



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 57177

(13) C2

(51) 7 G01N33/15,33/50

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(54) СПОСІБ СКРИНІНГУ ЛІКАРСЬКИХ ПРЕПАРАТІВ

1

(21) 2001106841
(22) 20 04 2000
(24) 16 06 2003
(86) PCT/EA00/00001, 20 04 2000
(31) 99108889
(32) 27 04 1999
(33) RU
(46) 16 06 2003, Бюл. № 6, 2003 р
(72) Волчек Ігорь Владімірович, RU
(73) Волчек Ігорь Владімірович, RU
(56) RU, C1, 2072100, 20 01 1997
US, B, 4 983 514, 08 01 1991
DE, A1, 4 017 818, 05 12 1991
DE, A1, 4 038 898, 11 06 1992
RU, C1, 2000739, 15 10 1993

2

(57) 1 Спосіб скринінгу лікарських препаратів для конкретного хворого, згідно з яким культивують компоненти крові хворого з препаратами, що тестуються, аналізують компоненти крові після культивування і вибирають оптимальний препарат, який відрізняється тим, що культивують препарат з цільної гепаринізованої крові хворого, введення препарату, що тестується, в кров здійснюють у дозі, що відповідає 1 5000 від терапевтичної та шуканий вибирають препарат з найбільшим співвідношенням -SH і -SS- груп у клітинній фракції у конкретного хворого

2 Спосіб за п 1, який відрізняється тим, що культивування проводять протягом 1 години при температурі 37°C

Винахід стосується медицини, а саме способів скринінгу лікарських препаратів, а саме підбору препарату і його оптимальної дози для лікування конкретного хворого

В даний час традиційний підбір препарату для конкретного хворого включає в себе клінічне обстеження хворого, зіставлення даних обстеження з рекомендаціями фармації, призначення препарату або групи препаратів і корекція призначення за результатами впливу препарату на організм (Методи експериментальної хіміотерапії. Практическое руководство, под ред. Першина Г.Н., М., 1971, с. 234)

Однак тривалість і ненадійність підбору методології лікування для конкретного хворого, висока роль суб'єктивного підходу примушує шукати нові більш об'єктивні методи підбору препаратів та їх дозування для конкретного хворого конкретним захворюванням

Відомий метод скринінгу лікарських препаратів для конкретного пацієнта, що включає в себе розміщення рук оператора над хворим і речовинами, що тестуються, і тестування оптимального препарату виходячи з температурної реакції оператора (патент РФ №2007117, 1992, кл. A61B 5/04)

Цей метод носить досить універсальний характер, однак для нього також характерна визначена суб'єктивність і недостатня надійність результатів

Відомі методи скринінгу лікарських препаратів для лікування окремих патологій - захворювань ЦНС, вірусних, онкологічних і інших захворювань (пат. і авт. св. РФ №1806601, 1990, кл. A61B 5/0476, №1540804, 1987, кл. A61B 10/00, №2000739, 1991, кл. A61B 5/02, №2046341, 1994, кл. G01N 33/48). В основі методів лежить введення препаратів, що тестуються, в організм або в контакт з препаратами тканин або рідин організму, виявлення значимих характеристик, вимір параметрів цих характеристик для кожного препарату, що тестується, і вибір як оптимального препарату за собою, що оказує максимальний вплив на обрані характеристики

Однак ці методи мають досить обмежене застосування і не дозволяють одержати досить надійні результати у випадку необхідності проведення комплексної терапії. Відомий спосіб вибору дози лікарського препарату для лікування серцево-судинної недостатності, в якому проводять хемілюмінесцентний аналіз венозної крові після її інкубації з розчинами препарату різної концентрації і вибирають в якості цільової дозу препарату, що забезпечує мінімальну активність хемілюмінесценції (патент РФ №2072100 C1, 20 01 97)

