99% ниже их исходной концентрации. Цвет полученного ультраконцентрата находится между В2 и В3 по измерительной шкале, установленной EUROPEAN PHARMACOPOEIA 5.0, 2.2.2, Degree of coloration of liquids (Степень окрашивания жидкостей).

Полученный диафильтрат может быть лиофилизирован после добавления маннита, например, в лиофилизаторе SMH 150, в результате чего образуется лиофилизированный экстракт табачного листа.

Пример 2. Определение белкового состава экстракта табачного листа, полученного в примере 1.

Белки экстракта табачного листа, полученного в примере 1, сначала разделяют на полиакриламидном геле. Для этого анализируемый экстракт добавляют в гель NuPage® Bis-Tris (4-12%) и выполняют электрофорез при 200 В в течение 35 мин, после чего вводят в контакт с 20 мл синим красителем Instant Blue, который выдерживают в течение 1 ч и затем промывают водой в течение ночи. Вырезают выбранные полосы полиакриламидного геля (6 полос) и затем обесцвечивают под действием буфера 50 мМ NH<sub>4</sub>CO<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>CN (50/50). Затем выполняют восстановление дисульфидных мостиков в растворе 10 мМ дитиотреита/50 мМ NH<sub>4</sub>CO<sub>3</sub> в течение 40 мин при 55°C. Восстановленные цистеиновые остатки затем алкилируют в растворе 100 мМ йодацетамида/50 мМ NH<sub>4</sub>CO<sub>3</sub> в течение 30 мин при комнатной температуре в темноте.

Полученный таким образом раствор белка подвергают расщеплению под действием фермента, получая фрагменты белка или пептида: расщепление проводят под действием трипсина (трипсин V5111, Promega), взятого в количестве, подходящем для окрашивания полос полиакриламидного геля в 50 мМ растворе NH<sub>4</sub>CO<sub>3</sub> в течение ночи при 37°C.

Пептиды из смеси пептидов, полученной в результате ферментной обработки, разделяют способом жидкостной нанохроматографии (U3000 Нано LC System, ThermoFischer Scientific) с предварительной концентрацией на микроколонке PepMap C18 для предварительной обработки (5 мкм; 100 Å; 300 мкм×5 мм; ThermoFisher Scientific) и последующим элюированием на наноколонке PepMap C18 (3 мкм; 100 Å; 75 мкм×250 мм; ThermoFisher Scientific) в режиме линейного градиента; буфер А 0,1% HCOOH в H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN (95/5), буфер В 0,1% HCOOH в H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN (20/80), Градиент от 0 до 60% В в течение 60 мин, скорость течения 300 мкл/мин).

Затем пептиды анализируют масс-спектрометрическим способом на анализаторе LTQ Velos (линейная ионная ловушка с двухуровневым давлением (Dual Pressure Linear Ion Trap); ThermoFisher Scientific), снабженном нанораспылительным источником (ThermoFisher Scientific) и соединенном с устройством U3000 NanoLC. Сбор данных был осуществлен с помощью программного обеспечения Excalibur 2.1 (ThermoFisher Scientific) в позитивном режиме с циклом MS (масс-спектрального) сканирования от m/z 400 до 1600 в режиме "Resolution Enhanced (повышенного разрешения)" с последующим сканированием MSMS (тандемная масс-спектрометрия, ТМС) в режиме "Normal Resolution (нормального разрешения)" на 20 MS ионах с наибольшей интенсивностью сигнала (заряд 2 и более) в режиме CID, в атмосфере гелия, с энергией столкновения 35 эВ. Ранее фрагментированные MS ионы подвергались динамическому исключению в течение 30 сек с допуском по массе 50 mmu (сокр. от "millimass unit" = одна тысячная атомной единицы массы).

Для идентификации масс пептидов и их фрагментов эти массы сравнивали с данными, имеющимися в базах данных. Для этого данные MS и MSMS обрабатывали с помощью программного обеспечения ProteomeDiscoverer 1.4 в соответствии с алгоритмом поиска MASCOT (Version 2.4), и были произведены запросы в базу данных UniprotKB/Swiss-Prot (выпущена в апреле 2015), сокращенной до видов TOBAC.

Идентификация белков подтверждена при использовании уровня достоверности  $p$ , составляющего менее 0,05. Были оставлены только белки, которые по данным идентификации содержали по меньшей мере 2 пептида с максимальным уровнем достоверности.

Количественные показатели каждого из идентифицированных таким образом белков позволяли лишь относительно классифицировать белки между собой, то есть такая классификация была соотнесена с концентрациями этих белков. Абсолютные значения таких показателей зависят от условий проведения эксперимента, типа испытуемого образца и взятых количеств.

Ниже представлен список 12 белков, идентифицированных и классифицированных указанным образом, где они перечислены в порядке убывания полученных показателей (от присутствующего в наибольшем количестве до присутствующего в наименьшем количестве):

P36401; E13H\_TOBAC; Глюкан-эндо-1,3-бета-глюкозидаза, кислотная изоформа PR-Q' (EC 3.2.1.39) ((1->3)-бета-глюкан-эндогидролаза) ((1->3)-бета-глюканаза) (Бета-1,3-эндоглюканаза) (PR-35); мол. масса 36995 Да

P17513; CHIP\_TOBAC; Кислотная эндохитиназа P (EC 3.2.1.14) (Связанный с патогенезом белок P) (PR-P); мол. масса 27469 Да

P17514; CHIQ\_TOBAC; Кислотная эндохитиназа Q (EC 3.2.1.14) (Связанный с патогенезом белок Q) (PR-Q); мол. масса 27633 Да

P27666; E13F\_TOBAC; Глюкан-эндо-1,3-бета-глюкозидаза, основная вакуолярная изоформа GLB (EC 3.2.1.39) ((1->3)-бета-глюкан-эндогидролаза) ((1->3)-бета-глюканаза) (Бета-1,3-эндоглюканаза, основная) (Глюканаза GLB); мол. масса 40443 Да

P14170; OSMO\_TOBAC; Осмотин; мол. масса 26681 Да

P24091; CHI2\_TOBAC; Эндохитиназа B (CHN-B) (EC 3.2.1.14); мол. масса 34721 Да

P11965; PERX\_TOBAC; Лигнинообразующая анионная пероксидаза (EC 1.11.1.7) (ТОРА); мол. масса 34674 Да

P13046; PRR1\_TOBAC; Связанный с патогенезом белок R основная форма (тауматиноподобный белок E22); мол. масса 24667 Да

P29062; PR4A\_TOBAC; Связанный с патогенезом белок PR-4A; мол. масса 16221 Да

Q03199; PIB\_TOBAC; Ингибитор протеиназы I-B (PI-IB) (Ингибитор микробных сериновых протеиназ, основная изоформа); мол. масса 11916 Да

Q03198; PIA\_TOBAC; Ингибитор протеиназы I-A (PI-IA) (Ингибитор микробных сериновых протеиназ, второстепенная изоформа); мол. масса 11880 Да

P29063; PR4B\_TOBAC; Связанный с патогенезом белок PR-4B; мол. масса 16235 Да

Таким образом, способ получения экстракта табачного листа позволяет концентрировать определенные белки и удалять другие белки. Так, в экстракте табачного листа, полученном в примере 1, из 759 белков *Nicotiana tabacum*, перечисленных в Swiss-Prot, в основном присутствуют только 6 семейств и 12 белков. Эти 12 белков, которые в основном присутствуют в экстракте табачного листа, полученном в примере 1, имеют молекулярную массу, составляющую от 10 до 50 кДа.

