

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **038932**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.11.11

(21) Номер заявки
201992336

(22) Дата подачи заявки
2018.07.17

(51) Int. Cl. **A61P 43/00** (2006.01)
A61K 39/205 (2006.01)
A61K 38/06 (2006.01)
A61K 38/21 (2006.01)
A61K 31/155 (2006.01)
A61K 31/4709 (2006.01)
A41D 31/00 (2019.01)

(54) ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ, ВКЛЮЧАЮЩАЯ ДИСУЛЬФИД ГЛУТАТИОНА И ГЛУТАТИОН ДИСУЛЬФИД S-ОКСИД

(31) **2017140106**

(32) **2017.11.17**

(33) **RU**

(43) **2020.02.29**

(86) **PCT/RU2018/000471**

(87) **WO 2019/098877 2019.05.23**

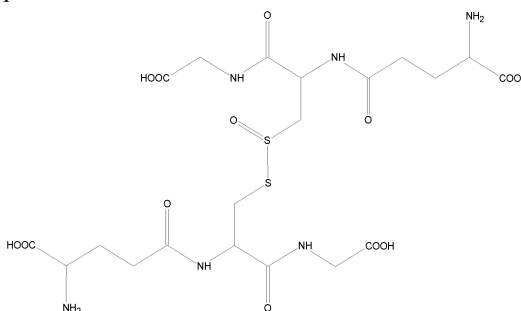
(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ
ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "ИВА
ФАРМ" (RU)**

(72) Изобретатель:
**Балазовский Марк Борисович,
Антонов Виктор Георгиевич,
Игнатенко Олег Александрович (RU)**

(74) Представитель:
Вахнин А.М. (RU)

(56) LI JUNFA ET AL.: "Glutathiolation of proteins by glutathione disulfide S-oxide derived from S-nitrosoglutathione: Modifications of rat brain neurogranin/RC3 and neuromodulin/GAP-43", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, US, vol. 276, no. 5, 2 February 2001 (2001-02-02), pages 3098-3105, XP009510493, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/JBC.M008260200, abstract, Materials and methods: Purification of GSNO; figure 2
US-A1-2005054580
US-A-6013632

(57) Предложена фармацевтическая композиция, включающая дисульфид глутатиона или его фармацевтически приемлемую органическую или неорганическую соль и глутатион дисульфид S-оксид следующей структуры:



или его фармацевтически приемлемую органическую или неорганическую соль для устранения дозозависимой токсичности и повышения терапевтической активности фармакологически активного соединения в терапии инфекционных и неинфекционных заболеваний. Обычно композиция содержит количество глутатион дисульфид S-оксида, которое составляет 0,01-10 мас.% от массы всей композиции, а также дополнительно металл (Me), представленный в виде координационного(ых) соединений, содержащих связь Me-S-глутатион, который выбирают из платиновой группы, как правило платину. Количество вводимого пациенту координационного соединения d-металла может составлять 10^{-3} - 10^{-15} моль/кг массы тела. Композиция может быть использована в комбинации с фармакологически активным соединением антикоагулянт, ингибитором фактора Ха, антимикробным или противовирусными средствами для повышения их терапевтической активности и устранения дозозависимой токсичности.

038932 B1

B1

038932

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к фармацевтической промышленности и к медицине, а именно к области получения лекарственных препаратов, и может быть использовано в фармакологии, медицине и ветеринарии.

Предшествующий уровень техники

Повышение терапевтической эффективности фармакологических молекул посредством оптимизации их фармакокинетики и/или фармакодинамики, и/или снижения токсичности за счет химической модификации молекулы лекарственного средства, и/или ее сочетанным использованием с другим химическим соединением или соединениями является одним из направлений создания лекарственных препаратов нового поколения, проявляющих свою активность в физиологически более оптимальных дозах.

В настоящее время известно вещество - окисленный глутатион (глутатион окисленный, дисульфид глутатиона, GSSG), которое представляет собой димер трипептида глутатиона, γ -глутамилцистеинил-глицина, в котором две молекулы указанного трипептида соединены друг с другом ковалентной дисульфидной связью между цистеиновыми остатками. Как трипептид глутатион (глутатион восстановленный, GSH), так и его димер - GSSG являются природными метаболитами и присутствуют в тканях и биологических жидкостях людей и животных [Isabella Dalle-Donne et al. S-glutathionylation in protein redox regulation/Free Radical Biology & Medicine, 2007, V.43, pp.883-898; Калинина Е.В. и др. Роль глутатиона, глутатионтрансферазы и глутаредоксина в регуляции редокс-зависимых процессов/Успехи биологической химии, 2014, Т.54, с. 299-348].

Из уровня техники известно, что окисленный глутатион (GSSG) сам по себе обладает разнообразной фармакологической активностью. В частности, показана способность окисленного глутатиона усиливать продукцию широкого спектра цитокинов, контролирующих комплекс защитных реакций организма, включая противовирусное, антибактериальное, противоопухолевое, антифибротическое действие.

Так, в патенте RU 2089179 C1, опубл. 10.09.1997, и в патенте WO 9721444 A1, опубл. 19.06.1997, раскрывается использование окисленного глутатиона и фармацевтических композиций на его основе для лечения онкологических, инфекционных, иммунологических, неопластических и гематологических заболеваний, при которых целесообразна стимуляция эндогенной продукции цитокинов и гемопоэтических факторов.

В патенте RU 2206334 C1, опубл. 20.06.2003, патенте RU 2208452 C1, опубл. 20.07.2003, и патенте RU 2208453 C1, опубл. 20.07.2003, раскрывается применение фармацевтических композиций на основе окисленного глутатиона для увеличения устойчивости (резистентности) организма соответственно к тепловому воздействию окружающей среды, к повышенному давлению дыхательной газовой среды и к укачиванию.

Лекарственная форма окисленного глутатиона разрешена к использованию и оказывает иммуномодулирующее, гепатопротективное, гемопоэтическое действие, а также фармакологические действия, регулирующие окислительно-восстановительные процессы в организме [http://www.rlsnet.ru/tn_index_id_10764.htm].

Из уровня техники также известно создание композитов окисленного глутатиона или его фармацевтически приемлемых солей с соединениями платины или палладия (в частности, композит, состоящий из диатриевой соли окисленного глутатиона с *cis*-диаминодихлорплатиной), обеспечивающих регуляцию эндогенной продукции цитокинов и/или гемопоэтических факторов, а также процессов метаболизма, пролиферации, дифференцировки и апоптоза нормальных и трансформированных клеток и применяемых для лечения онкологических, инфекционных, иммунологических, гематологических, ишемических, нейродистрофических, метаболических заболеваний [патент RU 2144374 C1, опубл. 20.01.2000; патент RU 2153350 C1, опубл. 27.07.2000; патент US 6312734 B1, опубл. 06.11.2001].

Кроме того, известны комбинированные средства на основе дисульфида глутатиона.

Так, в документе [заявка на патент WO 1998030228 A1, опубл. 16.07.1998] раскрывается применение окисленного глутатиона (GSSG) одного или в комбинации с восстановленной формой глутатиона (GSH), или в комбинации с аскорбат-2-фосфатом, или в комбинации с N-ацетил-L-цистеином для лечения вирусных инфекций гриппа.

В патенте RU 2482868 C1, опубл. 27.05.2013, описывается комбинация дисульфида глутатиона (GSSG) в виде диатриевой соли с липоевой кислотой, в виде натриевой соли и координационными соединениями, образованными палладием, медью и восстановленным глутатионом (GSH), которая обладает гипогликемизирующей, гипохолестеринемической, гиполипидемической и/или антиоксидантной активностью.

Наиболее близким аналогом является фармацевтическая композиция, представляющая собой лекарственное средство, раскрытая в патенте RU 2153351 C2, опубл. 27.07.2000, содержащая окисленный глутатион GSSG и его фармацевтически приемлемые соли в комбинации с пролонгатором, регулирующая эндогенную продукцию цитокинов и гемопоэтических факторов. В качестве пролонгаторов действия окисленного глутатиона используются аскорбиновая кислота, диметилсульфоксид, инозин(гипоксантин-9-D-рибофуранозид), цистамин(2,2'-дитиобис[этиламин]), соединения платины (например, платина-хлорид).

Недостатком указанного известного лекарственного средства, равно и всех перечисленных выше средств, является ограниченное применение в медицине, обусловленное рядом факторов. В частности, GSSG характеризуется очень коротким периодом полураспада в пределах 5-10 с после введения, что требует определенной подготовки и соответствующей квалификации медицинского персонала для определения точного места введения для получения искомого терапевтического эффекта препарата либо увеличения дозы и кратности введения. Частично задача решается использованием большого числа пролонгирующих соединений, как указано в RU 2153351, однако это повышает потенциальную опасность средства для пациента и требует тщательного подбора в комбинации GSSG и пролонгирующего агента. В сочетании или последовательном применении комбинации GSSG и пролонгирующего агента в комплексной терапии с другими лекарственными средствами дополнительно требуется учитывать схожесть фармакокинетики для получения ожидаемого терапевтического эффекта и отсутствие негативных изменений в профиле токсичности проводимой терапии. Создание комбинации GSSG и какого-либо пролонгирующего агента требует использования дополнительного технологического оборудования, введение дополнительного этапа или этапов в производстве лекарственной субстанции и соответствующей лекарственной формы, расширения перечня вспомогательных веществ. Несмотря на существующие ограничения в использовании препарата на основе окисленного глутатиона, GSSG, представляет несомненный интерес для фармакологических решений, что связано с его биологической активностью, особенностью обмена при патологических процессах, негативно влияющих на терапевтическую эффективность лекарственных средств, что снижает эффективность и безопасность терапии.

Раскрытие изобретения

Задачей изобретения является разработка новой фармацевтической композиции, обладающей высокой эффективностью и потенцирующей активностью в отношении фармакологически активных молекул из различных фармакотерапевтических групп. В частности, задачей является оптимизация фармакодинамики и, в конечном счете, фармакодинамики GSSG для того, чтобы стало возможным использование меньших доз для получения необходимого терапевтического эффекта при его введении пациенту в этом нуждающемуся, ингаляционно, энтерально, парентерально, при наружном применении как самостоятельно, так и в сочетании с другими фармакологически активными веществами в составе единой лекарственной формы. Фармакологически активное вещество может быть выбрано из любой фармакотерапевтической группы, включая антимикробные и противовирусные препараты, антикоагулянты, ингибиторы фактора Ха; модуляторы активности ионных каналов клеточной мембраны; иные лекарственные средства, для которых будет достигнута оптимизация фармакодинамики, и/или фармакокинетики, и/или снижение токсичности.

Как фармацевтическая композиция, так и фармацевтическая комбинация могут применяться в виде лекарственного средства, включающего дополнительно эксципиенты.

Техническим результатом данного изобретения является снижение разовой или курсовой дозы и, таким образом, снижение дозозависимой токсичности при принятой терапевтической дозе фармакологически активного вещества; усиление эффективности терапевтически активных агентов из различных фармакотерапевтических групп, соответственно снижение их разовой или курсовой дозы и, таким образом, снижение дозозависимой токсичности.

Указанный технический результат достигается за счет создания новой фармацевтической композиции, представляющей собой лекарственное средство, содержащее комбинацию дисульфида глутатиона (GSSG) или его фармацевтически приемлемой органической или неорганической соли и глутатион дисульфид S-оксида (GS(O)SG) или его фармацевтически приемлемой органической или неорганической соли, взятых в терапевтически эффективных количествах, совместно с фармацевтически приемлемыми эксципиентами и фармакологически активными молекулами из какой либо фармакотерапевтической группы, в отношении которых установлено снижение разовой или курсовой дозы и, соответственно, снижение дозозависимой токсичности.

Обычно фармакологически активное соединение выбирают из следующих фармакотерапевтических групп:

- антикоагулянты, ингибиторы фактора Ха, в частности амидин гидрохлорид;
- антимикробные и противовирусные препараты, в частности моксифлоксацин, антигенный материал антирабической вакцины, интерферона;
- модуляторы активности кальциевых каналов клеточной мембраны, в частности нифедипин; для которых будет достигнута оптимизация фармакодинамики, и/или фармакокинетики, и/или снижение токсичности.

Обычно количество глутатион дисульфид S-оксида составляет 0,01-10 мас.% от массы всей композиции.

Также композиция может дополнительно содержать d-металл (Me), предпочтительно платиновой группы, еще более предпочтительно платину, представленный в виде координационного(ых) соединений, содержащих связь Me-S-глутатион.

