



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 150 700** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) МПК⁷ **G 01 N 33/15**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

(21), (22) Заявка: 99108889/14, 27.04.1999
(24) Дата начала действия патента: 27.04.1999
(46) Дата публикации: 10.06.2000
(56) Ссылки: RU 2072100 C1, 20.01.1997. RU 2000739 C1, 15.10.1993. SU 741153 A, 15.06.1980.
(98) Адрес для переписки:
193313, Санкт-Петербург, ул. Подвойского 14,
корп.1, кв.741, Кузнецову В.А.

(71) Заявитель:
Волчек Игорь Владимирович
(72) Изобретатель: Волчек И.В.
(73) Патентообладатель:
Волчек Игорь Владимирович

(54) СПОСОБ СКРИНИНГА ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

(57) Реферат:

Изобретение может быть использовано в медицине, а именно в способах скрининга лекарственных препаратов для подбора препарата и его оптимальной дозы для лечения конкретного больного. Выбор лекарственного препарата осуществляют на основе результатов культивирования цельной гепаринизированной крови больного в присутствии водных растворов препаратов сравнения. Культивирование проводят в течение 1 ч при температуре, близкой к 37°C,

причем введение тестируемого препарата в кровь осуществляют в дозе, соответствующей 1: 5000 от терапевтической. Анализируют соотношение -SH и -SS-групп в клеточной фракции крови больного после культивирования и в качестве искомого выбирают препарат с наибольшим соотношением -SH и -SS-групп в клеточной фракции у конкретного больного. Способ позволяет снизить время скрининга до нескольких часов, он применим для лечения вирусных, онкологических, аутоиммунных и иных заболеваний. 1 з.п. ф-лы, 1 табл.



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 150 700** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) Int. Cl.⁷ **G 01 N 33/15**

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 99108889/14, 27.04.1999
(24) Effective date for property rights: 27.04.1999
(46) Date of publication: 10.06.2000
(98) Mail address:
193313, Sankt-Peterburg, ul. Podvojskogo 14,
korp.1, kv.741, Kuznetsovu V.A.

(71) Applicant:
Volchek Igor' Vladimirovich
(72) Inventor: Volchek I.V.
(73) Proprietor:
Volchek Igor' Vladimirovich

(54) **METHOD OF MEDICINAL PREPARATIONS SCREENING**

(57) Abstract:

FIELD: medicine. SUBSTANCE: invention relates to methods of drugs screening for selection of the preparation and its optimal dosage for treatment of individual patient. Selection of drug is carried out on the basis of results of culturing whole heparinized blood of patient in the presence of control aqueous solutions. Culturing is carried out at temperature about 37 C for 1 h. Preparation to be tested is added to

blood sample at the dose corresponding 1: 5000 of therapeutic one. Ratio of SH- and SS-groups in patient blood cellular fraction is analyzed after culturing and preparation with the most ratio of SH- and SS-groups in cellular fraction of individual patient is selected as required preparation. Method can be used for treatment of patients with viral, oncological, autoimmune and other diseases. EFFECT: decreased time of screening (to some hours). 2 cl, 1 tbl, 7 ex

Изобретение относится к медицине, а именно к способам скрининга лекарственных препаратов для подбора препарата и его оптимальной дозы для лечения конкретного больного.

В настоящее время традиционный подбор препарата для конкретного больного включает в себя клиническое обследование больного, сопоставление данных обследования с рекомендациями фармации, назначение препарата или группы препаратов и коррекцию назначения по результатам воздействия препарата на организм (Методы экспериментальной химиотерапии (Практическое руководство)/Под ред. Першина Г.Н.- М., 1971, с. 234).

Недостатком такого подхода является длительность и ненадежность подбора, высокая вероятность осложнений.

Известен метод скрининга лекарственных препаратов для конкретного пациента, включающий в себя помещение рук оператора над больным и тестируемыми веществами и тестирование оптимального препарата исходя из температурной реакции оператора (пат. РФ N 2007117, кл. А 61 В 5/04, 1992).

Недостатком метода является определенная субъективность и недостаточная надежность результатов.

