



УКРАЇНА

(19) UA (11) 38889 (13) A

(51) 7 A61K9/02, A61K31/661, A61K35/78,
C07C275/00МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) ЛІКУВАЛЬНИЙ ЗАСІБ "ЛІВАРЕКС" НА ОСНОВІ ДИМЕТОКСІУРЕЇДОФОСФОРНОЇ КИСЛОТИ

(21) 2000116479

(22) 16.11.2000

(24) 15.05.2001

(33) UA

(46) 15.05.2001, Бюл. № 4, 2001 р.

(72) Шумейко Володимир Миколайович, Овруцький Владислав Матвійович, Чекман Іван Сергійович, Квят В'ячеслав Петрович, Шарикіна Надія Іванівна, Лебіденко Володимир Миколайович, Лукошкін Георгій Іванович, Шумейко Микола Володимирович, Овруцький Олексій Владиславович, Лукошкін Олексій Георгійович

(73) Шумейко Володимир Миколайович, Овруцький Владислав Матвійович, Чекман Іван Сергійович, Квят В'ячеслав Петрович, Шарикіна Надія Іванівна, Лебіденко Володимир Миколайович, Лукошкін Георгій Іванович, Шумейко Микола Володимирович, Овруцький Олексій Владиславович, Лукошкін Олексій Георгійович

(57) 1. Лікувальний засіб на основі диметоксіуреїдофосфорної кислоти, який відрізняється тим, що представлений у вигляді супозиторію, причому він додатково містить сухий екстракт чистотілу великого, гермогран та основу при такому співвідношенні компонентів, мас. %:

диметоксіуреїдофосфорна

кислота	1,25-1,37
сухий екстракт чистотілу великого	0,25-0,27
гермогран	12,45-13,75
основа	решта.

2. Засіб за п. 1, який відрізняється тим, що він виявляє протипухлинну дію.

3. Засіб за п. 1 або 2, який відрізняється тим, що він виявляє інтерферогенну дію.

4. Засіб за будь-яким з пп. 1-3, який відрізняється тим, що він виявляє протівірусну дію.

5. Засіб за будь-яким з пп. 1-4, який відрізняється тим, що він виявляє протизапальну дію.

6. Засіб за будь-яким з пп. 1-5, який відрізняється тим, що як основу він містить желатину медичну, гліцерин, спирт етиловий 95% та воду дистильовану, при такому співвідношенні компонентів, мас. %:

диметоксіуреїдофосфорна

кислота	1,25-1,37
сухий екстракт чистотілу великого	0,25-0,27
гермогран	12,45-13,75
желатина медична	11,42-12,62
гліцерин	45,62-50,42
спирт етиловий 95%	1,18-1,30
вода дистильована	решта.

Винахід відноситься до медицини, конкретно - до фармакології речовин, які виявляють протипухлинні, протівірусні, інтерферогенні, протизапальні властивості при введенні у пряму кишку і може бути використаний у терапевтичній практиці органів охорони здоров'я та ветеринарній медицині.

Аналоги за складом компонентів, що мають подібний спектр активності, в літературі не описані, серед відомих лікувальних засобів не виявлені.

Відома велика кількість лікувальних засобів і біологічно активних речовин, що виявляють протипухлинну [1], протизапальну [2], протівірусну [3], інтерферогенну [4] активність. Але більшість з них, по-перше, розрахована на використання як окремі препарати, одночасне використання яких неможливе; по-друге, створює велике фармакотерапевтичне навантаження на організм, що може супроводжуватися побічною дією та викликати

небажані ускладнення; по-третє, вводяться ін'єкційно, що для хронічно хворих є незручним і вимагає залучення медперсоналу.

Протипухлинні лікувальні засоби [1, 5] відносяться до різноманітних класів органічних сполук, однак мають спільний недолік - вони є імунологічними депресантами. Жодна з вищезазначених сполук [1, 5] не мають інтерферогенної дії.

Аналогом за інтерферогенною та протизапальною дією є мефенамінова кислота [2, 4]. Але вона викликає агранулоцитоз та має виражену подразнюючу дію, особливо на шлунково-кишковий тракт, не призначена для ректального введення.

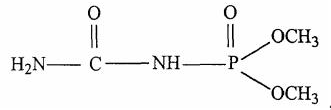
Відомі індуктори інтерферону - полі (І) і полі (Ц) та його аналоги [4], токсичні, викликають алергічні реакції, мають високу собівартість і обмежені у використанні.

(19) UA (11) 38889 (13) A

Використання полірибонуклеотидів чи "ослаблених" вірусів [4] для прискорення виділення інтерферону можливо лише для експериментальної практики та є вкрай небезпечним для здоров'я.

Аналогом за протипухлинною дією є натулан (прокарбазін) [1]. Його використовують для лікування пухлинної хвороби, але він здатний викликати ускладнення (блювання, запаморочення, інколи алергози).

Найближчим аналогом є диметоксіуреїдофосфорна кислота



яка описана в Патенті України 21453 А від 16.12.1997 р. Вона виявляє протипухлинну, інтерферогенну, протівірусну дію та характеризується низькою токсичністю. Недоліками зазначеного засобу є недостатня ефективність протипухлинної дії, незначно виражені інтерферогенна та протівірусна дії, та відсутність протизапальної дії, що перешкоджають широкому використанню в клінічній практиці.

Задача, яка була поставлена в основу винаходу, стосується розробки нового лікувального засобу "Ліварекс" на основі диметоксіуреїдофосфорної кислоти, який представлений у вигляді супозиторію і виявляє протипухлинну, інтерферогенну, протівірусну, та протизапальну дії.

Поставлена задача досягається тим, що запропонований лікувальний засіб містить диметоксіуреїдофосфорну кислоту і, відповідно до винаходу, додатково містить сухий екстракт чистотілу великого, гермогран та основу при такому співвідношенні компонентів, мас. %:

диметоксіуреїдофосфорна кислота	1,25-1,37
сухий екстракт чистотілу великого	0,25-0,27
гермогран	12,45-13,75
основа	решта.