Пример 3. Определение содержания белка.

Содержание белка в экстракте табачного листа, полученном в примере 1 (до и после проведения этапа диафильтрации), определяли способом Брэдфорда (англ. Bradford).

Экстракт, полученный в примере 1, растворяли в солевом растворе.

Были приготовлены три стандартных раствора белка: для получения стандартизованных растворов с точной концентрацией 100 мкг/мл, 50 мкл раствора альбумина бычьей сыворотки с концентрацией 2 мг/мл (Sigma Aldrich, номер продукта P0834) разбавляли в 20 раз добавлением 950 мкл солевого раствора.

В каждой испытуемой пробирке содержалось 80 мкл образца белка и 920 мкл реагента Брэдфорда (Sigma Aldrich, номер продукта B6916). После добавления реагента Брэдфорда в каждую пробирку пробирки осторожно встряхивали для создания воронки и затем инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре. Образцы переносили в кюветы объемом 1,5 мл и измеряли поглощение образцов при 595 нм в течение 1 ч.

Концентрацию белка определяли сравнением с приготовленными стандартными растворами белка.

Измеренные количества белка составляли:

до диафильтрации: 295,45 +/- 9,91 мкг/мл

после диафильтрации: 160,61 +/- 1,31 мкг/мл.

Картину электрофоретического разделения экстракта табачного листа согласно примеру 1 определяли после проведения этапа диафильтрации. На гель NuPage наносили белки в количествах 2, 5, 10 и 15 мкг.

Гель NuPage 4-12% подготавливали в течение 35 мин, затем помещали в 20 мл кумасси синего (англ. Coomassie Blue) на 1 ч и промывали водой в течение ночи. Гель анализировали с помощью системы ChemiDoc™ XRS BioRad, применяя программное обеспечение Image Lab™.

Были обнаружены три основных полосы, соответствующие приблизительно 15 и 30 кДа (фиг. 1). Также прослеживались две другие полосы, соответствующие приблизительно 40 кДа.

Результаты показывают, что в этом экстракте табачного листа количество обнаруженных белков, молекулярная масса которых превышает 100 кДа, мало по сравнению с количеством белков, молекулярная масса которых составляет от 10 до 50 кДа.

Пример 4. Влияние объема диафильтрации на удаление молекул, молекулярная масса которых составляет менее 10 кДа, из экстракта табачного листа согласно изобретению.

При проведении этапа диафильтрации отслеживали удаление молекул с молекулярной массой менее 10 кДа из экстракта табачного листа, полученного в примере 1, в зависимости от применяемого объема диафильтрации. Мониторинг выполняли с помощью газохроматографического анализа с аналитическим индикатором (никотином), имеющим молекулярную массу, составляющую менее 10 кДа.

Результаты представлены в нижеследующей таблице.

Образцы с соответствующим объемом диафильтрации	Площадь пика аналитического индикатора	Процентная доля оставшегося аналитического индикатора
До диафильтрации	54913	100 %
Диафильтрация с x3 объемом	2630	4,79 %
Диафильтрация с x4 объемом	809	1,47 %
Диафильтрация с x5 объемом	247	0,045 %
Диафильтрация с x6 объемом	н/о*	н/о

\* н/о - не поддающийся определению

Эффективность удаления молекул, молекулярная масса которых составляет менее 10 кДа, повышается при повышении объема диафильтрации, и такие молекулы полностью удаляются, если объем диафильтрации в 6 раз превышает исходный объем.

Пример 5. Биологическая активность экстракта примера 1 по отношению к мононуклеарным клеткам человека *in vitro* и в опытах на мышах *in vivo*.

#### Материалы и способы

Применяемые продукты

ФМА (форболмиристацетат)/Иономицин (Sigma-Aldrich, номер продукта P8139/I0634)

АБС (альбумин бычьей сыворотки) (Sigma Aldrich, номер продукта A7020)

ФСБ (фосфатно-солевой буфер) (PAA Laboratories, номер продукта H15-002)

Tween 20 (Sigma Aldrich, номер продукта P1379)

Антитела козы к IgG мыши (специфичные для g-цепи) - щелочная фосфатаза (Southern Biotech, номер продукта 1030-04)

Конъюгат биотина и антител к IgE мыши (Biolegend, номер продукта BLE406904) Стрептавидин - щелочная фосфатаза (Southern Biotech, номер продукта 7100-04)

#### Получение клеток и режим стимуляции

Мононуклеарные клетки периферической крови, полученной от разных здоровых доноров, отделяли центрифугированием по градиенту плотности (среда для разделения: LMS 1077, PAA Laboratories). Полученные мононуклеарные клетки стимулировали экстрактом примера 1 при различных разбавлениях в течение 24 или 48 ч. После стимуляции в течение 24 или 48 ч надосадочную жидкость извлекали и хранили при -80°C для последующего проведения анализа цитокинового профиля с помощью методики Luminex. После стимуляции в течение 24 ч клетки также подвергали фенотипическому исследованию способом проточной цитометрии.

#### Цитометрическое фенотипическое исследование

Для обнаружения различных маркеров мембран клетки сначала окрашивали маркером для оценки жизнеспособности (краситель eFluor 450 (65-0863-14 eBioscience), а затем антителами, непосредственно связанными с флуорохромами. Популяции Т и В лимфоцитов были идентифицированы с помощью маркеров CD3 и CD19. NK клетки (от англ. "natural killer cells", естественные клетки-киллеры) были обнаружены либо с помощью маркера NKp46, либо с помощью комбинации маркеров CD56 и CD16, или с помощью экспрессии CD56 в отсутствие CD3. Из этих клеточных популяций были выбраны "ворота (гейт, англ. "gate")" для анализа различных маркеров активации (CD69, CD25, HLA-DR).

Перечень антител, применяемых в фенотипическом цитометрическом исследовании, представлен в нижеследующей таблице.



	Клон	Номер продукта и поставщик
Анти-CD45-Хром Оранжевый	J.33	A96416; Beckman Coulter
Анти-CD56 APC	B159	555518; Becton Dickinson
Анти-CD25PC7	M-A251	557741; Becton Dickinson
Анти-CD25 PC5	B1.49.9	IM2646; Beckman Coulter
Анти-CD69 FITC	FN50	557049; Becton Dickinson
Анти-CD69 PE	L78	341652; Becton Dickinson
Анти-CD3 ECD	UCHT1	A07748; Beckman Coulter
Анти-КрP46 APC	9E2/NKp46	558051; Becton Dickinson
Анти-CD19 FITC	H1B19	11-0199-42; eBioscience
Анти-HLA-DR PE	G46-6	347401; Becton Dickinson

В каждом эксперименте применяли изотипический контроль, и для этого многопараметрического фенотипического исследования была создана матрица компенсации.

Окрашенные образцы анализировали с помощью устройства для подсчета клеток Navios (Beckman Coulter 10-colour) с минимальным набором данных 100000 событий на пробирку. Затем собранные данные анализировали с помощью программного обеспечения Kaluza.

Анализ профиля секреции цитокинов способами Luminex и ELISA

Эта методика, основанная на принципах ELISA (сокр. от enzyme-linked immunosorbent assay, что означает "твердофазный иммуноферментный анализ") и цитометрии, позволяет одновременно исследовать несколько анализируемых веществ.