Количество вводимого в композицию d-металла в составе координационного соединения не превышает физиологически допустимых значений для данного d-металла. Однако это значение может быть

превышено в случае, когда для достижения терапевтического эффекта требуются большие количества металла, вводимого в составе координационного соединения.

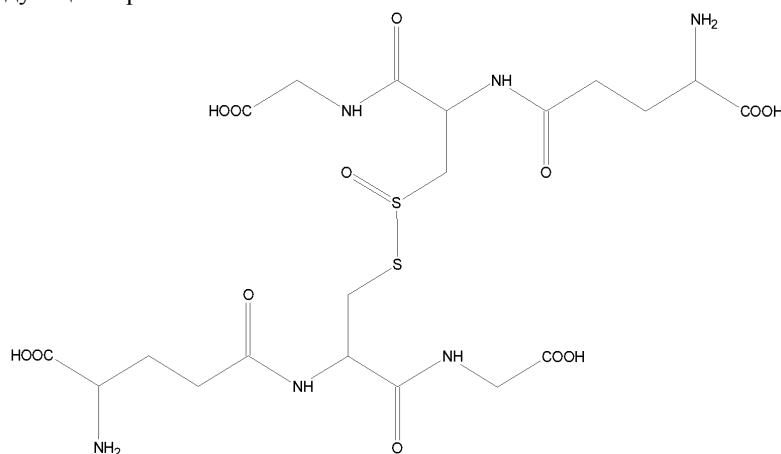
Количество d-металла в композиции варьируется от 1×10^{-10} до 1×10^{-3} моль на 1 кг композиции. Предпочтительно 1×10^{-5} моль на 1 кг композиции.

Предлагаемая композиция может быть изготовлена в форме для наружного, ингаляционного, энтерального или парентерального введения.

Характеристика компонентов.

Дисульфид глутатиона (или окисленный глутатион, GSSG) - димер трипептида глутатиона, γ -глутамилцистеинилглицина, в котором две молекулы указанного трипептида соединены друг с другом ковалентной дисульфидной связью между цистеиновыми остатками. В соответствии с настоящим изобретением дисульфид глутатиона в виде соли со щелочным или щелочеземельным металлом может быть получен любым известным из уровня техники способом [патент RU 2144374 C1, опубл. 20.01.2000].

Глутатион дисульфид S-оксида (также называемый глутатион тиосульфидат, или GS(O)SG) или сульфон, имеет следующее строение:



Глутатион дисульфид S-оксид характеризуется подобной окисленному глутатиону фармакокинетикой, и при этом является негативным регулятором ферментов распада окисленного глутатиона, таким образом, выступает как пролонгирующий агент GSSG, оптимизируя его фармакокинетику, потенцирует биологические эффекты окисленного глутатиона, что оптимизирует фармакодинамику GSSG и делает возможным использование меньших доз GSSG для получения необходимого терапевтического эффекта. Переход на более низкие уровни является одним из ключевых условий снижения токсичности действующего начала лекарственного средства. Таким образом, глутатион дисульфид S-оксид оптимизирует фармакокинетику, фармакодинамику, повышает безопасность использования GSSG, что в совокупности является условием оптимизации фармакоэкономических критериев при использовании комбинации глутатион дисульфид S-оксида и GSSG в терапевтической практике в сравнении с GSSG.

Молекулы дисульфида глутатиона и глутатион дисульфид S-оксида способны образовывать слабые межмолекулярные взаимодействия, такие как Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия, с действующим началом лекарственных препаратов, оптимизируя их терапевтические свойства посредством влияния на фармакокинетику, и/или фармакодинамику, и/или токсичность.

"Координационные соединения" подразумевают соединения, содержащие группу ионов или нейтральных молекул, называемых лигандами, в определенном порядке размещенных (координированных) вокруг центрального атома (иона), называемого комплексообразователем "d-металлы", "переходные металлы" и "переходные элементы" тождественны, и относятся к химическим элементам периодической системы, у которых происходит заполнение электронами d-подуровней.

"Фармацевтически приемлемые эксципиенты" представляют собой вещества, известные специалисту в данной области техники и подходящие для создания лекарственного средства, включающего предлагаемую в настоящем изобретении композицию, в форме для наружного, ингаляционного, энтерального, парентерального или др. введения. Например, в качестве эксципиентов могут использоваться любые известные фармацевтически приемлемые неорганические или органические носители, консерванты, солюбилизаторы, стабилизаторы, смачивающие вещества, эмульгаторы, подсластители, красители, корригенты, соли для регулирования осмотического давления, буферы, маскирующие агенты или антиоксиданты и другие необходимые компоненты.

"Фармацевтически приемлемые" подразумеваются соединения, которые не вызывают токсических или иных нежелательных эффектов при введении в организм пациента.

"Терапевтически эффективный агент" подразумевает любое вещество, которое используется с терапевтическими целями.

"Пациент" обозначает человек или другое млекопитающее, птицы, земноводные или рыбы, в организм которых тем или иным способом вводится композиция или ее комбинация с известным фармаколо-

гически активным соединением в частности ингибитором фактора Ха - амидина гидрохлоридом; антимикробным препаратом - моксифлоксацином, антигенным материалом противовирусной антирабической вакцины, противовирусным средством - интерфероном; ингибитором кальциевых каналов - нифедипином.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1 - электрофореграмма препарата моноклонального антитела, растворенного в различных растворах, хранившихся при температуре 37°C. Дорожка 1 - стандарты размеров (Fermentas PageRuler™ Prestained Protein Ladder); дорожка 2 - образец 2; дорожка 3 - образец 3, дорожка 4 - образец 4, дорожка 5 - образец 1;

фиг. 2 - данные ВЭЖХ о структурных интермедиатах моноклонального антитела, возникающих при хранении в образцах сыворотки крови в условиях, имитирующих физиологические ((1) - образец 1; (2) - образец 2; (3) - образец 3; (4) - образец 4);

фиг. 3 - средние значения МНО (1) - для субстанции амидина гидрохлорида, полученные из табл. 1, и (2) - для смеси субстанции амидина гидрохлорида с адьювантом, полученные из табл. 2 (адьювант - композиция, включающая комбинацию дисульфид глутатиона и глутатион дисульфид S-оксида);

фиг. 4 - Ca^{2+} -сигналы, индуцированные АТФ (1), (3) и тапсигаргином (2), (4) в перитонеальных макрофагах в среде, содержащей ионы Ca^{2+} (1), (2) и в бескальциевой среде (3), (4). По вертикали - концентрация Ca^{2+} в цитозоле, нМ. По горизонтали - время в минутах;

фиг. 5 - влияние дисульфида глутатиона на $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в покое и Ca^{2+} -сигналы, индуцированные 200 мкМ АТФ (1, 2) и 0,5 мкМ тапсигаргина (ТГ)(3) в макрофагах, находящихся в нормальном физиологическом растворе (1) или в номинально бескальциевой среде (2), (3);

фиг. 6 - влияние композиции (препарата) по примеру 3 на внутриклеточную концентрацию кальция $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в покое и Ca^{2+} -сигналы, вызванные АТФ. Препарат отменяет ингибирующий эффект селективного ингибитора кальциевых каналов - нифедипина (1), эффект самого препарата подавляется восстанавливающим агентом дитиотреитолом (ДТТ) (2).

Осуществление изобретения

Изобретение поясняется конкретными примерами осуществления изобретения, которые носят иллюстрирующий характер и никоим образом не ограничивают объем заявленных притязаний.

Сокращения.

GSH - глутатион (восстановленный глутатион);

GSSG - окисленный глутатион (дисульфид глутатиона);

GSO_3H - глутатионсульфоновая кислота;

GS(O)SG - глутатион дисульфид S-оксида или сульфон;

$\text{GS(O}_2\text{)SG}$ - глутатион дисульфид S-диоксида;

HPLC (ВЭЖК) - высокоэффективная жидкостная хроматография;

ПААГ - полиакриламидный гель;

SDS (ДЧН) - додецилсульфат натрия.

Способы получения композиций.

Способ А.

К раствору натриевой соли дисульфида глутатиона, полученному из L-глутатиона (пример 2), добавляют синтезированный в соответствии с методикой (пример 1) глутатион дисульфид S-оксида. Количество глутатион дисульфид S-оксида может составлять 0.1-10 мас.% от массы всей композиции. В практическом воплощении, в частности примеры 3 и 4, количество глутатион дисульфид S-оксида составило 2 и 4% соответственно от массы всей композиции. Предлагаемый способ позволяет контролировать содержание глутатион дисульфид S-оксида с высокой точностью.

Способ В.

К полученному раствору натриевой соли глутатион дисульфида в водном растворе гидроксида натрия добавляют избыток пероксида водорода при пониженной температуре, обычно 0-5°C с целью генерации глутатион дисульфид S-оксида *in situ*. В одном из воплощений (пример 5) при температуре не выше +3°C добавлено 127 г 6% пероксида водорода. Количество глутатион дисульфид S-оксида составило 5% от массы всей композиции.

Композиция, полученная способом А или В, характеризуется способностью влиять на образование и стабильность дисульфидной связи в белках (примеры 5 и 12), а значит и на фолдинг белка, что позволяет формировать и стабилизировать нативную конформацию белка, т.е. конформацию, в которой белок обладает функциональной активностью, в частности на конформацию лекарственного препарата, представленного белковым продуктом моноклональным антителом, состоящим из двух тяжелых и двух легких пептидных цепей, объединенных посредством дисульфидных связей в функционально активную молекулу, обладающую терапевтической активностью (пример 5).

Композиция, полученная способом А или В, характеризуется способностью повышать экспрессию ферментов второй фазы детоксикации ксенобиотиков (пример 13), что позволяет использовать ее самостоятельно как токсикомодифицирующее средство, т.е. средство, снижающее токсическое действие различных химических молекул, включая комплекс дозозависимых побочных токсических реакций при введении фармакотерапевтических средств.

Композиция, полученная способом А или В, может быть использована в комбинации для изготовления лекарственных средств в сочетании с другими известными, фармакологически активными и терапевтически востребованными молекулами: в частности, антикоагулянтом, ингибитором фактора Ха - амидином гидрохлоридом (пример 8); антибиотиком - моксифлоксацином; противовирусными средствами антигенным материалом антирабической вакцины и интерфероном (примеры 9, 10, 14); ингибитором кальциевых каналов - нифедипином (пример 11), в отношении которых установлено снижение дозы и, соответственно, снижение дозозависимой токсичности.

Пример 1. Способ получения глутатион дисульфид S-оксида (сульфон) (GS(O)SG).

К раствору 100 г субстанции L-глутатиона восстановленного (GSH) в 100 мл воды при перемешивании и охлаждении до 0-5°C прикапывают 150 мл 30% раствора надуксусной кислоты в уксусной кислоте в течение 30-40 мин. После окончания прикапывания реакционную массу перемешивают при температуре не выше 5°C в течение 1 ч, после чего замораживают и лиофилизируют в течение 24 ч. Получают 110 г вещества в виде белой пены согласно данным ВЭЖХ содержащего смесь компонентов (40% GSO₃H, 55% GS(O)SG, 5% GS(O₂)SG).

Лиофилизат растворяют в 400 мл воды и проводят очистку с использованием препаративной ВЭЖХ (колонна YMC-Actus Triart Prep C18-S 50×250 мм, элюент - вода), фракции, содержащие целевое соединение с чистотой выше 95% объединяют, упаривают до объема 700 мл и лиофилизируют. Получают 42 г целевого соединения - глутатион дисульфид S-оксида (в виде смеси диастереомеров) с чистотой 95+% (HPLC).

Пример 2. Получение окисленного глутатиона (дисульфид глутатиона).

К суспензии 2760 г L-глутатиона, восстановленного в 7 л воды, добавляют при перемешивании 2245 г 16% раствора гидроксида натрия при температуре не выше 17°C. После полного растворения глутатиона смесь охлаждают и добавляют при перемешивании со скоростью 30-50 мл/мин 2546 г 6% пероксида водорода при температуре реакционной массы не выше +15°C. По окончании добавления пероксида полученный раствор перемешивают при заданной температуре еще 1 ч. По окончании реакции (HPLC контроль) получают раствор с содержанием 2,95 кг натриевой соли дисульфида глутатиона в 11,5 л воды, который охлаждают до 3°C. Химическая чистота продукта - натриевой соли дисульфида глутатиона более 98,5% (HPLC контроль), что не требует дополнительных процедур выделения продукта.

