



ГОСУДАРСТВЕННОЕ АГЕНТСТВО
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ
ПРИ ПРАВИТЕЛЬСТВЕ КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ (КЫРГЫЗПАТЕНТ)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

к предварительному патенту Кыргызской Республики

(19) KG (11) 84 (13) C1

(51)⁵ A61K 39/145

(21) 940016.1

(22) 22.03.1994

(46) 01.01.1996, Бюл. №4, 1996

(71)(73) Республиканский научно-производственный центр народной медицины "Бейиш", (KG)

(72) Камышенцев М.В., Нарбеков О.Н., Волчек И.В., Лавинский Ю.Х., Нуралиева Ж.С., (KG)

(56) Oberg B., Vrag Z. - Europ.j. Clin. Mikrobiol. Gnfec. Dis., 1990

(54) **Способ скрининга лекарственных средств против гриппа**

(57) Изобретение относится к области медицины, точнее, к химиотерапии гриппа для проведения скрининга лекарственных средств против гриппа. Сущность изобретения заключается в том, что способ основан на принципиально новом решении-оценке способности тестируемых средств не элиминировать патоген в инфицированном организме, а корректировать "узловые" метаболические процессы, нарушающие патогеном, например, липидную пероксидацию и/или вторично-мессенджерное протеинкиназное фосфорилирование в клетках органа-мишени (легочной ткани). Скрининг осуществляется на экспериментальной модели гриппа, например, мышц, зараженных вирусом гриппа: 1.0 ЛД₅₀ - 1.0 ЛД₉₀. Способ позволяет повысить разрешающую способность скрининга, упростить его технологию, повысить качество отбора. 1 з.п. ф-лы, 2 табл.

Изобретение относится к области медицины, точнее к способу химиотерапии гриппа.

Известен способ скрининга по полной программе, заключающийся в том, что скрининг антигриппозных средств осуществляется исключительно на выявлении наличия или отсутствия у исследуемого препарата антивирусных свойств и в 4 этапа. Первый этап:

оценка антивирусного действия исследуемого препарата на экспериментальной модели гриппа (клеточной культуре, развивающихся куриных эмбрионах, биологических сусpenзиях вируса и т.д.). Процесс осуществляют путем контакта исследуемого средства с биологическим объектом, зараженным вирусом гриппа. Оценку противовирусной активности средства осуществляют определением титра вируса после инкубации от 1-2 мин до 2-3 сут всей композиции, соответственно в системе, содержащей исследуемый препарат и не содержащий его. Падение тигра вируса гриппа в исследуемой композиции свидетельствует о наличии антагриппозных свойств у исследуемого препарата. Второй этап: выявление антагриппозных свойств у препаратов - "кандидатов", показавших наличие антагриппозной активности на 1-м этапе, осуществляющее на лабораторных животных (мыши, хомяки, хлопковые крысы). Используется аналогичный принцип: оценка снижения титра вируса гриппа в ткани зараженного животного (как правило, легочной) после контакта его с исследуемым препаратом. Определение титров вируса гриппа проводят известными вирусологическими методами, как и на 1-м этапе. Третий этап: оценка безвредности отобранных препаратов по ОМУ 64-33-81 стр. 21 (острая токсичность, хроническая токсичность и т.д.) в соответствии с требованием Фармкомитета. Четвертый этап: испытание препаратов на добровольцах.

Недостатком способа-прототипа является низкая эффективность и качество отбора, а также сложность технологии.

Задача изобретения - повышение разрешающей способности способа, упрощение технологии и повышение качества скрининга.

Сущность изобретения основана на принципиально новой научной аргументации: не элиминации патогена, а коррекции метаболических нарушений, вызываемых патогеном в пораженных клетках органа-мишени (бронхолегочной системы). Предлагается осуществлять оценку проводимой коррекции по состоянию уровня липидной пероксидации и системе вторично-мессенджерного фосфорилирования, ниже именуемых как "узловые" системы метаболизма.

