

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ ПЕРОРАЛЬНОЙ ФОРМЫ ПЕГИЛИРОВАННОГО ИНТЕРФЕРОНА $\alpha$ 2-b

Дмитрий Николаевич КИНШТ<sup>1,2</sup>, Павел Геннадьевич МАДОНОВ<sup>1,2</sup>,  
Татьяна Сергеевна ТАРТЫНОВА<sup>1</sup>, Алексей Александрович ЧУРИН<sup>3</sup>,  
Евгений Юрьевич ШЕРСТОБОЕВ<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России  
630091, г. Новосибирск, Красный просп., 52

<sup>2</sup> АО «Сибирский центр фармакологии и биотехнологии»  
630056, г. Новосибирск, ул. Софийская, 20

<sup>3</sup> НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга,  
Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН  
634028, г. Томск, просп. Ленина, 3

Цель работы – изучение острой токсичности готовой лекарственной формы пегилированного интерферона  $\alpha$ -2b для перорального применения, полученного с помощью технологии электронно-лучевого синтеза. **Материал и методы.** Препарат вводился перорально мышам и крысам в расчетных терапевтических дозах и дозах, их превышающих. Регистрировались параметры: гибель животных, общее состояние и поведение, масса тела. **Результаты и их обсуждение.** Препарат не обладает токсическим действием при пероральном введении. Макроскопических признаков повреждения желудка не обнаружено. Определение LD не представляется возможным.

**Ключевые слова:** интерферон  $\alpha$ -2b, пегилирование, иммобилизация, острая токсичность, доклинические исследования.

Рекомбинантные интерфероны в современной медицине применяются для терапии вирусных инфекций. В основном используется инъекционный путь введения интерферонов, который в ряде случаев недостаточно комплаентен для пациента, а также не всегда обеспечивает терапевтическую концентрацию в органах, поврежденных вирусами. Технология радиационного синтеза, основанная на облучении потоком ускоренных электронов раствора инертного полимера (например, полиэтиленгликоля (ПЭГ)) с белковыми молекулами (например, интерферона (ИФН)) позволяет синтезировать лекарственные средства, обладающие биодоступностью при пероральном приеме и сохраняющими фармакодинамические свойства исходных белковых молекул [1, 2]. Вместе с тем необходимо учитывать, что иммобилизация белковых молекул на инертных носителях изменяет фармакологические свойства исходных белков

[9]. Воздействие ионизирующего излучения также может изменять структуру протеинов вплоть до их разрушения. В связи с этим фармакологические свойства интерферонов, модифицированных иммобилизацией с помощью технологии электронно-лучевого синтеза, должны быть тщательно изучены. Ранее *in vitro* и *in vivo* было показано сохранение иммунотропных свойств модифицированного ПЭГ-ИФН  $\alpha$ -2b [7, 8]. Изучение токсикологической безопасности на животных в остром эксперименте является обязательной частью изучения токсичности новых лекарственных препаратов и химических соединений [5].

Цель данной работы – токсикологическая оценка безопасности готовой лекарственной формы для перорального применения ПЭГ-ИФН  $\alpha$ -2b, полученного с помощью технологии электронно-лучевого синтеза, на животных в остром эксперименте.

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

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

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

**Чурин А.А.** – д.м.н., заведующий отделом лекарственной токсикологии

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

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Действующее вещество ПЭГ-ИФН  $\alpha$ -2b получали с помощью облучения пучком электронов в дозе 1,5 Мрад предварительно замороженной при  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  смеси рекомбинантного ИФН  $\alpha$ -2b с 5%-м раствором ПЭГ-1500. Состав готовой лекарственной формы (на 1 капсулу): ПЭГ-ИФН  $\alpha$ -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]. Животным перорально вводили готовую лекарственную форму в растворе фосфатно-солевого буфера.