Пример 3. Получение композиции (лекарственного средства) дисульфид глутатиона с заданным содержанием глутатион дисульфид S-оксида.

К полученной в примере 2 натриевой соли дисульфида глутатиона (2,95 кг в 11,5 л воды) при температуре 3-5 С добавляют 60 г глутатион дисульфид S-оксида, полученного в соответствии с примером 1, тщательно перемешивают в течение 5 мин, раствор оставляют на 120 мин при температуре 5°C, после чего лиофилизируют.

Пример 4. Получение композиции (лекарственного средства) дисульфид глутатиона с заданным содержанием глутатион дисульфид S-оксида.

К полученной в примере 2 натриевой соли дисульфида глутатиона (2,95 кг в 11,5 л воды) добавляют 120 г глутатион дисульфид S-оксида, полученного в соответствии с примером 1 тщательно перемешивают в течение 5 мин, раствор оставляют на 120 мин при температуре 5 С, после чего лиофилизируют.

Пример 5. Получение композиции натриевой соли дисульфида глутатиона с заданным содержанием глутатион дисульфид S-оксида.

К суспензии 2760 г L-глутатиона, восстановленного в 7 л воды, добавляют при перемешивании 2245 г 16% раствора гидроксида натрия при температуре не выше 17°C. После полного растворения глутатиона смесь охлаждают и добавляют при перемешивании со скоростью 30-50 мл/мин 2546 г 6% пероксида водорода при температуре реакционной массы не выше +15°C. По окончании добавления пероксида полученный раствор перемешивают при заданной температуре еще 1 ч. По окончании реакции (HPLC контроль) реакционную массу охлаждают до 3°C. Химическая чистота продукта - натриевой соли дисульфида глутатиона более 98,5% (HPLC контроль).

Затем при температуре не выше +3°C добавляют еще 127 г 6% пероксида водорода со скоростью 30-50 мл/мин. Выдерживают реакционную массу 1 ч при температуре +3°C и лиофилизируют.

Полученная композиция содержит 95% натриевой соли дисульфида глутатиона и 4,5-5,0% натриевой соли глутатион дисульфид S-оксида (HPLC контроль), что не требует дополнительных процедур очистки продукта.

Пример 6. Получение композиции дисульфид глутатиона с заданным содержанием глутатион дисульфид S-оксида и Pt-S.

К суспензии 2760 г L-глутатиона, восстановленного в 7 л воды, добавляют при перемешивании 2245 г 16% раствора гидроксида натрия при температуре не выше 17°C. После полного растворения глутатиона смесь охлаждают, вносят 0,5 г цис-платины и добавляют при перемешивании со скоростью 30-50 мл/мин 2546 г 6% пероксида водорода при температуре реакционной массы не выше +15°C. По окончании добавления пероксида полученный раствор перемешивают при заданной температуре еще 1 ч. По окончании реакции (HPLC контроль) получают раствор с содержанием натриевой соли дисульфида глутатиона 2,95 кг в 11,5 л воды, который охлаждают до 3°C. Химическая чистота продукта - натриевой со-

ли дисульфида глутатиона более 98,5% (HPLC контроль), что не требует дополнительных процедур выделения продукта. Раствор охлаждают до 3°C и добавляют 60 г глутатион дисульфид S-оксида, тщательно перемешивают в течение 5 мин, раствор оставляют на 120 мин при температуре 5°C, после чего лиофилизуют.

Пример 7. Анализ фолдирующей активности композиции, полученной по примеру 5.

Состав препарата моноклонального антитела:

моноклональное антитело - 10 мг/мл;

глицин - 2 мг/мл;

полисорбат 80 - 0,05 мг/мл;

натрия хлорид - 7 мг/мл;

лимонной кислоты моногидрат - 2,101 мг/мл;

вода для инъекций.

Для воспроизведения физиологических условий использовалась сыворотка крови человека, полученная с письменного добровольного согласия. Номер сыворотки в банке хранения сывороток О-17-1002.

В эксперименте по рефолдингу использовались

образец 1 - состав препарата моноклонального антитела в количестве 50 мкл + 1 мл сыворотки О-17-1002;

образец 2 - состав препарата моноклонального антитела + 0,2 мМ композиции, полученной по примеру 3 в количестве 50 мкл + 1 мл сыворотки О-17-1002;

образец 3 - состав препарата моноклонального антитела + 0,2 мМ композиции, полученной по примеру 4 в количестве 50 мкл + 1 мл сыворотки О-17-1002;

образец 4 - состав препарата моноклонального антитела + 0,2 мМ композиции, полученной по примеру 5 в количестве 50 мкл + 1 мл сыворотки О-17-1002.

Флаконы с образцами 1 и 2 помещают на хранение при температуре 37°C. Через 24 ч флаконы извлекают из термостатов и подвергают анализу на стабильность моноклонального антитела в процессе хранения при разных температурах в условиях имитации физиологической среды человеческого организма.

Результаты исследования стабильности вначале анализируют методом электрофоретического разделения в полиакриламидном геле (ПААГ) в восстанавливающих условиях.

Электрофорез проводят в 15%-ном ПААГ в денатурирующих условиях в неоднородной (ступенчатой) буферной системе (диск-электрофорез) с использованием на стадии концентрирования образца механизма изотахофореза (ИТФ). Образцы готовят следующим способом: осаждают клетки центрифугированием и ресуспендируют в 200 мкл буфера (0,2М трис-НСl pH 7,5; 0,2М NaCl; 0,01М ацетат натрия; 0,01М b-меркаптоэтанол и 5% - глицерин), после чего кипятят две минуты.

Для проведения электрофореза используют систему из нескольких буферных растворов: катодного буфера - Tris base 0,1М; Tricine 0,1М; SDS 0,1% (закрывающий анион - трицин); анодного буфера - Tris base 0,2М pH 8,9 (ведущий анион - Cl⁻). Концентрирующий гель T=2,5-3%, разделяющий гель с T=5-15% и C=2-5% (где T - относительное содержание мономеров в геле, C - содержание сшивающего агента в сумме мономеров). Электрофорез клеточных лизатов проводят в денатурирующих условиях в 2% SDS.

Электрофореграмма препаратов белков (фиг. 1) была проанализирована с помощью программы ImageJ. Программа предназначена для денситометрического анализа данных различных экспериментов. В ручном режиме были размечены дорожки, затем отмечены полосы, соответствующие белкам, в рамках каждой из дорожек. Программа оценивает плотность каждой из полос за вычетом фона, что позволяет рассчитать чистоту целевого белка.

Условия ВЭЖХ для изучения структурных интермедиатов моноклонального антитела, возникающих при хранении в условиях, имитирующих физиологические.

Хроматограф Shimadzu LC-20 "Prominence".

Колонка Phenomenex "Jupiter" C18, 5 кмк, 300А, 250×4,6.

Детекция при длине волны - 210 нм.

Объем инъекции - 25 мкл.

Скорость потока - 1,0 мл/мин.

Температура колонки - 35°C.

Температура ячейки детектора - 35°C.

Подвижная фаза.

Элюэнт А. 30% ацетонитрил+ 0,1% трифторуксусная кислота в воде.

Элюэнт В. 70% ацетонитрил+ 0,1% трифторуксусная кислота в воде.

Время анализа - 47 мин.

Градиентная программа.

0-1 мин 44% ацетонитрила;

1-5 мин 48% ацетонитрила;

5-20 мин 50% ацетонитрила;

20-30 мин 53,4% ацетонитрила;
 30-35 мин 60% ацетонитрила;
 35-37 мин 60% ацетонитрила;
 37-40 мин 44% ацетонитрила;
 40-47 мин 44% ацетонитрила.

Полученные данные представлены на фиг. 2, которые свидетельствуют о том, что в образцах сыворотки крови, содержащих композиции, полученные по примерам 3, 4, 5 (соответственно фиг. 2 (2), фиг. 2 (3), фиг. 2 (4)), в отличие от образца, не содержащего указанные композиции (фиг. 2 (1)), отсутствует фракция моноклонального антитела с нарушенной структурой, которая неспособна распознавать ген.

Пример 8. Совместное применение композиции, содержащей дисульфид глутатиона и глутатион дисульфид S-оксид в комбинации с антикоагулянтом, ингибитором фактора Ха - амидином гидрохлоридом.

Исследуют способность композиции, полученной в соответствии с примером 3 настоящей заявки, усиливать терапевтическую эффективность фармакологически активного агента амидаина гидрохлорида, который является антикоагулянтом, ингибитором фактора Ха. Тестируемую субстанцию амидаина гидрохлорида (например, полученного в соответствии с примером 2 в патенте ЕА 015918 В1, опубл. 30.12.2011) или смесь субстанции амидаина гидрохлорида с адьювантом (адьювант - композиция, полученная в примере 3 настоящей заявки) вводят внутривенно с помощью инсулинового шприца с иглой 30G объемом 1 мл в боковую хвостовую вену в области 1/3 ближе к основанию хвоста. Индивидуальный объем вводимой дозы для каждого животного рассчитывают, исходя из значения массы тела, и корректируют после каждого взвешивания. Введение веществ однократное. Для внутривенного введения животным смеси субстанции амидаина гидрохлорида с адьювантом готовят указанные смеси. Для этого субстанцию амидаина гидрохлорида и адьювант растворяют в дистиллированной воде отдельно, а затем растворы смешивают. Раствор готовят непосредственно перед введением животным и вводят не позднее, чем через 10 мин после приготовления. Объем доз для крыс составил 0,31-0,42 мл.

Отбор крови осуществляют без наркоза из боковой хвостовой вены выше места внутривенного введения (от 1/3 до 2/3 длины хвоста), предварительно прогревая хвост крысы в течение как минимум 15 мин в водяной бане с температурой 43°C. Кровь объемом 0,36 мл отбирают иглой размером 23G в пластиковые пробирки (типа "Эппендорф"), содержащие 0,04 мл 0,11М раствора цитрата натрия до объема 0,4 мл, таким образом, чтобы отношение раствора цитрата натрия к крови составляло 1:9. В течение 30 мин после взятия для получения бедной тромбоцитами плазмы кровь центрифугируют 10 мин при 8000 об/мин (7000g), плазму переносят в другую пробирку и повторно центрифугируют 10 мин при 12000 об/мин (15000g) при 20°C. Полученную плазму в объеме 110 мкл разливают в пластиковые пробирки (типа "Эппендорф") и замораживают при -20°C. Забор осуществляют 6 раз у одной крысы.

В экспериментах использовался водорастворимый, лиофильно высушенный тромбопластин с добавлением ионов кальция, аттестованный по Международному индексу чувствительности (МИЧ) - Ренампластин (НПО "РЕНАМ").

Принцип метода: при добавлении к цитратной плазме избытка тканевого тромбопластина и ионов кальция время образования сгустка фибрина зависело только от активности факторов внешнего и общего пути свертывания: факторы I, II, V, VII, X. Измеряют время от момента добавления к плазме тромбопластина с кальцием до момента образования фибринового сгустка.

Проведение анализа: вносят во флакон с лиофильно высушенным ренампластином 8 мл дистиллированной воды и растворяют при покачивании. Перед проведением анализа реагент прогревают при 37°C в течение 30 мин. Вносят в кювету анализатора цитратную плазму объемом 50 мкл, инкубируют при 37°C точно 1-2 мин. Затем вносят ренампластин 100 мкл и фиксируют время свертывания в секундах на коагулологическом анализаторе Merlin MC 1 компании ABW Medizin und Technik GmbH.

Полученные результаты выражают в Международном Нормализованном Отношении (МНО):

$$\text{МНО} = \text{ПО}^{\text{МИЧ}},$$

где МИЧ - Международный Индекс Чувствительности Ренампластина, который должен быть указан в прилагаемом паспорте. ПО - протромбиновое отношение:

$$\text{ПО} = \text{ПВ}_\text{Б} / \text{ПВ}_{100\%},$$

где ПВ_Б - протромбиновое время плазмы исследуемого образца в секундах, ПВ_{100%} - усредненное протромбиновое время для образцов, полученных перед введением субстанции для данного животного.

Результаты измерения значений исследованных показателей были усреднены по экспериментальным группам и представлены в виде $M \pm m$, где M - среднее по группе, m - стандартное отклонение. Достоверность различий между группами определяют с помощью параметрического t-критерия Стьюдента при $p < 0,05$ при нормальном распределении выборки и непараметрического U-критерия Манна-Уитни при $p < 0,05$ при ненормальном распределении.