Техническое решение реализуют на экспериментальной модели гриппа (например, мышах, зараженных летальной дозой вируса гриппа 1.0-ЛД₅₀-1.0 АД₉₀), которую обрабатывают тестируемым препаратом по схеме: аэрозольно (при среднем массовом размере аэрозоля 5-0.5 мкм) на протяжении 5 дней по 1-15 мин за сеанс через день. Состояние "узловых" систем метаболизма оценивают на 6 день от начала инфекции в легочной ткани в группах животных, обработанных и необработанных исследуемым (в скрининге) препаратом (легочная ткань выделяется из декапитированных животных). В случае, если препарат вызывает снижение уровня липидной пероксидации до значений, имевших место до заражения гриппом (в пределах статистически недостоверных различий по доверительному интервалу при $P = 0.95$), а вторично-мессенджерное фосфорилирование активирует (на момент определения) до значений, превышающих таковые у "нелеченного" варианта (при наличии достоверных различий $P = 0.95$), то исследуемый препарат может рассматриваться как противогриппозное средство. Из нескольких препаратов, подвергаемых скринингу, более эффективным противогриппозным средством считается то, которое в большей степени корректирует состояние отмеченных критерии: более близко приближает уровень липидной пероксидации к норме, и более "отдаленно" - состояние протеинкиназного фосфорилизирования от состояния его в ткани, необработанной препаратом.

Липидная пероксидация и вторично-мессенджерное протеинкиназное фосфорилирование определяются известными методами. Лекарственная эффективность противогриппозного средства, выявленного в процессе скрининга, может быть проверена на экспериментальной модели гриппа путем оценки эффективности проведенной химиотерапии исследуемым препаратом, соответственно, на 14-й день от начала инфекции (момент окончания проявления клинических признаков инфекции) или на 30-й день (момент, учитывающий основные постгриппозные осложнения).

Пример 1. Ставится задача скрининга средств против гриппа-А, например, А/Аичи/2/68, из совокупности следующих препаратов: ремантадина, экстракта из (САП-1), -

токоферола, аскорбиновой кислоты, водного раствора табачного дыма. Для этого популяция животных (мыши СВА) заражалась в камере в течение 15 мин вирусом гриппа А/Аichi/2/68 (аэрозольное распыление вирусодержащей жидкости при среднемассовом размере аэрозоля 5-3 мкм). Зараженные животные делились на группы: 1-ю контрольную (без последующей обработки препаратами), 2-ю - обработанную токоферолом, 0.001 %, 3-ю обработку ремантадином, 1.0 %, 4-ю - обработанную САП-1, 0.001 %, 5-ю - обработанную аскорбиновой кислотой 0.1 %, 6-ю - обработанную раствором табачного дыма, 0.13 %. Группы животных обрабатывались соответствующими препаратами (в указанных концентрациях) через день, соответственно, на 1-й, 3, 5 и 7 дни инфекции по 15 мин в день, а на 2-й, 4-й, 6-й, 8-й или только на 5-й день процесса тестиировалось состояние липидной пероксидации (по количеству первичных продуктов-гидроперекисей) и Са, фосфолипидзависимого и с-АМР-зависимого фосфорилирования. Результаты скрининга проверялись тестом жизнеспособности экспериментальной модели, соответственно, на 14-й и/или 30 день со дня начала инфекции. Результаты скрининга представлены в табл.1. Из представленных данных видно что, скрининг средств, пригодных для достижения терапевтического эффекта против гриппа, произведенный на основе способа-прототипа, оказывается менее эффективным, чем аналогичный по цели отбор, произведенный на основе предлагаемого технического решения, т.к. лекарственные средства (препараты № 2 и № 3 в табл.1), не обладающие антивирусной активностью попадали в разряд средств, не пригодных для химиотерапии гриппа в указанных схемах их применения.

Проверка правильности произведенных скринингов (табл.1) подтвердила преимущество предлагаемого технического решения перед прототипом. Критериями предлагаемого технического решения явилась коррекция тестируемых метаболических систем при гриппе: липидной пероксидации и вторично-мессенджерного протеинкиназного фосфорилирования.

Липидная пероксидация - это интегральный, при высоких и сверхвысоких значениях - деструктивный процесс в отношении всех биомембранных структур клетки. Обнаружено, что грипп может индуцировать развитие этого процесса до сверхвысоких значений, особенно на стадии резкого ухудшения клинического состояния. А вторично-мессенджерное протеинкиназное фосфорилирование, как известно, является интегральным регулятором и координатором метаболической активности клетки. Биологический смысл коррекции "узловых" метаболических систем при гриппе заключается, во-первых, в ослаблении разрушительных процессов, инициируемых патогеном, а во-вторых, в интенсификации всей метаболической активности, необходимой "ослабленной" клетке для интенсификации систем жизнеобеспечения.

Пример 2. Ставится задача скрининга средства против гриппа-В, например, В/Ли/40, из совокупности следующих препаратов: экстракта из Средне-Азиатского пустырника (САП-1), раствора из дыма САП, раствора дыма табака, ремантадина. Проведенные мероприятия аналогичны изложенным в примере 1.

