

На правах рукописи

ВАСИЛЬЕВ АНДРЕЙ НИКИФОРОВИЧ

**РАЗРАБОТКА НАЦИОНАЛЬНОЙ ПРОГРАММЫ
КАЧЕСТВЕННЫХ ДОКЛИНИЧЕСКИХ
ИССЛЕДОВАНИЙ БИОЛОГИЧЕСКИ АНАЛОГИЧНЫХ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ РЕКОМБИНАНТНОГО
ИНТЕРФЕРОНА АЛЬФА-2b**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

14.03.06 — фармакология, клиническая фармакология

Волгоград-2012 г.

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России и в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России

Научные консультанты:

доктор медицинских наук, профессор,
академик РАМН

Ершов Феликс Иванович

доктор фармацевтических наук,
профессор

Бунятян Наталья Дмитриевна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук,
профессор, академик РАМН, директор НИИ вакцин
и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН

Зверев Виталий Васильевич

доктор медицинских наук,
профессор, член-корр. РАМН, заведующий кафедрой
фармакологии и биофармации ФУВ
Волгоградского государственного
медицинского университета

Тюренков Иван Николаевич

доктор биологических наук,
ведущий научный сотрудник
ОАО «Всероссийский научный центр по безопасности
биологически активных веществ»

Шилова Елена Владимировна

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова» РАМН

Защита диссертации состоится «___» _____ 2013 г. в ___ часов на заседании Диссертационного совета Д 208.008.02 при Волгоградском государственном медицинском университете Минздрава России по адресу: 400131, Волгоград, пл. Павших борцов, 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ВолгГМУ

Автореферат разослан «___» _____ 2012 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета
Доктор биологических наук, профессор

Бугаёва Любовь Ивановна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Проблема профилактики и лечения вирусных инфекций является одной из основных для современного здравоохранения (Веревищев В.К. и др., 2008). Одним из путей решения указанной проблемы является разработка новых противовирусных лекарственных препаратов (ЛП), в т.ч. ЛП, содержащих в качестве действующего начала интерферон альфа (ИФН альфа) (Ершов Ф.И. и др., 2006).

ИФН альфа относятся к цитокинам (медиаторам иммунитета) и представлены семейством белков, обладающих противовирусной, иммуномодулирующей и противоопухолевой активностью, что позволяет отнести их к полифункциональным биорегуляторам широкого спектра действия и гомеостатическим агентам (Ершов Ф.И. и др., 2005, 2006, Sen GC, 2001). До начала 1980-х гг. производство осуществлялось путем получения нативного ИФН альфа. С открытием гена ИФН альфа, началась эра его биотехнологического синтеза (Nagata S. et al, 1980). Рекомбинантный ИФН альфа является белком, полученным с помощью генно-инженерных технологий. После разрешения медицинского применения первых оригинальных ИФН, в РФ с начала 2000-х гг. проводится активная разработка и государственная регистрация биологически аналогичных ИФН (Государственный реестр лекарственных средств, 2012 г.).

Биологически аналогичный ЛП (биоаналог) — ЛП биологического происхождения, сходный с ЛП сравнения (оригинальным ЛП), но не подпадающий под определение воспроизведенного ЛП, особенно в силу различий по исходному сырью или различий в технологическом процессе производства между биологическим ЛП и биологическим ЛП сравнения. В таких случаях необходимо представить соответствующие результаты доклинических и клинических исследований в отношении указанных различий.

На сегодняшний день вопросы обращения биологических ЛП подняты на государственный уровень (Комплексная программа развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 г., Стратегия развития фармацевтической промышленности Российской Федерации на период до 2020 г.). Однако в Федеральном законе № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» отсутствуют прямые нормы, регламентирующие обращение биологически аналогичных ЛП. В тоже время в ч. 1 ст. 14 декларируется необходимость со-

блюдения «объективности, всесторонности и полноты исследований, проводимых с использованием современных достижений науки и техники».

При разработке биоаналогичных препаратов концепция, используемая для воспроизведенных ЛП неприменима (СНМР/437/04), поскольку трехмерная структура, количество кислотно-основных вариантов или посттрансляционных модификаций (например, профиль гликозилирования) могут существенно различаться в зависимости от способа и условий производства белка с одной и той же аминокислотной последовательностью и впоследствии влиять на эффективность и безопасность. Для подтверждения биологической аналогичности ЛП, полученного биотехнологическим путем, необходимо доказать, что он по своему качеству, безопасности и эффективности не отличается от оригинального. Для этого проводятся исследования, объем которых значительно превышает требования, предъявляемые к воспроизведенным ЛП, действующим веществом которых являются небольшие, полученные путем химического синтеза молекулы (СНМР/437/04; ЕМЕА/СНМР/ВWР/49348/2005; ЕМЕА/СНМР/ВМWР/42832/2005).

Для подтверждения биологической аналогичности новых ЛП ИФН альфа препарату сравнения необходимо придерживаться как ранее разработанных рекомендаций (Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств, 2012 г.), так и использовать новые. При этом целесообразно использовать как общие подходы, имеющие отношение ко всем ЛП, полученным биотехнологическим путем, так и частные, затрагивающие непосредственно ЛП ИФН альфа (ЕМЕА/СНМР/ВМWР/31329/2005).

Гармонизация с европейскими подходами к оценке медицинских технологий позволит решить частные вопросы проведения доклинических исследований биологически аналогичных ЛП ИФН альфа, что хорошо понимается государством (тематический план научно-исследовательских работ Федерального государственного бюджетного учреждения «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России (ФГБУ «НЦЭСМП») на 2012–2014 гг.

В связи с вышеизложенным, разработка национальной программы качественных доклинических исследований ЛП рекомбинантного

ИФН альфа-2b представляет собой актуальное направление научных исследований.

Цель и задачи исследования

Основной целью исследования являлась разработка национальной программы проведения комплексных, качественных доклинических исследований препаратов рекомбинантного ИФН альфа-2b на основе нормативных документов Российской Федерации и международных нормативных актов.