Полученные результаты представлены в табл. 1 и 2 и на фиг. 3. В табл. 1 и на фиг. 3 (1) приведены данные, полученные для отдельно взятой субстанции амидаина гидрохлорида, а в табл. 2 и на фиг. 3 (2) представлены данные, полученные для смеси субстанции амидаина гидрохлорида с адьювантом.

Таблица 1. Результаты анализа значений МНО при введении амидина гидрохлорида

Время после инъекции, сек	0	5	10	20	40	60
МНО	1	1,46	1,33	1	0,94	
	1	4,18	3,72	3,45	3,16	
	1	6,45	2,42	1,93	0,96	
	1	3,22	2,51	1,9	1,25	
	1	2,71	2,76	1,53	2,04	
	1	5,88	2,08	1,59	1,83	0,79
	1	9,82	1,18	2,94	1,74	1,63
	1	2,05	5,01	1,57	1,3	0,98
	1	2,42	5,53	1,85	1,8	1,43
	1	2,62	1,78	1,41	1,61	1,75
	1	2,13	2,15	1,68	1,05	1,24
	1	2,46	1,85	1,45	1,35	1,52
	1	2,3	2,21	2	1,44	1,65
	1	6,32	2,12	1,21	1,33	1,55
	1	4,85	2,23	1,75	1,48	1,38
	1	5,46	2,11	1,54	0,93	0,9
	1	2,63	2,23	1,79	1,31	1,24
	1		1,72	1,61	1,21	0,96
	1				1,15	1,07

Таблица 2. Результаты анализа значений МНО при сочетанном использовании амидина гидрохлорида с адьювантом

Время после инъекции, сек	0	5	10	20	40	60
МНО	1	9,64	6,77	4,96	2,68	2,47
	1	10,38	5,21	4,26	2,38	1,92
	1	11,38	3,64	3,02	2,94	2,73
	1	4,53	4	2,44	1,63	1,84
	1	4,35	3,69	2,59	4,84	4,45
	1	6,84	3,9	2,09	2,28	1,59
	1	6,97	3,71	2,7	1,72	2,05
	1	4,69	4,17	2,29	1,72	1,96

Полученные результаты демонстрируют способность предлагаемых в настоящем изобретении композиций усиливать эффективность других терапевтически активных агентов.

Пример 9. Исследование антимикробной активности комбинации, включающей моксифлоксацин в сочетании с композицией дисульфида глутатиона и глутатион дисульфид S-оксида.

Исследовали препараты, полученные в соответствии с примерами 3, 4, 5 настоящей заявки.

Антимикробную активность препаратов изучали в отношении грамотрицательных: *Escherichia coli* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, клинический изолят - *Acinetobacter baumannii* и грамположительных бактерий: *Listeria monocytogenes* EGD (ATCC BAA-679), *Staphylococcus aureus* ATCC 25922, MRSA ATCC 33591 - золотистый стафилококк, устойчивый к метициллину.

Микроорганизмы культивируют в течение ночи (16-18 ч) в 2,1% бульоне Мюллера-Хинтон М391 (Oxoid, Германия) при 37°C с непрерывным перемешиванием на шейкере. Затем из ночной культуры отбирают аликвоты суспензии бактерий и переносят в 15 мл свежего стерильного 2,1% бульона Мюллера-Хинтон, после чего инкубируют при 37°C на шейкере в течение 2,5-3 ч. После этого измеряют оптическую плотность (OD) полученной суспензии на спектрофотометре DU-50 (Beckman, США) при длине волны 620 нм против стерильного 2,1% бульона Мюллера-Хинтон и определяют количество колониеобразующих единиц в мл (КОЕ) по формуле: $1 \times OD_{620} = 2.5 \times 10^8$ КОЕ/мл [Protocols in antimicrobial peptides. W. Shafer Ed. Springer-Verlag New York, LLC, 7/8/1997]. Исходя из этого расчёта разводят суспензии бак-

терий стерильным 2,1% бульоном Мюллера-Хинтон до концентрации 1×10^5 КОЕ/мл.

Используют 96-луночные стерильные планшеты с U-образным дном (Sarstedt, Германия). Готовят двукратные серийные разведения исследуемых препаратов в среде Мюллера-Хинтон (по 8 разведений для каждого препарата в объеме 50 мкл/пробу). Далее в лунки планшетов вносят по 50 мкл суспензии бактерий (конечная концентрация бактерии в пробах составляла $0,5 \times 10^5$ КОЕ/мл). Для каждого разведения препарата готовят по пять параллельных проб.

Планшеты с пробами инкубируют в термостате при 37°C в течение 18 ч.

Регистрацию результатов производят на следующий день. За минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) принимают наименьшую концентрацию вещества, при которой визуально не наблюдается (полностью ингибируется) рост микроорганизмов в соответствующих лунках планшета. Окончательные результаты рассчитывают на основании данных 5 независимых экспериментов, в каждом из которых имелось по 5 параллельных проб для каждого разведения каждого из исследованных образцов.

Антимикробную активность (АМА) препаратов определяют также методом радиальной диффузии в агарозном геле, содержащем тестируемые микроорганизмы, разработанным проф. Лерером, Университет Лос-Анжелеса, США [Lehrer R.I. et al. Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial poly-peptides/Journal of Immunological Methods, 1991, V.137, pp. 167-173]. Микроорганизмы предварительно культивируют в течение 16 ч в среде, представляющей 3%-ный раствор триптического гидролизата сои при 37°C . Аликвоты сред с микробами переносят затем раздельно в свежеприготовленную среду и инкубируют при 37°C в течение 2,5 ч для получения микроорганизмов, находящихся в середине логарифмической фазы роста. Количество клеток каждого из микроорганизмов оценивают, измеряя оптическую плотность суспензий на спектрофотометре при длине волны 620 нм. Аликвоты суспензий, содержащие 4×10^6 клеток микроорганизмов, перемешивают с 10 мл стерильного 1% раствора агарозы в 10 мМ натрий-фосфатном буфере, pH 7,4, содержащем 0,15M NaCl, при температуре 42°C . Полученную смесь выливают в стерильные пластиковые чашки Петри диаметром 90 мм и оставляют при комнатной температуре до застывания. В лунки, сделанные аппликатором (диаметр 3 мм) вносят анализируемые образцы, представляющие последовательные разведения препаратов в 10 мМ натрий-фосфатном буфере, pH 7,4 в объеме 5 мкл и инкубируют в воздушном термостате в течение 3 ч при 37°C . Затем чашки заливают 1% агарозой, содержащей 6% ТГС и инкубируют в течение 18 ч при 37°C . Диаметр зоны ингибирования роста (зона вокруг лунки, свободная от микроорганизмов) измеряют, принимая за 1 условную единицу антимикробной активности 0,1 мм и вычитая из измеренного значения 30 условных единиц, соответствующих диаметру самой лунки. Использованные концентрации препаратов - 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1 мкг/мл.

Минимальные ингибирующие рост микроорганизмов концентрации (МИК) препаратов определяют путем построения линейных регрессий зависимости антимикробной активности от концентрации пептидов:

$$y = a + bx,$$

где y - антимикробная активность (у.е.), x - концентрация препарата. За МИК принималось значение x при $y = 0$, т.е. МИК = $-a/b$.

Таблица 3. Минимальные ингибирующие концентрации пептидов, мкг/мл, в отношении *Escherichia coli* ATCC 25922[#] (метод серийных разведений в жидкой питательной среде)

Бактерия Препарат	МИК, мкг/мл					
	Эксп. 1	Эксп. 2	Эксп. 3	Эксп. 4	Эксп. 5	mean $\pm$ SE
№ 1 (по примеру 3)	0.25; 0.25; 0.25; 0.25; 0.25	0.25; 0.25; 0.25; 0.25; 0.5; 0.25	0.25; 0.25; 0.25; 0.25; 0.5; 0.25	0.25; 0.25; 0.25; 0.5; 0.25	0.5; 0.5; 0.5; 0.5; 0.5	0.33 $\pm$ 0.02
№ 2 (по примеру 4)	0.25; 0.25; 0.25; 0.25; 0.25	0.25; 0.25; 0.25; 0.25; 0.5	0.5; 0.5; 0.5; 0.5; 0.25	0.25; 0.25; 0.25; 0.25; 0.25	0.5; 0.5; 0.5; 0.5; 0.5	0.35 $\pm$ 0.03
№ 3 (по примеру 5)	0.25; 0.5; 0.5; 0.5; 0.5	0.25; 0.25; 0.25; 0.25	0.25; 0.25; 0.25; 0.25	0.25; 0.25; 0.25; 0.25; 0.25	0.25; 0.25; 0.25; 0.5; 0.5	0.31 $\pm$ 0.02

[#] Каждое из представленных значений является средним $\pm$ стандартная ошибка среднего ($n=25$).

Таблица 4. Минимальные ингибирующие концентрации пептидов, мкг/мл, в отношении *Staphylococcus aureus* ATCC 25923[#] (метод серийных разведений в жидкой питательной среде)

Бактерия Препарат	МИК, мкг/мл					
	Эксп. 1	Эксп. 2	Эксп.3	Эксп. 4	Эксп.5	mean ±
						SE
№ 1 (по примеру 3)	0.5; 0.5; 0.5; 0.5; 0.5	0.5; 0.5; 0.5; 0.5; 0.5	0.25; 0.25; 0.25; 0.5; 0.25	0.5; 0.25; 0.25; 0.25; 0.25	0.25; 0.25; 0.25; 0.5; 0.25	0.38 ± 0.03
№ 2 (по примеру 4)	0.25; 0.25; 0.25; 0.25; 0.25	0.5; 0.5; 0.5; 0.5; 0.5	0.25; 0.25; 0.25; 0.25; 0.5	0.25; 0.25; 0.25; 0.25; 0.25	0.25; 0.25; 0.25; 0.25; 0.25	0.31 ± 0.02
№ 3 (по примеру 5)	0.25; 0.25; 0.25; 0.25; 0.25	0.5; 0.5; 0.5; 0.5; 0.5	0.25; 0.25; 0.25; 0.25; 0.25	0.25; 0.25; 0.25; 0.25; 0.25	0.25; 0.25; 0.25; 0.5; 0.5	0.32 ± 0.22

[#]Каждое из представленных значений является средним ± стандартная ошибка среднего (n=25).

*достоверные отличия по сравнению с МИК моксифлоксацина (№ 13), t-критерий Стьюдента.

Проведённые исследования демонстрируют высокую антимикробную активность предлагаемых в настоящем изобретении композиции в отношении как грамотрицательных, так и грамположительных бактерий.

Пример 10. Использование композиции, полученной по примеру 3, содержащей дисульфид глутатиона и глутатион дисульфид S-оксид, в качестве адьюванта в вакцинном препарате.

Приготовление комбинации вакцины антирабической культуральной концентрированной очищенной инактивированной сухой и композиции по примеру 3 настоящей заявки.

Приготовили стерильный раствор гидроксида алюминия 0,5 мг/мл в PBS. В 60 мл полученного раствора внесли 12 г композиции, полученной по примеру 3 настоящей заявки. Полученный раствор стерилизовали, пропуская через фильтр с диаметром пор 0,44 мкм. Из полученного раствора приготовили разведение растворы (АД) с концентрацией 20, 10, 5, 1 мг/мл на PBS с концентрацией 0,5 мг/мл гидроксида алюминия.

Полученные растворы используют в приготовлении вакцин с разведением 1:200 (расчётные 50% защиты мышей) и 1:1200 (расчётные 20% защиты мышей) в растворе с заданной концентрацией субстанции по примеру 3 (настоящей заявки) на PBS с 0,5 мг/мл гидроксида алюминия. Полученные растворы инкубируют при температуре 4°C в течение 1 ч на шейкере (около 150 об./мин), не допуская вспенивания.

В качестве образца сравнения используется вакцина антирабическая культуральная концентрированная очищенная инактивированная сухая с разведением 1:200 и 1:1200.

В качестве объекта исследования использовались мыши линии BALB/c, весом 13-15 г одного привоза.

Рабочее разведение, содержащее от 20 до 100 ЛД₅₀ в 0,03 мл рассчитывалось из результатов титрования тест-штамма CVS вируса бешенства (10% мозговая суспензия мышей инфицированных вирусом бешенства).