Сухий екстракт чистотілу великого був одержаний з *Herba chilionii majoris* відповідно до вимог XI Державної фармакопеї СРСР, т. 2, ст. 47, с. 309-311 та с. 160-161 (ст. "Екстракти"), та виявляє протизапальну дію.

Гермогран (ТУ-У-15.054.-94) був одержаний з зародку пшениці. Він дозволений до використання у ветеринарній медицині. Згідно рішення Державного науково-експертного центру лікарських засобів МОЗ України (Протокол № 3 від 7.03.2000 р.) дозволений до клінічних випробувань як лікувальний засіб з адаптогенними та біостимулюючими властивостями.

Для формування лікувального засобу "Ліварекс" у вигляді супозиторію як основа (допоміжні речовини) введені вода (Х Державна фармакопея СРСР, стаття 73, Вода дистильована, стор. 107-108), спирт етиловий 95% (Х Державна фармакопея СРСР, ст. 631. Спирт етиловий. - С. 644-646), желатина (Х Державна фармакопея СРСР, ст. 309. Желатина медична. - С. 331-333) та гліцерин (Х Державна фармакопея СРСР, ст. 309. Гліцерин. - С. 876).

Запропонований лікувальний засіб відносно відомих препаратів має переваги, які полягають в

ефективному лікуванні онкологічних захворювань та їх інфекційних та запальних ускладнень.

Наступні приклади ілюструють даний винахід і не повинні розглядатися як такі, що обмежують даний винахід, викладений в наведеній формулі винаходу.

Приклад 1. Виготовлення лікувального засобу "Ліварекс" на основі диметоксіуреїдофосфорної кислоти.

Лікувальний засіб "Ліварекс" на основі диметоксіуреїдофосфорної кислоти виготовлений відповідно до вимог XI Державної Фармакопеї СРСР, том 2, стор. 151-153.

Для виготовлення 100 супозиторіїв "Ліварекс" необхідно використати компоненти у такій кількості:

диметоксіуреїдофосфорна кислота	5,0 г;
сухий екстракт чистотілу великого	1,0 г;
гермогран (ТУ-У-15.054.-94)	50,0 г;
желатина медична	46,0 г;
гліцерин	183,7 г;
спирт етиловий 95%	4,8 г;
вода дистильована	92,0 г.

Перший склад. Для його утворення 46,0 г желатини медичної змішували з 70,0 г дистильованої води та ставили на 120 хвилин для набування при температурі 20°C. Потім додавали 183,7 г гліцерину, при температурі 55-60°C ретельно перемішували до однорідної маси і додавали гермогран 50,0 г.

Другий склад готували паралельно. Для цього у залишку води (22,0 г) з 4,8 г спирту етилового 95% розчиняли 5,0 г диметоксіуреїдофосфорної кислоти і 1,0 г сухого екстракту чистотілу великого. Все перемішували до повного розчинення при температурі до 50°C.

Перший та другий склади змішували до однорідної, гомогенної маси при температурі не вище 60°C.

Потім суміш у теплом вигляді розливали у форми для виготовлення супозиторіїв.

Маса одного супозиторію не повинна перевищувати 3,825±0,021 г, що відповідає дозі 55 мг на 1 кг маси тіла

Отримані супозиторії зберігалися у вакуумній упаковці при температурі + 4-5°C.

Приклад 2. Вивчення гострої токсичності лікувального засобу "Ліварекс" на основі диметоксіуреїдофосфорної кислоти.

Вивчались основні параметри токсикометрії запропонованого, відповідно до винаходу, лікувального засобу при різних шляхах аплікації супозиторію відповідно до вимог ГОСТ 12.1.007-76.

Згідно із "Методичним рекомендаціям..." [6], гостра токсичність повинна вивчатися на "не менше ніж на 3-х видах тварин, але обов'язково на гризунах та негризунах". Оцінка безпечності впливу "Ліварексу" була розпочата з вивчення його відповідності вимогам ГОСТ 12.1.007-76. Використані для вивчення дози чи концентрації лімітувались технічними умовами введення потенційного лікувального засобу.

Зразки супозиторію розігрівали до 30-32°C у стерильній мірній колбі об'ємом 50 мл та набирали у стерильний, теплий на дотик шприц. Після цієї операції супозиторії були застосовані для парен-

терального (внутрішньом'язевого і внутрішньочеревинного), наскірного, перорального, ректального і вагінального введення за стандартними операційними процедурами. Підготовлені для використання супозиторії вводили інгалаційне тваринам за допомогою ежекторного пристрою ЭГВ-ПАУ-м, що був розроблений у ГОСНІОХТ (Москва - Шихани, 1979 р.) для інгалації у статичних та динамічних умовах. Пристрій придатний для введення загущених рецептур речовин, які мають здатність змінювати агрегатний стан (з рідини до гелю) та "залипати" на поверхнях.

Результати експерименту фіксувались на 7 та 14 добу спостереження.

В узагальненому вигляді показники гострої токсичності наведені у табл. 1.

Таким чином, можна констатувати, що при вивченні гострої токсичності лікувального засіб "Ліварекс", незалежно від шляху аплікації при виконанні досліджень за ГОСТ 12.1.007-76, має властивості БАР 3-го класу небезпеки.