Использовались аутбредные животные, 60 мышей CD-1, 60 крыс CD. 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». Определение острой токсичности ПЭГ-ИФН  $\alpha$ -2b проведено в соответствии с «Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [5]. В исследовании использованы животные одного возраста (2,5 мес.). Животные распределялись по группам случайным образом, так, чтобы их индивидуальная масса не отличалась более чем на 10 % средней массы животных одного пола. Время непрерывного наблюдения составляло 8 ч после введения вещества. Наблюдение общего состояния здоровья, выявление признаков токсичности, тяжелого состояния, смертности проводились один-два раза в день (в первой и во второй половине дня) во всех группах в течение всего периода наблюдения. Осмотр осуществлялся в клетке, на руках, а в случае необходимости – на открытой поверхности. Потребление корма регистрировалось ежедневно, визуально.

Оценивались характер экскреции, состояние шерсти, кожных покровов и слизистых оболочек, аппетит, дыхание, подвижность, нервно-мышечная возбудимость, походка, агрессивность, миез/мидриаз/экзофтальм и другие признаки отклонения от здоровья. Массу тела регистрировали во всех группах перед введением препарата, ежедневно в течение всего периода наблюдения, и выражали в граммах, прирост массы тела относительно первого дня исследования – в процентах.

В «остром» эксперименте были использованы следующие дозы: общепринятые терапевтические для человека в пересчете на мышей и крыс [6], а также дозы, их превышающие, – до пятикратной у мышей и девятикратной у крыс.

Препарат вводили внутривентрикулярно, мышам (самцы и самки):  $60 \times 10^6$  и  $120 \times 10^6$  МЕ/кг – однократно,  $200 \times 10^6$  МЕ/кг – двукратно с интервалом 4 ч в максимально допустимых объемах,  $250 \times 10^6$  МЕ/кг и  $300 \times 10^6$  МЕ/кг – трехкратно с интервалом 4 ч в максимально допустимых для мышей объемах (0,8–1 мл); крысы получали  $12 \times 10^6$  МЕ/кг,  $24 \times 10^6$  МЕ/кг и  $36 \times 10^6$  МЕ/кг – однократно,  $72 \times 10^6$  МЕ/кг – двукратно с интервалом 4 ч в максимально допустимых объемах,  $108 \times 10^6$  МЕ/кг – трехкратно с интервалом 4 ч в максимально допустимых для крыс объемах (5–8 мл).

Дозы препарата рассчитывали для каждого животного индивидуально, исходя из массы тела. В ходе исследования регистрировались:

- 1) гибель животных – ежедневно от начала до окончания периода наблюдения (14 дней);
- 2) общее состояние и поведение, тип токсических проявлений, их появление, развитие и/или прекращение их проявлений – ежедневно на протяжении 14-дневного периода наблюдения;
- 3) степень выраженности токсических проявлений (при их наличии) – ежедневно на протяжении 14-дневного периода наблюдения;
- 4) массу тела животных – в период проведения карантина и в ходе наблюдения.

После окончания эксперимента на 15 день животные были подвергнуты эвтаназии для осмотра внутренних органов. В случае гибели животных для определения  $LD_{10}$ ,  $LD_{50}$ , и  $LD_{90}$  планировалось проведение пробит-анализа методом В.Б. Прозоровского [4].

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 – 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.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При внутривентрикулярном введении готовой лекарственной формы ПЭГ-ИФН  $\alpha$ -2b мышам и крысам в различных дозах гибели животных не наблюдалось. При наблюдении в течение 14 дней

Таблица 1

Средние значения и прирост массы тела мышей при пероральном введении готовой лекарственной формы ПЭГ-ИФН  $\alpha$ -2b в разных дозировках