Для достижения поставленной цели решались следующие конкретные задачи:

1. Провести анализ данных литературы и методических документов, регламентирующих доклинические исследования биоаналогов и обосновать методологические подходы к доклиническим исследованиям биологически аналогичных ЛП рекомбинантного ИФН альфа-2b.

2. Определить параметры стандартизации и подтверждения биологической аналогичности, необходимые при планировании и проведении доклинического изучения качества, эффективности и безопасности новых субстанций и ЛП рекомбинантного ИФН альфа-2b.

3. Предложить методики, обосновать их необходимость и достаточность, апробировать предложенные методические приемы в эксперименте при доклиническом изучении качества, эффективности и безопасности биоаналогов рекомбинантного ИФН альфа-2b.

4. Оценить качество рекомбинантного ИФН альфа-2b с использованием методов высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), электрофореза, реакции вирусной нейтрализации и специфической активности *in vitro*.

5. Оценить специфическую противовирусную активность различных лекарственных форм (ЛФ) ЛП ИФН альфа-2b *in vivo* для использования в качестве моделей доклинического изучения фармакодинамики.

6. Изучить общетоксические свойства различных ЛФ препаратов рекомбинантного ИФН альфа-2b с использованием лабораторных животных в условиях острых и хронических экспериментов, в т.ч. местнораздражающего действия при различных путях введения, для использования в качестве моделей доклинического изучения безопасности *in vivo*.

7. Исследовать специфические виды токсичности — влияние на репродуктивную функцию и эмбриотоксичность, а также иммуно-токсическое и аллергизирующее действие.

8. Провести доклинические фармакокинетические исследования препаратов рекомбинантного ИФН альфа-2b *in vivo*.

9. Оценить фармакодинамические свойства комбинаций рекомбинантного ИФН альфа-2b и химиотерапевтических препаратов *in vitro* в отношении различных возбудителей вирусных инфекций для создания новых комбинированных ЛП.

10. Оценить фармакологические свойства новой фиксированной комбинации ИФН альфа-2b с кетоконазолом и нового биоаналога ИФН альфа-2b, ковалентно связанного с одной линейной молекулой монометоксиполиэтиленгликоля (ПЭГ ИФН альфа-2b). Провести доклиническое изучение фармакодинамики, безопасности и фармакокинетики указанных препаратов.

11. По результатам доклинического изучения разработать программы клинических исследований I фазы комбинации ИФН альфа-2b с кетоконазолом и ПЭГ ИФН альфа-2b.

Научная новизна работы

Впервые разработана комплексная программа проведения качественных доклинических исследований ЛП рекомбинантного ИФН альфа-2b на основе нормативных документов Российской Федерации и международных нормативных актов.

Впервые, как необходимый элемент комплексного доклинического изучения в соответствии с нормативными документами Российской Федерации и требованиями Европейских руководств по биотехнологическим препаратам, обоснованы и апробированы методики подтверждения параметров качества, эффективности и безопасности биоаналогов ИФН альфа-2b.

Впервые проведены комплексные доклинические исследования отечественных биоаналогов ИФН альфа-2b: изучена новая оригинальная комбинация ИФН альфа-2b и кетоконазола, предназначенная для лечения грибковых инфекций, и новый пэгилированный ИФН — препарат ПЭГ ИФН альфа-2b, предназначенный для лечения хронического вирусного гепатита С.

Практическая значимость

На основании разработанного комплекса доклинических исследований проведена оценка качества, безопасности, фармакокинетики

и фармакодинамики новой комбинации — ИФН альфа-2b и кетоконазол, а также нового биоаналога ИФН альфа-2b — ПЭГ ИФН альфа-2b.

Разработаны протоколы клинических исследований I фазы, нормативно-техническая документация. Досье поданы в установленном порядке в Минздрав России для проведения процедуры государственной регистрации.

Результаты настоящего исследования использованы:

на **Федеральном** уровне:

- в Методических указаниях по изучению специфической противовирусной активности фармакологических веществ, вошедших в «Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» под общей редакцией член-корр. РАМН, проф. Хабриева Р.У. (утверждены и изданы в 2005 г.);

- в Методическом пособии по исследованию антиоксидантных свойств лекарственных препаратов под редакцией профессора Юргеля Н.В., д.б.н. Новикова К.Н. (утверждены Росздравнадзором и изданы в 2009 г.);

- в Методических рекомендациях по подготовке текста инструкции по медицинскому применению лекарственных препаратов (утверждены Росздравнадзором и изданы в 2009 г.);

- в Руководстве по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях (рекомендовано Учебно-методическим объединением в качестве учебного пособия, 2010 г.);

- в Методических рекомендациях по составлению, изложению и оформлению инструкции по применению лекарственного препарата (утверждены Минздравсоцразвития РФ в 2012 г.);

- в Методических рекомендациях по общим принципам проведения клинических исследований, МР № 10-02/02/10-2012, Москва 2012;

- в Методических рекомендациях по составлению протокола контролируемого клинического исследования ЛП (выбор контрольной группы), МР № 11-02/02/10-2012, Москва 2012;

- в Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств (утверждены Минздравсоцразвития РФ в 2012 г.);

- практические рекомендации диссертационной работы используются при планировании и проведении доклинических исследований НЦ биомедицинских технологий РАМН и ГК «Биопроцесс».

на **Муниципальном** уровне:

- в методических рекомендациях (№ 23) «Современные аспекты герпесвирусной инфекции. Эпидемиология, клиника, диагностика, лечение и профилактика» (утверждены Департаментом здравоохранения Правительства Москвы и изданы в 2012 г.).

на уровне **Учреждения**:

- в практике экспертной работы центра экспертизы и контроля готовых лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России;

- в лекционных курсах 2009-2012 гг. центра образовательных программ и повышения квалификации ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России.

