

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ ПЕРОРАЛЬНОЙ ФОРМЫ ПЕГИЛИРОВАННОГО ИНТЕРФЕРОНА $\alpha 2\text{-b}$

Дмитрий Николаевич КИНСИТ^{1,2}, Павел Геннадьевич МАДОНОВ^{1,2},
Татьяна Сергеевна ТАРТЫНОВА¹, Алексей Александрович ЧУРИН³,
Евгений Юрьевич ШЕРСТОБОЕВ³

¹ Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России
630091, г. Новосибирск, Красный просп., 52

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

³ 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 $\alpha 2\text{-b}$ 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 $\alpha 2\text{-b}$, 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 $\alpha 2\text{-b}$ [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 $\alpha 2\text{-b}$, полученного с помощью технологии электронно-лучевого синтеза, на животных в остром эксперименте.

Кинсит 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 α -2b получали с помощью облучения пучком электронов в дозе 1,5 Мрад предварительно замороженной при $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ смеси рекомбинантного ИФН α -2b с 5%-м раствором ПЭГ-1500. Состав готовой лекарственной формы (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]. 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 α -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): 60×10^6 и 120×10^6 МЕ/кг – однократно, 200×10^6 МЕ/кг – двукратно с интервалом 4 ч в максимально допустимых объемах, 250×10^6 МЕ/кг и 300×10^6 МЕ/кг – трехкратно с интервалом 4 ч в максимально допустимых для мышей объемах (0,8–1 мл); крысы получали 12×10^6 МЕ/кг, 24×10^6 МЕ/кг и 36×10^6 МЕ/кг – однократно, 72×10^6 МЕ/кг – двукратно с интервалом 4 ч в максимально допустимых объемах, 108×10^6 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 α -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 α -2b в разных дозировках

День взвешивания	Пол, число в группе	Группа животных					
		Контроль	60×10 ⁶ МЕ/кг	120×10 ⁶ МЕ/кг	200×10 ⁶ МЕ/кг	250×10 ⁶ МЕ/кг	300×10 ⁶ 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 α -2b в разных дозировках

День взвешивания	Пол, число в группе	Группа животных					
		Контроль	12×10 ⁶ МЕ/кг	24×10 ⁶ МЕ/кг	36×10 ⁶ МЕ/кг	72×10 ⁶ МЕ/кг	108×10 ⁶ 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 LD₁₀, LD₅₀, и LD₉₀ 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 α -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 300×10^6 МЕ/кг, для крыс – 108×10^6 МЕ/кг. Используемые дозы многократно превышают максимально применяемые суточные дозы ИФН α -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 α -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 α 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. 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 α -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- α 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 α 2-b

**Dmitriy Nikolaevich KINSHT^{1,2}, Pavel Gennad'evich MADONOV^{1,2},
Tatyana Sergeevna TARTYNOVA¹, Alexey Alexandrovich CHURIN³,
Eugeny Yur'evich SHERSTOBOEV³**

¹ *Novosibirsk State Medical University of Minzdrav of Russia
630091, Novosibirsk, Krasny av., 52*

² *Siberian Center of Pharmacology and Biotechnology
630056, Novosibirsk, Sofiyevskaya st., 20*

³ *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 α -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 α -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