Даний спосіб також має вузький спектр застосування

Завданням винаходу є створення більш швид-

(13) C2

(11) 57177

(19) UA

кого й універсального способу скринінгу лікарських препаратів

Для вирішення цього завдання було запропоновано проводити скринінг на основі результатів культивування проби цільної гепаринізованої крові хворого з водними розчинами препаратів, що тестуються, у різних дозах, визначення співвідношення -SH і -SS- груп у клітинній фракції крові хворого після культивування і вибирають в якості оптимального препарату або оптимальної дози препарат, що забезпечує найбільше співвідношення -SH і -SS- груп у клітинній фракції крові хворого

(При виборі препарату призначення слід виходити з того, що, як показали проведені експерименти, оптимальний препарат в оптимальній дозі для лікування даного хворого дає зазначене співвідношення близько 3,0)

Культивування крові проводять, як правило протягом 1 години при температурі, максимально близькій до 37°C, причому введення препарату, що тестується, в кров здійснюють у дозі, що відповідає 1 5000 від терапевтичної

В основу способу була покладена гіпотеза про те, що сірковміщуючі компоненти крові є найбільш чутливими до впливу на організм факторів різної етіології, зв'язаних із захворюваннями організму, і, отже, препарати, здатні їх нормалізувати є найбільш ефективними для лікування

Основними відмінностями заявляемого способу від прототипу є використання для культивування цільної крові, визначення нового параметра - співвідношення -SH і -SS- груп у клітинній фракції крові і визначення оптимального параметру стану

До 1мл цільної гепаринізованої крові, взятої з периферичної вени додають препарати, що тестуються, в необхідних дозах (дозування *in vitro* розраховується виходячи з 1 5000 від терапевтичної), у контрольну пробірку додається розчинник, суміші інкубують 1 годину при температурі близько 37°C. Можливе продовження строку культивування до 2 годин, що дозволяє трохи підвищити точність способу, однак цей прийом доцільно використовувати тільки при близькості результатів тестування різних препаратів або при слабкому впливі препаратів на співвідношення -SH і -SS- груп

Кількість -SH, -SS- груп і їх співвідношення в клітинній фракції крові визначають, в основному, методами прямого (-SH), і зворотного(-SS) амперометричного титрування

При прямому амперометричному титруванні кров з вени (10мл) вносять у пробірку, яка містить антикоагулянт (1 - 2 краплі гепарину, 1мл якого містить 5000МЕ). Потім кров розливають по 1мл у необхідну кількість пробірок (звичайно 7 - 9), яка залежить від кількості препаратів, що тестуються, та їх доз. У кожен пробірку додають препарати, що тестуються, в необхідних дозах (дозування *in vitro* розраховується виходячи з 1 5000 від терапевтичної), у контрольну пробірку додається розчинник, суміші інкубують у термостаті 1 годину при $t = 37^{\circ}\text{C}$. Після інкубації пробірки центрифугують 5 - 7 хвилин при 800об/хв, після чого плазму видаляють. Потім клітинну фракцію крові гемолізуєть у 0,1% розчині Трилону «Б» ($\text{pH} = 7,0$) 1 частина клітин крові і 19 частин розчину змішують, поміщають у холодильник ($+4^{\circ}\text{C} - +5^{\circ}\text{C}$) і через 30 хви-

лин центрифугують для осадження зруйнованих клітин протягом 15хв при 6000об/хв. Надосадову рідину (гемолізат) використовують у роботі. У посудину для титрування (бюкс, скляна чашка на 30 - 40мл) вносять 25 - 30мл аміачного буфера. Поміщають посудину на магнітну мішалку, занурюють у досліджуваний розчин платиновий електрод і вільний кінець сольового містка, вмикають у мережу мікроамперметр, опускають у центр посудини капсулу з магнітом і починають її обертання зі швидкістю, що виключає розбризкування розчину. Дозатором відмірюють у посудину 0,2мл гемолизату. Після того, як стрілка мікроамперметра прийме стабільне положення починають титрування, додаючи по 0,05 (0,1) мл $1 \cdot 10^{-3}\text{M}$ розчину AgNO_3 . Після кожної чергової порції чекають, щоб стрілка зупинилася, відзначають відповідне її положенню число поділів шкали і продовжують титрування. По досягненні кінцевої його точки перша ж чергова порція титранту викликає помітний стрибок сили струму і відхилення стрілки на більшу, ніж раніше, величину. Зробивши після цього ще 4 - 5 вимірів, титрування припиняють, і за його результатами графічним способом знаходять кількість нітрату срібла, витраченого на титрування розчину, на базі чого розраховують вміст SH-груп