Связь задач исследований с проблемным планом

Диссертационная работа осуществлялась в соответствии с планом научно-исследовательской работы ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России по теме «Научное обоснование методических подходов к доклиническому и клинико-фармакологическому изучению и экспертной оценке эффективности и безопасности лекарственных средств» (№ Гос. регистрации 01201172531).

Апробация диссертации

Материалы диссертации доложены и обсуждены на Научно-практической конференции «Рациональное использование лекарственных средств: достижения и перспективы» (Москва, 2006), XIV Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2007), Международной конференции «50-я годовщина открытия интерферона» (Оксфорд, Англия, 2007), VI Международной конференции «Клинические исследования лекарственных средств» (Москва, 2007), Научно-практической конференции «Интерферону — 50» (Москва, 2007), Всероссийской конференции по вопросам государственного регулирования в сфере обращения лекарственных средств и медицинских изделий (Москва, 2007), XV Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2008), XVI Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2009), II Конгрессе Международного общества клинических фармакологов и фармацевтов стран СНГ (Москва, 2010), XV Международном кон-

грессе «Фитофарм 2011» (Нюрнберг, Германия, 2011), Конференции с международным участием «Актуальные вопросы доклинических и клинических исследований лекарственных средств» (Санкт-Петербург, 2011), Международной научно-практической конференции «Фармацевтические и медицинские биотехнологии» (Москва, 2012), учебном цикле ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва 2005–2012).

Первичная экспертиза диссертации проведена на заседании расширенной конференции отделов интерферонов и эпидемиологии ФГБУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России и на заседании Ученого совета ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России.

Личный вклад автора

Автором осуществлен выбор научного направления, сформулированы цель и задачи исследования, обоснован выбор адекватных путей их решения. Вклад автора является определяющим и заключается в непосредственном участии на всех этапах научно-практического исследования. Автором предложена схема проведения исследований. Автором предложена новая фиксированная комбинация ИФН альфа-2b с кетоконазолом. При личном участии автора проведены доклинические исследования ЛП в клеточных культурах и на экспериментальных животных, подтвердившие его безопасность и потенциальную эффективность. Автором предложена схема проведения дальнейшего клинического исследования, разработан дизайн и протокол клинического исследования I фазы. В публикациях, написанных в соавторстве, авторский вклад составляет не менее 80 %.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 53 печатных работы, из них 2 за рубежом, 20 статей в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Параметрами стандартизации качества субстанции рекомбинантного ИФН альфа-2b, влияющими на эффективность и безопасность готовых лекарственных форм (ЛФ), являются: специфическая активность, токсичность, подлинность, специфические и неспецифические примеси.

2. Исследованные ЛФ ИФН альфа-2b характеризуются высокой противовирусной активностью *in vitro* и *in vivo*. Они обладают

благоприятным фармакологическим профилем эффективности и безопасности вне зависимости от способа введения, как в остром, так и в хроническом эксперименте.

3. Изученные ИФН альфа-2b-содержащие ЛП не обладают эмбриотоксическим действием, не влияют на физическое развитие, скорость развития сенсорно-двигательных рефлексов, эмоционально-двигательное поведение и тонкую координацию движений в постнатальном периоде *in vivo*.

4. Изученные ЛФ ИФН альфа-2b не оказывают иммунотоксического, алергизирующего и нейротоксического действия.

5. Фиксированная комбинация ИФН альфа-2b и кетоконазола обладает оптимальным соотношением потенциальной пользы к возможному риску медицинского применения, низкой токсичностью, как при остром, так и при хроническом введении. При ректальном введении кетоконазол всасывается в кровь, а ИФН альфа-2b не изменяет фармакокинетику кетоконазола.

6. Разработанная программа доклинических исследований биологически аналогичных ЛП рекомбинантного ИФН альфа-2b является научно-обоснованной и достаточной для подтверждения их качества, безопасности и эффективности.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 270 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части (материалы и методы, результаты исследований и их обсуждение), выводов, списка литературы, а также включает в себя 5 приложений. Работа иллюстрирована 131 таблицей и 22 рисунками. Библиографический указатель включает 150 источников, из них 70 на иностранных языках.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследований

В процессе исследования использовали: системный и информационный подход, общенаучные методы исследования, методы логического, документального и статистического анализа. В программе доклинических исследований использованы зарегистрированные и готовые к регистрации в России ЛП рекомбинантного ИФН альфа-2b в различных ЛФ под торговыми наименованиями Виферон, ПегАльтевир, ПегИнтрон (в качестве препарата сравнения) (табл. 1), новая

разработанная нами фиксированная комбинация ИФН альфа-2b и ке-токоназола.

Таблица 1. ЛФ и субстанции рекомбинантного ИФН альфа-2b, использованные для отработки программы доклинических исследований

ЛФ	Дозировка (ИФН альфа-2b)	Регистрационный статус
<i>Виферон</i>		
Суппозитории рек-тальные	150000 МЕ; 500000 МЕ; 1000000 МЕ; 3000000 МЕ	Разрешены для медицин-ского применения
Гель для наружного и местного приме-нения	36000 МЕ/г	Разрешен для медицинско-го применения
Капли глазные	4000 МЕ/мл	В разработке
Раствор для местного применения	40000 МЕ/мл	В разработке
Суппозитории ваги-нальные	500000 МЕ	Получено разрешение на проведение клинического исследования
Мазь для наружного и местного приме-нения	40000 МЕ/г	Разрешена для медицин-ского применения
<i>ПегАльтевир</i>		
Лиофилизат для при-готовления раствора для подкожного вве-дения	100 мкг	Получено разрешение на проведение клинического исследования
<i>ПегИнтрон</i>		
Лиофилизат для при-готовления раствора для подкожного вве-дения	100 мкг	Разрешен для медицинско-го применения
<i>Субстанции</i>		
ИФН альфа-2b человеческий рекомбинантный, ООО «Фармапарк», г. Москва		
ИФН альфа-2b человеческий рекомбинантный, ЗАО «Вектор-медика», г. Но-восибирск		
Международный стандартный образец активности WHO International Standard Interferon alpha 2b, NIBSC code: 95/566		
Международный стандарт ИФН альфа-2b человека для хроматографических исследований Interferon alpha-2b CRS EDQM, каталожный номер I0320301		
Смесь маркерных белков производства фирмы MBI Fermentas, каталожный номер SM0431		

