

ДОКЛИНИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ТОКСИЧНОСТИ ПЕРОРАЛЬНОЙ ФОРМЫ ПЕГИЛИРОВАННОГО ИНТЕРФЕРОНА α -2b ПРИ ЕГО ДЛИТЕЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ

Алексей Александрович ЧУРИН¹, Евгений Юрьевич ШЕРСТОБОЕВ¹,
Дмитрий Николаевич КИНШТ^{2,3}, Татьяна Сергеевна ТАРТЫНОВА²,
Павел Геннадьевич МАДОНОВ^{2,3}

¹ *НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга,
Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН
634028, г. Томск, просп. Ленина, 3*

² *Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России
630091, г. Новосибирск, Красный просп., 52*

³ *АО «Сибирский центр фармакологии и биотехнологии»
630056, г. Новосибирск, ул. Софийская, 20*

Цель работы – изучение хронической токсичности готовой лекарственной формы пегилированного интерферона α -2b для перорального применения, полученного с помощью технологии электронно-лучевого синтеза. **Материал и методы.** Препарат вводился перорально крысам и кроликам в расчетных терапевтических дозах и дозах, их превышающих. Изучалось влияние препарата на общее состояние и массу тела, гематологические показатели, миелограмму, биохимические параметры крови, выделительную и сердечно-сосудистую системы, ЦНС, проводилось патоморфологическое исследование. **Результаты и их обсуждение.** Препарат не обладает токсическим и местно-раздражающим действием при курсовом пероральном введении.

Ключевые слова: интерферон α -2b, пегилирование, электронно-лучевая иммобилизация, хроническая токсичность, доклинические исследования.

Несмотря на успехи в создании противовирусных препаратов прямого действия, в современной медицине сохраняется необходимость использования интерферонов (ИФН). Парентеральное введение не во всех случаях обеспечивает достижение их высокой концентрации в поврежденных органах и создает определенные неудобства для пациентов. Иммобилизация интерферонов на биологически инертном полимере (например, полиэтиленгликоле (ПЭГ)) с помощью ионизирующего излучения при одновременном обеспечении пероральной биодоступности препарата и сохранении фармакодинамических свойств исходных белковых молекул открывает новые возможности в терапии вирусных заболеваний [1, 2, 6]. В то же

время ионизирующее излучение может в значительной степени изменять структуру белков [8], что требует тщательного изучения фармакологических свойств полученных веществ. Изучение токсикологической безопасности на животных является неотъемлемой частью доклинических исследований, направленных на получение доказательств безопасности лекарственных средств [4].

Целью данной работы является характеристика степени повреждающего действия готовой лекарственной формы (ГЛФ) для перорального применения ПЭГ-ИФН α -2b, полученного с помощью технологии электронно-лучевого синтеза, при его длительном введении крысам и кроликам.

Чурин А.А. – д.м.н., зав. отделом лекарственной токсикологии

Шерстобоев Е.Ю. – д.м.н., проф., зав. отделом иммунофармакологии

Киншт Д.Н. – к.м.н., доцент кафедры фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины, e-mail: kinsht@scpb.ru

Тартынова Т.С. – клинический ординатор кафедры фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины

Мадонов П.Г. – д.м.н., проф., зав. кафедрой фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Действующее вещество ПЭГ-ИФН α -2b получали с помощью облучения пучком электронов в дозе 1,5 Мрад предварительно замороженной при -70 °С смеси рекомбинантного ИФН α -2b с 5%-м раствором ПЭГ-1500. Состав ГЛФ (на 1 капсулу): ПЭГ-ИФН α -2b $1,2 \times 10^6$ МЕ, вспомогательные вещества – мальтодекстрин 0,3–0,36 г, декстран 0,03592–0,0898 г, полиэтиленгликоль 0,004–0,01 г, ЭДТА 0,08–0,2 мг. Изучаемое лекарственное средство защищено патентом РФ [3].