При зворотному амперометричному титруванні в посудину для титрування наливають 25мл аміачного буфера, ставлять його на поверхню магнітної мішалки, занурюють у розчин індикаторний електрод і кінець сольового містка від електрода порівняння, вмикають у мережу мікроамперметр і магнітну мішалку, пускають її, і при безперервному перемішуванні послідовно вносять у буферну суміш наступні реагенти 0,5мл $1 \cdot 10^{-3}\text{M}$ розчину AgNO_3 , 0,2мл гемолизату, 200мг сульфату натрію

Вмикають мікроамперметр і після того, як стрілка прийме стабільне положення (приблизно через 3 - 5 хвилин), починають титрувати досліджувану пробу $5 \cdot 10^{-4}\text{M}$ розчином унітіолу, додаючи його в реакційну суміш по 0,05мл (або по 0,1мл) до кінцевого об'єму 0,5мл. Після завершення титрування кількість унітіолу, витраченого на титрування проби визначають графічним способом, а потім на основі цієї величини розраховують кількість SS-груп, після чого розраховують відношення концентрації SH-груп до концентрації SS-груп

Як правило, зазначені способи суміщають між собою. Після визначення вмісту SH-груп вищесказаним способом прямого титрування не перериваючи перемішування розчину, вносять у посудину для титрування сульфат натрію і зворотним титруванням за допомогою еквімолярного розчину унітіолу визначають у тій же пробі вміст SS-груп. При цьому надлишковий розчин срібла для зворотного титрування вносять у реакційну суміш не однократно, а окремими порціями в процесі прямого титрування

Можливість застосування заявляемого способу скринінгу препаратів для лікування захворювань різної етіології демонструється наступними прикладами

Приклад 1. Хвора Б-я Е В поступила з діагнозом рак поперечно-ободочної кишки, $\text{T}_3\text{N}_0\text{M}_0$, виконана радикальна операція - резекція поперечно-ободочної кишки

Було проведено дослідження по заявляємій методиці впливу різних доз протипухлинного та імунomodуючого препарату україн («Nowicky Pharma», Австрія) і антипексанту оліфену (ТзОВ «Корпорація Оліфен») на стан тиодисульфідної рівноваги крові, результати якого представлені в таблиці

Оптимальним препаратом, за нашими оцінками, був україн у дозі 5,0мг на введення (при додаванні україн в цій дозі -SH/-SS- коефіцієнт підвищився з 2,00 до 3,00)

Хворий був проведений 1 курс лікування україню до операції і 2 - після оперативного лікування з використання україню в дозі 5,0мг на введення через день (10 введення на 1 курс)

При гістологічному дослідженні видаленої пухлини залозистий рак з ослизненням у просвіті залоз, некрозами, запальним інфільтратом у стромі

До цього часу протягом трьох років зберігається повна ремісія захворювання і нормальні показники вмісту раково-ембріонального антигену (PEA) у сироватці крові (27 12 96 - 1,2нг/мл, 10 04 97 - 1,1нг/мл, при нормі до 5нг/мл)

Приклад 2 Хвора Г-ва Н В поступила з діагнозом рак поперечно-ободочної кишки, $T_4N_2M_1$, була проведена резекція пухлини з приводу кишкової непрохідності, у ході операції виявлений канцероматоз очеревини

Проводилося вивчення впливу україн і реаферона (НПО «Вектор», Новосибірська обл.) на стан тиодисульфідної рівноваги крові (таблиця)

Оптимальним препаратом, за нашими даними, був україн у дозі 10,0мг на введення (при додаванні україн в цій дозі -SH/-SS- коефіцієнт підвищився з 1,17 до 1,75)