В работе использовано 26 штаммов вирусов: вирус энцефаломиокардита мышцы (ЕМС), штамм Кислинга 40614; вирус везикулярного стоматита (VSV), штамм Индиана; 15 штаммов вируса простого герпеса (ВПГ): из них 3 эталонных штамма; 12 клинических изолятов; эталонный штамм аденовируса человека Ad5; 6 штаммов вируса гриппа; штамм вируса гриппа птиц А/Н5N1 (Цинхай-Сибирский генотип-2); тест-штамм гриба *Candida albicans* ATCC 885-653 и 102 клинических изолята *C. albicans*.

В работе использовали 6 линий культур клеток: почки эмбриона свиньи (СПЭВ); почки африканской зеленой мартышки, клон Е6 (Vero E6); легкого эмбриона человека (MRC-5); почки эмбриона человека, трансформированной ДНК аденовируса 5 типа; почки собаки (MDCK), почки теленка (MDBK).

Для проведения токсикологических, фармакодинамических и фармакокинетических исследований использовали животных различных видов: линейных белых мышей BALB/c, мышей-гибридов F1 (СВАХС57В1/6), крыс породы Вистар, беспородных белых крыс (половозрелых и неполовозрелых), морских свинок (половозрелых и неполовозрелых), кроликов и обезьян.

Методы сравнительного изучения качества

При определении подлинности ИФН альфа-2b использовали метод пептидного картирования. Исследование проводили путем оценки профиля хроматограммы испытуемого образца субстанции и стандарта после ферментативного гидролиза трипсином с использованием высокоэффективного хроматографа Sammit, DIONIX, хроматографической колонки Vydac C18 218TP54 5 μ m, 300 Å , 100 \times 4,6 мм. Профиль хроматограммы раствора испытуемого образца субстанции после ферментативного гидролиза трипсином должен принципиально соответствовать профилю хроматограммы раствора стандарта.

Определение подлинности ИФН альфа-2b проводили также методом изоэлектрофокусирования с использованием модульной системы Multiphor II и системы гель-документирования G:BOX EF. Положение основных полос в изоэлектрофореграмме испытуемого препарата должно соответствовать положению основных полос в изоэлектрофореграмме стандарта.

Определение специфических и неспецифических примесей в ИФН альфа-2b проводили методом ВЭЖХ путем оценки профиля

хроматограммы испытуемого образца субстанции и стандарта с использованием высокоэффективного хроматографа Sammit, DIONIX, С колонки Vydac C18 218TP54 5 μ m, 300 Å , 100 \times 4,6 мм. На хроматограмме, полученной для раствора испытуемого образца, площадь основного пика должна составлять не менее 95 % от общей площади всех пиков, площадь любого дополнительного пика должна составлять не более 3 % от общей площади всех пиков. Сумма площадей дополнительных пиков должна составлять не более 5 % от общей площади всех пиков.

Определение содержания белковых примесей в ИФН альфа-2b проводили методом электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях с использованием прибора для электрофореза Mini-PROTEAN 3 Cell, фирмы «BIO RAD». Электрофорез в восстанавливающих условиях: в дополнение к основной полосе могут присутствовать менее интенсивные полосы с более низкой молекулярной массой, чем основная полоса. Ни одна из дополнительных полос не может быть более интенсивной, чем основная полоса, полученная для 1,0 % раствора стандарта, и должно быть не более 3-х дополнительных полос, более интенсивных, чем основная полоса, полученная для 0,2 % раствора стандартного образца. Электрофорез в невосстанавливающих условиях: для раствора испытуемого препарата в дополнение к основной полосе могут присутствовать менее интенсивные полосы с более высокой молекулярной массой, чем основная полоса. Ни одна из дополнительных полос не может быть более интенсивной, чем основная полоса, полученная для 1,0 % раствора стандарта и должно быть не более 3-х дополнительных полос, более интенсивных, чем основная полоса, полученная для 0,2 % раствора стандарта.

Определение аномальной токсичности субстанции ИФН альфа-2b проводили двумя биологическими методами: с использованием культуры клеток и белых мышей в соответствии с требованиями ОФС 42-0060-07 ГФ XII, с. 124.

Методы сравнительного изучения специфической активности

Определение цитотоксического действия ИФН альфа-2b *in vitro* проводили биологическим методом по оценке влияния присутствия вещества на жизнеспособность клеток и их морфологию.

Определение специфической противовирусной активности и подлинности ИФН альфа-2b проводили на 1–2 суточном монослое культуры клеток — MDBK, Vero или СПЭВ, используя индикаторные штаммы VSV или EMC. В качестве стандарта противовирусной активности использовали Международный стандартный образец активности (WHO International Standard Interferon alpha 2b, NIBSC code: 95/566).

Определение специфической активности *in vitro*. Определение противогерпетической, противoadеновирусной и противогриппозной активности фармацевтических субстанций и готовых ЛП проводили путем оценки концентрации ИФН альфа-2b, обеспечивающей защиту клеточного монослоя от развития вирусиндуцированного цитопатического действия (ЦПД) в 50 % лунок, которая обозначалась, как 50 % ингибирующая доза (ИД₅₀), а также путем оценки снижения инфекционного титра вируса под воздействием различных концентраций ИФН альфа-2b.

С целью выявления различий в биологической активности между аналогичным ЛП ИФН альфа-2b и ЛП сравнения можно провести ряд сравнительных исследований (например, исследования связывания с рецептором, противовирусных эффектов на культуре клеток, антипролиферативных эффектов на клеточных линиях опухолей человека), результаты большинства из которых могут быть доступны по итогам изучения качества.