Уникальные микрогранулы с цветным кодом связываются, захватывая антитела, специфичные для каждого анализируемого вещества. После инкубации с анализируемыми образцами производят обнаружение антител, связанных с флуорохромом, что позволяет проводить анализ с помощью оптической системы, включающей два лазера (Bio-plex 200 систем Bio-rad). С помощью первого лазера выполняют идентификацию микрогранулы, а с помощью второго лазера выполняют количественную оценку обнаруженных антител, связанных с флуорохромом. С помощью сетевого набора Bio-Plex Pro Human Cytokine Grp1 panel 17 (Bio-rad) можно исследовать 17 анализируемых веществ в образцах, отобранных в различных экспериментах по стимуляции, проводимых на клетках. Основные концентрации каждого цитокина могут быть получены из клеток, стимулированных в культуральной среде, не содержащей экстракта табачного листа примера 1.

Анализ IL-8 ELISA основан на традиционной методике иммуноферментного сэндвич-анализа. Применяли коммерчески доступные наборы, предоставленные Eurobio-Diaclone (Besancon).

Иммунизация мышей экстрактом табачного листа примера 1

Самки мышей пород C57BL/6 и Balb/c в возрасте семь недель были приобретены у Компании Charles River (L'Arbresles, Франция). Мышей подвергали иммунизации в 0 и 21-е сутки, вводя внутривенно (абдоминально) 200 мкл экстракта табачного листа примера 1, предварительно лиофилизированного и восстановленного в 5 мл солевого раствора. Кровь отбирали от всех мышей до и после иммунизации. После центрифугирования сыворотку крови замораживали при -20°C.

ELISA IgG и IgE

Для эксперимента ELISA один флакон продукта восстанавливали в 2,5 мл карбонатно-бикарбонатного буфера (0,1 М, pH 9). Планшеты Nunc Maxisorb 96W инкубировали с 100 мкл экстракта табачного листа, лиофилизированного как указано в примере 1, затем восстанавливали и инкубировали в течение 18 ч. Планшеты промывали ФСБ-0,05% буфера Tween, и затем планшеты насыщали 200 мкл ФСБ-1% буфера АБС в течение 1 ч при комнатной температуре. После промывки планшетов ФСБ-0,05% буфера Tween, 100 мкл сыворотки крови мыши, разбавленной до 1/20 в ФСБ-1% АБС, инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре.

IqG Elisa

После промывки ФСБ-буфером Tween 20 100 мкл вторичного антитела козы к IgG мыши, связанного со щелочной фосфатазой (Southern Biotechnology, номер продукта 1030-04) и разбавленного ФСБ-1% АБС, инкубировали в течение 1 ч при температуре. После промывок ФСБ-0,05% Tween добавляли 100 мкл пара-нитрофенилфосфатного субстрата (обозначаемого pNPP, Sigma) щелочной фосфатазы и оставляли на 15 мин при комнатной температуре в темноте. Затем реакцию останавливали добавлением 50 мкл 3 М NaOH и оптические плотности (ОП) считывали при 405 нм.

IgE Elisa

После промывки ФСБ с буфером Tween 20, 100 мкл вторичного антитела крысы к IgE мыши, связанного с биотином (Biolegend, номер продукта BLE406904) и разбавленного в ФСБ-1% АБС, инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. После промывок ФСБ-0,05% Tween добавляли 100 мкл

стрептавидина, связанного со щелочной фосфатазой (Southern Biotechnology, номер продукта 7100-04), и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре (1:2000-е разбавление в ФСБ-1% АБС в соответствии с рекомендациями поставщика). После дополнительных промывок ФСБ-0,05% Tween добавляли 100 мкл pNPP-субстрата щелочной фосфатазы и оставляли на 15 мин при комнатной температуре в темноте. Затем реакцию останавливали добавлением 50 мкл 3 М NaOH и оптические плотности (ОП) считывали при 405 нм.

#### Результаты

Экстракт табачного листа примера 1 вызывает специфичную IgG-гуморальную ответную реакцию у мышей

После двух иммунизаций мышей экстрактом табачного листа, лиофилизированным как указано в примере 1 и восстановленным в 5 мл солевого раствора, наблюдали возбуждение IgG, вызываемое компонентами продукта. Таким образом, у мышей 4/5 пород C57BL/6 и 4/5 Balb/c наблюдали повышение уровня IgG, вызываемое экстрактом табачного листа, на 28-е сутки, т.е. спустя 7 суток после второй вакцинации (фиг. 2). Единственная мышь в каждой группе, у которой не наблюдали реакции, имела базовые уровни антител IgG. Титры антител у мышей Balb/c оказались ниже, чем у мышей C57BL/6 (фиг. 2).

Тем не менее, гуморальной ответной реакции IgE после 2 вакцинаций мышей экстрактом табачного листа обнаружено не было. Оптические плотности (ОП) составляли менее 0,05 во всех анализах, выполненных в различных сыворотках.

Экстракт табачного листа предпочтительно активирует естественные клетки-киллеры периферической крови.

После извлечения мононуклеарных клеток из периферической крови обработкой с градиентом плотности (Ficoll) могут быть охарактеризованы (фиг. 3) различные клеточные популяции (Т и В лимфоциты, NK клетки и т.д.). Таким образом, NK клетки (естественные клетки-киллеры) были идентифицированы в негативной CD3 популяции по маркерам CD56 и CD16 или по маркеру NKp46. После инкубации мононуклеарных клеток с экстрактом табачного листа, полученным в примере 1, наблюдали увеличение экспрессии маркеров активации CD69, CD25 и HLA-DR на NK клетках, идентифицированных по маркерам CD16+CD56+ (CD3-) (фиг. 4A) и по маркеру NKp46 (фиг. 4B). При использовании разбавленного в два раза экстракта табачного листа и выявлении экспрессии CD69 получали более выраженные результаты. Таким образом, более 60% NK клеток экспрессируют маркер CD69 в течение 24 ч после контакта с экстрактом табачного листа (фиг. 4A-B). В состоянии покоя менее 5% NK клеток крови экспрессируют CD69.

Влияние экстракта табачного листа на активацию лимфоцитов периферической крови гораздо слабее. Таким образом, в состоянии покоя 2% Т лимфоцитов экспрессируют CD69, и эта экспрессия увеличивается до 6% после 24 ч культивирования с экстрактом табачного листа (фиг. 5A). Экспрессия CD25 на Т лимфоцитах, активизированных экстрактом табачного листа, не повышается (фиг. 5A). Аналогично, экстракт табачного листа не оказывает существенного влияния на лимфоциты В периферической крови, поскольку менее 3% В лимфоцитов экспрессируют CD69 после 24 ч культивирования с экстрактом этим (фиг. 5B).

Профиль цитокинов, генерируемых под действием экстракта табачного листа, полученного в примере 1, на мононуклеарных клетках крови человека

Мононуклеарные клетки периферической крови контактировали с экстрактом табачного листа, лиофилизированным, как указано в примере 1, и восстановленным в 5 мл ФСБ при различных разбавлениях (1/2 или 1/20) в течение 24 ч, после чего способом Lumiplex проводили исследования цитокинов, хемокинов и факторов роста, находящихся в надосадочной жидкости.

На фиг. 6 представлена интенсивная генерация цитокинов воспаления (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ , IL-17) под действием экстракта табачного листа. Для примера, базовые уровни этих цитокинов в отсутствие контакта мононуклеарных клеток с экстрактом табачного листа составляют менее 10 пикограммов/мл (фиг. 6A).