Первая иммунизация мышей проводилась внутрибрюшинно по 0,5 мл из расчёта 10 голов на каждое разведение композиции.

Вторая иммунизация мышей через 7 суток внутрибрюшинно по 0,5 мл из расчёта 10 голов на каждое разведение композиции.

Приготовление рабочего (разрешающего) разведения вируса и 3 последующих десятикратных разведений на воде для инъекций с добавлением 2% сыворотки крови лошади, инактивированной при 56°C в течение 30 мин для определения реальной дозы вируса взятой в опыт.

Контрольной группе мышей одновременно с иммунизированными мышами вводят интрацеребрально по 0,03 мл разрешающую дозу и её десятикратные разведения, используя на каждое разведение 6 мышей.

Срок наблюдения за животными 14 суток. При оценке результатов опыта учитывают мышей, заболевших или павших с 5 по 14 сутки.

Математическая обработка результатов по методу Рида и Менча.

Полученные результаты сведены в табл. 5.

Таблица 5. Результаты влияния адьюванта на эффективность вакцинного препарата

Наименование введенного материала	Вакцина (1:200)		Вакцина (1:1200)		СПЖ
	выжившие	% защиты	выжившие	% защиты	
Вакцина (1:70) с АД 1 мг/мл	10/10	100%	6/10	60%	12,8 дней
Вакцина (1:200) с АД 5 мг/мл	10/10	100%	1/10	10%	12,8 день
Вакцина (1:70) с АД 10 мг/мл	8/10	80%	5/10	50%	10,7 дней
Вакцина (1:200) с АД 20 мг/мл	10/10	100%	2/10	20%	11,2 дней
Вакцина без АД	7/10	70%	3/10	30%	12,8 дней
шт. CVS	-	-	-	-	5,5 дней

Приведённые данные свидетельствуют о высоких показателях выживаемости животных при введении вакцины, содержащей комбинацию дисульфид глутатиона и глутатион дисульфид S-оксида. Эти показатели сравнимы, а в большинстве случаев даже выше показателей образца сравнения (для вакцины антирабической культуральной).

Пример 11. Влияние композиции, полученной по примеру 3, содержащей дисульфид глутатиона и глутатион дисульфид S-оксид на активность ингибиторов кальциевых каналов.

Цель исследования - изучение влияния композиции, полученной в примере 3 настоящей заявки, на активность ионных каналов клеточной мембраны и активность ингибиторов кальциевых каналов.

В качестве исследуемых соединений используют селективный ингибитор кальциевого канала нифедипин, глутатион дисульфид (полученный в примере 2 настоящей заявки) и композиция по примеру 3 настоящей заявки (содержащая дисульфид глутатиона совместно с глутатион дисульфид S-оксидом).

Приготовление препаратов для проведения исследования.

Исследуемые соединения и композиции хранят при +4°C; непосредственно перед началом эксперимента вещества растворяют в деионизированной воде (super Q). Приготовленный раствор хранят не более 5 ч при +4°C.

Соединения добавляют в среду культивирования клеток до исследуемой конечной концентрации.

Препарат добавляют к клеткам однократно на указанный период времени.

Использованная линия клеток, условия культивирования.

Эксперименты проводят на культивируемых резидентных перитонеальных макрофагах крысы. Резидентные макрофаги выделяют из перитонеальной полости крыс весом 200-300 г по методу, описанному ранее в [Conrad R.E. Induction and collection of peritoneal exudate macrophages. Manual of macrophages methodology/New York: Marcell Dekker. - pp. 5-11; Randriamampita C. et al. Ionic channels in murine macrophages/Cell Biology, 1987, V.105, pp.761-769]. Сразу после выделения клетки имеют сферическую форму и диаметр 10-20 мкм. Суспензию клеток помещают в бакпечатки, содержащие кварцевые стекла размером 10×10 мм. Клетки на стеклах культивируют в среде 199 (pH 7,2) с добавлением 20% сыворотки крови быка, раствора глутамина (3%), пенициллина (100 ед./мл) и стрептомицина (100 мг/мл) в течение 1-3 суток при 37°C. По окрашиванию α-нафтил ацетат эстеразой [Monahan R.A. et al. Ultrastructural localization of nonspecific esterase activity in guinea pig and human monocytes, macrophages and lymphocytes/Blood, 1981, V.58, pp.1089-1099] было определено, что по меньшей мере 96% клеток в монослоях были макрофагами. Эксперименты проводят при комнатной температуре 20-22°C на 2-3 сутки культивирования клеток.

Кварцевые стёкла с клетками помещают в экспериментальную камеру, заполненную физиологическим раствором следующего ионного состава (мМ): NaCl - 140, KCl - 5, CaCl₂ - 1, MgCl₂ - 1, HEPES-NaOH - 5; pH 7,3-7,4 (Alonso-Torre, Trautmann, 1993). Бескальциевая среда содержала 0 мМ CaCl₂ и 1 мМ ЭГТА.

В опытах используют реактивы фирмы Sigma. Маточные растворы тапсигаргина (500 мкМ), нифедипина (20 мМ) готовят в диметилсульфоксиде. Маточные растворы дисульфида глутатиона и композиции по примеру 3 (0,45 мкмоль/мл), АТФ (100 мМ), готовили на воде.

Ход эксперимента.

Для измерения внутриклеточной концентрации кальция ($[Ca^{2+}]_i$) используют флуоресцентный зонд Fura-2AM. Макрофаги инкубируют в течение 45 мин в физиологическом растворе, содержащем 2 мкМ Fura-2AM при комнатной температуре (для предотвращения эндоцитоза мицелл Fura-2AM, который происходит при 37°C) [Alonso-Torre S.R. et al. Calcium responses elicited by nucleotides in macrophages. Interaction between two receptor subtypes/The Journal of Biological Chemistry, 1993, V. 268, pp.18640-18647].

Стекла с окрашенными клетками отмывают физиологическим раствором и переносят в экспериментальную камеру, расположенную на столике люминесцентного микроскопа "Люмам-КФ". Флуоресценцию Fura-2 возбуждают при 337 нм с помощью азотного лазера ЛГИ-503. Лазер располагают сбоку от микроскопа под углом 30° к экспериментальной камере, что позволяет направить луч лазера непосредственно на объект. Интенсивность флуоресценции регистрируют с помощью спектрофотонасадки СФН-10 при длине волны 510 нм. Сигнал с ФЭУ-79 усиливают специально сконструированным усилителем и регистрируют на компьютере IBM PC с использованием оригинального программного обеспечения. В экспериментах используют объектив 10×0,40. При данном увеличении в площадь фотометрируемого участка попадает 40-50 клеток. С целью избежания фотоблещивания измерения проводят через каждые 20 с облучением объекта в течение 2,5 с. При добавлении АТФ и УТФ клетки облучают непрерывно до достижения максимума флуоресценции. Значения $[Ca^{2+}]_i$ рассчитывают по уравнению Гринкевича [Gryniewicz G. et al. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties/The Journal of Biological Chemistry, 1985, V.260, pp.3440-3450]

$$[Ca^{2+}]_i = K_d \cdot (F - F_{min}) / (F_{max} - F),$$

где F - наблюдаемая интенсивность флуоресценции; F_{max} - флуоресценция красителя, насыщенного Ca^{2+} ; F_{min} - флуоресценция красителя, свободного от Ca^{2+} (в бескальциевой среде).

При 20°C и pH 7,1-7,2, константа диссоциации, K_d , для комплекса Fura-2AM: Ca^{2+} составляет 135 нМ, F_{max} измеряют после добавления 10 мкМ иономицина или 25 мкМ дигитонина к клеткам, находящимся в среде, содержащей Ca^{2+} . Обработка клеток дигитонином позволяет ионам Ca^{2+} свободно проникать через плазматическую мембрану, не влияя на проницаемость мембран митохондрий и эндоплазматического ретикулума. После стабилизации сигнала добавляют 5 мМ ЭГТА и определяют флуоресценцию красителя в номинально бескальциевой среде (F_{min}). Уровень собственной флуоресценции вычитают после добавления к макрофагам раствора $MnCl_2$ (100 мкМ). Mn^{2+} вытесняет Ca^{2+} из комплекса с Fura-2, а флуоресценция комплекса красителя с Mn^{2+} в 100 раз ниже флуоресценции комплекса Fura-2 с Ca^{2+} . Для Fura-2, $F_{min} = F_{max}/3$.

В исследованиях используют два экспериментальных подхода. В первом исследовали действие фармакологических агентов на Ca^{2+} -ответ, вызываемый АТФ, УТФ, тапсигаргином или циклопязониковой кислотой (ЦПК) в макрофагах, находящихся в нормальном физиологическом растворе. Агенты вводят либо до действия агонистов, либо после, во время фазы плато Ca^{2+} -сигнала, отражающей вход Ca^{2+} из наружной среды. Во втором варианте опытов для выявления и усиления входа Ca^{2+} в клетки используют следующую схему эксперимента (Ca^{2+} -free/ Ca^{2+} -reintroduction protocol). Макрофаги инкубировали в номинально бескальциевой среде, затем на них действовали одним из агонистов, вызывая мобилизацию Ca^{2+} из внутриклеточных депо. После добавления в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} и восстановления физиологического градиента концентрации Ca^{2+} , 15 наблюдается быстрое повышение $[Ca^{2+}]_i$, отражающее вход Ca^{2+} в клетку. Далее исследуют влияние фармакологических агентов, добавленных до введения агонистов, до введения Ca^{2+} или во время развивающегося входа Ca^{2+} из наружной среды.

Результаты влияния исследуемых соединений на внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} и Ca^{2+} -сигналы, индуцированные АТФ и тапсигаргином, в макрофагах крысы.

Введение в среду инкубации перитонеальных макрофагов крысы 200 мкМ АТФ вызывает двухфазный Ca^{2+} -сигнал, состоящий из начального кратковременного пика, связанного в основном, с мобилизацией Ca^{2+} из депо, вызванной активацией P_{2u} -рецепторов, и выраженной длительной фазой "плато". Эта фаза плато обусловлена входом Ca^{2+} из наружной среды и отражает, по-видимому, одновременную активацию P_{2u} и P_{2z} -рецепторов. На фиг. 4 (1) представлен характерный Ca^{2+} -сигнал, индуцированный внеклеточной АТФ (200 мкМ) в популяции из 40-50 макрофагов, находящихся в нормальном физиологическом растворе.

В ответ на введение экстраклеточной АТФ $[Ca^{2+}]_i$ увеличивается от базального уровня 75 ± 18 нМ до пика 820 ± 105 нМ. Далее следует медленно убывающая фаза плато, во время которой $[Ca^{2+}]_i$ составляет в среднем 460 ± 115 нМ через 4 мин после добавления АТФ.

Специфический ингибитор эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз тапсигаргин (0,5 мкМ) также вызывает двухфазный Ca^{2+} -сигнал: достаточно быстрый пик, связанный с мобилизацией Ca^{2+} из депо, и длительную фазу, отражающую депо-зависимый вход Ca^{2+} из наружной среды. На фиг. 4 (2) представлен типичный Ca^{2+} -сигнал, индуцированный тапсигаргином в макрофагах, находящихся в нормальном физиологическом растворе.

Для выявления и усиления фазы входа Ca^{2+} в клетку были проведены эксперименты с использованием бескальциевой среды. После стимуляции макрофагов 200 мкМ АТФ (фиг. 4 (3)) или 0,5 мкМ тапсигаргина (фиг. 4 (4)) в номинально бескальциевой среде (0 мМ $CaCl_2$ и 1 мМ ЭГТА), вход Ca^{2+} индуциру-

ют введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} .

На фиг. 5 представлено влияние дисульфида глутатиона на $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в покое и Ca^{2+} -сигналы, индуцированные 200 мкМ АТФ (1), (2) и 0,5 мкМ тапсигаргина (3) в макрофагах, находящихся в нормальном физиологическом растворе (1) или в номинально бескальциевой среде (2), (3).

Полученные данные свидетельствуют о способности дисульфида глутатиона увеличивать $[\text{Ca}^{2+}]_i$ до 180 ± 19 нМ за счет мобилизации кальция из внутриклеточного депо. Опустошение внутриклеточных депо кальция снижает эффект от действия АТФ. Тапсигаргин полностью отменяет действие способности дисульфида глутатиона осуществлять мобилизацию кальция из депо.