В подальшому у всіх випадках вивчення ефектів дії лікувального засобу "Ліварекс" та засоби порівняння вводились ректально. Всі дози визначались у частках від показника середньолетальної дії (0,5; 0,25; 0,1; 0,01 чи Lim_{ac}) при спостереженні за тваринами протягом 14 діб (LD_{50}^{h336}). При цьому використовувались ректальні ефективні дози супозиторію для білих щурів: при значенні 0,5 LD_{50} дорівнювало 205 мг "Ліварекс" на кг маси тіла тварини; для 0,25 LD_{50} - 102,5 мг "Ліварекс" на кг маси тіла тварини; 0,1 LD_{50} - 41 мг "Ліварекс" на кг маси тіла тварини; 0,01 LD_{50} - 4,1 мг "Ліварекс" на кг маси тіла тварини. Ефективні дози для білих мишей при значенні 0,5 LD_{50} , 0,25 LD_{50} , 0,1 LD_{50} та 0,01 LD_{50} становили відповідно 250 мг "Ліварекс" на кг маси тіла тварини; 125 мг "Ліварекс" на кг маси тіла тварини; 50 мг "Ліварекс" на кг маси тіла тварини та 5 мг "Ліварекс" на кг маси тіла тварини.

Для порівняння вираженості специфічних ефектів дії лікувального засобу "Ліварекс" та засобу порівняння диметоксіурейдофосфорної кислоти використовувались значення доз 0,1 LD_{50} та 0,01 LD_{50} , які становили відповідно 47 та 4,7 мг засобу на кг маси тіла щура.

Приклад 3. Випробування лікувального засобу "Ліварекс" на основі диметоксіурейдофосфорної кислоти у вигляді супозиторію на токсичність.

Виготовлені відповідно до винаходу супозиторії "Ліварекс" призначаються для введення у пряму кишку або вагіну. Відповідно до вимог Державної фармакопеї СРСР XI випуску (вона залишається директивним документом в Україні при контролі якості лікувальних засобів) випробування лікувального засобу на токсичність проводяться на білих мишах обох статей після відповідного карантинного утримання з метою визначення стану їх здоров'я. Перевага надається перевірці при внутрішньочеревинному введенні чи введенні тим шляхом, яким препарат вводиться для використання у хіміотерапевтичній практиці.

Експерименти проводились на білих мишах з масою тіла від 19 до 21 г. Кожна серія супозиторіїв випробовувалась на різних групах тварин, що кількісно складалась з 5 мишей.

За добу до проведення випробування тварини переносились у кімнату для виконання дослідів, де

вони знаходились в умовах постійної температури та вологості.

Після зважування тварини протягом 2-4 год не отримували корм та воду.

Зразки 3-х серій супозиторіїв розігрівались до 30-32°C. Далі готували тест-дозу за умов, що наведені у прикладі 2. Час, необхідний для внутрішньочеревинного введення, має становити не більше 7-10 хвилин.

Кожна з білих мишей у групах тварин (табл. 2) отримувала рівну за масовими показниками тест-дозу, що виготовлена з різних зразків супозиторію "Ліварекс", які передавались на токсикологічне випробування. Приготовані об'єми тест-доз вводились у ректальну порожнину мишей у кількості 0,2 мл на одну тварину. Спостереження за білими мишами тривало 48 год з моменту аплікації. На 24 та 48 годину візуально оцінювався стан інтегральних показників здоров'я мишей (активність, охайність, відношення до води та їжі, реакції на дотик, тургор м'язів). Тварини виводились з досліду на 72 годину з моменту аплікації.

На основі вивчення гострої токсичності (приклад 2), такі зразки лікувального засобу, які не приводили до загибелі білих щурів протягом 2-х діб з моменту ректального введення, вважаються такими, що пройшли випробування.

Таким чином, зразок лікувального засобу "Ліварекс", виготовленого відповідно до винаходу, може вважатись таким, що витримав випробування на токсичність, оскільки при ректальному введенні 0,2 мл протягом 48 годин спостереження не загинула жодна з піддослідних білих мишей масою 20 г.

Приклад 4. Вивчення впливу лікувального засобу "Ліварекс" на основі диметоксіурейдофосфорної кислоти на меланому В16.

Протипухлинні властивості запропонованого лікувального засобу вивчали на перевивних моделях пухлин за загальноприйнятими методами [5].

Досліди *in vivo* були розпочаті з використання експериментальних пухлин на моделі трансплантованої метастазуючої меланоми В16. Штам метастазуючої меланоми В16 підтримували на мишах лінії СС57ВІ шляхом внутрішньом'язевого перещеплювання суспензій пухлинних клітин. В підготовчій стадії експерименту було проведено повторне пасивування штаму в умовах, які дозволяли досягати 100% розвитку пухлин.

Ректальне введення супозиторію "Ліварекс" в усіх дослідах здійснювалось у дозі 0,01 LD_{50} . Введення розпочинали наступної доби після перещеплення пухлини і проводили 4 рази з інтервалом в 1 добу.

Маса пухлин після введення "Ліварексу" мала вигляд некробіотичних утворень. Враховуючи це, результати дослідів аналізували через 2 тижні після перещеплення пухлини. Пухлини перепарували, ретельно відділяючи тканину меланоми від неушкодженої м'язової тканини, після чого визначали масу пухлин.

Результат експерименту наведені у табл. 3.

Як бачимо з наведених даних, введення лікувального засобу "Ліварекс", призводить до зменшення маси первинних пухлин меланоми В16 (59,73%). При цьому слід також зазначити, що у контрольній групі у 3 тварин з 8 на момент закін-

чення дослідів було виявлено по 2 метастатичних вузли в легенях, в той же час як у дослідній групі, де використовували "Ліварекс", ознак додаткової токсичності чи метастатичних вузлів у паренхіматозних органах не виявлено у жодної миші.

Приклад 5. Вивчення впливу лікувального засобу "Ліварекс" на основі диметоксіурейдофосфornoї кислоти на саркому Уокера та лімфалейкоз L-1210.

Дослідження протипухлинної активності лікувального засобу "Ліварекс" на основі диметоксіурейдофосфornoї кислоти проводилось на тваринах, яким перевивалась саркома Уокера або лімфалейкоз L-1210. Експеримент проводився на 80 мишах. При проведенні дослідів враховувалось виживання тварин, термін їх загибелі, загальний стан, поведінка та маса тіла тварин. Результати ефективності впливу "Ліварексу" на пухлини оцінювали за відсотком гальмування росту пухлини (у випадку пухлини саркома Уокера) та за тривалістю життя (у випадку лімфосаркоми L-1210).