Было показано, что после инкубации с разбавленным в два раза экстрактом табачного листа концентрации цитокинов IL-1 $\beta$ , IL-6 и TNF $\alpha$  превышают 1000 пикограммов/мл (фиг. 6A). Такое явное возбуждение цитокинов воспаления также наблюдали при разбавлении экстракта табачного листа до 1/20 (фиг. 6A). Результаты, полученные на испытуемом материале, взятом у разных доноров, достаточно однородны. Среди цитокинов TN1 (IL-2, IFN $\gamma$ , IL-12), обеспечивающих клеточно-медируемый иммунитет, значительная стимуляция под действием экстракта табачного листа, разбавленного до 1/2 и до 1/20, наблюдалась только у IFN $\gamma$  (фиг. 6B). Экстракт табачного листа вызывает генерацию очень низких концентраций цитокинов TN2 (IL-4, IL-5, IL-13), составляющую порядка нескольких пикограммов/мл (фиг. 7A). Напротив, экстракт табачного листа стимулирует выработку IL-10 мононуклеарными клетками, и его концентрация в надосадочной жидкости клеток, подвергшихся контактной обработке экстрактом табачного листа, разбавленным в два раза, составляет 750 пикограммов/мл (фиг. 7A). Первоначально IL-10 считался TN2 цитокином, но он также может вырабатываться регуляторными Т лимфоцитами, обозначаемыми Tr1.

Авторами изобретения также было показано, что экстракт табачного листа также может вызывать выработку гемопоэтических факторов роста, таких как G-CSF, который способствует размножению и рекрутингу нейтрофилов и хемокинов, таких как MCP-1, который, как известно, оказывает хемотаксическое действие на макрофагов (фиг. 7B). Однако, как показано, экстракт табачного листа не оказывает значительного влияния на другие факторы роста, такие как IL-7 или GM-CSF (фиг. 7B). Профиль цитокинов/хемокинов оставался тем же при выполнении исследований в надосадочной жидкости, собранной после 48 ч культивирования с экстрактом табачного листа.

#### Заключение

Экстракт табачного листа, полученный в примере 1, может вызывать специфичную гуморальную ответную реакцию IgG, направленную против белков, присутствующих в продукте, у двух видов мышей, имеющих разный фоновый генотип.

Ответная гуморальная реакция IgE не наблюдалась после двух введений вещества одним и тем же мышам.

Обработка мононуклеарных клеток периферической крови экстрактом табачного листа, полученным в примере 1, *in vitro* вызывает преимущественную активацию NK клеток. Эта активация отражается в повышенной экспрессии молекул CD69, CD25 и HLA-DR.

Экстракт табачного листа, полученный в примере 1, *in vitro* вызывает выработку цитокинов воспаления, таких как IL-1 $\beta$ , IL6, IL-17, IL-8 и TNF $\alpha$ . Эти цитокины присутствуют в высоких концентрациях в культуральной надосадочной жидкости, собранной спустя 24 ч после стимуляции.

Экстракт табачного листа, полученный в примере 1, также вызывает выработку IFN $\gamma$ , IL-10, G-CSF и MCP-1. Однако, этот экстракт не оказывает существенного влияния на выработку цитокинов TH2 (IL-4, IL-5, IL-13).

Пример 6. Токсикологическое исследование экстракта табачного листа, полученного в примере 1.

#### Материалы и способы

Все описанные ниже исследования были выполнены с использованием экстракта табачного листа, полученного в примере 1.

Во всех случаях введение производят подкожно. Токсикологические исследования проводили на грызунах (крысы Han Wistar). Токсикологические исследования проводили в соответствии с Принципами Надлежащей Лабораторной Практики, утвержденными ОЭСР (Организацией экономического сотрудничества и развития) (Взаимное принятие данных (англ. Mutual Acceptance of Data, сокращенно MAD) в оценочных данных, 26 ноября 1997 г. (C(97) 186 Окончательная редакция) и в соответствии со Сводом международных требований к лабораторным исследованиям (англ. Good Laboratory Practices (GLP)), опубликованным Министерством Занятости и Солидарности Франции (англ. French Ministry of Employment and Solidarity) (No 2000/5bis, Приказ от 14 марта 2000 г., JO 23/03/2000).

Исследования подкожной токсичности по прошествии 14 суток

Задача этого исследования состояла в определении токсичности экстракта табачного листа, полученного в примере 1, для крыс после подкожного введения (один раз в неделю в течение 2 недель).

Исследования проводили следующим образом:

No. группы	Доза, экспрессируемая в виде белка (мкг/кг/абдом.)	Объем дозы (мл/кг/абдом.)	Концентрация дозы, экспрессируемой в виде белка (мкг/мл)	Количество животных	
				самцы	самки
1	0	2	0	6	6
2	11,2	0,4	28	6	6
3	56	2	28	6	6

абдом. = абдоминально

Результаты исследования показали:

ни при одной из дозировок не отмечено смертности;

не наблюдали никаких связанных с лечением клинических проявлений, и подкожное введение локально хорошо переносится (клинические проявления и местную переносимость наблюдали до и после инъекции и один раз в сутки в отсутствие терапии);

не оказывает вредного влияния на массу тела и потребление пищи (по сравнению с контрольными животными);

имеются биологически значимые различия между количествами белых кровяных клеток у грызунов, получавших терапию, и у грызунов, не получавших терапию, но эти различия не оказывают токсичного действия;

наблюдали различия в концентрациях белка и холестерина у групп, получавших терапию и не получавших терапию, но эти различия оставались в пределах или близки к параметрам животных из контрольной группы. Эти изменения не оказывали вредного влияния;

не наблюдали различий в массах органов у животных группы, получавшей терапию, и у животных контрольной группы.

Таким образом, подкожное введение экстракта табачного листа, полученного в примере 1, один раз в неделю в течение 2 недель в дозировках 11,2 и 56 мкг белка/кг/абдом. хорошо переносилось крысами Wistar.

#### Четырехнедельное исследование подкожной токсичности

Задача исследования состояла в определении токсичности экстракта табачного листа, полученного в примере 1, по результатам подкожного введения крысам Wistar один раз в неделю, а также в определении регрессии любого признака токсичности в течение 4-недельного периода в отсутствие терапии.

Особое внимание было уделено возможным иммунологическим явлениям. Исследование проводили следующим образом:

Группа/ терапия	Доза <sup>(1)</sup> (мкг/кг/ абдом.)	Объем дозы (мл/кг/ абдом.)	Концентрация дозы (мкг/мл)	Количество животных			
				После терапии <sup>(2)</sup>		После периода наблюдения <sup>(3)</sup>	
				самцы	самки	самцы	самки
1. Контрольная (носитель: 0,9 % NaCl)	0,0	4,0	0,0	10	10	5	5
2. Низкая дозировка	16,8	0,6	28,0	10	10	/	/
3. Промежуточная дозировка	33,6	1,2	28,0	10	10	/	/
4. Высокая дозировка	112,0	4,0	28,0	10	10	5	5

(1) Выраженная в виде концентрации белков

(2) Крыс умерщвляли спустя 2 суток после последнего введения (сутки 23)

(3) Крыс умерщвляли спустя 4 недели после последнего введения (сутки 49)

В течение периода терапии крыс наблюдали до и по меньшей мере 3 раза после введения. В течение периода наблюдения крыс наблюдали один раз в сутки.

Полный клинический осмотр выполняли один раз в неделю. Местную переносимость отмечали до и после каждой инъекции, один раз в сутки в течение первой недели и затем два раза в неделю до окончания периода наблюдения.

Температуру тела измеряли на следующие сутки после каждого введения (1, 8, 15 и 22-е сутки).

Офтальмологический осмотр проводили до исследований, а также на следующие сутки после первых и последних суток введения (1-е и 22-е сутки).

Массы тела животных и индивидуальное потребление пищи измеряли два раза в неделю.