Известны методы скрининга лекарственных препаратов для лечения отдельных патологий - заболеваний ЦНС, вирусных, онкологических и иных заболеваний (пат. и авт. свид. РФ N 1806601, кл. А 61 В 5/0476, 1990; N 1540804, кл. А 61 В 10/00, 1987; N 2000739, кл. А 61 В 5/02, 1991; N 2046341, кл. G 01 N 33/48, 1994). В основе методов лежит введение тестируемых препаратов в организм или в контакт с препаратами тканей или жидкостей организма, выявление значимых характеристик, измерение параметров этих характеристик для каждого тестируемого препарата и выбор в качестве оптимального препарата средства, оказывающего максимальное воздействие на выбранные характеристики.

Недостатком методов является ограниченная область применения, что наиболее негативно сказывается в случае необходимости проведения комплексной терапии.

Прототипом заявляемого изобретения является способ скрининга противовирусных препаратов для конкретного индивидуума, включающий в себя отбор пробы крови больного, выделение из нее взвеси лейкоцитов, культивирование их с исследуемыми препаратами, фиксацию формалином моноцитов, их прокрашивание, определение клеток с вирусными включениями и выбор в качестве целевого препарата из исследуемых средств, обеспечивающего наибольшее снижение определяемых параметров (авт. свид. СССР N 1266029, кл. А 61 В 10/00, G 01 N 33/15, 1985).

Недостатком способа является узкий спектр применения, длительность анализа (около 2 суток).

Задачей, решаемой изобретением, является создание более быстрого и универсального способа скрининга лекарственных препаратов.

Указанная задача решается путем культивирования пробы цельной гепаринизированной крови больного с водными растворами тестируемых препаратов в разных дозах, определения соотношения -SH и -SS-групп в клеточной фракции крови больного после культивирования и выбор в качестве оптимального препарата или оптимальной дозы препарата, обеспечивающего указанное соотношение, наиболее близкое к 3,0.

Культивирование крови проводят, как правило, в течение 1 ч при температуре, близкой к 37°C, причем введение тестируемого препарата в кровь осуществляют в дозе, соответствующей 1:5000 от терапевтической.

В основу способа была положена гипотеза о том, что серусодержащие компоненты крови являются наиболее чувствительными к воздействию на организм факторов различной этиологии, связанных с заболеваниями организма, и, следовательно, препараты, способные их нормализовать, являются наиболее эффективными для лечения.

Основными отличиями заявляемого метода от прототипа является использование для культивирования цельной крови, определение нового параметра - соотношения -SH и -SS-групп в клеточной фракции крови и определение оптимального параметра состояния - соотношения параметров близкого к 3,0.

Способ осуществляется следующим образом.

К 1 мл цельной гепаринизированной крови, взятой из периферической вены, добавляют тестируемые препараты в необходимых дозах (дозировка *in vitro* рассчитывается исходя из 1:5000 от терапевтической), в контрольную пробирку добавляется растворитель, смеси инкубируют 1 ч при температуре около 37°C. Возможно продление срока культивирования до 2 ч, позволяющее несколько повысить точность метода, однако этот прием целесообразно использовать только при близости результатов тестирования разных препаратов или при слабом воздействии препаратов на соотношение -SH и -SS-групп.

Количество -SH, -SS-групп и их соотношение в клеточной фракции крови определяют в основном методами прямого (-SH) и обратного (-SS) амперометрического титрования.

При прямом амперометрическом титровании кровь из вены (10 мл) вносят в пробирку, содержащую антикоагулянт (1-2 капли гепарина, 1 мл которого содержит 5000 ME). Затем кровь разливают по 1 мл в необходимое количество пробирок (обычно 7-9), которое зависит от количества тестируемых препаратов и их доз. В каждую пробирку добавляют тестируемые препараты в необходимых дозах (дозировка *in vitro* рассчитывается исходя из 1:5000 от терапевтической), в контрольную пробирку добавляется растворитель, смеси инкубируют в термостате 1 ч при $t = 37^{\circ}\text{C}$. После инкубации пробирки центрифугируют 5-7 мин при 800 об/мин, после чего плазму удаляют. Затем клеточную фракцию крови гемолизируют в 0,1%-ном растворе Трилона "Б" ($\text{pH} = 7,0$): 1 часть клеток крови и 19 частей раствора смешивают, помещают в холодильник (4-5°C) и через 30 мин