Саркома Уокера трансплантувалась білим безпородним мишам підшкірно 20-25% гомогенатом пухлинної тканини в фізіологічному розчині об'ємом 0,25 мл. Для лікування тварин "Ліварекс" вводили через добу після перевивки пухлин, щоденно, протягом 10 діб. Після закінчення курсу лікування тварин забивали, пухлини виділяли та зважували.

Штам лімфолейкозу L-1210 перевивали мишам лінії ДБА-2 внутрішньочеревинно, пухлинною суспензією в концентрації 10^6 лейкоцитних клітин в об'ємі 0,1 мл. Інокулят розводили стерильним середовищем 199. Лікування мишей з лейкозом L-1210 починали через добу після перевивання. Курс складався з 5 щоденних введень супозиторію "Ліварекс". Після закінчення лікування тварин залишали під наглядом для визначення тривалості життя.

Результати виконаних *in vitro* експериментів свідчать про те, що лікувальний засіб "Ліварекс" гальмує ріст культури лімфомних клітин людини. Зокрема, експериментально показано, що тривалість життя збільшувалась на 25,5% при лімфосаркомі L-1210, а при саркомі Уокера маса пухлин зменшувалась на 29% через 12 діб введення "Ліварексу".

Середня тривалість життя дослідних тварин при лімфосаркомі L-1210 була: без лікування - 12,0 діб, а при використанні лікувального засобу "Ліварекс" на основі диметоксіурейдофосфornoї кислоти збільшувалась до 17,2 доби.

Приклад 6. Порівняння ефективності впливу на карциноми Герена лікувального засобу "Ліварекс" та диметилурейдофосфornoї кислоти.

Були проведені порівняльні дослідження ефективності протипухлинної активності супозиторіїв "Ліварекс" та диметилурейдофосфornoї кислоти на моделі карциноми Герена. Експеримент проводили на 60 білих щурах з масою 210 ± 23 г, яким підшкірно в ділянці правого стегна (задня кінцівка) перевивали карциному Герена у вигляді 20% суспензії на фізіологічному розчині, яку отримували з 10-денної пухлини. Останню попередньо звільняли від капсули, судин, сполучнотканинних прошарків. Тварин розподіляли на 3 групи по 20 щурів в кожній.

В першій групі (контроль) тварини не отримували лікування. В другій групі на 9 добу після перевивання пухлини, в момент появи пальпаторно визначеної пухлини, починали вводити лікувальний засіб "Ліварекс" ректально у дозі 0,1 ЛД₅₀ щоденно протягом 7 діб. Третю групу складали тварини, яким з 9 доби після перевивання вводили ректально розчин диметилурейдофосфornoї кислоти у дозі 0,1 ЛД₅₀ щоденно терміном 7 діб.

Порівнюючи результати застосування еквітоксичних доз супозиторію "Ліварекс" та диметилурейдофосфornoї кислоти в модельному досліді на карциному Герена. Експериментально було встановлено, що застосування лікувального засобу "Ліварекс" виявляло кращу протипухлинну дію, ніж використанням диметилурейдофосфornoї кислоти (табл. 4).

Найбільшого позитивного ефекту дії досягнуто в другій групі, де використовували лікувальний засіб "Ліварекс". Повне розсмоктування було зафіксоване при введенні "Ліварексу" у 11 щурів з 20, що є високим результатом.

Приклад 7. Дослідження впливу лікувального засобу "Ліварекс" на основі диметоксіурейдофосфornoї кислоти на клінічні показники при лікуванні пухлин прямої кишки людини, раку шийки і тіла матки та раку яєчника (підкапсульний тест).

Проведені дослідження щодо вивчення впливу супозиторію "Ліварекс" на ріст пухлин прямої кишки людини, раку шийки та тіла матки та раку яєчника (підкапсульний тест).

Імплантація матеріалу злоякісних пухлин прямої кишки людини, раку шийки та тіла матки та раку яєчника під капсулу нирки мишей лінії СВА здійснювалась інокулятами з масою в 1 мг. Супозиторії "Ліварекс" вводили у дозі 0,1 ЛД₅₀ *per rectum* протягом 3-х днів, починаючи з 4-ї доби після трансплантації пухлинної тканини. В досліді використані тварини СВА (СВА_α, СВ₇, ВС/0, F₁), що були розведені у розпліднику НАН України (м. Глеваха), які отримували звичайний харчовий раціон. Маса тіла тварин складала 18 ± 2 г. Миші забивались евентерацією - гільйотинна дислокація. В клініко-експериментальних дослідженнях на ксенограмах пухлин хворих людей (операційний матеріал) був використаний метод Богдена і співавторів (підкапсульний тест).

Ефективність використаних супозиторіїв оцінювали через 7 діб після введення інокуляту. Регресію пухлини визначали як відношення зміни маси пухлини у дослідних групах щодо контролю ("Ліварекс" не використовували) у відсотках. Пухлина вважалась чутливою до введення супозиторію, якщо її маса під впливом лікування була на 25% менше відносно контрольних тварин. Показником активності супозиторію був відсотком гальмування росту гетеротрансплантантів пухлини людини під капсулою нирки мишей лінії СВА при критерії значущості більше або на рівні 25%.

В табл. 5-9 наведені експериментальні дані про вплив "Ліварексу" на тканину пухлин.

Таким чином, застосування лікувального засобу "Ліварекс" на основі диметоксіурейдофосфornoї кислоти в дозі 0,1 ЛД₅₀ *per rectum* зменшувало масу пухлини у порівнянні з контролем, гальмувало ріст пухлини прямої кишки людини, раку шийки та тіла матки та раку яєчника (підкапсульний тест).