Исследование хронической токсичности проводилось в соответствии с «Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [4]. В эксперименте использовали аутбредные животные: 80 крыс CD, по 10 самцов и 10 самок в каждой группе (контрольная группа и три группы наблюдения), возраст 2,5 мес.; 12 кроликов породы шиншилла, по 2 самца и 2 самки в каждой группе (контрольная и две группы наблюдения), масса 2600–3100 г, возраст 2,5–3 мес. Содержание животных осуществлялось в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных (Страсбург, 1986), ГОСТ Р 53434–2009, со статьей 11 Федерального закона от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств».

Для эксперимента были использованы общепринятые терапевтические дозы для человека в пересчете на крыс и кроликов [5], а также дозы, превышающие их в 5 и 10 раз для крыс (соответственно 85 000, 425 000 и 850 000 МЕ/кг) и в 5 раз для кроликов (46 500 и 232 500 МЕ/кг). ГЛФ вводили внутривентрикулярно в растворе фосфатно-солевого буфера в течение 28 дней, контрольная группа получала фосфатно-солевой буфер. Крысы наблюдались в течение 14 дней после окончания курса введения ГЛФ.

Наблюдение общего состояния здоровья, выявление признаков токсичности, тяжелого состояния, смертности проводились один-два раза в день во всех группах в течение всего периода наблюдения. Осмотр осуществлялся в клетке, на руках, а в случае необходимости – на открытой поверхности. Масса тела регистрировалась во всех группах перед первым введением, еженедельно в течение всего периода наблюдения. Потребление корма регистрировалось еженедельно, визуально. Температуру тела измеряли ректально с помощью медицинского электротермометра ТПЭМ-1, у крыс по окончании введения ГЛФ и по окончании срока наблюдения, у кроликов – еженедельно.

Лабораторные исследования крови и костного мозга проводились у всех животных на 28 день эксперимента, у крыс также через 14 дней после окончания курса введения ГЛФ. Гематологические показатели (количество эритроцитов, ретикулоцитов, лейкоцитов, тромбоцитов, уровень гемоглобина, гематокрит, показатели лейкограммы, СОЭ) определялись с помощью гематологического анализатора Mythic 18 (Orphée, Швейцария). Состояние костно-мозгового кровотока у крыс оценивали путем подсчета общего количества миелокариоцитов на бедренную кость и миелограмм на мазках, приготовленных из гомогената фрагмента миелоидной ткани, взятой из сегмента грудины, и аутологичной сыворотки (1:1), комбинированно окрашенных фиксатором-красителем Май-Грюнвальда и азуром II и эозином по Нохту. У кроликов костный мозг получали из сегмента грудины.

Биохимические показатели сыворотки крови (активность АсАТ, АлАТ, щелочной фосфатазы; содержание глюкозы, общего белка, мочевины, креатинина, общего холестерина, билирубина, натрия, калия, хлоридов) определяли на полуавтоматических анализаторах (PZ S.A. Coema, Польша; ERBA Diagnostics Mannheim GmbH, Германия) с использованием стандартных наборов для биохимического анализа.

Почечный метаболизм у крыс изучали на 28 день эксперимента и через 14 дней после окончания курса введения ГЛФ. Определяли суточный диурез, удельную плотность и pH мочи, наличие глюкозы, билирубина, кетонов, скрытой крови, белка, уробилиногена, нитритов и лейкоцитов. Исследование проводилось на автоматическом анализаторе мочи CLINITEK-50 на полосках URS-10 (Siemens, США). Сбор мочи проводили в индивидуальных обменных клетках, в которых крысы находились в течение суток после предварительной адаптации и водной нагрузки. Дистиллированную воду вводили животным внутривентрикулярно с помощью зонда из расчета 2 % от массы тела.

Для оценки влияния препарата на ЦНС изучалось ориентировочно-исследовательское поведение крыс в «открытом поле» (самцы и самки раздельно) на 28 день эксперимента и через 14 дней после окончания курса введения ГЛФ. Экспериментальная установка «открытое поле» представляет собой камеру размером $100 \times 100 \times 60$ см с квадратным полом и стенками белого цвета. Пол камеры разделен на 16 квадратов, в каждом квадрате – круглое отверстие диаметром 6 см. Сверху камера освещена электрической лампой накаливания мощностью 100 Вт, расположенной на высоте 1 м от пола камеры. Крыса помеща-

лась в один из углов камеры и в течение 5 мин регистрировалось количество пересеченных ею горизонтальных квадратов (горизонтальная активность), количество заглядываний в отверстия (норковый рефлекс), вставаний на задние лапы (вертикальная активность), умывание (груминг), актов дефекаций по количеству фекальных шариков. Затем все данные суммировались и определялась общая двигательная активность.