| День взвешивания      | Пол, число в группе | Группа животных |                          |                           |                           |                           |                           |
|-----------------------|---------------------|-----------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
|                       |                     | Контроль        | 60×10 <sup>6</sup> МЕ/кг | 120×10 <sup>6</sup> МЕ/кг | 200×10 <sup>6</sup> МЕ/кг | 250×10 <sup>6</sup> МЕ/кг | 300×10 <sup>6</sup> МЕ/кг |
| Масса тела, г         |                     |                 |                          |                           |                           |                           |                           |
| Карантин              | ♂, n = 5            | 24,14 ± 0,57    | 25,82 ± 0,86             | 24,92 ± 0,87              | 24,73 ± 0,52              | 26,08 ± 0,43              | 24,24 ± 0,69              |
|                       | ♀, n = 5            | 20,14 ± 0,26    | 20,02 ± 0,10             | 19,98 ± 0,16              | 19,87 ± 0,16              | 19,98 ± 0,07              | 20,26 ± 0,27              |
| 1 день                | ♂, n = 5            | 31,44 ± 1,80    | 31,52 ± 1,29             | 32,58 ± 1,44              | 31,70 ± 0,91              | 31,96 ± 0,97              | 32,50 ± 1,53              |
|                       | ♀, n = 5            | 22,80 ± 0,93    | 23,36 ± 0,70             | 22,28 ± 0,72              | 21,92 ± 0,69              | 22,78 ± 0,50              | 22,54 ± 0,80              |
| 8 день                | ♂, n = 5            | 34,94 ± 1,80    | 35,02 ± 1,29             | 36,18 ± 1,51              | 35,10 ± 1,01              | 35,50 ± 0,94              | 35,78 ± 1,52              |
|                       | ♀, n = 5            | 26,30 ± 0,93    | 26,42 ± 0,77             | 26,02 ± 0,90              | 25,44 ± 0,89              | 25,98 ± 0,76              | 25,98 ± 0,78              |
| 15 день               | ♂, n = 5            | 38,86 ± 1,91    | 39,00 ± 1,49             | 39,78 ± 1,59              | 38,50 ± 1,11              | 39,04 ± 0,91              | 39,06 ± 1,52              |
|                       | ♀, n = 5            | 30,22 ± 0,98    | 29,48 ± 0,92             | 29,76 ± 1,10              | 28,96 ± 1,14              | 29,18 ± 1,04              | 29,42 ± 0,86              |
| Прирост массы тела, % |                     |                 |                          |                           |                           |                           |                           |
| 8 день                | ♂, n = 5            | 11,30 ± 0,68    | 11,18 ± 0,45             | 11,10 ± 0,39              | 10,72 ± 0,10              | 11,12 ± 0,45              | 10,18 ± 0,66              |
|                       | ♀, n = 5            | 15,46 ± 0,66    | 13,14 ± 1,19             | 16,76 ± 0,72              | 16,03 ± 1,21              | 13,99 ± 1,14              | 15,40 ± 1,58              |
| 15 день               | ♂, n = 5            | 23,84 ± 1,82    | 23,84 ± 1,85             | 22,22 ± 0,79              | 21,44 ± 0,17              | 22,26 ± 0,93              | 20,38 ± 1,32              |
|                       | ♀, n = 5            | 32,75 ± 1,51    | 26,27 ± 2,37             | 33,52 ± 1,45              | 32,06 ± 2,42              | 27,98 ± 2,29              | 30,79 ± 3,17              |

Таблица 2

Средние значения и прирост массы тела крыс при пероральном введении готовой лекарственной формы ПЭГ-ИФН  $\alpha$ -2b в разных дозировках