Приклад 8. Вивчення протизапальної дії лікувального засобу "Ліварекс" на основі диметоксіуреїдофосфорної кислоти.

Протизапальні властивості заявлено засобу вивчали на моделях карагенового та формалінового набряку, які моделювали шляхом субплантального введення щурам 0,1 мл 1% розчину карагенину чи 0,1 мл 10% розчину формаліну. Лікувальний засіб "Ліварекс" вводили ректально в дозі 0,1 ЛД₅₀ або 0,01 ЛД₅₀. Як препарат порівняння використовували вольтарен в терапевтичній дозі. Критерієм оцінки був відсоток інгібування набряку, який вимірювали волюметрично.

Дослідження проведено на білих нелінійних мишах та щурах з масою відповідно 20±2 г та 140±20 г. Тварини утримувались на стандартному харчовому раціоні і одержували їжу та питво *ad libitum*.

Первинна оцінка анальгезуючої дії препарату досліджена на моделях хімічної ("корчі", що викликані оцтовою кислотою) та термічної (метод "гарячої пластики") ноцицептивної стимуляції при ректальному введенні супозиторію "Ліварекс" мишам. Критеріями оцінки служили відсотки інгібування кількості "корчів" та відсоток зміни до вихідного латентного періоду реакції облизування задньої лапки.

Жарознижуючі властивості лікувального засобу "Ліварекс" оцінювались на моделі пірогеналової лихоманки, яку викликали шляхом внутрішньовенного введення пірогеналу із розрахунку 500 МПД/кг маси тварин. Порівнювали температуру тіла тварин до і у різні строки після введення супозиторію "Ліварекс". Отримані результати наведені в табл. 10.

Проведені дослідження, результати яких наведені в табл. 10, свідчать, що лікувальний засіб "Ліварекс" виявляє протизапальну активність.

В табл. 11 наведені результати оцінки протизапальної дії лікувального засобу "Ліварекс" залежно від дози та у порівнянні з вольтареном. Отримані результати узгоджуються з результатами розгляду результатів антипроліферативної дії (табл. 12) та результатами оцінки анальгезуючої (табл. 13-14) та жарознижуючих властивостей на моделі пірогеналової лихоманки (табл. 15).

Як показали проведені дослідження, лікувальний засіб "Ліварекс" виявляє статистично достовірні жарознижуючі властивості, що найбільш виражено при застосуванні препарату в дозі 1,54 мг/кг через 60 хвилин після введення. При використанні зазначеної дози зниження температури тіла при пірогеналовій лихоманці реєструється вже через 30 хвилин і становить - 0,7°C. Пік жарознижуючої дії припадає на 60 хвилину (зниження температури становить 1,14°C). Необхідно зазначити, що жарознижуючий ефект препарату має короточасний характер. Вже через 1,5 години після застосування наведена різниця температур відсутня.

Приклад 9. Вивчення інтерферогенної активності лікувального засобу "Ліварекс" на основі диметоксіуреїдофосфорної кислоти.

Спочатку було досліджено інтерферогенну активність в системі суспензійних культур Т-лімфоцитів-STM. Вивчення проводилось порівняно з гама-інтерфероном (табл. 16). Було встановлю-

но, що запропонований лікувальний засіб "Ліварекс" є активним індуктором інтерферону.

При поглибленому вивченні інтерферогенних властивостей супозиторію "Ліварекс" при введенні його мишам у дозі 55 мг/кг вміст у сироватці крові досягав 640 од/мл. Тому для з'ясування рівня оптимальної дози ввели по 0,2 мл в кількості від 25 до 125 мг/кг маси тіла тварини (табл. 17).

З наведених даних видно, що оптимальна доза індукції інтерферону у мишей за допомогою "Ліварексу" може знаходитись в межах 50-100 мг/кг.

Оптимальна доза для досягнення позитивного ефекту в культурі клітин лімфоцитів людини є 1 мг/кг при вмісті інтерферону 640 од/мл.акт. 50 дослідів було проведено у порівнянні з відомим індуктором Полі І:ПоліЦ. Концентрація інтерферону у надосадковій рідині сягала 640 од/мл.акт.

Таким чином, індукований інтерферон був типовим в реакції нейтралізації моноклональних антитіл до альфа-інтерферону.

Приклад 10. Вивчення впливу лікувального засобу "Ліварекс" на основі диметоксіуреїдофосфорної кислоти на модель герпетичного менінгоенцефаліту.

Для вивчення антивірусної дії супозиторію "Ліварекс" була використана модель герпетичного менінгоенцефаліту. Ця модель зручна для оцінки вираженості симптоматики, відмічається 100% відтворюваність. Розвиток клінічних симптомів герпетичного менінгоенцефаліту починається на 5-6 добу з моменту інфікування. Максимального прояву зміни досягають на 13-14 добу, а далі відмічається зменшення проявів симптоматики з наступним клінічним одужанням тварин, що вижили. Наявність гострої герпетичної інфекції підтверджується за допомогою імунофлюоресценції. Летальність тварин, що були інфіковані вірусом герпесу простого наближається без лікування до 100%. Для моделювання експериментальної герпетичної інфекції використовували вірус герпесу простого 1 типу. До введення у дослід він зберігався у 50% розчині гліцерину на фосфорному буферному розчині при температурі 15°C.

В досліді були використані білі безпородні миші вагою 14-16 г. Вірус герпесу простого 1 типу вводили мишам у мозок в об'ємі 0,03 мл. Величина заражаючої дози в досліді дорівнювала 0,1 ЛД₅₀ (мишиних летальних доз). В досліді використовували "Ліварекс" у вигляді свічок ректального або вагінального введення. Як референс-препарат використовувався препарат Віралекс фірми Wellcome (Великобританія) відповідно до стандартної схеми лікування.