центрифугируют для осаждения разрушенных клеток в течение 15 мин при 6000 об/мин. Надосадочную жидкость (гемолизат) используют в работе. В сосуд для титрования (бюкс, стеклянная чашка на 30-40 мл) вносят 25-30 мл аммиачного буфера. Помещают сосуд на магнитную мешалку, погружают в исследуемый раствор платиновый электрод и свободный конец солевого мостика, включают в сеть микроамперметр, опускают в центр сосуда капсулу с магнитом и начинают ее вращение со скоростью, исключающей разбрызгивание раствора. Дозатором отмеривают в сосуд 0,2 мл гемолизата. После того как стрелка микроамперметра примет стабильное положение начинают титрование, добавляя по 0,05 (0,1) мл $1 \cdot 10^{-3}$ М раствора AgNO_3 . После каждой очередной порции ждут, чтобы стрелка остановилась, отмечают соответствующее ее положению число делений шкалы и продолжают титрование. По достижении конечной его точки первая же очередная порция титранта вызывает заметный скачок силы тока и отклонение стрелки на большую, нежели прежде, величину. Сделав после этого еще 4-5 измерений, титрование прекращают, и по его результатам графическим способом находят количество нитрата серебра, затраченного на титрование раствора, на базе чего рассчитывают содержание SH-групп.

При обратном амперометрическом титровании в сосуд для титрования наливают 25 мл аммиачного буфера, ставят его на поверхность магнитной мешалки, погружают в раствор индикаторный электрод и конец солевого мостика от электрода сравнения, включают в сеть микроамперметр и магнитную мешалку, пускают ее, и при непрерывном перемешивании последовательно вносят в буферную смесь следующие реагенты: 0,5 мл $1 \cdot 10^{-3}$ М раствора AgNO_3 ; 0,2 мл гемолизата; 200 мг сульфата натрия.

Включают микроамперметр и, после того как стрелка примет стабильное положение (примерно через 3-5 мин), начинают титровать исследуемую пробу $5 \cdot 10^{-4}$ М раствором унитиола, добавляя его в реакционную смесь по 0,05 мл (или по 0,1 мл) до конечного объема 0,5 мл. По завершении титрования количество унитиола, затраченного на титрование пробы, определяют графическим способом, а затем на основе этой величины рассчитывают количество SS-групп, после чего рассчитывают отношение концентрации SH-групп к концентрации SS-групп.

Как правило, указанные методы совмещают между собой. После определения содержания SH-групп вышеописанным методом прямого титрования, не прерывая перемешивания раствора, вносят в сосуд для титрования сульфит натрия и обратным титрованием с помощью эквивалентного раствора унитиола определяют в той же пробе содержание SS-групп. При этом избыточный раствор серебра для обратного титрования вносят в реакционную смесь не однократно, а отдельными порциями в процессе прямого титрования.

Возможность применения заявляемого способа скрининга препаратов для лечения заболеваний различной этиологии демонстрируется следующими примерами.

Пример 1. Больная Б-я Э.В. с диагнозом:

рак поперечно-ободочной кишки, $\text{T}_3\text{N}_0\text{M}_0$, выполнена радикальная операция - резекция поперечно-ободочной кишки. Было проведено исследование влияние разных доз противоопухолевого и иммуномодулирующего препарата украин ("Nowicky Pharma", Австрия), антигипоксанта олифена (ООО "Корпорация Олифен") на состояние тиолдисульфидного равновесия крови, результаты которого представлены в таблице.

Оптимальным препаратом, по нашим оценкам, являлся украин в дозе 5,0 мг на введение (при добавлении украин в этой дозе -SH/-SS-коэффициент повысился с 2,00 до 3,00). Больной был проведен 1 курс лечения украином до операции и 2 - после оперативного лечения с использованием украин в дозе 5,0 мг на введение через день (10 введений на 1 курс). При гистологическом исследовании удаленной опухоли: железистый рак с ослизнением в просвете желез, некрозами, воспалительным инфильтратом в строме. До настоящего времени в течение трех лет сохраняются полная ремиссия заболевания и нормальные показатели содержания раково-эмбрионального антигена (РЭА) в сыворотке крови (27.12.96 - 1,2 нг/мл, 10.04.97 - 1,1 нг/мл, при норме до 5 нг/мл).