| День взвешивания      | Пол, число в группе | Группа животных |                          |                          |                          |                          |                           |
|-----------------------|---------------------|-----------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
|                       |                     | Контроль        | 12×10 <sup>6</sup> МЕ/кг | 24×10 <sup>6</sup> МЕ/кг | 36×10 <sup>6</sup> МЕ/кг | 72×10 <sup>6</sup> МЕ/кг | 108×10 <sup>6</sup> МЕ/кг |
| Масса тела, г         |                     |                 |                          |                          |                          |                          |                           |
| Карантин              | ♂, n = 5            | 185,96 ± 7,47   | 183,03 ± 12,52           | 172,92 ± 7,18            | 176,04 ± 7,38            | 183,57 ± 5,01            | 183,10 ± 11,30            |
|                       | ♀, n = 5            | 169,43 ± 7,11   | 160,47 ± 4,06            | 163,32 ± 3,98            | 167,20 ± 6,05            | 159,77 ± 4,49            | 162,49 ± 10,75            |
| 1 день                | ♂, n = 5            | 234,00 ± 5,10   | 233,20 ± 2,60            | 233,40 ± 3,08            | 234,40 ± 3,87            | 235,00 ± 2,81            | 234,40 ± 3,01             |
|                       | ♀, n = 5            | 203,95 ± 5,57   | 202,98 ± 6,67            | 202,77 ± 7,48            | 204,24 ± 5,78            | 200,81 ± 5,99            | 202,74 ± 5,78             |
| 8 день                | ♂, n = 5            | 272,00 ± 5,51   | 269,60 ± 3,57            | 270,00 ± 3,69            | 272,80 ± 4,94            | 274,00 ± 3,16            | 270,40 ± 4,03             |
|                       | ♀, n = 5            | 236,15 ± 5,67   | 235,37 ± 6,18            | 235,17 ± 6,81            | 235,44 ± 6,97            | 233,81 ± 5,50            | 234,94 ± 6,18             |
| 15 день               | ♂, n = 5            | 308,00 ± 5,54   | 306,80 ± 3,51            | 305,60 ± 4,42            | 308,00 ± 6,26            | 310,60 ± 3,64            | 305,00 ± 4,42             |
|                       | ♀, n = 5            | 267,95 ± 6,23   | 267,34 ± 5,64            | 267,17 ± 7,12            | 266,04 ± 6,46            | 265,01 ± 5,29            | 266,74 ± 5,77             |
| Прирост массы тела, % |                     |                 |                          |                          |                          |                          |                           |
| 8 день                | ♂, n = 5            | 16,26 ± 0,71    | 15,60 ± 0,51             | 15,68 ± 0,62             | 16,37 ± 0,24             | 16,60 ± 0,58             | 15,35 ± 0,61              |
|                       | ♀, n = 5            | 15,83 ± 0,66    | 16,06 ± 0,77             | 16,11 ± 0,93             | 15,27 ± 0,59             | 16,53 ± 1,03             | 15,91 ± 0,30              |
| 15 день               | ♂, n = 5            | 31,70 ± 1,58    | 31,58 ± 1,03             | 30,93 ± 0,78             | 31,37 ± 0,58             | 32,17 ± 0,33             | 30,13 ± 1,06              |
|                       | ♀, n = 5            | 31,44 ± 0,77    | 31,91 ± 1,57             | 31,96 ± 1,41             | 30,33 ± 0,89             | 32,15 ± 1,86             | 31,67 ± 0,89              |

после внутрижелудочного введения препарата не было зафиксировано никаких отклонений общего состояния, внешнего вида и поведения животных. В этой ситуации проведение пробит-анализа для определения LD<sub>10</sub>, LD<sub>50</sub>, и LD<sub>90</sub> не представляется возможным.

При запланированной эвтаназии на 15 день наряду с общим осмотром проведен осмотр желуд-

ка (место введения). Никаких макроскопических признаков, свидетельствующих о повреждении желудка – гиперемии, нарушении целостности слизистой оболочки, не обнаружено. Результаты взвешивания животных, представленные в таблицах, свидетельствуют о том, что статистически значимых различий между контролем и группами наблюдения не наблюдается.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведена токсикологическая оценка безопасности готовой лекарственной формы для перорального применения ПЭГ-ИФН  $\alpha$ -2b, полученного с помощью технологии электронно-лучевого синтеза, на мышах и крысах в остром эксперименте. Установлено, что исследуемый препарат в расчетных терапевтических дозах и дозах, их превышающих (до пятикратной у мышей и девятикратной у крыс), не обладает токсическим действием при внутрижелудочном введении в течение 14 дней; у мышей и крыс не было зафиксировано никаких отклонений общего состояния, внешнего вида и поведения. Гибели животных не зафиксировано, статистически значимых различий массы тела между контролем и группами наблюдения не обнаружено. Макроскопическое исследование при вскрытии животных на 14 сутки после введения не выявило какой-либо патологии внутренних органов. Препарат не обладает местно-раздражающим действием.