Кожний дослід включав 3 групи тварин по 10-15 мишей у кожній:

1 група - миші, яким вводили досліджуваний засіб "Ліварекс" за 24 години (профілактична дія), через 24 години після інфікування тварин вірусом герпесу (лікувальна дія);

2 група - миші, яким вводили Віралекс за 24 години, через 24 години після інфікування тварин вірусом герпесу;

3 група - миші, яким вводили фізіологічний розчин та вірус герпесу (плацебо).

Оцінка активності препарату проводилась шляхом порівняння летальності мишей в дослідній та контрольних групах. При цьому враховувалось: відсоток летальності тварин;

кратність захисту (КЗ) - кратність зменшення кількості мишей, що загинули в дослідній групі у порівнянні з контрольним;

індекс ефективності (ІЕ) - обчислювали за формулою

$$IE = \frac{(K3 - 1) \cdot 100}{K3}$$

Результати дослідження профілактичної та лікувальної дії наведені у табл. 18-20.

Тестування репродукції вірусу здійснювалось імуноферментним методом з залученням моноклональних антитіл. Результати експерименту показали, що лікувальний засіб "Ліварекс" інгібує репродукцію вірусу грипу на 2,0 Іг. ЛД₅₀. Це свідчить про активний процес інгібування репродукції вірусу грипу.

Таким чином, проведені дослідження показали, що супозиторії "Ліварекс" при введенні rectum, мають виражений антигерпетичний ефект при профілактичному та лікувальному застосуванні.

Приклад 11. Вивчення впливу лікувального засобу "Ліварекс" на основі диметоксіуреїдофосфорої кислоти на ВІЛ.

Для оцінки анти-ВІЛ активності використовували модель первинно-інфікованих вірусом імунодефіциту людей суспензійних клітин МТ-4. Штам ВІЛ-1 одержаний з Інституту вірусології РАМН. Інфікування клітин МК-4 штамом ВІЛ-1 проводили додаванням вірусу до клітинної суспензії в концентрації 4x10⁵ кл/мл та множинністю зараження 1,0 Іг ІД₅₀. Інгібуючий ефект препаратів оцінювали

на 5 добу культивування за кількістю вірусного антигену імуноферментним методом (тест-систем Vironostika, Нідерланди).

В дослідженні використовували супозиторії "Ліварекс", що вводились ректально в дозі 55 мг на 1 кг маси тварини. Як референт-препарат використовували ретровір в дозі 100 мкг/мл.

Результати дослідження наведені в табл. 21.

В результаті досліджень було встановлено, що введення лікувального засобу "Ліварексу" Інгібує репродукцію ВІЛ. Можна вважати, що інгібування репродукції ВІЛ здійснюється за рахунок сполуки диметилуреїдофосфорої кислоти.

Таким чином, проведені дослідження показали, що запропонований лікувальний засіб "Ліварекс" виявляє протипухлинну, інтерферогенну, протівірусну та протизапальну та може бути використаний в клінічній практиці органів охорони здоров'я та ветеринарної медицини для лікування онкологічних та супутніх інфекційних і запальних захворювань.

Джерела інформації

1. Phamindex. Лекарственные препараты. - К.: Морион, 1998. - 1038 с.

2. XI Державна фармакопея СРСР. - Т. 1, 2.

3. Патент України 21453 А від 16.12.1997 р.

4. Шумейко О.В. Екологічна токсикологія на порозі ХХІ сторіччя. Збірник наукових праць. - К.: ДІПРК, 1997. - Вип. 1. - С. 76-79.

5. Шумейко О.В. // Український кардіологічний журнал. - 1999. - Вип. II. - № 2. - С. 81-85.

6. Методичні рекомендації по представленню документації на лікарські засоби у Фармакологічний комітет МОЗ України / За ред. В.І. Кондратюка. - К.: МОЗ України, 1993. - 36 с.

Таблиця 1

Токсикометричні показники згідно із ГОСТ 12.1.007-76

Показник ефекту дії	Вид тварин	Термін визначення ефекту дії	
		7 доба	14 доба
Середня летальна доза при введенні у шлунок (ЛД ₅₀), мг/кг	Білі щури	>5000,0	5200,0±500,0
	Білі миші	>5000,0	6500,0±250,0
	Морські свинки	>5000,0	>5000,0
	Кролі	>5000,0	5100,0±450,0
	Коти	>5000,0	5250,0±160,0
Середня летальна доза при наскірній дії, (ЛД ₅₀), мг/кг	Білі щури	>2500,0	>2500,0
	Білі миші	>2500,0	>2500,0
	Кролі	>2500,0	>2500,0
Середня летальна концентрація у повітрі: Статика; Динаміка, LC ₅₀ ^{h336} , мг л/хв.	Білі щури, (ЛК ₅₀), мг/м ³	>50000,0	51000,0±110,50
	Білі миші (ЛК ₅₀), мг/м ³	>50000,0	52500,0±16,0
	Коти, (ЛК ₅₀), мг/м ³	>50000,0	52500,0±9,0
	Білі щури	0,320±0,09	
Внутрішньом'язево (ЛД ₅₀ ^{h336}), мг/кг	Білі миші	0,280±0,07	
	Білі щури	235,0±7,5	
Внутрішньочеревинно (ЛД ₅₀ ^{h336}), мг/кг	Білі миші	270,0±2,4	
	Білі щури	165,0±3,36	
Ректально (ЛД ₅₀ ^{h336}), мг/кг	Білі миші	200,0±8,51	
	Білі щури	410,0±20,0	
	Білі миші	500,0±15,5	
Оцінка небезпеки використання	Морські свинки	350,0±34,3	
	Помірно небезпечні	Помірно небезпечні	
Прогнозоване ГДК _{рз} , мг/м ³		>10,0	

Продовження табл. 1

Показник ефекту дії	Вид тварин	Термін визначення ефекту дії	
		7 доба	14 доба
Коефіцієнт видової чутливості		Щури:миші=0,8275	Морські свинки: щури від 0,85 до 0,96
Зона гострої дії		Від 15 до 42	Середнє 23,6
Клас небезпеки, ГОСТ 12.1.007.-76		3 - помірно токсичний	3 - помірно токсичний