Пример 2. Больная Г-ва Н.В. с диагнозом: рак поперечно-ободочной кишки, $\text{T}_4\text{N}_2\text{M}_1$, была проведена резекция опухоли по поводу кишечной непроходимости, в ходе операции выявлен канцероматоз брюшины.

Проводилось изучение влияния украин и реаферона (НПО "Вектор", Новосибирская обл.) на состояние тиолдисульфидного равновесия крови (таблица).

Оптимальным препаратом, по нашим данным, являлся украин в дозе 10,0 мг на введение (при добавлении украин в этой дозе -SH/-SS-коэффициент повысился с 1,17 до 1,75). Проведен курс лечения в дозе 10,0 мг украин внутривенно через день (10 инъекций). После первой же инъекции была отмечена характерная реакция на введение препарата, свидетельствующая об эффективности терапии: повышение температуры тела до $37,9^\circ\text{C}$, потливость. По мере продолжения терапии реакция ослабевала и к концу курса лечения стала минимальной. Субъективно было отмечено значительное улучшение самочувствия больной, а при лабораторных исследованиях - нормализация содержания РЭА в сыворотке крови (9.12.96 - 1,7 нг/мл, а 27.12.96 - 1,3 нг/мл). В дальнейшем больной было проведено еще 2 курса лечения украином, при этом была отмечена стабилизация опухолевого процесса в течение 8 месяцев.

Пример 3. Больная Л-н Б. А. с диагнозом: рак левой молочной железы, $\text{T}_3\text{N}_2\text{M}_1$, с метастазами в позвоночник (T_{12} , L_{1-2}), состояние после мастэктомии. Получила курс лучевой терапии на позвоночник, 4 курса химиотерапии, бонефос.

При исследовании влияния украин и олифена на тиолдисульфидное равновесие крови (таблица) отмечено, что у данной больной на всех дозах препаратов отмечались низкие показатели коэффициента -SH/-SS-, оптимальным препаратом был украин в дозе 5,0 мг на введение (при добавлении украин в этой дозе

-SH/-SS-коэффициент повысился с 1,00 до 1,67). Однако в соответствии с общепринятыми правилами в данном случае было проведено лечение украином в дозе 10 мг на введение внутривенно через день (10 инъекций). После курса терапии состояние больной существенно не улучшилось, сохранялся болевой синдром, содержание онкомаркера СА 15-3 несколько повысилось (14.01.97 - 38,3 ЕД/мл, 04.02.97 - 42,6 ЕД/мл, при норме до 26,9 ЕД/мл), а в дальнейшем заболевание продолжало быстро прогрессировать.

Пример 4. Больная А-ва Ш.О., 59 лет, с диагнозом: рак пищевода, $T_2N_xM_0$, проведена лучевая терапия.

При исследовании влияния украин и циклоферона (индуктор интерферона, НТФФ "Полисан") на состояние тиолдисульфидного равновесия установлено, что оптимальный эффект давал украин в дозе 5,0 мг (при добавлении украин в этой дозе -SH/-SS-коэффициент повысился с 0,93 до 2,50). Проведено 2 курса лечения украином в дозе 5,0 мг через день (10 инъекций). Перед первым и вторым курсами терапии содержание онкомаркеров было в норме, при этом после проведения второго курса терапии украином отмечено снижение содержания СА 19-9 (24.01.97 содержание РЭА - 0,53 нг/мл, СА 19-9 - 5,0 ЕД/мл; 30.12.98 содержание РЭА - 0,80 нг/мл, СА 19-9 - 23,9 ЕД/мл; 27.01.99 СА 19-9 - 18,1 ЕД/мл при норме до 37 ЕД/мл). До настоящего времени в течение трех лет у больной отмечается стабилизация процесса, по данным фиброгастродуоденоскопии (22.12.98) - язва нижней трети пищевода (язвенный дефект 0,3х0,5 см под фибрином), эрозивный эзофагит; при УЗИ брюшной полости данных о генерализации процесса не получено.