Клинический анализ гематологических параметров, свертываемости крови, химические параметры сыворотки крови и лимфоцитарные анализы выполняли на 23 и 49/48 сутки (самцы/самки, соответственно). Анализ мочи выполняли на 23-и сутки.

Всех животных умерщвляли спустя 2 суток после последнего введения или после четырехнедельного периода наблюдения и производили вскрытие. Некоторые органы взвешивали и проводили их гистопатологические исследования.

Результаты исследования показали, что:

- ни при одной из дозировок не отмечено смертности;
- подкожное введение дозировок, выраженных в содержании белка и составляющих 16,8, 33,6 и 112,0 мкг/кг/абдом., хорошо переносится при местном введении;
- не наблюдали никаких клинических проявлений, связанных с терапией;
- терапия не влияет на температуру тела;
- не наблюдали связанного с терапией офтальмологического воздействия;
- масса тела и потребление пищи не изменялись;
- не наблюдали значительных изменений гематологических параметров, свертываемости крови и состава мочи;

к окончанию периода терапии активность фермента креатинкиназа снижается у самок групп 3 и 4 (промежуточные и высокие дозировки; 33,6 и 112 мкг/кг/абдом., соответственно). Эти изменения не считаются вредными до тех пор, пока они не связаны с гистопатологией;

наблюдали небольшое снижение количества НК клеток в кровотоке самок и самцов, получавших терапию с промежуточными и высокими дозировками (группы 3 и 4);

по завершении периода наблюдения среднее количество НК клеток в кровотоке самцов, получавших терапию с высокой дозировкой (группа 4), было ниже;

не наблюдали изменений массы органов;

во время гистопатологического исследования в месте инъекции наблюдали темное пятнышко, вызванное подкожным кровотечением. Считали, что это наблюдение не связано с процедурой введения.

По завершении терапии в месте инъекции у групп 3 и 4 наблюдали минимальные или легкие воспа-

лительные изменения кожи, в то время как в группах 1 и 2 воспалительных изменений практически не отмечали.

По завершении периода наблюдения воспалительные изменения, ранее наблюдавшиеся в группе 4, практически полностью исчезли.

4 подкожные инъекции экстракта табачного листа, полученного в примере 1, в дозировках до 112 мкг/кг/абдом. хорошо переносились, и у получавших терапию крыс наблюдали лишь минимальные и обратимые воспалительные изменения по сравнению с крысами, не получавшими терапию.

В заключение следует отметить, что в экспериментальных условиях, описанных выше, подкожное введение крысам Wistar экстракта табачного листа, полученного в примере 1, один раз в неделю в течение 4 недель в дозировках 16,8, 33,6 и 112 мкг/кг/абдом. хорошо переносилось и не вызывало никаких негативных побочных явлений.

Пример 7. Клинические исследования после введения экстракта табачного листа, полученного в примере 1.

Фармацевтическую композицию, включающую экстракт табачного листа, полученный в примере 1, содержащую 100 мкг или 200 мкг белков и маннит, вводили посредством подкожной инъекции первый раз в 0 сутки и второй раз на 29-е сутки (каждый раз по 1 мл в каждую руку) двадцати четверем (24) курильщикам. Включения осуществляли в соответствии с принципом расширения группы, 6 первоначальных пациентов, получавших дозировку 100 мкг, были включены первыми, затем были включены 6 первоначальных пациентов, получавших дозировку 200 мкг и затем включали 6 дополнительных пациентов, получавших дозировку 100 мкг. Группа субъектов, получавших терапию, состояла из 24 человек, 14 мужчин и 10 женщин в возрасте от 30 до 65 лет, то есть их средний возраст составлял 44,5 года.

Следует отметить, что ни одна из испытанных дозировок не достигала токсичности уровня 3-4 по шкале токсичности Стандартных терминологических критериев нежелательных явлений (англ. Common Terminology Criteria for Adverse Events, сокращенно СТСАЕ) v4.0, определяемой National Cancer Institute.

Исходные характеристики субъектов, описывающие потребление ими табака, представлены в таблице ниже.

	N	%	Среднее	Диапазон
Статус потребителя				
Курильщик	24	100		
Потребление				
Готовые сигареты, кол-во/сутки	18	75	20	(15; 30)
Крученые сигареты, кол-во/сутки	3	12,5	20	(15; 30)
Сигарилы, кол-во/сутки	3	12,5	20	(15; 20)
Уровень зависимости по Фагерстрёму (Fagerström)				
5	11	46		
6	5	21		
7	2	8		
8	3	12,5		
9	3	12,5		
Измеренное количество выдыхаемого СО (части на миллион)	24		24,5	(9; 45)
Хотели бы Вы бросить курить?				
Нет				
Да	24	100		

На фиг. 8 и 9 представлено изменение потребления табака.

Ниже приведена формула для вычисления уменьшения количества сигарет:

$$\left( \frac{\text{Количество сигарет, визит } n - \text{Количество сигарет при включении в исследование}}{\text{Количество сигарет при включении в исследование}} \right)$$

Проведенный спустя 4 недели опрос показал, что 16 курильщиков (67% курильщиков) бросили курить или уменьшили ежедневное потребление сигарет по меньшей мере на 50% и что ежедневное потребление сигарет у 24 курильщиков снизилось на 60%.

Проведенный спустя 12 недель опрос показал, что 15 курильщиков (63% курильщиков) бросили курить или уменьшили ежедневное потребление сигарет по меньшей мере на 50% и что ежедневное потребление сигарет у 24 курильщиков снизилось на 60%.

Интересно отметить, что у последних 12 курильщиков (12 из 24) было больше времени (иногда месяц или более) между их первым контактом с Центром клинических исследований и получением инъекции табачного экстракта согласно примеру 1, в то время как у первых 12 курильщиков этот период был

короче (часто только несколько суток). Для тех 12 курильщиков, у которых было больше времени, процентная доля курильщиков, снизивших потребление табака по меньшей мере на 50% или прекративших курить на 3 и 4 неделях, составила 83% (10 курильщиков из 12), в то время как она составила только 50% (6 курильщиков из 12) для 12 тех курильщиков, для которых этот период был короче. Такая повышенная эффективность объясняется лучшей подготовкой тех курильщиков, которые имели больше времени для усиления мотивации перед получением инъекции табачного экстракта согласно примеру 1. Из последних 12 курильщиков 5 постоянно воздерживались от курения с первой недели после окончания терапии до 12 недели (окончание последующего наблюдения), и 8 постоянно воздерживались от курения последние 7 суток недели 12.

Получавшие терапию курильщики указывали на снижение притягательности сигарет и уменьшение позыва закурить, а также на возникновение определенного безразличия по отношению к сигаретам. Они отмечали снижение привлекательности сигарет. Некоторые говорили об изменении вкуса сигареты. Их мотивация бросить курить усилилась.

До введения фармацевтической композиции IgG антитела, направленные на фармацевтическую композицию, были обнаружены у всех пациентов. До получения терапии средние концентрации IgG, направленные на фармацевтическую композицию, составляли 6,07 мкг/мл (стандартное отклонение: 2,98 мкг/мл).