Проведено курс лікування в дозі 10,0мг україню внутрішньовенно через день (10 ін'єкцій) Після першої ж ін'єкції була відзначена характерна реакція на введення препарату, що свідчить про ефективність терапії: підвищення температури тіла до $37,9^{\circ}\text{C}$, пилливість При продовженні терапії реакція слабшала і до кінця курсу лікування стала мінімальною Суб'єктивно було відзначено значне поліпшення самопочуття хворої, а при лабораторних дослідженнях - нормалізація вмісту PEA в сироватці крові (9 12 96 - 1,7нг/мл, а 27 12 96 - 1,3нг/мл) Надалі хворий було проведено ще 2 курси лікування україню, при цьому була відзначена стабілізація пухлинного процесу протягом 8 місяців

Приклад 3 Хвора Л-н Е А поступила з діагнозом рак лівої молочної залози, $T_3N_2M_1$, з метастазами в хребет (T_{12} , L_{12}), стан після мастектомії Отримала курс променевої терапії на хребет, 4 курси хіміотерапії, бонифос

При дослідженні впливу україню й оліфену на тиодисульфідну рівновагу крові (таблиця) відзначено, що у даної хворої на всіх дозах препаратів відзначалися низькі показники коефіцієнта -SH/-SS-, оптимальним препаратом був україн у дозі 5,0мг на введення (при додаванні україню в цій дозі -SH/-SS- коефіцієнт підвищився з 1,00 до 1,67) Однак, відповідно до загальноприйнятих правил у даному випадку було проведено лікування україню у дозі 10мг на введення внутрішньовенно через день (10 ін'єкцій) Після курсу терапії

стан хворої суттєво не покращився, зберігався больовий синдром, вміст онкомаркера СА 15-3 трохи підвищився (14 01 97 - 38,3ЕД/мл, 04 02 97 - 42,6ЕД/мл, при нормі до 26,8ЕД/мл), а надалі захворювання продовжувало швидко прогресувати

Приклад 4 Хвора А-ва Ш О, 59 років поступила з діагнозом рак стравоходу, $T_2N_0M_0$, проведена променева терапія

При дослідженні впливу україню і циклоферону (індуктор інтерферону, НТФФ «Полісан») на стан тиодисульфідної рівноваги встановлено, що оптимальний ефект давав україн у дозі 5,0мг (при додаванні україню в цій дозі -SH/-SS- коефіцієнт підвищився з 0,93 до 2,50)

Проведено 2 курси лікування україню у дозі 5,0мг через день (10 ін'єкцій) Перед першим і другим курсами терапії вміст онкомаркерів був у нормі, при цьому після проведення другого курсу терапії україню відзначено зниження вмісту СА 19-9 (24 01 97 вміст PEA - 0,53нг/мл, СА 19-9 - 5,0ЕД/мл, 30 12 98 вміст PEA - 0,80нг/мл, СА 19-9 - 23,9ЕД/мл, 27 01 99 СА 19-9 - 18,1ЕД/мл при нормі до 37ЕД/мл) До цього часу протягом трьох років у хворої відзначається стабілізація процесу, за даними фіброгастродуоденоскопії (22 12 98) - виразка нижньої третини стравоходу (виразковий дефект 0,3 x 0,5см під фібрином), ерозивний езофагіт, при УЗД черевної порожнини даних про генералізацію процесу не одержано

Приклад 5 Хвора Д-ва С В поступила з діагнозом неходжкінська лімфома шлунка (пролімфоцитарна), $T_3N_2M_0$, проведена субтотальна резекція шлунка по Більрот-2 При гістологічному дослідженні видаленої пухлини - пролімфоцитарна лімфома, в лімфовузлах великої і малої кривизни шлунка аналогічна гістологічна картина

При дослідженні впливу україню й оліфену на тиодисульфідну рівновагу крові (таблиця) відзначено, що у даної хворої оптимальним препаратом був оліфен у дозі 0,5г на введення (при додаванні оліфену в цій дозі -SH/-SS- коефіцієнт підвищився з 2,00 до 3,12)