На фиг. 6 показано влияние композиции (препарата) по примеру 3 настоящей заявки на внутриклеточную концентрацию кальция $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в покое и Ca^{2+} -сигналы, вызванные АТФ. Препарат отменяет ингибирующий эффект селективного ингибитора кальциевых каналов - нифедипина (1), эффект самого препарата подавляется восстанавливающим агентом дитиотреитолом (2).

Полученные данные свидетельствуют о способности дисульфида глутатиона совместно с глутатион дисульфид S-оксидом увеличивать $[\text{Ca}^{2+}]_i$ до 240 ± 28 нМ за счет мобилизации кальция из внутриклеточного депо. Опустошение внутриклеточных депо кальция снижает эффект от действия АТФ. Дисульфид глутатиона совместно с глутатион дисульфид S-оксидом стабилизирует процесс поступления кальция в клетку из среды, что выражается в подавлении действия на этот процесс ингибитора кальциевых каналов - нифедипина. Дитиотреитол отменял стабилизирующее влияние дисульфида глутатиона совместно с глутатион дисульфид S-оксидом на работу кальциевых каналов.

Таким образом, глутатион дисульфид S-оксид способен усиливать действие одних соединений на клетки, в поставленном эксперименте таковым был дисульфид глутатиона, по отношению к которому глутатион дисульфид S-оксида выступал в качестве синергиста. Глутатион дисульфид S-оксид в сочетании с дисульфидом глутатиона снижать или подавлять влияние других соединений (в поставленном эксперименте - нифедипин), по отношению к которому композиция выступает в качестве антагониста и средства устраняющего токсичность нифедипина.

Результаты приведенных примеров показывают, что дисульфид глутатиона в сочетании с глутатион дисульфид S-оксидом проявляет высокую биологическую активность, что выражается в повышении мобилизующей активности кальция на 30-50%. Учитывая способность дисульфида глутатиона модулировать активность поверхностно-клеточных рецепторов и ионных каналов указывает, оказывать влияние на внеклеточные и внутриклеточные рецепторы, белки транспортеры цитоплазматической и внутриклеточных мембран, внеклеточные регуляторные и транспортные молекулы пептидной природы, белки цитоскелета, аутоиммунные реакции; связывание и распознавание антигена, процессы экзо- и эндоцитоза, хемотаксиса, хемокинеза, цитокинеза; межклеточные, матрикс клеточные и гуморально-клеточные взаимодействия можно полагать, что дисульфид S-оксид будет выступать в качестве синергиста в этих воздействиях дисульфида глутатиона, что может быть использовано в создании новых лекарственных средств, возможностью использования в более низких дозах без потери терапевтической эффективности, но и снижением спектра дозозависимых токсических и побочных эффектов.

Пример 12. Влияние композиции, полученной по примеру 5, на скорость образования дисульфидной связи.

Образец весом 1 г, полученный по примеру 5 (содержание глутатион дисульфид S-оксида - 5%), растворяют в воде (9 мл). К полученному раствору при перемешивании добавляют 1 мл раствора натриевой соли L-глутатиона восстановленного (2,5 мг/мл). Реакционную массу перемешивают 5 мин и анализируют ВЭЖХ. В полученном растворе глутатион дисульфид S-оксид не обнаружен.

Пример 13. Влияние композиции, полученной по примеру 6, включающей глутатион дисульфид S-оксид с дисульфидом глутатиона и металлом - соединением платины - цисплатин Pt-S на экспрессию ферментов второй фазы детоксикации ксенобиотиков.

В качестве исследуемых соединений используют

- 1 - глутатион дисульфид S-оксид (соединение, полученное в примере 1);
- 2 - дисульфид глутатиона (соединение, полученное в примере 2);
- 3 - композиция глутатион дисульфид S-оксид с дисульфидом глутатиона (композиция, полученная в примере 5);
- 4 - композиция глутатион дисульфид S-оксида с дисульфидом глутатиона и металлом - соединением платины - цисплатин Pt-S (композиция, полученная в примере 6).

Исследование проводят на белых рандомбредных крысах-самцах массой 140-160 г, из питомника РАМН "Рапполово", гепатотоксическое действие у которых вызывалось ежедневным, в течение 10 суток, введением циклофосфана (ЦФ) в дозе 20 мг/кг подкожно в физиологическом растворе.

Было сформировано 6 групп экспериментальных животных.

№ 1 - интактные животные, получавшие инъекции растворителя изучаемых соединений (физиологический раствор)(контроль растворителя);

№ 2 - животные, получившие ЦФ, которым в дальнейшем в качестве лечебного средства вводили физиологический раствор (контроль).

Опытные группы.

№ 3 - животные, получившие исследуемое соединение 1 в физиологическом растворе внутривенно в дозе 10 мг/кг в течение 10 дней через 30 мин после введения токсиканта ЦФ.

№ 4 - животные, получившие исследуемое соединение 2 в физиологическом растворе внутривенно в дозе 0.1 мг/кг в течение 10 дней через 30 мин после введения токсиканта ЦФ.

№ 5 - животные, получившие исследуемую композицию 3 в физиологическом растворе внутривенно в дозе 10 мг/кг в течение 10 дней через 30 мин после введения токсиканта ЦФ.

№ 6 - животные, получившие исследуемую композицию 4 в физиологическом растворе внутривенно в дозе 10 мг/кг в течение 10 дней через 30 мин после введения токсиканта ЦФ.

Исследовались ферменты второй фазы детоксикации ксенобиотиков в цитозольной фракции клеток печени: глутатион-S-трансфераза (КФ 2.5.1.18), глутатионпероксидазы (КФ 1.11.1.9), глутатионредуктаза (КФ 1.6.4.2) глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (КФ 1.1.1.49).

Результаты исследования.

Результаты изучения комплекса молекулярных реакций, обеспечивающих толерантность к действию токсических веществ, свидетельствуют о способности сульфона (1), дисульфида глутатиона (2), композиций с их использованием (3 и 4) индуцировать активность ферментов второй фазы детоксикации ксенобиотиков -глутатионредуктазы (КФ 1.6.4.2), глутатионпероксидазы (КФ 1.11.1.9), глутатион-S-трансферазы (КФ 2.5.1.18) а также сопряженного с ними обмена восстановленного глутатиона (табл. 6).

Таблица 6. Изменение активности ферментов второй фазы детоксикации ксенобиотиков в клетках печени белых беспородных крыс при повторном введении циклофосфана в дозе 20 мг/кг в течение 10 суток

Группа исследования	Значения анализируемого показателя				
	GR	GP	GST	G-6-PDG	GSH
Контроль	371,3 ± 15,8	71,2 ± 0,4	2 281 ± 187	181,6 ± 12,9	23,68 ± 0,62
Без коррекции	95,3 ± 11,7*	13,8 ± 0,2	1727 ± 86*	86,2 ± 7,7*	9,61 ± 0,02*
№1 (GS(O)SG-соединение по примеру 1)	117,8 ± 12,6**	27,9 ± 2,2**	1857 ± 120**	98,1 ± 13,3**	11,21 ± 0,56**
№2 – (GSSG -соединение по примеру 2)	125,6 ± 11,2**	24,5 ± 3,1**	1794 ± 165**	96,9 ± 18,7**	12,93 ± 1,15**
№3 (GSSG + GS(O)SG - композиция по примеру 5)	237,4 ± 23,1**	48,3 ± 5,9**	2117 ± 223**	133,1 ± 21,2**	17,87 ± 2,12**
№4- (GSSG + GS(O)SG +	394,7 ± 37,4**	83,9 ± 7,1**	2310 ± 343**	189,7 ± 29,3**	36,12 ± 5,07**
Pt-S- композиция по примеру 6)					

(Активность ферментов в мкмоль/(минт белка, восстановленного глутатиона- мкмоль/г белка) при действии исследуемых веществ: 1 - сульфид; 2 - дисульфид глутатиона; 3 - композиция сульфона с дисульфидом глутатиона (композиция, полученная в примере 5); 4 - композиция сульфона с дисульфидом глутатиона и металлом - соединение платины - цисплатин Pt-S (композиция, полученная в примере 6).

* - достоверность отличия $p < 0,05$ по сравнению с группой контроля;

** - достоверность отличия $p < 0,05$ по сравнению с группой отравленных животных без коррекции;

GR - глутатионредуктаза (КФ 1.6.4.2);

GP - глутатионпероксидаза (КФ 1.11.1.9);
 GST- глутатион-S-трансфераза (КФ 2.5.1.18);
 G6PDG- глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (КФ 1.1.1.49);
 GSH-восстановленный глутатион.

Введение в композицию соединения металла, в частности соединения платины Pt-S, повышало способность композиции дисульфида глутатиона и сульфона индуцировать активность ферментов второй фазы детоксикации ксенобиотиков, увеличивали интенсивность обмена ключевого, сопряженного с ними метаболита восстановленного глутатиона.

Таким образом, соединение металла, в частности соединения платины Pt, обладающей способностью индуцировать активность ферментов второй фазы детоксикации ксенобиотиков, усиливают ее токсикомодифицирующее и, соответственно, цитопротекторное действие за счет индукции ферментов второй фазы детоксикации ксенобиотиков композиции сульфона и дисульфида глутатиона.

Пример 14. Влияние глутатион дисульфид S-оксида и композиций с его участием на противовирусную эффективность интерферона α .

Изучение влияния глутатион дисульфид S-оксида и композиций с его участием (примеры 1, 2, 5, 6) на противовирусную активность интерферона проводят на культуре инфицированных клеток.

Метод оценки противовирусной активности интерферона основан на определении его минимального количества, защищающего клетки линии Л-68 от цитопатического действия вируса. Композиции вводят в среду инкубации клеток до концентрации 0,0015 мкмоль/мл, 0,015 мкмоль/мл и 0,15 мкмоль/мл перед внесением интерферона, совместно с интерфероном, после внесения интерферона через 10, 30 и 60 мин. Титр интерферона в экспериментах составил 4×10^{-4} , 8×10^{-4} , $1,6 \times 10^{-5}$, $3,2 \times 10^{-5}$, $6,4 \times 10^{-5}$, $1,28 \times 10^{-6}$, $2,56 \times 10^{-6}$, $5,12 \times 10^{-6}$ Ед/мл. Противовирусную активность препаратов оценивали по способности живых клеток поглощать кристаллический фиолетовый. Количество поглощенного кристаллического фиолетового определялось фотометрически при длине волны 595 нм, после выделения фракции живых клеток и экстракции красителя метанолом. Количество поглощенного красителя пропорциональное количеству живых клеток выражалось в единицах оптической плотности.

Подготовка клеточной линии Л-68 для эксперимента.

Клеточная линия Л-68 является штаммом диплоидных клеток легкого эмбриона человека, полученного в Московском НИИ вирусных препаратов АМН РФ из клеток легкого эмбриона человека 11 недель, абортированного у женщины 28 лет, у которой онкологические, венерические заболевания, гепатит, туберкулез, генетические и врожденные аномалии отсутствовали.

Посевной банк штамма диплоидных клеток Л-68 аттестован для приготовления иммунобиологических препаратов в МНИИ ВП АМН РФ совместно с ГИСК им. Л.А. Тарасевича МЗ РФ.

Клетки линии Л-68 культивируют при 37°C в полной ростовой среде I. Культивирование проводят в пластиковых флаконах вместимостью 250 мл (типа "Costar"). Клетки распластаются на дне флакона, формируя монослой с типичной для диплоидных фибропластов морфологией. Распластаные клетки переводят в суспензию специальной средой, состоящей из равных частей 0,02% раствора Версена и 0,25% раствора трипсина. Для этого из флакона со сформировавшимся монослоем клеток сливают полную ростовую среду, дважды промывают монослой специальной средой (раствор Версена с трипсином) и инкубируют при 37°C в течение 5 мин. За это время происходит отлипание монослоя фибробластов от пластика. Отлипшие клетки разводят полной ростовой средой, разбивая конгломераты клеток многократным пипетированием. Клетки переносят в стерильную пробирку для центрифугирования, центрифугируют при 1200 об/мин в течение 10 мин. Образовавшийся супернатант сливают и клетки переводят в полную ростовую среду. Далее клетки подсчитывают в камере Горяева и используют в опытах.

Для определения активности и токсичности могут использоваться культуры клеток, прошедшие не менее 20 и не более 30 пассажей.

Подготовка вируса везикулярного стоматита.

Для эксперимента используют лиофильно высушенный вирус везикулярного стоматита (ВВС), стерильно расфасованный в стеклянные запаянные ампулы.