Результаты скрининга проявлялись тестом жизнеспособности (на наличие лекарственного эффекта) на экспериментальной модели, соответственно, на 30-й день после начала инфекции, и изложены в табл.2.

Из представленных данных видно, что скрининг средств, пригодных для достижения терапевтического эффекта против гриппа, выполненный с помощью предлагаемого технического решения более эффективен (более мощен по разрешающей способности) и дает возможность обнаружить средства против гриппа (при неэффективности прототипа), например, препарат № 1 (табл.2).

При реализации предлагаемого технического решения:

- 1) повышается эффективность скрининга - выявляются пригодными для химиотерапии те средства, которые прототипом квалифицируются как "не пригодные";
- 2) упрощается технология процесса скрининга (изымается весь первый этап работ, необходимых для прототипа);

3) повышается качество скрининга (оценивается эффект достаточности дозы препарата для достижения коррекции "узловых" процессов метаболизма, а эффект побочных реакций (от малой дозы препарата) минимален. При прототипе же эффект побочных реакций пропорционален величине достигаемого эффекта, т.е. результат элиминации патогена тем выше, чем выше применяемая доза препарата и, соответственно от более высокой дозы и более высокий токсический эффект.

Таблица 1

Результаты сравнительного скрининга (выявления, отбора) лекарственных средств, пригодных для химиотерапии гриппа, полученные на основе метода-прототипа и предлагаемого технического решения (вирус гриппа А/Аichi/2/68, испытание на 5-й день инфекции)

№/п	Вид исследуемого препарата	Прототип		Предлагаемое техническое решение			Проверка правильности скрининга (% живых, 30 день, I LD ₅₀)
		1-й этап (титр вируса в РКЭ±4	2-й этап (титр вируса в животн.)	ЛП	Са, РИ-аза	с-AMP-аза	
1	Ремантадин (1.0 %)	5.7 ± 0.12 3.0 ± 0.1	1.5 ± 02 1.0 ± 0.1	44.1 ± 8.3 18.5 ± 2.8 N:3.5 ±03	7.4 ± 0.6 6.4 ± 0.4 6.9 ±03	4.7 ± 0.6 4.5 ± 0.4 3.5 ±0.4	6.6% 44.8%
		вывод: "пригоден"		вывод: "пригоден"			Заключен.: "пригоден"
2	Экстракт САП-1 (0.001 %)	5.7 ± 0.1 $6.7 + 0.2$	1.5 ± 0.2 1.6 ± 0.2	44.1 ± 83 7.6 ± 0.8 N:3.5±03	7.4 ± 0.8 9.4 ± 0.8 6.9 ±03	4.7 ± 0.4 41 ± 0.4 3.5 ±0.4	6.6% 48.8%
		"не пригоден"		"пригоден"			Заключен.: "-----"
3	-токоферол (0.001 %) липосопн. форма, 22 кгц	5.7 ± 0.1 6.0 ± 0.1	1.5 ± 0.2 1.8 ± 0.6	44.1 ± 8.3 53 ± 1.8 N:3.5±03	7.4 ± 0.8 $83 + 0.9$ 6.9 ±0.3	$4.7 + 0.4$ 4.0 ± 03 3.5 ±0.4	6.6% 18.6%
		"не пригоден"		"пригоден"			Заключен.: " "
4	Аскорбиновая кислота (0.1 %)	5.7 ± 0.1 5.0 ± 0.1	1.5 ± 0.2 3.1 ± 0.15	44.1 ± 8.3 56.3 ± 6.8 N:3.5 ± 03	$7.4 + 0.8$ $7.0 + 0.5$ 6.9 ±0.3	4.7 ± 0.4 3.8 ± 0.4 3.5 ±0.4	6.6% 1.5%
		"не пригоден"		"не пригоден"			Заключен.: "-----"
5	Водный раствор табачного дыма (0.13 %)	5.7 ± 0.1 5.7 ± 0.2	1.5 ± 0.2 3.1 ± 0.2	44.1 ± 8.3 28.5 ± 3.8 N:3.5 ± 03	$7.4 + 0.8$ 7.0 ± 0.6 6.9 ±0.3	$4.7 + 0.4$ 3.9 ± 0.4 3.5 + 0.4	6.6% 0%
							Заключен.: "-----"

"не пригоден"	"не пригоден"	"не
Примечание: 1) числитель - без обработки препаратом; знаменатель - при обработке препаратом; N - норма.	2) ЛП - липидная пероксидация (экв/г легочн.тк. $\times 10^{-8}$); Са, Раза- и с-АМРаза - Са - фосфолипидзависимая и с-АМР - зависимая протеинкиназа (сrm /33р/ мг белка $\times 10^3$).	