Определение противогрибковой активности субстанций и ЛП для комбинирования с ИФН альфа *in vitro* проводили по методу двукратных серийных разведений путем определения минимальной фунгицидной концентрации препарата, подавляющей рост испытуемого штамма *C.albicans*.

Определение противовирусной активности *in vivo* провели на экспериментальной модели герпетического кератита кроликов (был использован штамм вируса простого герпеса I типа «Коптев») и на модели генитального герпеса у самцов морских свинок (штамм вирус ВПГ-2 ЕС с инфекционным титром 10^7 тканевой цитопатической инфекционной дозы (ТЦИД)₅₀/мл). При динамическом наблюдении за развитием герпетической инфекции учитывали: поверхность поражения в %, интенсивность выраженности признаков поражения, наличие кровоточащих язв, орхит, сроки полной эпителизации слизистой оболочки. Для количественной оценки использовали систему баллов

от 0 до 4, выражавшую суммарно интенсивность патологических признаков. Эффективность оценивали по разнице суммы баллов в основной и контрольной группе. Наблюдение проводили в течение 20 дней.

Для ЛП рекомбинантного ИФН альфа-2b, при применении доз выше 9 млн. МЕ, возможно изучение специфической активности на животных с определением основных фармакодинамических маркеров — 2',5'-олигоаденилатсинтетазы, β_2 -микроглобулина, неоптерина.

Определение противовирусной активности комбинации препаратов *in vitro* проводили по методу Anhal et al, 1980 и Neyts J., De Clercq E, 1997. Для оценки эффективности комбинации использовали понятие фракционного ингибирующего коэффициента (ФИК), значение которого вычисляли по формуле:

$$\text{ФИК} = \frac{\text{ИД}_{50} \text{ комбинации}}{\text{сумма ИД}_{50} \text{ отдельных соединений}}$$

При значении ФИК 0,5 имеет место умеренный синергизм соединений, при значении ФИК равном 1–1,5 имеет место аддитивный эффект комбинации, при значении ФИК более 2 имеет место антагонизм соединений.

Методы сравнительного изучения фармакокинетики

Изучение фармакокинетических свойств препарата ПЭГ ИФН альфа-2b проводили на крысах-самцах Sprague-Dawley и яванских макаках. В качестве препарата сравнения использовали Пегинтрон. Крысам ЛП вводили подкожно (п/к) и внутривенно (в/в) в дозах 140 мкг/кг, обезьянам — п/к в дозе 115 мкг/кг. Определение концентрации ИФН альфа-2b проводили с помощью стандартного иммуноферментного анализа с использованием тест системы Human IFN α BMS 216 (Bender MedSystems, Austria); для определения концентраций образцов строили калибровочную кривую по стандартным образцам в диапазоне концентраций от 1 нг/мл до 5000 нг/мл.

Изучение биодоступности ИФН альфа-2b при его ректальном введении в виде суппозиторий и через катетер проведено на кроликах породы Шиншилла (в т.ч. неполовозрелых) после однократного введения ЛП в дозе 150 тыс. МЕ. Исследования проведены в соответствии с действующими в РФ рекомендациями по изучению фармакокинетики лекарственных средств. Определяли основные фармакокинетические параметры: площадь под фармакокинетической кривой «концентрация-время» (AUC), период полувыведения ($T_{1/2}$), макси-

мальная концентрация (C_{\max}), время достижения максимальной концентрации (t_{\max}) и др.

Изучение фармакокинетики комбинации ИФН альфа-2b и кетоконазола. С учетом литературных данных была разработана процедура количественного определения кетоконазола в плазме крови кроликов методом ВЭЖХ. Разработанный метод предусматривает осаждение белков в плазме крови метиловым спиртом с последующим центрифугированием. При изучении фармакокинетики кетоконазола вводили ректально суппозитории, содержащие 50, 100 или 200 мг кетоконазола и 500 тыс. ИФН альфа-2b, и внутрь (для сравнения) — кетоконазол, таблетки, 200 мг.

Изучение общетоксического действия и специфических видов токсичности проводили в соответствии с действующими методическими указаниями и рекомендациями (2000, 2005 гг.) по экспериментальному изучению новых фармакологических веществ. Использовали животных различных видов: мышей, крыс, кроликов, морских свинок, как половозрелых, так и неполовозрелых. Путь введения соответствовал изучаемой ЛФ. Высшая изученная доза в экспериментах многократно превышала терапевтическую дозу или определялась технической возможностью введения соответствующей ЛФ.

При изучении острой и субхронической токсичности состояние гомеостаза экспериментальных животных оценивали с помощью функциональных, гематологических, биохимических и патоморфологических методов.

Проводили общий клинический анализ крови и мочи, определяли основные биохимические показатели сыворотки крови. После эвтаназии перед проведением вскрытия оценивали: состояние кожи, шерстного покрова, видимых слизистых оболочек, а также внутренних органов грудной, брюшной полостей и органов таза. Отбирали образцы органов и тканей, в т.ч. место введения препарата, для последующего гистологического анализа.

Поведенческие реакции крыс оценивали тестированием свободного поведения (с использованием компьютеризированной системы Auto Track System) и обучения (в Shuttle-Box). Определение водной мотивации и анксиолитического действия проводили в модификации конфликтного теста Вогеля (Зозуля А.А. и соавт., 1999).

Исследования аллергизирующего и иммунотоксического действия проводили с помощью стандартных методов *in vivo* (на мышах,

крысах и морских свинках) и *in vitro*. Для сенсibilизации лабораторных животных использовали разные схемы многократного введения исследуемых препаратов. При изучении алергизирующего действия выявляли состояние гиперчувствительности немедленного и замедленного типов: в тесте отека лапки мыши, реакциях активной и пассивной кожной анафилаксии, в реакции дегрануляции тучных клеток *in vitro*. Иммунотоксические свойства препарата оценивали на мышах по гуморальному и клеточному иммунному ответу на чужеродный антиген, в качестве которого использовали эритроциты барана, а также на крысах по показателям фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов и содержанию комплемента в сыворотке крови.