Наращивание вируса проводят на линии клеток L-929. Для этого во флакон со сформировавшимся монослоем клеток в полной культуральной среде добавляют заранее оттитрованную дозу вируса (инфекционный титр ВВС - максимальное разведение вируса, при котором в течение 1 суток при 37°C происходит полное разрушение монослоя клеток). Содержимое во флаконе культивируют в течение 1 суток при 37°C, после чего культуральную среду сливают в стерильные пробирки вместимостью 50 мл и центрифугируют при 2000 об/мин. Далее полученный супернатант, содержащий вирус везикулярного стоматита, разливают в стерильных условиях по 1 мл в ампулы и лиофильно высушивают.

Определение инфекционного титра вируса.

В 96-луночный планшет (типа "Costar") вносят приготовленные клетки линии Л-68, переведенные в суспензию в полной культуральной среде 1 в концентрации 5×10^4 клеток на лунку в объеме 0,2 мл. После этого планшет инкубируют в течение 1 суток при температуре 37°C в CO₂-инкубаторе в атмосфере 5% CO₂. За это время клетки распластаются в лунках, образуя сплошной монослой. Через 1 сутки культу-

ральную среду декантируют в стерильных условиях и в лунки планшета вносят заранее приготовленные двукратные разведения вируса в четырех параллелях. Вирус ВВС вносится в полной культуральной среде в объеме 0,2 мл. После этого планшет инкубируют в условиях, описанных выше. По окончании инкубации (через 1 сутки) культуральную среду декантируют и в лунки вносят по 0,05 мл 0,2% раствора кристаллического фиолетового на 20% метаноле. Через 10 мин краску удаляют, планшет промывают под струей воды и высушивают. Далее в планшет добавляют 0,1 мл лизирующего буфера для элюции красителя в раствор. Интенсивность окрашивания учитывают на ридере для микропланшетов при длине волны 595 нм.

За инфекционный титр вируса принимают максимальное разведение вируса, при котором в течение 1 суток в данных условиях происходит полное разрушение монослоя клеток в лунках. Оптическая плотность раствора в данных лунках будет минимальной и близкой к фоновому значению.

Определение активности.

В полной ростовой среде готовят двукратные разведения (выше и ниже предполагаемого титра) стандартного образца активности (42-28-119-96П, ГИСК им. Л.А. Тарасевича), активность которого выражена в международных единицах МЕ. Разведения стандарта проводят в 96-луночном планшете (типа "Costar") в объеме 0,1 мл. На каждое разведение используют не менее 4 лунок. Один ряд планшета оставляют для контроля культуральной среды (4 лунки) и для контроля дозы вируса ВВС (4 лунки). В эти лунки вносят по 0,1 мл. После разведения стандарта в планшет вносят приготовленные клетки линии L-68, переведенные в суспензию в полной культуральной среде I в концентрации $5 \cdot 10^4$ клеток на лунку в объеме 0,1 мл. После этого через определенные промежутки времени в часть рядов с разведённым стандартом вносят исследуемые фракции:

- 1 - сульфон (соединение, полученное в примере 1);
- 2 - дисульфид глутатиона (соединение, полученное в примере 2);
- 3 - композиция сульфона с дисульфидом глутатиона (композиция, полученная в примере 5);
- 4 - композиция сульфона с дисульфидом глутатиона и металлом - соединением платины - цисплатин

Pt-S (композиция, полученная в примере 6);

в концентрациях 0,0015, 0,015 и 0,15 мкмоль/мл. Далее каждый планшет инкубируют в течение 1 суток при температуре 37°C в CO₂-инкубаторе в атмосфере 5% CO₂. За это время клетки расплываются в лунках, образуя сплошной монослой. Через 1 сутки полную ростовую культуральную среду декантируют в стерильных условиях и в лунки каждого планшета вносят вирус ВВС, инфекционный титр которого был определен заранее. Вирус ВВС вносится в полной ростовой культуральной среде в объеме 0,2 мл. В лунки для контроля среды вносится по 0,2 мл среды того же состава без вируса ВВС. После этого каждый планшет инкубируют в условиях, описанных выше. По окончании инкубации (через 1 сутки) культуральную среду декантируют и в лунки вносят по 0,05 мл 0,2% раствора кристаллического фиолетового на 20% метаноле. Через 10 мин краску удаляют, планшет промывают под струей воды и высушивают. В лунках, где проводился контроль среды, окрашенный монослой должен быть без признаков разрушения. Далее в каждый планшет добавляют 0,1 мл лизирующего буфера для элюции красителя в раствор. Интенсивность окрашивания учитывают на ридере для микропланшетов при длине волны 595 нм.

За титр интерферона принимают величину, обратную разведению препарата, при котором клеточная культура в 50% лунок оказалась полностью защищенной от цитопатического действия вируса.

Результаты эксперимента.

Экспериментально установлено, что предварительная инкубация клеток с каждым исследуемым соединением не сказывалась на противовирусной активности интерферона.

Результаты экспериментов, в которых каждую композицию вводили после интерферона, свидетельствуют о способности практически всех исследуемых веществ повышать эффективность интерферона в случае, если композиция вносилась не ранее, чем через 30 мин после воздействия интерферона на клетки.

Исследуемые вещества в разной степени повышали эффективность при титрах интерферона $6,4 \cdot 10^{-5}$ - $1,28 \cdot 10^{-6}$, что выражалось в большем повышении оптической плотности в опыте, где действие интерферона осуществлялось совместно с тем или иным веществом относительно опыта, где действовал только интерферон.

Для выявления более достоверного значения величины повышения эффективности интерферона той или иной композицией был проведён эксперимент с получением большего числа экспериментальных данных в области разведений интерферона, где отмечается его активность (табл. 7).

Таблица 7. Количественные значения повышения эффективности интерферона (даны в единицах оптической плотности)

Разведение интерферона α	Контроль среды	Стандарт интерферона α	Стандарт интерферона α + вещество по примеру 1	Стандарт интерферона α + вещество по примеру 2	Стандарт интерферона α + вещество по примеру 5	Стандарт интерферона α + вещество по примеру 6	Количество наблюдений
$0,64 \times 10^{-6}$	$2,703 \pm 0,089^*$	$1,59 \pm 0,131^*$	$1,73 \pm 0,076^*$	$1,79 \pm 0,079^*$	$1,91 \pm 0,096^*$	$2,57 \pm 0,098^*$	n=21
$1,28 \times 10^{-6}$	$2,728 \pm 0,172^*$ *	$0,905 \pm 0,088^*$ *	$1,03 \pm 0,097^*$ *	$1,01 \pm 0,137^*$ *	$1,72 \pm 0,133^*$ *	$2,34 \pm 0,118^*$ *	n=19

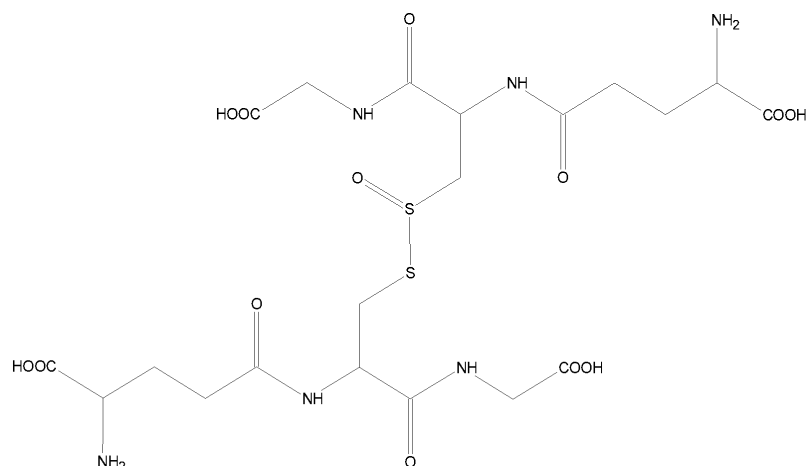
* - $P < 0,1$ ** - $P < 0,05$.

Полученные результаты указывают на то, что все исследуемые композиции повышают противовирусную активность интерферона α в определённой области его концентраций и в случае, если они вводятся после него. Подобный характер эффекта композиции обусловлен тем, что при его предварительном или совместном введении с интерфероном в культуральной среде нет или в относительно недостаточном количестве присутствует окисляющий агент. Сложный состав культуральной среды приводит к тому, что малые количества действующего начала относительно быстро исчезают из культуральной среды во внутриклеточное пространство. Действие интерферона на тропные клетки сопровождается продукцией окисляющих агентов, однако время их наработки в достаточном количестве превышает время нахождения в культуральной среде координационного соединения металла. Предварительное введение интерферона и его действие на тропные клетки способствует продукции этими клетками окисляющего агента, который в последующем используется в каталитическом воздействии на сульфгидрильные группы различных рецепторов, включая рецепторы интерферона, что в итоге способствует и увеличению числа клеток, вступивших во взаимодействие с интерфероном, а это в свою очередь предопределяет усиление его противовирусного эффекта.

Таким образом, все исследуемые вещества способны повышать эффективность действия интерферона α , однако координационное соединение металла в составе композиции существенно потенцирует его активность, увеличивая число клеток способных к рецептор опосредованному взаимодействию с интерфероном α . При этом следует отметить, что потенцирование противовирусного эффекта интерферона α веществами, полученными по примерам 1 и 2, практически совпадает и составляет 9-10% при различных разведениях. Совместное воздействие веществ по примеру 1 и 2 в составе композиции по примеру 5 позволяет получить дополнительное усиление противовирусной эффекта интерферона α на меньших разведениях (до 18%) и практически двукратное усиление на больших разведениях интерферона α , т.е. при меньших дозах интерферона α . Схожая закономерность выявлена в случае использования композиции по примеру 6: противовирусный эффект интерферона α носил более выраженный характер, в частности возрастал на 50% при малых разведениях и в 2.5 раза при более глубоких. Противовирусное действие интерферона α в терапевтических дозах сопряжено с развитием дозозависимых побочных и токсических эффектов у 72% пациентов получающих препараты интерферона α . Среди негативных проявлений проводимой терапии наиболее часто встречается гриппоподобный синдром, симптомы гастроинтестинальных и психогенных нарушений, признаки миелосупрессии, расстройства функций щитовидной и паращитовидной желез, формирование пула аутоантител к эндогенному интерферону α пациента. Возможность использования интерферона α в более меньших терапевтических дозах в сочетании с композицией по примеру 5 или 6 позволяет существенно сократить спектр побочных и токсических дозозависимых реакций интерферона α .

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция для устранения дозозависимой токсичности и повышения терапевтической активности фармакологически активного соединения в терапии инфекционных и неинфекционных заболеваний, включающая дисульфид глутатиона или его фармацевтически приемлемую органическую или неорганическую соль и глутатион дисульфид S-оксида следующей структуры:



или его фармацевтически приемлемую органическую или неорганическую соль, а также содержит d-металл (Me), представленный в виде координационного(ых) соединений, содержащих связь Me-S-глутатион.

2. Композиция по п.1, характеризующаяся тем, что количество глутатион дисульфид S-оксида составляет 0,01-10 мас.% от массы всей композиции.

3. Композиция по п.1, характеризующаяся тем, что металл выбран из платиновой группы.

4. Композиция по п.1, характеризующаяся тем, что металлом является платина.

5. Композиция по п.1, характеризующаяся тем, что количество d-металла в композиции варьируется от 1×10^{-10} до 1×10^{-3} моль на 1 кг композиции.

6. Композиция по п.1, характеризующаяся тем, что количество d-металла в композиции составляет 1×10^{-5} моль на 1 кг композиции.

7. Фармакологическая комбинация для устранения дозозависимой токсичности и повышения терапевтической активности фармакологически активного соединения в терапии инфекционных и неинфекционных заболеваний, включающая в себя композицию по любому из пп.1-6 и фармакологически активное соединение, выбранное из группы антикоагулянта, ингибитора фактора Ха, антимикробного или противовирусного средства, ингибитора кальциевых каналов.

8. Комбинация по п.7, предназначенная для терапии тромбозов, где фармакологически активное соединение представляет собой антикоагулянт, ингибитор фактора Ха - амидина гидрохлорид.

9. Комбинация по п.7, предназначенная для терапии инфекционных заболеваний, вызванных грамотрицательными и грамположительными бактериями, включая *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* и *Listeria monocytogenes* EGD, *Staphylococcus aureus*, MRSA -золотистый стафилококк, устойчивый к метициллину, где фармакологически активное соединение представляет собой антимикробное средство моксифлоксацин.