После введения фармацевтической композиции наблюдали значительное повышение концентраций IgG антител к фармацевтической композиции. Таким образом, концентрации IgG, измеренные на 29 сутки после введения фармацевтической композиции, составили 7,19 мкг/мл (стандартное отклонение: 4,04 мкг/мл), и эти концентрации повышались до 7,5 мкг/мл (стандартное отклонение 4,28 мкг/мл), спустя 8 недель после первого введения фармацевтической композиции. Варьирование концентраций IgG было значительным (порог значимости t-критерия  $p < 0,05$ ) в диапазоне 29-е сутки - 0-е сутки ( $p = 0,02$ ) и в диапазоне между измерениями 8-я неделя - 0-е сутки ( $p = 0,006$ ). Значительную разность также наблюдали между концентрациями IgG антител к фармацевтической композиции, измеренными на 8-й неделе и на 29-е сутки ( $p = 0,029$ ).

Статистический анализ, связывающий концентрации IgG антител к фармацевтической композиции и бросание курить, выявил корреляцию (критерий Уилкоксона, порог значимости  $p < 0,05$ ) между более высокими уровнями IgG антител к фармацевтической композиции и бросанием курить.

У пациентов, снизивших потребление табака по меньшей мере на 50% спустя одну неделю после первого введения фармацевтической композиции, наблюдали более высокие уровни IgG антител к фармацевтической композиции на 29-е сутки ( $p = 0,034$ ) и на 8-й неделе ( $p = 0,044$ ).

У пациентов, которые воздерживались от курения в течение 7 суток подряд (преобладающее воздержание), к моменту наступления 36 суток были обнаружены более высокие уровни IgG антител к фармацевтической композиции на 29-е сутки ( $p < 0,001$ ) и на 8-й неделе ( $p < 0,001$ ).

У пациентов, которые воздерживались от курения в течение 7 суток подряд (преобладающее воздержание), к моменту наступления 12-й недели были обнаружены более высокие уровни IgG антител к фармацевтической композиции на 29-е сутки ( $p = 0,013$ ) и на 8-й неделе ( $p = 0,016$ ).

У пациентов, которые постоянно воздерживались от курения до наступления 12 недели, были обнаружены более высокие уровни IgG антител к фармацевтической композиции на 29-е сутки ( $p = 0,007$ ) и на 8-й неделе ( $p = 0,009$ ).

После введения фармацевтической композиции IgE антитела обнаружены не были.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Экстракт табачного листа для лечения табачной зависимости, содержащий по меньшей мере 5 мас.% белков от общей массы сухого экстракта, где молекулярная масса белков превышает 10 кДа и белки по существу не содержат молекул с молекулярной массой менее 10 кДа, причем:

содержание белков, молекулярная масса которых превышает 500 кДа, составляет менее 15 мас.% от общей массы белков в экстракте; и

содержание молекул с молекулярной массой менее 10 кДа составляет менее 5 мас.% от общей массы экстракта.

2. Экстракт табачного листа по п.1, в котором белки выбраны из группы, состоящей из следующих семейств белков: лигнинообразующей анионной пероксидазы, глюкан-эндо-1,3-бета-глюкозидазы, эндохитиназы, связанного с патогенезом белка, осмотина и ингибитора протеиназы, а также их смесей.

3. Экстракт табачного листа по п.1 или 2, в котором содержание белков, молекулярная масса которых превышает 500 кДа, предпочтительно молекулярная масса которых превышает 400 кДа, предпочтительнее молекулярная масса которых превышает 300 кДа, более предпочтительно молекулярная масса которых превышает 200 кДа, более предпочтительно молекулярная масса которых превышает 150 кДа, еще более предпочтительно молекулярная масса которых превышает 100 кДа и еще более предпочтительно молекулярная масса которых превышает 50 кДа, составляет менее 15 мас.% от общей массы белков в экстракте, предпочтительно менее 10 мас.% от общей массы белков в экстракте, более предпочти-

тельно менее 7,5 мас.% от общей массы белков в экстракте, более предпочтительно менее 5 мас.% от общей массы белков в экстракте, предпочтительно менее 2,5 мас.% от общей массы белков в экстракте, более предпочтительно менее 1 мас.% от общей массы белков в экстракте и еще более предпочтительно менее 0,5 мас.% от общей массы белков в экстракте.

4. Экстракт табачного листа по любому из предшествующих пунктов, в котором содержание молекул, молекулярная масса которых составляет менее 10 кДа, составляет менее 2,5 мас.%, предпочтительно менее 1 мас.% от общей массы экстракта.

5. Экстракт табачного листа по любому из предшествующих пунктов, который получен способом экстракции растворителем, например водным растворителем, размолотых высушенных табачных листьев с последующим отделением твердых остатков от раствора экстракта размолотого высушенного табачного листа и последующей диафильтрации при постоянном объеме раствора экстракта размолотого высушенного табачного листа, который не содержит твердого остатка, в присутствии водного растворителя, взятого в количестве, составляющем от 2 до 12 объемов, предпочтительно от 3 до 10 объемов, предпочтительно от 4 до 8 объемов, предпочтительно 6 объемов, где объем равен объему экстракта, с помощью мембраны с граничным значением пропускания 10 кДа.

6. Экстракт табачного листа по любому из предшествующих пунктов, включающий по меньшей мере один белок, принадлежащий семейству глюкан-эндо-1,3-бета-глюкозидаз и предпочтительно выбранный из кислотной изоформы PR-Q' бета-1,3-эндоглюканазы (PR36401 согласно базе данных UniProt), основной вакуолярной изоформы GLB бета-1,3-эндоглюканазы (P27666 согласно базе данных UniProt) и их смесей.

7. Экстракт табачного листа по любому из предшествующих пунктов, включающий по меньшей мере один белок, принадлежащий семейству эндохитиназ и предпочтительно выбранный из кислотной эндохитиназы P (P17513 согласно базе данных UniProt), кислотной эндохитиназы Q (P17514 согласно базе данных UniProt), эндохитиназы B (P24091 согласно базе данных UniProt) и их смесей.

8. Экстракт табачного листа по любому из предшествующих пунктов, включающий по меньшей мере осмотин (P14170 согласно базе данных UniProt).

9. Экстракт табачного листа по любому из предшествующих пунктов, включающий по меньшей мере одну лигнинообразующую анионную пероксидазу (P11965 согласно базе данных UniProt).

10. Экстракт табачного листа по одному из предшествующих пунктов, включающий по меньшей мере один связанный с патогенезом белок, предпочтительно выбранный из связанного с патогенезом белка R (P13046 согласно базе данных UniProt), связанного с патогенезом белка PR-4A (PR29062 согласно базе данных UniProt), связанного с патогенезом белка PR-4B (PR29063 согласно базе данных UniProt) и их смесей.

11. Экстракт табачного листа по любому из предшествующих пунктов, включающий по меньшей мере один белок, принадлежащий семейству ингибиторов протеиназы и предпочтительно выбранный из ингибитора протеиназы I-B (Q03199 согласно базе данных UniProt), ингибитора протеиназы I-A (Q03198 согласно базе данных UniProt) и их смесей.

12. Экстракт табачного листа по меньшей мере по одному из предшествующих пунктов, где содержание белка в сухом экстракте составляет по меньшей мере 10 мас.%, предпочтительно по меньшей мере 15 мас.%, предпочтительно по меньшей мере 20 мас.% от общей массы сухого экстракта.

13. Фармацевтическая композиция для лечения табачной зависимости, включающая в качестве действующего вещества экстракт табачного листа по любому из предшествующих пунктов, а также фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

14. Фармацевтическая композиция по п.13, в которой белки, находящиеся в экстракте табачного листа, присутствуют в количестве, составляющем от 1 до 1000 мкг/мл, предпочтительно от 10 до 500 мкг/мл, предпочтительно от 50 до 300 мкг/мл, предпочтительно от 60 до 200 мкг/мл, предпочтительно от 80 до 150 мкг/мл.