Таблиця 2

Вплив тест-доз різних зразків лікувального засобу "Ліварекс" на білих мишей з масою тіла 20 г при ректальному введенні

Зразок лікувального засобу Серія	Розподіл загибелі (%) у різні терміни (год.)			Оцінка стану дослідних тварин
	24	48	72	
120595	0	0	0	Задовільний
141196	0	0	0	Задовільний
220499	0	0	0	Задовільний

Таблиця 3

Вплив лікувального засобу "Ліварекс" на зноші диметоксіуреїдофосфорної кислоти на розвиток перещепленої меланоми B16 у мишей

№ п/п	Маса пухлини, мг	
	Контрольна група	Дослідна група
1	660	132
2	656	255
3	625	355
4	680	475
5	729	515
6	1060	520
7	-	615
8	-	645
Середнє	735±180	439±108*
% змін відносно контролю		59,73

Таблиця 4

Динаміка зміни об'єму та маси пухлини карциноми Герена

Група	Кількість щурів	Об'єм пухлини, см ³					Маса пухлини (г)
		Початок	3 доба	5 доба	7 доба	10 доба	
1	20	0,8±0,02	6,6±0,8	39,2±1,1	50,1±3,6	75,3±5,3	42,5±6,1
2	20	0,8±0,04	2,3±0,2*	24,7±1,3*	24,2±2,0*	30,1±2,7*	20,2±0,1*
3	20	0,8±0,03	2,9±0,5*	33,6±1,2*	32,5±0,8*	38,8±1,3*	29,6±2,0*

* - зміни достовірні відносно контролю

Таблиця 5

Вплив лікувального засобу "Ліварекс" на ріст пухлини прямої кишки людини (підкапсульний тест)

№ групи	Умови дослідів	Кількість тварин	Маса пухлини, мг	Гальмування росту, %
1	Контроль	6	1,05±0,02	-
	Дослід	3	0,57±0,01	45,7
2	Контроль	6	1,20±0,02	-
	Дослід	3	0,45±0,02	62,5
3	Контроль	6	1,58±0,03	-
	Дослід	3	0,84±0,01	46,8
4	Контроль	6	1,60±0,01	-
	Дослід	3	0,75±0,02	53,1

Продовження табл. 5

№ групи	Умови дослід	Кількість тварин	Маса пухлини, мг	Гальмування росту, %
5	Контроль	6	1,38±0,03	-
	Дослід	3	0,67±0,01	51,5
Середнє значення	Контроль		1,362±0,012	-
	Дослід		0,688±0,011	51,02±1,92

Таблиця 6

Вплив лікувального засобу "Ліварекс" на рак шийки матки (підкапсульний тест)

	Маса трансплантату, г	Маса після лікування, г	Зміна відносно контролю, %
	2,36	1,63	30,93
	2,11	1,46	30,80
	2,51	1,86	25,89
	3,03	1,82	40,00
	3,14	2,53	19,42
Середнє значення	2,63±0,22	1,86±0,23	29,40±2,34

Таблиця 7

Вплив лікувального засобу "Ліварекс" на раку тіла матки (підкапсульний тест)

	Маса трансплантату, г	Маса після лікування, г	Гальмування відносно контролю, %
	2,85	1,60	43,86
	2,44	1,50	38,50
	3,69	2,85	22,80
	2,87	1,50	47,70
	3,05	2,40	33,01
Середнє значення	2,98±0,12	1,90±0,28	37,17±3,21

Таблиця 8

Вплив лікувального засобу "Ліварекс" на рак яєчника (підкапсульний тест)

	Маса трансплантату, г	Маса після лікування, г	Гальмування відносно контролю, %
	2,12	1,23	42,00
	2,40	1,67	30,41
	3,10	1,87	39,67
	2,41	1,20	50,20
	3,22	1,65	48,75
Середнє значення	2,65±0,35	1,53±0,14	42,21±3,23

Таблиця 9

Вплив лікувального засобу "Ліварекс" на основі диметоксіуреїдофосфорної кислоти на ріст пухлин людини в підкапсульному тесті

Пухлина	Маса пухлини, г		Гальмування росту, %	
	Контроль	"Ліварекс"	Контроль	"Ліварекс"
Рак прямої кишки	1,362±0,012	0,688±0,011	0	51,02±1,92
Рак яєчника	2,65±0,35	1,53±0,14	0	42,21±3,23
Рак тіла матки	2,98±0,12	1,90±0,28	0	37,17±3,21
Рак шийки матки	2,63±0,22	1,86±0,23	0	29,40±2,34
Критеріальне значення наявності ефекту гальмування росту = 25,0%				

Таблиця 10

Вплив лікувального засобу "Ліварекс" на основі диметоксіуреїдофосфорної кислоти на карагеніновий та формаліновий набряк

Модель набряку	Лікувальний засіб	Приріст набряку, мл	Зниження набряку, %
Карагеніновий набряк	Контроль	1,52±0,3	-
	Вольтарен	0,45±0,2	70,39
	0,1 ЛД ₅₀ "Ліварекс"	0,74±0,1	51,33
	0,1 ЛД ₅₀ "Ліварекс"	0,65±0,2	57,24
Формаліновий набряк	Контроль	1,35±0,2	-
	Вольтарен	0,53±0,1	60,74
	0,1 ЛД ₅₀ "Ліварекс"	0,72±0,1	46,67
	0,1 ЛД ₅₀ "Ліварекс"	0,63±0,1	53,33

Таблиця 11

Вплив лікувального засобу "Ліварекс" на основі диметоксіуреїдофосфорної кислоти на "вологу" та "суху" гранульому