10. Комбинация по п.7, характеризующаяся тем, что предназначена для терапии вирусных заболеваний, где фармакологически активное соединение представляет собой противовирусное средство широкого спектра противовирусного действия - интерферон α .

11. Комбинация по п.7, характеризующаяся тем, что предназначена для профилактики бешенства, где фармакологически активное соединение представляет собой антигенный материал антирабической вакцины.

12. Лекарственное средство для устранения дозозависимой токсичности и повышения терапевтической активности фармакологически активного соединения в терапии инфекционных и неинфекционных заболеваний, включающее по меньшей мере одну композицию по любому из пп.1-6 в терапевтически эффективном количестве совместно с фармацевтически приемлемыми эксципиентами.

13. Лекарственное средство для устранения дозозависимой токсичности и повышения терапевтической активности фармакологически активного соединения в терапии инфекционных и неинфекционных заболеваний, включающее, по меньшей мере, комбинацию по любому из пп.7-11 в терапевтически эффективном количестве совместно с фармацевтически приемлемыми эксципиентами.

14. Лекарственное средство, характеризующееся тем, что изготовлено для устранения дозозависимой токсичности и повышения терапевтической активности фармакологически активного соединения в терапии инфекционных и неинфекционных заболеваний, по любому из пп.12, 13, характеризующееся тем, что может быть изготовлено в форме для наружного, ингаляционного, энтерального или парентерального введения.

15. Применение фармацевтической композиции по любому из пп.1-6 для устранения дозозависимой токсичности и повышения терапевтической активности фармакологически активного соединения в терапии инфекционных и неинфекционных заболеваний.

16. Применение по п.15, характеризующееся тем, что композиция дополнительно содержит d-

металл (Me), предпочтительно платиновой группы, еще более предпочтительно платину, представленный в виде координационного(ых) соединений, содержащих связь Me-S-глутатион, при этом количество вводимого пациенту координационного соединения d-металла составляет 10^{-3} - 10^{-15} моль/кг массы тела.

17. Применение фармакологической комбинации по любому из пп.7-11 для устранения дозозависимой токсичности и повышения терапевтической активности фармакологически активного соединения в терапии инфекционных и неинфекционных заболеваний.

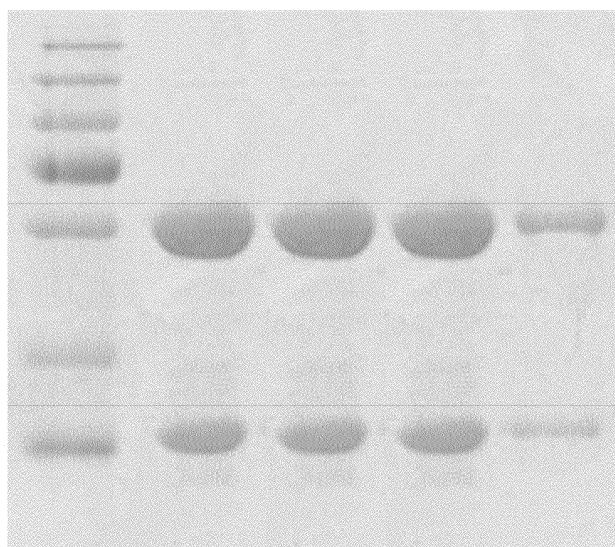
18. Применение по п.17, характеризующееся тем, что фармакологически активное соединение представляет собой антикоагулянт, ингибитор фактора Ха - амидин гидрохлорид для терапии тромбозов.

19. Применение по п.17, характеризующееся тем, что фармакологически активное соединение представляет собой антимикробное средство моксифлоксацин для лечения инфекционных заболеваний, вызванных грамотрицательными и грамположительными бактериями, включая *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* и *Listeria monocytogenes* EGD, *Staphylococcus aureus*, MRSA - золотистый стафилококк, устойчивый к метициллину.

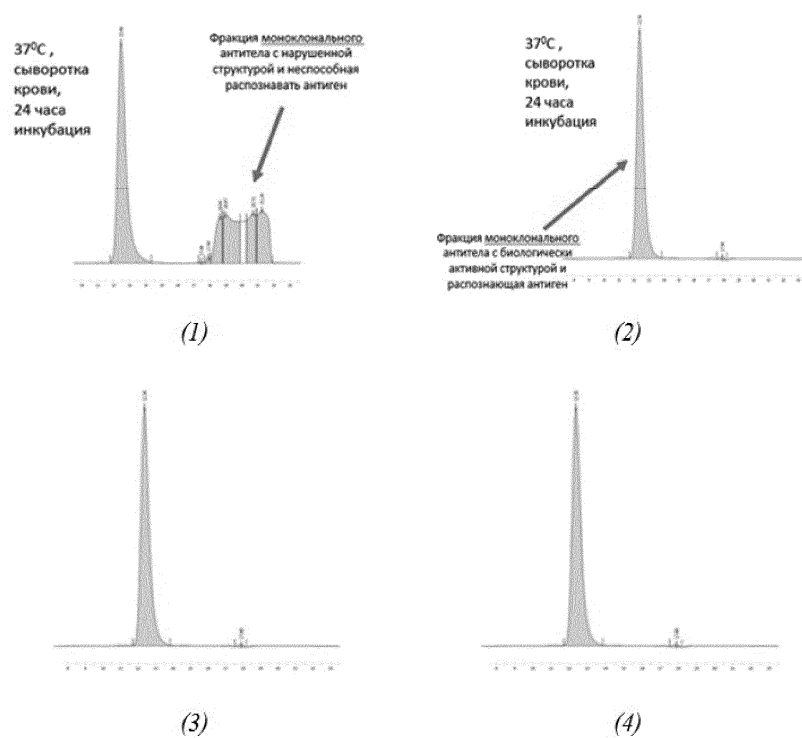
20. Применение по п.17, характеризующееся тем, что фармакологически активное соединение представляет собой противовирусное средство интерферон α для терапии вирусных заболеваний.

21. Применение по п.17, характеризующееся тем, что фармакологически активное соединение представляет собой антигенный материал антирабической вакцины для профилактики бешенства.

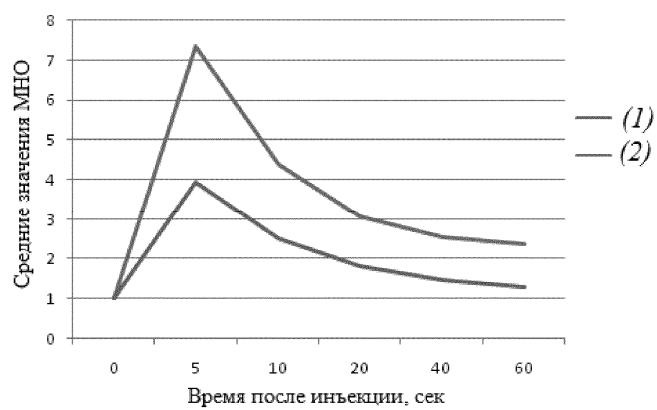
22. Применение по п.17, характеризующееся тем, что введение указанной фармакологической комбинации проводят ингаляционно, энтерально или парентерально.



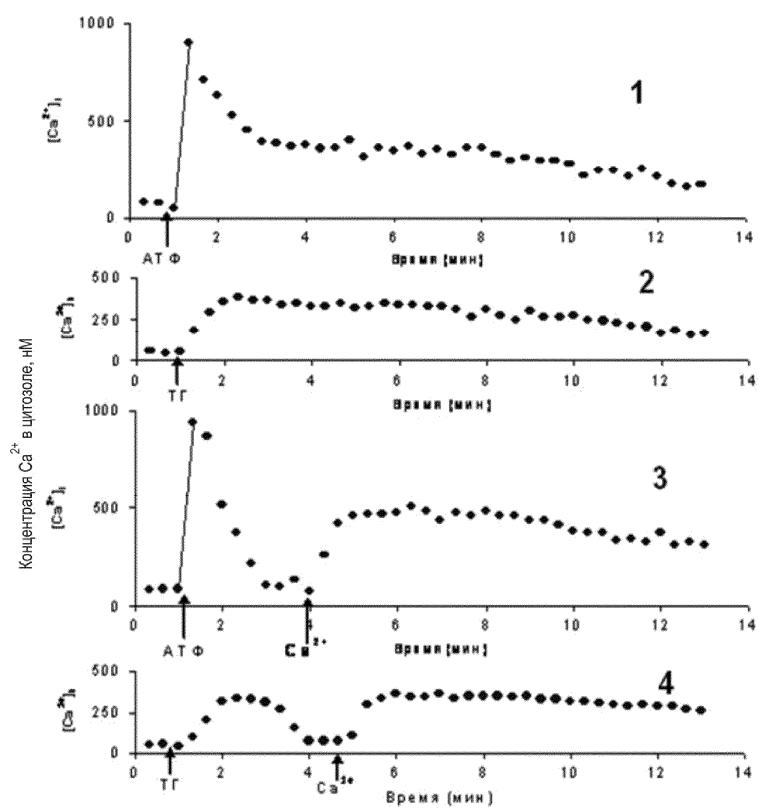
Дорожка 1 Дорожка 2 Дорожка 3 Дорожка 4 Дорожка 5
Фиг. 1



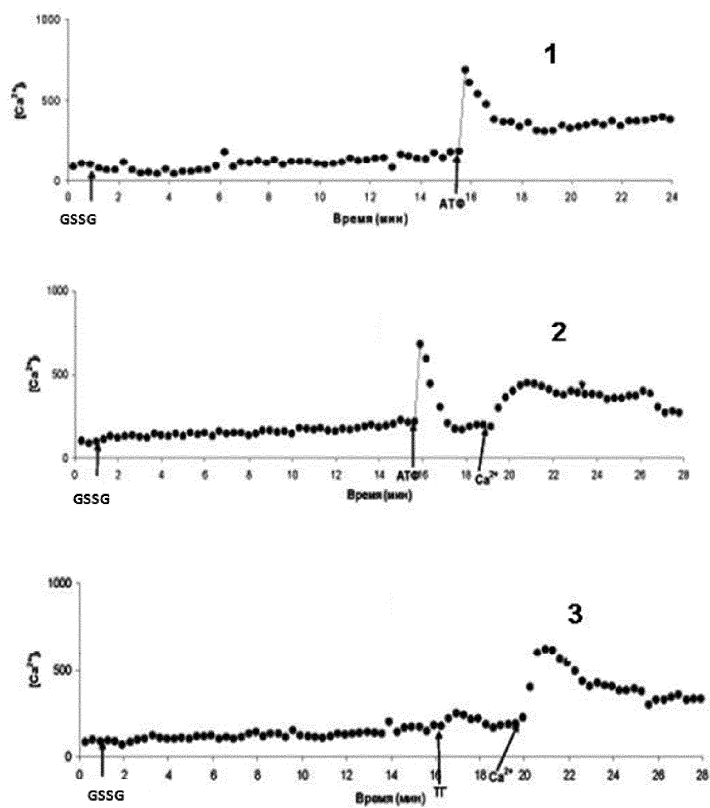
Фиг. 2



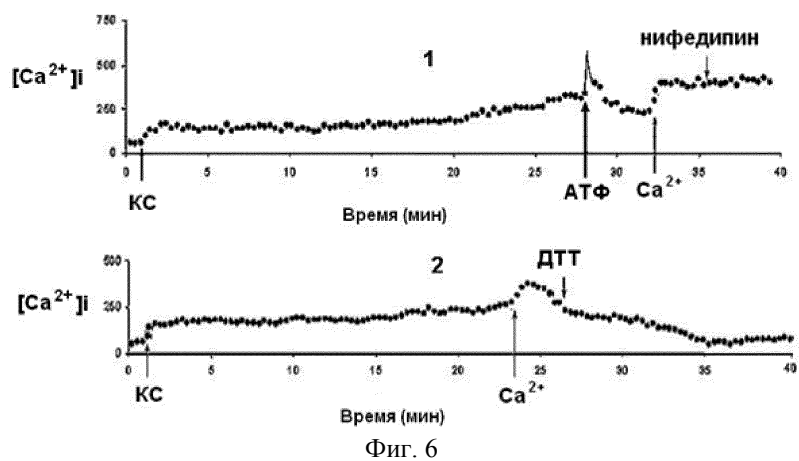
Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2