15. Фармацевтическая композиция по п.13 или 14, дополнительно содержащая белки, экстрагированные из марихуаны.

16. Фармацевтическая композиция по любому из пп.13-15, выполненная в форме, подходящей для введения посредством подкожной инъекции, в форме, подходящей для введения посредством адгезионной трансдермальной терапевтической системы, такой как пластырь, или в форме, подходящей для введения распылением или выпариванием.

17. Применение фармацевтической композиции по любому из пп.13-16 для лечения табачной зависимости.

18. Применение фармацевтической композиции по п.15 для комбинированного лечения от табачной зависимости и пристрастия к марихуане.

19. Применение по п.17 или 18, в котором фармацевтическая композиция выполнена в виде лекарственной формы объемом от 0,03 до 10 мл, предпочтительно от 0,1 до 5 мл, предпочтительно от 0,5 до 2 мл.

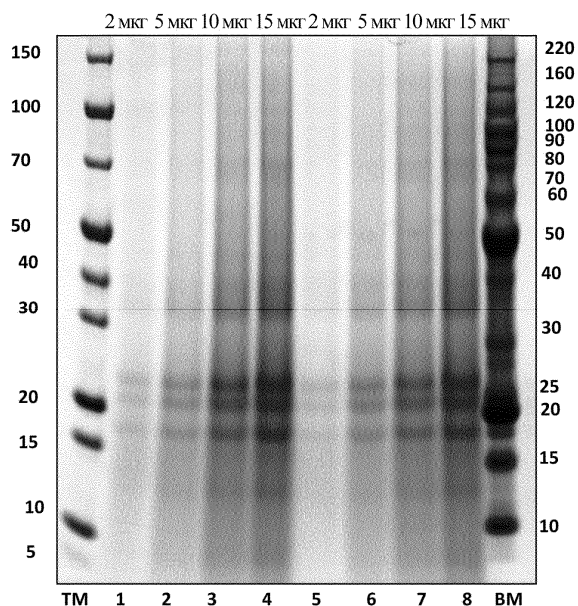
20. Способ получения экстракта табачного листа по любому из пп.1-12, включающий следующие этапы:

- а) сушку табачных листьев,  
 б) размалывание высушенных табачных листьев до получения размолотых высушенных табачных листьев,  
 в) экстракцию размолотых высушенных табачных листьев при механическом перемешивании растворителем,  
 г) отделение твердых остатков от раствора экстракта размолотого высушенного табачного листа фильтрованием или центрифугированием, в результате чего получают не содержащий твердого остатка раствор экстракта размолотого высушенного табачного листа,  
 д) диафильтрацию при постоянном объеме раствора, полученного на этапе г, в присутствии растворителя, взятого в количестве, составляющем от 2 до 12 объемов, где объем равен объему экстракта, с помощью мембраны с граничным значением пропускания 10 кДа.

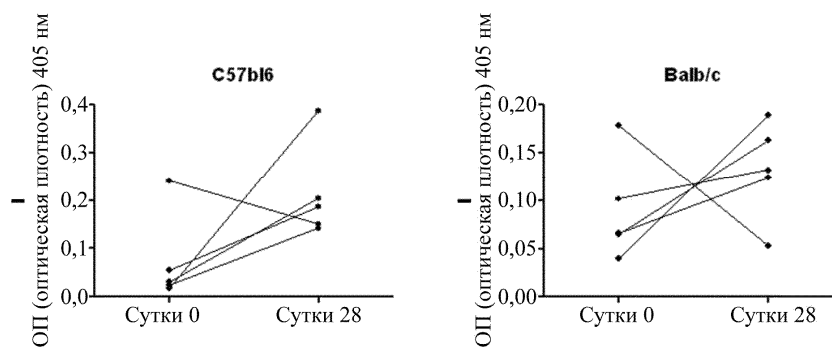
21. Способ по п.20, в котором растворитель на этапе с и/или растворитель на этапе д представляет собой водный растворитель, причем растворитель на этапе с предпочтительно представляет собой водный буферный раствор, рН которого составляет от 6,0 до 8,5.

22. Способ по п.20 или 21, в котором диафильтрацию на этапе д осуществляют в количестве растворителя, составляющем от 3 до 10 объемов, предпочтительно от 4 до 8 объемов, предпочтительно 6 объемов, где объем равен объему экстракта.

23. Способ по любому из пп.20-22, дополнительно включающий этап ф лиофилизации раствора белка, полученного на этапе е.