На 28 день эксперимента и через 14 дней после окончания курса введения ГЛФ у крыс проводили исследование сердечно-сосудистой системы. ЭКГ регистрировали во втором стандартном отведении при усилении $1 \text{ mv} = 20 \text{ мм}$ и скорости записи 50 мм/с на электрокардиографе Поли-Спектр-8В (программа анализа «Поли-Спектр») под эфирным наркозом в положении животных спиной вверх. По снятой электрокардиограмме рассчитывали частоту сердечных сокращений, измеряли амплитуду зубцов Р, R, Т и длительность интервалов PQ, QT, QRS. Показатели опытных групп сравнивались с соответствующими показателями для контрольных групп животных, для самок и самцов раздельно [7].

Эвтаназия осуществлялась ингаляцией CO_2 , кроликам – после 28 дней введения исследуемого препарата, крысам – через 28 дней введения и через 2 недели после отмены. При некропсии исследовали внешнее состояние тела животных, полость черепа, грудную, брюшную и тазовую полости с находящимися в них органами и тканями, внутренние поверхности и проходы, шею с органами и тканями, скелетно-мышечную систему и каркас. Все отклонения от нормы документировались. Определялась масса головного мозга, тимуса, сердца, легких, печени, надпочечников, почек, селезенки, семенников/яичников. Коллекция органов производилась сразу после некропсии животных. Фиксированные ткани обезвоживали, пропитывали парафином и заливали в парафиновые блоки; с помощью микротомы изготавливали тонкие серийные (не более 5 мкм) срезы и окрашивали гематоксилином и эозином. Проводили гистологическое исследование срезов с помощью световой микроскопии с оценкой и описанием состояния исследуемых тканей.

Для количественных данных применена описательная статистика: подсчитаны среднее значение и стандартная ошибка среднего, которые представлены в итоговых таблицах. Для определения достоверности межгрупповых различий данные проанализированы с применением параметрических или непараметрических критериев в зависимости от типа распределения количественных данных. Нормальность распределения вариантов в группе определялась тестом Шапиро

ро – Уилка при 5%-м уровне значимости, различия между группами определяли с помощью t -критерия Стьюдента или критерия Манна – Уитни и считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Анализ выполнен для каждого пола отдельно. Различия определялись при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование хронической токсичности на крысах. Во время введения препарата состояние крыс было удовлетворительным, гибели животных не наблюдалось. Все крысы равномерно прибавляли в массу, по окончании введения и через две недели после отмены препарата масса тела и ее прирост во всех экспериментальных группах не отличались от контроля. При измерении температуры тела крыс по окончании введения и через 2 недели после отмены приема ГЛФ ПЭГ-ИФН α -2b не выявлено патологических изменений и статистически значимых различий с контрольной группой. Анализ лабораторных показателей крови и результатов исследования костного мозга через 28 дней введения ГЛФ ПЭГ-ИФН α -2b и через 2 недели после отмены препарата не выявил изменений в экспериментальных группах по сравнению с контролем.

Результаты экспериментов показали, что введение ГЛФ ПЭГ-ИФН α -2b в течение 28 дней не приводит к изменению биохимических показателей крови крыс, а также показателей, отражающих функциональное состояние почек. Так, суточный объем мочи, рН, удельная плотность не различались в опытных и контрольной группах. Глюкоза, белок, билирубин, уробилиноген, нитриты, кетоны, лейкоциты скрытой крови, определяемые полуколичественным методом, не были выявлены в моче у животных во всех группах по окончании введения лекарственного средства и через 14 дней после окончания курса введения.