Умови дослідження	"Волога" гранульома		"Суха" гранульома	
	маса, мг	пригнічення, %	маса, мг	пригнічення, %
Контроль	424,1±0,5	0	64,8±2,3	0
Вольтарен	205,0±11,4	-51,66	33,3±2,1	-48,61
0,1 ЛД ₅₀ "Ліварекс"	187,6±8,5	-55,76	30,5±2,5	-52,93
0,01 ЛД ₅₀ "Ліварекс"	131,8±21,3	-68,92	26,3±1,2	-59,41

Таблиця 12

Оцінка антипроліферативної дії лікувального засобу "Ліварекс" на основі диметоксіуреїдофосфорної кислоти

Умови дослідження	Термін реєстрації ефекту альтерації на шкірі			Розмір некрозу, мм
	гіперемія, хв	набряк, хв	виразка, год	
Контроль	35-45	40-50	24-32	30-48
Вольтарен	50-99	50-85	24-49	19-29
0,1 ЛД ₅₀ "Ліварекс"	60-175	90-120	37-75	10-20
0,01 ЛД ₅₀ "Ліварекс"	60-120	90-125	48-100	8-18

Таблиця 13

Оцінка анальгезуючої дії лікувального засобу "Ліварекс" на основі диметоксіуреїдофосфорної кислоти на моделі "корчів", що викликані оцтовою кислотою

Тест-доза "Ліварексу"	Кількість "корчів" у контрольній групі тварин	Кількість "корчів" у дослідній групі тварин	Відсоток інгібування кількості "корчів"
0,25 ЛД ₅₀	15,00±2,87	15,41±1,78	стимуляція на +2,73
0,1 ЛД ₅₀	15,00±2,87	14,15±3,25	пригнічення на -5,66
0,01 ЛД ₅₀	15,00±2,87	14,11±2,22	пригнічення на -5,93

Таблиця 14

Результати дослідження анальгезуючої дії лікувального засобу "Ліварекс" на основі диметоксіуреїдофосфорної кислоти на в тесті "гарячої" пластинки

Тест-доза "Ліварексу"	Латентний період реакції (вихідне значення)	Відсоток змін до латентного вихідного періоду реакції через:			
		30 хвилин	60 хвилин	90 хвилин	120 хвилин
0,25 ЛД ₅₀	15,24±0,95	+30,45	+68,89	+11,02	+0,13
0,1 ЛД ₅₀	14,96±0,51	+18,05	+20,99	+75,93	+43,05
0,01 ЛД ₅₀	15,46±0,50	+0,78	+13,84	+22,12	+28,85

Таблиця 15

Результати оцінки жарознижуючих властивостей лікувального засобу "Ліварекс" на основі диметоксіуреїдофосфорної кислоти на моделі пірогеналової лихоманки

Тест-доза "Ліварекс"	Підвищення температури тіла $M \pm m, \sigma t$	Зниження температури $M \pm m, \sigma t$ через:				
		30 хвилин	60 хвилин	90 хвилин	120 хвилин	180 хвилин
0,1 ЛД ₅₀	1,03±0,19	-0,70±0,27	-1,14±0,52	-0,46±0,33	-0,54±0,25	-0,28±0,34
0,01 ЛД ₅₀	1,00±0,17	-0,36±0,48	-0,38±0,13	-0,08±0,15	-0,1±0,15	+0,24±0,23

Таблиця 16

Вплив лікувального засобу "Ліварекс" на основі диметоксіуреїдофосфорної кислоти на активність інтерферону

	Доза у мг	Активність інтерферону у од/ мл. акт
"Ліварекс"	100	640
Гама-інтерферон	100	640

Таблиця 17

Вплив лікувального засобу "Ліварекс" у різних дозах на індукцію інтерферону у мишей

Доза, мг/кг	Кількість тварин	Вміст інтерферону у сироватці крові		
		через 6 годин	через 18 годин	через 48 годин
25	12	150	80	20
50	12	640	320	160
75	12	320	320	160
100	12	640	32	320
125	12	160	160	80

Таблиця 18

Введення лікувального засобу "Ліварекс" при герпетичному менінгоенцифаліті з профілактичною метою

	Шлях введення	Кількість мишей	Загинуло мишей		КЗ	ІЕ
			шт.	відсоток		
Плацебо	В/очеревинно	14	14	100	-	-
"Ліварекс"	Ректально	14	0	0	0	100
Віралекс	В/очеревинно	10	7	70	1,4	28

Таблиця 19

Введення лікувального засобу "Ліварекс" при герпетичному менінгоенцифаліті з лікувальною метою

	Шлях введення	Кількість мишей	Загинуло мишей		КЗ	ІЕ
			шт.	відсоток		
Контроль – плацебо	В/очеревинно	14	14	100	-	-
"Ліварекс"	Ректально	12	4	33,3	3,0	66,6
Віралекс	В/очеревинно	12	7	58,3	1,7	41,1

Таблиця 20

Вплив лікувального засобу "Ліварекс" на репродукцію вірусу

Умови дослідження	Доза, мкг	Інфекційний титр вірусу Іг. ЛД ₅₀
Вірус (Гонконг 68)	-	6,0
Вірус грипу А (Гонконг 68) + "Ліварекс"	100	2,0

Вплив лікувального засобу "Ліварекс" на основі диметоксіуреїдофосфорної кислоти на ВІЛ

	Експресія p24, пг/мл	Інфекційний титр, Іg ІД ₅₀	Інгібіція інфекційного титру, Іg ІД ₅₀
Контроль ВІЛ	800	3,0	-
"Ліварекс"	400	0	3,0
Ретровір	302	1,5	3,0

ДП "Український інститут промислової власності" (Укрпатент)
Україна, 01133, Київ-133, бульв. Лесі Українки, 26
(044) 295-81-42, 295-61-97

Підписано до друку _____ 2001 р. Формат 60х84 1/8.
Обсяг _____ обл.-вид. арк. Тираж 50 прим. Зам. _____

УкрІНТЕІ, 03680, Київ-39 МСП, вул. Горького, 180.
(044) 268-25-22