Пример 5. Больная Д-ва С.В. с диагнозом: неходжкинская лимфома желудка (пролимфоцитарная), $T_3N_2M_0$, проведена субтотальная резекция желудка по Бильрот-2. При гистологическом исследовании удаленной опухоли - пролимфоцитарная лимфома, в лимфоузлах большой и малой кривизны желудка аналогичная гистологическая картина. При исследовании влияния украин и олифена на тиолдисульфидное равновесие крови (таблица) отмечено, что у данной больной оптимальным препаратом был олифен в дозе 0,5 г на введение (при добавлении олифена в этой дозе -SH/-SS-коэффициент повысился с 2,00 до 3,12). Проведено 3 курса лечения олифеном по 1 таблетке (0,5 г) 3 раза в день в течение 1,5 месяцев с прорывами 2-3 месяца. В течение 5 лет у больной сохранялась полная клинико-гематологическая ремиссия заболевания.

Пример 6. Больной К-н А.В. с диагнозом: хронический вирусный гепатит В без дельта-агента (вируса).

При исследовании влияния реаферона и циклоферона на тиолдисульфидное равновесие крови (таблица) отмечено, что у

данного больного оптимальным препаратом был реаферон в дозе 1 млн.МЕ на введение (при добавлении реаферона в этой дозе -SH/-SS-коэффициент повысился с 1,52 до 3,07). Проведен курс лечения реафероном по 1 млн.МЕ внутримышечно через каждые 3 дня в течение 6 месяцев. В результате проведенной терапии произошла нормализация активности АЛАТ и АсАТ, реверсия ДНК HBV, HBeAg и HBsAg, сохраняется стабильная ремиссия в течение 8 месяцев.

Пример 7. Больная П-ва Г.А. с диагнозом: ревматоидный полиартрит с поражением плечевых, локтевых, лучезапястных, пястно-фаланговых и межфаланговых суставов, тазобедренных суставов, суставов голеней и стоп, серонегативный, быстро прогрессирующее течение, 2-я степень активности, функциональная способность больной - 3. При исследовании влияния олифена и циклоферона на тиолдисульфидное соотношение в крови (таблица), оказалось, что для данной больной оптимальным препаратом оказался циклоферон в разовой дозе 0,25 г (при добавлении циклоферона в этой дозе соотношение SH/SS повысилось с 1,24 до 2,56). Проведен курс лечения циклофероном по 2 мл 2%-ного раствора внутримышечно по схеме в 1,2,4,6,8,10,12,14,16,18 и 20-й дни. В результате проведенной терапии уже на 5-й день от начала терапии удалось снизить дозу ибупрофена с 3 (0,6 г) до 2 (0,4 г) таблеток в день, на 10-й день до 1 (0,2 г) таблетки, а к 16-му дню полностью отказаться от приема анальгетиков в связи с уменьшением болевого синдрома значительно повысилась двигательная активность больной; по лабораторным данным СОЭ уменьшилось с 39 до 24 мм/ч, а С-реактивный белок понизился с ++ до +.

Как показали проведенные эксперименты, предлагаемый способ является достаточно универсальным, позволяя тестировать препараты для лечения онкологических, вирусных, аутоиммунных и иных заболеваний. Срок скрининга оптимального препарата и его дозы составляет 2-3 ч.

Формула изобретения:

1. Способ скрининга лекарственных препаратов для конкретного больного, включающий в себя культивирование компонентов крови больного с тестируемыми препаратами, анализ компонентов крови после культивирования и выбор оптимального препарата, отличающийся тем, что культивируют препарат цельной гепаринизированной крови больного, введение тестируемого препарата в кровь осуществляют в дозе, соответствующей 1 : 5000 от терапевтической, и в качестве искомой выбирают препарат с наибольшим соотношением -SH и -SS-групп в клеточной фракции у конкретного больного.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что культивирование проводят в течение 1 ч при 37°C.

Влияние лекарственных препаратов на
соотношение SH/SS в культивируемой фракции крови больного.

Препарат	Доза	Соотношение SH/SS в крови для различных примеров						
		1	2	3	4	5	6	7
Контроль	0	2,00	1,17	1,00	0,93	2,00	1,52	1,24
Украин, мг	05	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	-	-
Олифен, 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. ME	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