Таблица 2

Результаты сравнительного скрининга лекарственных средств, пригодных для химиотерапии гриппа, полученные на основе метода-прототипа и предлагаемого технического решения (вирус гриппа В/Ли/40, испытание на 5-й день)

№/п	Вид исследуемого препарата	Прототип		Предлагаемое техническое решение			Проверка правильности скрининга (% живых, 30 день, I LD ₅₀)
		1-й этап (титр вируса в РКЭ±)	2-й этап (титр вируса в животн.)	ЛП	Ca, PI-аза	c-AMP-аза	
1	Экстракт САП-1 (0.001 %)	$\frac{6.6 \pm 0.3}{6.0 \pm 0.5}$	$\frac{0.9 \pm 0.1}{1.6 \pm 0.2}$	$\frac{52.3 + 8.1}{8.5 \pm 2.7}$	$\frac{9.8 + 0.6}{10.1 + 0.5}$	$\frac{6.9 \pm 0.6}{6.9 + 0.3}$	$\frac{30.0\%}{45.0\%}$
				N:3.4+0.8		3.5+0.4	
		"не пригоден"			"пригоден"		"пригоден"
2	Раствор дыма САП (0.001 %)	$\frac{6.6 \pm 0.3}{6.0 \pm 0.5}$	$\frac{0.9 \pm 0.1}{1.7 \pm 0.3}$	$\frac{52.3 + 8.1}{36.1 + 8.5}$	$\frac{9.8 + 0.6}{6.0 + 0.3}$	$\frac{6.9 + 0.6}{5.0 + 0.4}$	$\frac{30.0\%}{15.0\%}$
				N:3.4+0.8		3.5+0.4	
		"не пригоден"			"не пригоден"		"не пригоден"
3	Раствор дыма табака (0.001 %)	$\frac{6.6 \pm 0.3}{6.2 \pm 0.4}$	$\frac{0.9 \pm 0.1}{1.8 + 0.6}$	$\frac{52.3 \pm 8.1}{42.3 \pm 6.9}$	$\frac{9.8 \pm 0.6}{5.8 \pm 0.4}$	$\frac{6.9 \pm 0.6}{5.2 \pm 0.6}$	$\frac{30.0\%}{10.0\%}$
				N:3.4±0.8		3.5±0.4	
		"не пригоден"			"не пригоден"		"не пригоден"
4	Ремантадин	$\frac{6.6 \pm 0.3}{6.4 \pm 0.4}$	$\frac{0.9 \pm 0.1}{1.6 \pm 0.4}$	$\frac{52.3 \pm 8.1}{44.8 \pm 7.6}$	$\frac{9.8 \pm 0.6}{5.2 \pm 0.6}$	$\frac{6.9 \pm 0.6}{6.0 \pm 0.3}$	$\frac{30.0\%}{20.0\%}$
				N:3.4±0.8		3.5±0.4	
		"не пригоден"			"не пригоден"		"не пригоден"

Примечание:

1) числитель - без обработки препаратом; знаменатель - при обработке препаратом; N - норма.

2) ЛП - липидная пероксидация (экв/г легочн.тк.х 10^{-8}); Са, РІаза- и с-АМРаза - Са - фосфолипид зависимая и с-АМР - зависимая протеинкиназа (сrm /33р/ мг белка x 10^3).

Формула изобретения

1. Способ скрининга лекарственных средств против гриппа путем контакта исследуемого средства с экспериментальной моделью гриппа, отличающейся тем, что выявляют способность у препаратов корректировать внутриклеточные метаболические системы органа-мишени по состоянию уровней липидной пероксидации и вторично-мессенджерного протеинкиназного фосфорилирования.
2. Способ по п.1, отличающейся тем, что более эффективным средством против гриппа отмечают то, которое на 4-8 дни инфекции гриппа приближает уровень липидной пероксидации к состоянию, близкому до заражения, а протеинкиназное фосфорилирование - наиболее далеким от состояния, характерного для инфекционного процесса, не подвергавшегося терапии тестируемым препаратом.

Составитель описания

Соловаева Э.А.

Ответственный за выпуск

Ногай С.А.

Кыргызпатент, 720021, г. Бишкек, ул. Московская, 62, тел.: (312) 68 08 19, 68 16 41, факс: (312) 68 17 03