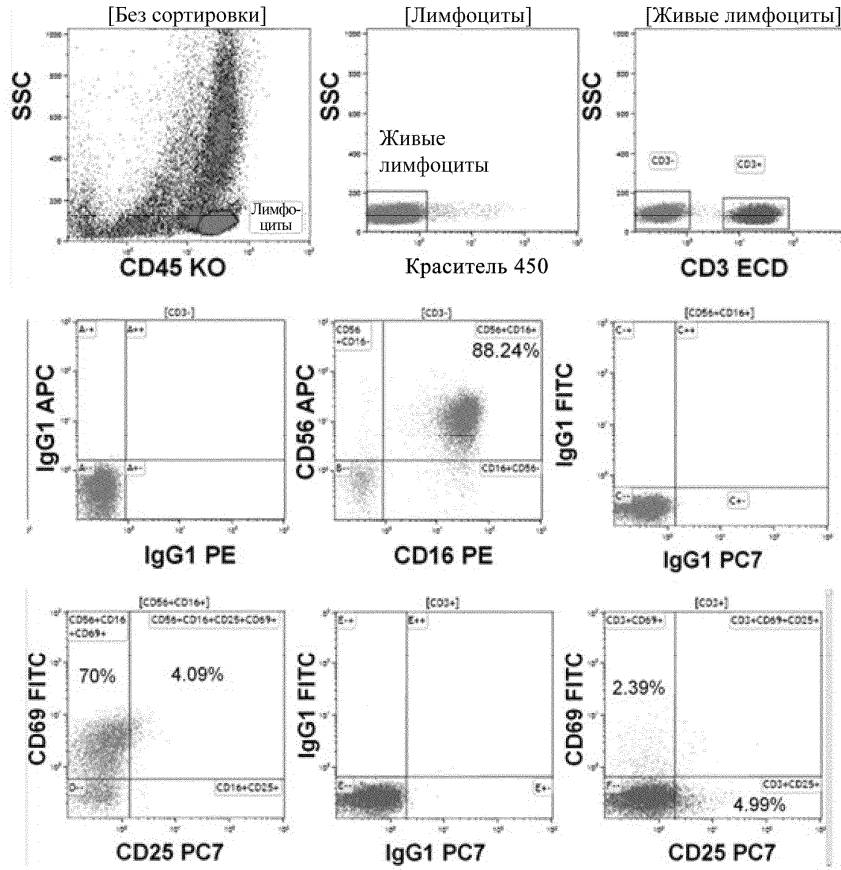


Фиг. 1

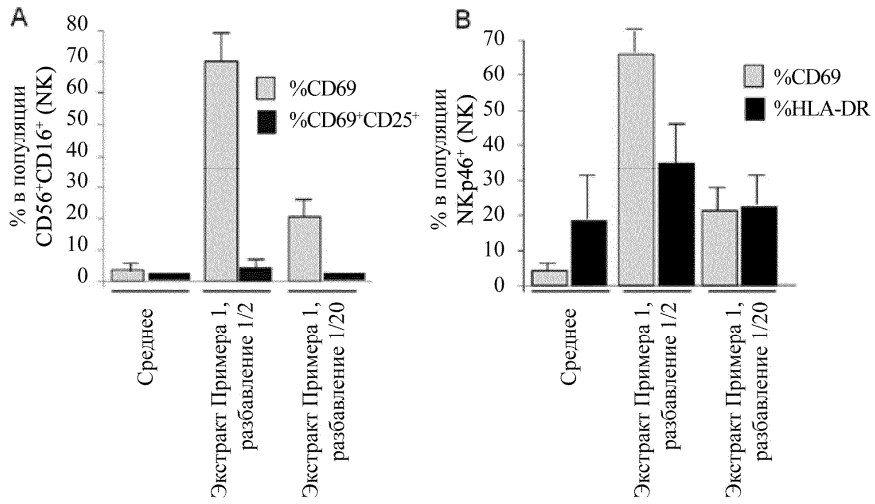


Фиг. 2

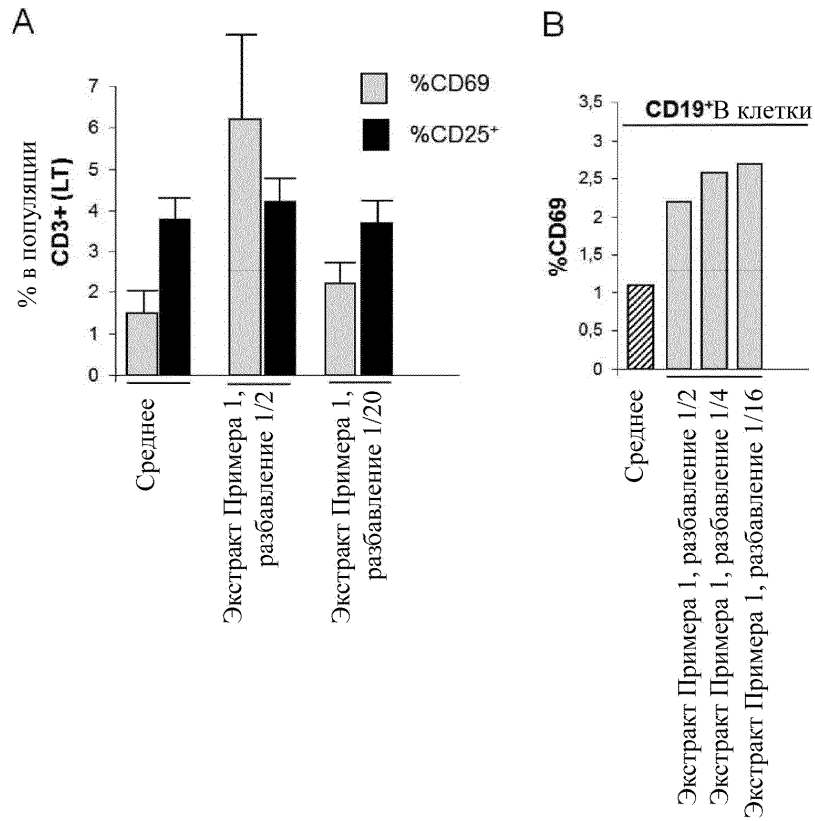




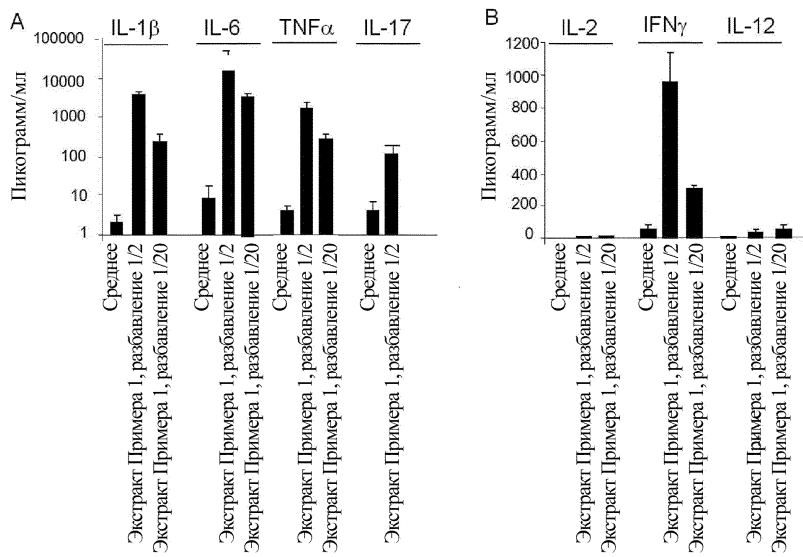
Фиг. 3



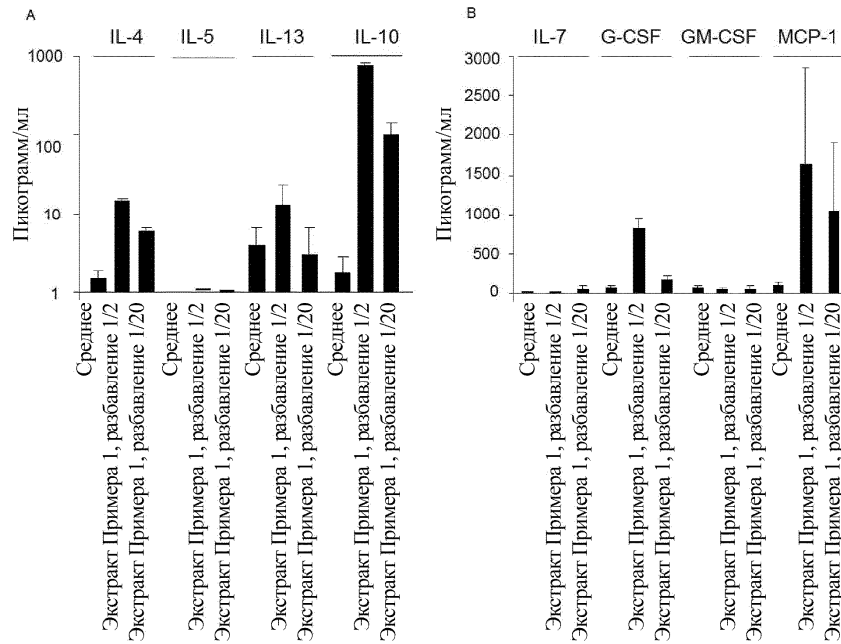
Фиг. 4



Фиг. 5



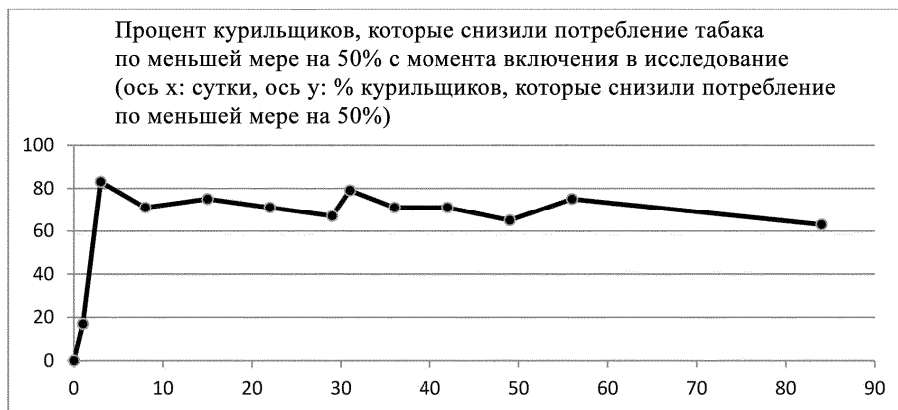
Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9