Введение лекарственной формы крысам и мышам в максимально возможном объеме не позволило достигнуть гибели животных и, следовательно, применить пробит-анализ для вычисления  $LD_{10}$ ,  $LD_{50}$  и  $LD_{90}$ . Таким образом, для мышей значение  $LD_{50}$  превышает  $300 \times 10^6$  МЕ/кг, для крыс –  $108 \times 10^6$  МЕ/кг. Используемые дозы многократно превышают максимально применяемые суточные дозы ИФН  $\alpha$ -2b для человека в пересчете на массу тела при парентеральном введении (от 3 млн МЕ/сут или 43000 МЕ/кг); препарат при внутрижелудочном введении в дозах, максимально возможных для введения животным, может быть отнесен к 4 классу опасности (по классификации ГОСТ 12.1.007-76).

Таким образом, отсутствие токсичности в «остром» эксперименте при сохранении иммунотропных свойств и подтвержденной биодоступности при пероральном приеме позволяет рассматривать модифицированный иммобилизацией с помощью технологии электронно-лучевого синтеза ИФН  $\alpha$ -2b как препарат, расширяющий арсенал пероральных иммунотропных средств в практической медицине.

## 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. Киншт Д.Н., Мадонов П.Г., Святченко В.А., Терновой В.А. Экспериментальное обоснование применения пероральной формы пегилированного интерферона  $\alpha$ 2-b для терапии энтеровирусной инфекции // Сиб. науч. мед. журн. 2017. 37. (3). 11–16.
2. Мадонов П.Г., Ершов К.И., Дубровин А.В., Запозецкий Е.Н., Мирошников П.Н., Шилова М.А., Киншт 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](http://ngmu.ru/cozo/mos/article/text_full.php?id=1115). Дата обращения: 13.09.2017.
3. Пат. № 2554761 РФ. Противоэнтеровирусное и иммуностимулирующее средство / А.В. Аргамонов, 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. Прозоровский В.Б. Использование метода наименьших квадратов для пробит-анализа кривых летальности // Фармакология и токсикология. 1962. 25. (1). 115–119.
5. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / ред. А.Н. Миронов. М.: Гриф и К, 2012. 944 с.
6. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / ред. Р.У. Хабриев. М.: Медицина, 2005. 832 с.
7. 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. Иммунотропные свойства иммобилизованного интерферона  $\alpha$ -2b // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2016. 161. (5). 637–641.
8. Шитикова О.Г., Шерстобоев Е.Ю., Масная Н.В., Данилец М.Г., Трофимова Е.С., Лигачева А.А., Мадонов П.Г., Киншт Д.Н., Ершов К.И., Шилова М.А. Влияние иммобилизованного интерферона- $\alpha$ 2b на функциональную активность иммунокомпетентных клеток *in vitro* // Иммунология. 2016. 37. (3). 155–161.
9. 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.

## **EXPERIMENTAL STUDY OF THE ACUTE TOXICITY OF THE ORAL FORM OF PEGYLATED INTERFERON $\alpha$ 2-b**

**Dmitriy Nikolaevich KINSHT<sup>1,2</sup>, Pavel Gennad'evich MADONOV<sup>1,2</sup>,  
Tatyana Sergeevna TARTYNOVA<sup>1</sup>, Alexey Alexandrovich CHURIN<sup>3</sup>,  
Eugeny Yur'evich SHERSTOBOEV<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> *Novosibirsk State Medical University of Minzdrav of Russia  
630091, Novosibirsk, Krasny av., 52*

<sup>2</sup> *Siberian Center of Pharmacology and Biotechnology  
630056, Novosibirsk, Sofiyevskaya st., 20*

<sup>3</sup> *Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine,  
Tomsk National Research Medical Center of RAS  
634028, Tomsk, Lenin av., 3*

---

The aim of the study is to investigate the acute toxicity of the oral finished dosage form of pegylated interferon  $\alpha$ -2b, obtained with the help of electron-beam synthesis technology. **Material and methods.** The preparation was orally administered to mice and rats at calculated therapeutic doses and doses exceeding them. Recorded parameters: animal death, general condition and behavior, weight of animals. **Results and discussion.** The drug has no toxic effect when administered orally. No macroscopic signs of gastric damage were found. The definition of LD is not possible.

---

**Key words:** interferon  $\alpha$ -2b, pegylation, immobilization, acute toxicity, preclinical trials.

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

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

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

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

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