Изучение репродуктивной токсичности проводили на крысах породы Вистар. Первым днем беременности считали день обнаружения сперматозоидов в вагинальных мазках самок, подсаженных накануне к самцам в соотношении 3:2. Наблюдение за животными вели в течение всего срока беременности. Тестируемый препарат (ЛП или плацебо) вводили животным ректально. На 20-й день беременности часть животных умерщвляли и определяли количество желтых тел беременности в яичниках, мест имплантации в матке. При оценке тератогенного действия подсчитывали количество плодов с аномалиями, заметными при внешнем осмотре, далее плоды осматривали на предмет состояния внутренних органов и скелета, взвешивали и определяли их краниокаудальный размер. Часть плодов фиксировали в растворе Буэна и исследовали методом серийных срезов по Вилсону с целью выявления дефектов развития внутренних органов. Другую часть плодов фиксировали в 96 % растворе этилового спирта и окрашивали по методу Доусона для идентификации аномалий развития скелета. Проводили наблюдение за физическим развитием крысят, изучали скорость созревания сенсорно-двигательных рефлексов в период вскармливания, обучаемость и память.

Методы статистической обработки

Статистическую обработку результатов экспериментов проводили с использованием метода описательной статистики: вычисляли среднее значение, рассчитывали стандартное отклонение. Для получения достоверных результатов каждый опыт с использованием культур клеток повторяли не менее 3-х раз.

Статистическая обработка данных экспериментальных исследований на животных выполнялась с использованием пакета приклад-

ных программ «Statistica 9.1» (StatSoft Inc., США). Количественные признаки, имевшие нормальное распределение, описывались средними и среднеквадратическими отклонениями ($M \pm s$); не имевшие нормального распределения, описывались медианами и квартилями (Me [LQ; UQ]). Качественные признаки описывались абсолютными и относительными частотами их значений. Для количественных признаков сравнение несвязанных групп проводилось с использованием непараметрического теста Манна-Уитни (U-test), сравнение связанных групп проводилось с использованием непараметрического теста Вилкоксона (W-test). Для сравнения частот значений признаков в группах применялся двусторонний точный критерий Фишера. Различия считались статистически значимыми при достигнутом уровне значимости $P < 0,05$.

Результаты исследований и их обсуждение

Результаты сравнительного изучения качества

Анализ данных литературы и изучение законодательных актов, регламентирующих процедуру доклинического и клинического исследования биоаналогов ЕС и США, позволил установить параметры стандартизации и методики анализа фармацевтической субстанции рекомбинантного ИФН альфа-2b — это подлинность, специфическая активность, чистота (микробиологическая, специфические и неспецифические примеси), аномальная токсичность. Другие показатели, например, концентрация белка - специфичны для каждого препарата и не являются характеристиками его качества и безопасности. Определение подлинности в нормативных документах ЕС, США и РФ проводится аналогичными методиками: методом электрофокусирования, методом электрофореза в ПААГ, методом пептидного картирования. В России кроме перечисленных методов, используемых для установления подлинности субстанции рекомбинантного ИФН альфа-2b, указан еще метод нейтрализации противовирусной активности специфическими антителами. В нормативных документах Европы и США, в свою очередь, указан метод определения специфической активности в сравнении с международным стандартным образцом активности. Таким образом, для выбора показателей и определения основных параметров, определяющих качество субстанции ИФН альфа-2b и ЛФ, произведенных на ее основе, были выбраны методы, указанные в табл. 5. Проанализировав образцы субстанции ИФН альфа-2b различных производителей методами, указанными в табл. 5, были

получены данные, свидетельствующие о том, что выбранные методы позволяют установить различия в качестве субстанций. Результаты анализа субстанции ИФН альфа-2b методом электрофореза в ПААГ в восстанавливающих и невосстанавливающих условия приведены на рис. 1, методом пептидного картирования — на рис. 2, а методом ВЭЖХ — на рис. 3. Для оценки подлинности препаратов ИФН альфа-2b методы, указанные в табл. 5 не всегда применимы, в связи с малой концентрацией белка в некоторых ЛФ. В таких случаях для установления подлинности субстанции ИФН альфа-2b можно использовать метод нейтрализации противовирусной активности, а так же биологический метод оценки противовирусной активности.

Таблица 5. Параметры стандартизации субстанции ИФН альфа-2b.

Показатель	Требования РФ	Требования ЕС
Подлинность	<i>1. Реакция нейтрализации противовирусной активности:</i> противовирусная активность ЛП должна нейтрализоваться анти-альфа-интерфероновым иммуноглобулином	<i>1. Специфическая активность:</i> образец должен обладать противовирусной активностью в сравнении с активностью международного стандарта активности ИФН альфа-2b
	<i>2. Метод изоэлектрического фокусирования:</i> на изоэлектрограмме испытуемого ЛП основные полосы должны соответствовать основным полосам на изоэлектрограмме раствора стандарта	
	<i>3. Метод электрофореза в ПААГ в восстанавливающих условиях:</i> положение основной полосы на электрофограмме испытуемого ЛП должно соответствовать положению основной полосы на электрофограмме раствора стандарта	
	<i>4. Метод пептидного картирования с использованием метода ВЭЖХ:</i> профиль хроматограммы раствора испытуемого ЛП (ВЭЖХ после ферментативного гидролиза трипсином) должен соответствовать профилю хроматограммы раствора стандарта	
Аномальная токсичность	ЛП должен быть нетоксичным. <i>Контроль №1</i> с использованием культуры клеток. <i>Контроль №2</i> на животных (белые мыши)	
Специфические и неспецифические примеси	<i>1. Метод электрофореза:</i> а) в восстанавливающих условиях: в дополнение к основной полосе могут присутствовать менее интенсивные полосы с более низкой молекулярной массой, чем основная полоса. Ни одна из дополнительных полос не может быть более интенсивной, чем ос-	

новная полоса, полученная для 1,0 % раствора стандарта и должно быть не более трех дополнительных полос, более интенсивных, чем основная полоса, полученная для 0,2 % раствора стандарта; б) в невосстанавливающих условиях: помимо основной полосы могут присутствовать менее интенсивные полосы с более высокой молекулярной массой, чем основная полоса. Ни одна из дополнительных полос не может быть более интенсивной, чем основная полоса, полученная для 1,0 % раствора стандарта, и должно быть не более трех дополнительных полос, более интенсивных, чем основная полоса, полученная для 0,2 % раствора стандарта.