Курс введения ГЛФ ПЭГ-ИФН α -2b не влиял на показатели ориентировочно-исследовательского поведения у крыс в тесте «открытое поле», о чем свидетельствует отсутствие статистически значимых различий между показателями опытных и контрольных групп животных. У крыс экспериментальных групп через 28 дней введения исследуемого препарата и через 14 дней после окончания курса не выявлено нарушений сердечного ритма и проводимости. Длительность интервалов и амплитуда зубцов электрокардиограммы также статистически достоверно не отличались от соответствующих значений у животных контрольной группы и не выходили за пределы физиологических норм, принятых для данного вида животных. При макроскопическом исследовании

довании на вскрытии у всех крыс, получавших ГЛФ ПЭГ-ИФН α -2b, не обнаружено какой-либо патологии внутренних органов и изменений в месте введения. Анализ полученных данных по массе и коэффициенту массы органов не выявил различий между контрольными и экспериментальными животными. Микроскопическое исследование внутренних органов всех крыс показало, что они имели обычное строение и не отличались от контрольных животных. Слизистая оболочка желудка без признаков гиперемии, отека и инфильтрации.

Исследование хронической токсичности на кроликах. Введение ГЛФ ПЭГ-ИФН α -2b кроликам в течение 28 дней внутрижелудочно в исследуемых дозах не вызывало патологических изменений общего состояния. Гибели животных не наблюдалось. При еженедельном взвешивании масса тела и ее прирост у животных опытных и контрольной групп статистически значимо не различались. Измерение температуры тела кроликов не выявило патологических изменений и статистически значимых различий с контрольными животными. Патологических изменений показателей форменных элементов крови, СОЭ и костного мозга не обнаружено. Биохимические показатели сыворотки крови не отличались у кроликов разных групп и не выходили за пределы физиологических норм. Макроскопическое исследование при вскрытии всех животных не выявило какой-либо патологии внутренних органов. Анализ полученных данных показывает отсутствие разницы в массе и коэффициенте массы внутренних органов кроликов контрольной и экспериментальных групп. Микроскопическое исследование внутренних органов экспериментальных животных показало, что практически все они имели обычное строение и не отличались от контроля. Слизистая оболочка желудка была без признаков гиперемии, отека и инфильтрации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведено изучение хронической токсичности готовой лекарственной формы ПЭГ-ИФН α -2b для перорального применения на крысах и кроликах. Исследуемый препарат вводился крысам в терапевтической дозе и в дозах, превышающих терапевтическую в 5 и 10 раз (соответственно 85 000, 425 000, 850 000 МЕ/кг), кроликам – в терапевтической дозе и дозе, превышающей терапевтическую в 5 раз (соответственно 46 500 и 232 500 МЕ/кг). Проведенные эксперименты показали, что препарат в исследуемых дозах не оказывает влияния на общее состояние, массу тела и температуру тела крыс и кроликов, показатели

форменных элементов крови и СОЭ, показатели миелограммы, биохимические параметры сыворотки крови. При исследовании функции почек, ЦНС и сердечно-сосудистой системы у крыс не обнаружено патологических изменений после 28-дневного курса введения препарата и 14 дней после отмены курса.

Макро- и микроскопическое исследование внутренних органов не выявило каких-либо патологических изменений по сравнению с контролем у крыс и кроликов. Исследование слизистой оболочки желудка экспериментальных животных показало, что при внутрижелудочном введении ГЛФ ПЭГ-ИФН α -2b не обладает местно-раздражающим действием.

Проведенные исследования позволяют утверждать, что ГЛФ иммобилизованного с помощью электронно-лучевой технологии ИФН α -2b при пероральном приеме в течение 28 дней не оказывает токсического влияния на исследованные органы и системы экспериментальных животных в выбранных условиях экспериментального исследования. Отсутствие токсичности у ГЛФ ПЭГ-ИФН α -2b при сохранении иммунотропного эффекта, противовирусного действия, а также пероральной биодоступности дает возможность рассматривать разработанное лекарственное средство как перспективный иммунотропный и противовирусный препарат для перорального приема.