Проведено 3 курси лікування оліфеном по 1 таблетці (0,5г) 3 рази на день протягом 1,5 місяців з перервами 2 - 3 місяці Протягом 5 років у хворої зберігалася повна клініко-гематологічна ремісія захворювання

Приклад 6 Хворий К-н А В поступив з діагнозом хронічний вірусний гепатит В без дельта-агента (вірусу)

При дослідженні впливу реаферона і циклоферона на тиодисульфідну рівновагу крові (таблиця) відзначено, що в даного хворого оптимальним препаратом був реаферон у дозі 1млн МЕ на введення (при додаванні реаферона в цій дозі -SH/-SS- коефіцієнт підвищився з 1,52 до 3,07) Проведено курс лікування реафероном по 1млн МЕ внутрішньом'язово через кожні 3 дні протягом 6 місяців В результаті проведеної терапії відбулася нормалізація активності АлАТ і АсАТ, реверсія ДНК HBV, HBeAg і HBsAg, зберігається стабільна ремісія протягом 8 місяців

Приклад 7 Хвора П-ва Г А поступила з діагнозом - ревматоїдний поліартрит з поразкою плечових, ліктьових, променезап'ясткових, п'ястно-фалангових і міжфалангових суглобів, тазостегно-

вих суглобів, суглобів гомілок і стоп, сірконегативний, швидко прогресуючий перебіг, 2-а ступінь активності, функціональна здатність хворої - 3. При дослідженні впливу опіфену і циклоферону на тиосульфідне співвідношення в крові (таблиця), виявилось, що для даної хворої оптимальним препаратом виявився циклоферон у разовій дозі 0,25м (при додаванні циклоферону в цій дозі співвідношення SH/SS підвищилось з 1,24 до 2,56)

Проведено курс лікування циклофероном по 2мл 2% розчину внутрішньом'язово за схемою в 1,

2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 і 20 дні. В результаті проведеної терапії вже на 5-й день від початку терапії вдалося знизити дозу ібупрофену з 3 (0,6г) до 2 (0,4г) таблеток на день, на 10-й день до 1 (0,2г) таблетки, а до 16 дня повністю відмовитися від прорізу анальгетиків у зв'язку зі зменшенням больового синдрому, значно підвищилася рухова активність хворої, за лабораторними даними СОЕ зменшилося з 39 до 24мм/годину, а С-реактивний білок понизився з ++ до +

Таблиця

Вплив лікарських препаратів на співвідношення SH/SS у культивуємій фракції крові хворого

Препарат	доза	Співвідношення SH/SS в крові для різних прикладів						
		1	2	3	4	5	6	7
Контроль	0	2,00	1,17	1,00	0,93	2,00	1,52	1,24
Україн, мг	0,5	2,29	1,00	1,45	1,42	2,28	-	-
	2,5	2,00	0,50	1,14	1,20	2,55	-	-
	5,0	3,00	1,27	1,67	2,50	2,16	-	-
	10,0	1,75	1,75	1,38	2,00	2,11	-	-
Опіфен, г	0,05	1,89	-	1,22	-	2,35	-	1,45
	0,15	2,17	-	1,10	-	2,77	-	1,39
	0,5	2,83	-	1,35	-	3,12	-	0,93
	1,0	2,51	-	1,51	-	2,86	-	1,12
Реаферон, млн МЕ	0,5	-	1,25	-	-	-	2,53	-
	1,0	-	1,50	-	-	-	3,07	-
	3,0	-	1,08	-	-	-	2,14	-
	6,0	-	1,03	-	-	-	1,79	-
Циклоферон, г	0,25	-	-	-	1,57	-	2,14	2,58
	0,5	-	-	-	1,94	-	2,66	2,18

Як показали проведені експерименти, пропонуваний спосіб є досить універсальним, дозволяючи тестувати препарати для лікування онкологіч-

них, вірусних, аутоімунних і інших захворювань. Строк скринінга оптимального препарату і його дози складає 2 - 3 години.