2. *Метод ВЭЖХ:* на хроматограмме, полученной для раствора испытуемого препарата, площадь основного пика должна составлять не менее 95 % от общей площади всех пиков. Площадь любого дополнительного пика должна составлять не более 3 % от общей площади всех пиков. Сумма площадей дополнительных пиков должна составлять не более 5 % от общей площади всех пиков.

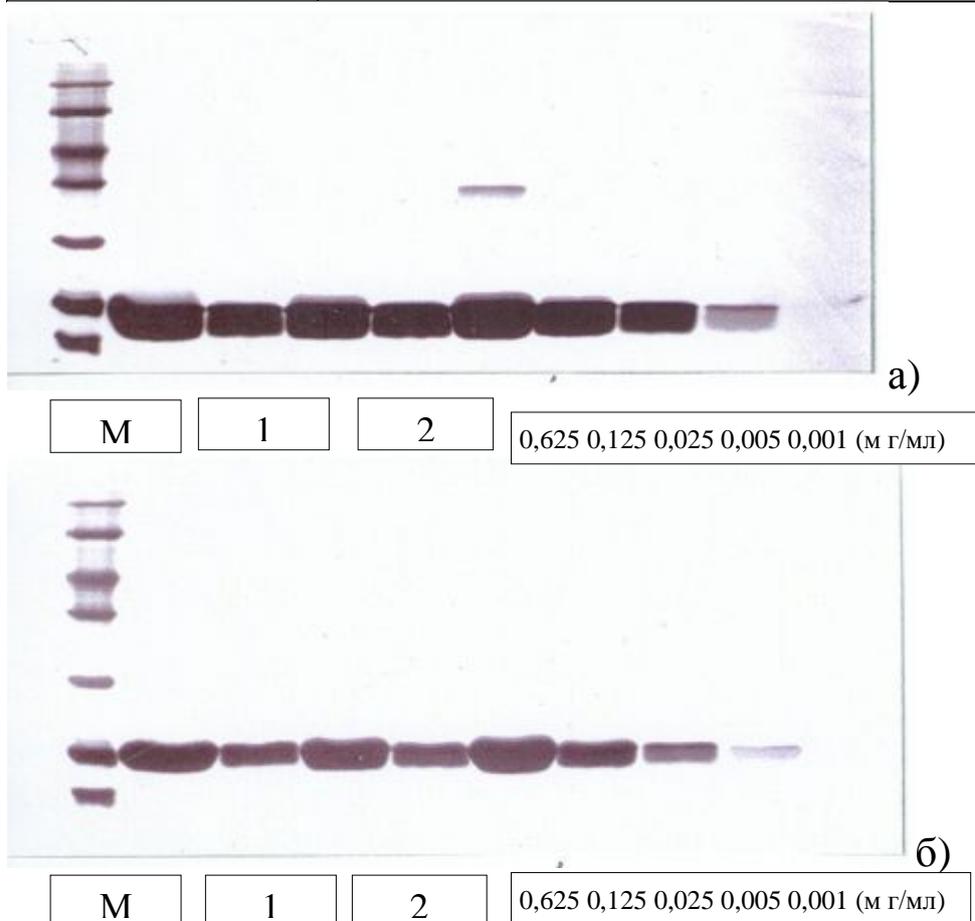


Рисунок 1. Результаты анализа подлинности субстанции ИФН альфа-2b методом электрофореза в ПААГ в восстанавливающих (а) и невосстанавливающих (б) условиях. 1 - образец субстанции ИФН альфа-2b

производства ООО «Фармапарк», 2 - образец субстанции производства ЗАО «Вектор-медика» и растворы стандарта различной концентрации.

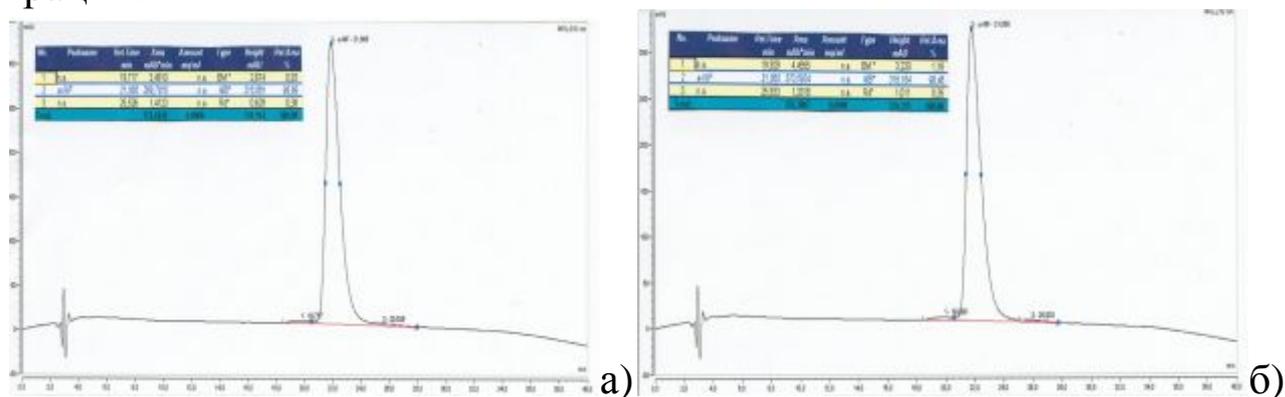


Рисунок 2. Результаты анализа субстанции ИФН альфа-2b методом ВЭЖХ: а) образец субстанции ИФН альфа-2b производства ООО «Фармапарк», б) образец субстанции производства ЗАО «Вектор-медика».