БЛАГОДАРНОСТИ

Данная работа проведена в рамках исполнения Государственного контракта от 14 мая 2012 г. № 16.N08.12.1017, ФЦП «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» (шифр темы проекта «2012-2.5-16-N08-0001-001»).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кинит Д.Н., Мадонов П.Г., Святченко В.А., Терновой В.А. Экспериментальное обоснование применения пероральной формы пегилированного интерферона α 2-b для терапии энтеровирусной инфекции // Сиб. науч. мед. журн. 2017. 37. (3). 11–16.
2. Мадонов П.Г., Еришов К.И., Дубровин А.В., Заполоцкий Е.Н., Мирошников П.Н., Шилова М.А., Кинит Д.Н. Электронно-лучевая модификация препаратов белковой природы для улучшения их фармакологических свойств // Мед. и образ. в Сибири. 2013. (4). Режим доступа: http://ngmu.ru/cozo/mos/article/text_full.php?id=1115 (дата обращения: 13.02.2017).

3. Пат. № 2554761 РФ. Противоэнтеровирусное и иммуностимулирующее средство / А.В. Артамонов, А.А. Бекарев, Н.В. Балданов, Д.Н. Киншт, П.Г. Мадонов, П.Н. Мирошников, А.М. Дыгай, М.Г. Данилец, А.А. Лигачева, Н.В. Масная, Е.С. Трофимова, Е.Ю. Шерстобоев, О.Г. Шитикова; Опубл. 13.05.2014.

4. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / ред. А.Н. Миронов. М.: Гриф и К, 2012. 944 с.

5. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / ред. Р.У. Хабриев. М.: Медицина, 2005. 832 с.

6. Шерстобоев Е.Ю., Шитикова О.Г., Масная Н.В., Данилец М.Г., Трофимова Е.С., Лигачева А.А., Мадонов П.Г., Киншт Д.Н., Ершов К.И., Шилова М.А. Иммуотропные свойства иммобилизованного интерферона α -2b // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2016. 161. (5). 637–641.

7. Martin M. Small animal ECGs: an introductory guide, 2nd Edition. Wiley-Blackwell, 2013. 136 p.

8. Wang Y.S., Youngster S., Grace M., Bausch J., Bordens R., Wyss D.F. Structural and biological characterization of pegylated recombinant interferon alpha-2b and its therapeutic implications // Adv. Drug Deliv. Rev. 2002. 54. (4). 547–570.

PRECLINICAL STUDY OF THE TOXICITY OF THE ORAL FORM OF PEGYLATED INTERFERON α -2b UNDER ITS LONG-TERM USE

Alexey Alexandrovich CHURIN¹, Eugeny Yur'evich SHERSTOBOEV¹,
Dmitriy Nikolaevich KINSHT^{2,3}, Tatyana Sergeevna TARTYNOVA²,
Pavel Gennad'evich MADONOV^{2,3}

¹ Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine,
Tomsk National Research Medical Center of RAS
634028, Tomsk, Lenin av., 3

² Novosibirsk State Medical University of Minzdrav of Russia
630091, Novosibirsk, Krasny av., 52

³ Siberian Center of Pharmacology and Biotechnology
630056, Novosibirsk, Sofiyskaya str., 20

The aim of the study is to investigate the chronic toxicity of the oral finished dosage form of pegylated interferon α -2b, obtained with the help of electron-beam synthesis technology. **Materials and methods.** The preparation was orally administered to rats and rabbits at the calculated therapeutic doses and doses exceeding them. The drug effect on the general condition and body weight, hematological parameters, myelogram, blood biochemical parameters, excretory and cardiovascular system, CNS were studied. As well as pathomorphological examination was carried out. **Results and discussion.** The drug has no toxic and locally irritating effect under its long-term use per os.

Key words: interferon α -2b, pegylation, electron-beam immobilization, chronic toxicity, preclinical trials.

Churin A.A. – doctor of medical sciences, the department of drug toxicology

Sherstoboev E. Yu. – doctor of medical sciences, professor, head of immunopharmacology department

Kinsht D.N. – candidate of medical sciences, associate professor of the chair for pharmacology, clinical pharmacology and evidentiary medicine, e-mail: kinsht@scpb.ru

Tartynova T.S. – clinical resident of the chair for pharmacology, clinical pharmacology and evidentiary medicine

Madonov P.G. – doctor of medical sciences, professor, head of the chair for pharmacology, clinical pharmacology and evidentiary medicine