В результате проведенного анализа подлинности фармацевтической субстанции и ЛП ИФН альфа-2b по двум методикам, указанным в табл. 5, были получены данные, подтверждающие подлинность. Методом электрофореза в ПААГ в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях для двух образцов субстанции разных производителей (рис. 1) показано, что на электрофореграмме для обоих испытуемых образцов основная полоса располагается аналогично основной полосе международного стандартного образца Interferon alpha-2b CRS EDQM, при этом отсутствуют полосы с более высоким молекулярным весом, чем основная полоса. В образцах присутствуют две полосы с более низким молекулярным весом, чем основная полоса, при этом интенсивность этих полос меньше, чем интенсивность основной полосы, полученной для раствора стандарта с разведением до концентрации 1,0 %. При анализе подлинности субстанции методом пептидного картирования профиль хроматограммы растворов исследуемых образцов субстанции (ВЭЖХ после ферментативного гидролиза трипсином) соответствовал профилю хроматограммы раствора стандарта. При оценке специфических и неспецифических примесей в образцах субстанции методом ВЭЖХ (рис. 2) на хроматограмме испытуемого образца №1 площадь основного пика составила 98,69 %, при этом площадь остальных пиков составила 1,31 %. На хроматограмме образца №2 площадь основного пика составила около

98,46 %, при этом площадь дополнительных пиков составила 1,53 %. Площадь дополнительных пиков была не более 2 %.

Таким образом, установленный комплекс методов для оценки качества субстанции ИФН альфа-2b является достаточным для подтверждения биоаналогичности.

Результаты сравнительного изучения специфической активности

Оценка фармакологической активности *in vitro* и *in vivo* является одним из наиболее доступных методов предварительной оценки эффективности ЛП. Перед проведением оценки противовирусной активности проводили исследование цитотоксических свойств ЛП по стандартной методике. Результаты сравнительного изучения ИФН альфа-2b-содержащих ЛП представлены в табл. 6.

Таблица 6. Результаты сравнительного изучения ИФН альфа-2b

Противогерпесвирусовая активность ИФН альфа-2b-содержащих ЛП	ИД ₅₀ при инфекционной множественности заражения (ИМЗ) 0,1 БОЕ/Кл составила 250 МЕ/мл, ИД ₅₀ при ИМЗ 0,01 БОЕ/Кл составила 156,25 МЕ/мл. ЭД ₁₀₀ при ИМЗ 0,1 БОЕ/Кл составила 5000 МЕ/мл, ЭД ₁₀₀ при ИМЗ 0,01 БОЕ/Кл составила 1250 МЕ/мл. Для сравнения противогерпесвирусовая активность субстанции рекомбинантного ИФН альфа-2b: ИД ₅₀ при ИМЗ 0,1 БОЕ/Кл составила 962,5 МЕ/мл, ЭД ₁₀₀ при ИМЗ 0,1 БОЕ/Кл составила 962,5 МЕ/мл Под воздействием ЛП в концентрации 625 МЕ/мл происходит снижение инфекционного титра ацикло-вир-резистентных изолятов на 2,5 lg БОЕ/мл по сравнению с контролем
Противоаденовирусная активность ИФН альфа-2b-содержащих ЛП	Концентрация 2000 МЕ/мл (ИД ₅₀) подавляет репродукцию аденовируса человека 5-го серотипа в культуре клеток 293 при низкой ИМЗ (в пределах 0,1 БОЕ/Кл). Предварительная обработка клеток ЛП в концентрации 1000 МЕ/мл за 24 ч до инфицирования повышает проявляемую им на культуре клеток противоаденовирусную активность
Противогриппозная активность ИФН альфа-2b-содержащих ЛП	При концентрации 5000 МЕ/мл наблюдали снижение инфекционного титра вируса гриппа А Н3N2/Aichi/68 на 1,01 lg ТЦИД ₅₀ /мл, вируса гриппа А Н3N2/Aichi/68, выделенного из легочной ткани белых мышей, на 1,0 lg ТЦИД ₅₀ /мл, вируса гриппа А Н ₁ N ₁ /USSR/77 на 2,32 lg ТЦИД ₅₀ /мл
Определение противовирусной активности	По всем критериям (динамика среднего индекса роговичной патологии, сроки полной эпителизации ро-

ЛП <i>in vivo</i> на модели экспериментального герпетического кератита кроликов	говицы и степени помутнения роговицы) отмечается преимущество глазных капель ИФН альфа-2b при сравнении с контрольной группой без лечения
Определение противовирусной активности <i>in vivo</i> на модели экспериментального генитального герпеса морских свинок	Местное нанесение ЛП на зону поражения через 3–4 ч после инфицирования животных предотвращало развитие выраженной местной симптоматики или ограничивало развитие инфекционного процесса.

Определение противовирусной активности комбинаций *in vitro*. На модели герпетической, гриппозной и аденовирусной инфекции были исследованы комбинации ИФН альфа-2b и других этиотропных противовирусных препаратов: ацикловира (АЦВ), фосфита ацикловира (Ф-АЦВ); ганцикловира (ГНР); 9- β -D-арабинофуранозиладенина (АраА); 5-йод-2'-дезоксинуридина (ИДН); (Е)-5-(бромовинил)-2'-дезоксинуридина (БВИДН); рибавирина (РБН); тринатриевой соли фосфорномуравьиной кислоты (ФСТ), видарабина (ВДН) и кетоконазола (ККЛ) (рис. 3 и 4).

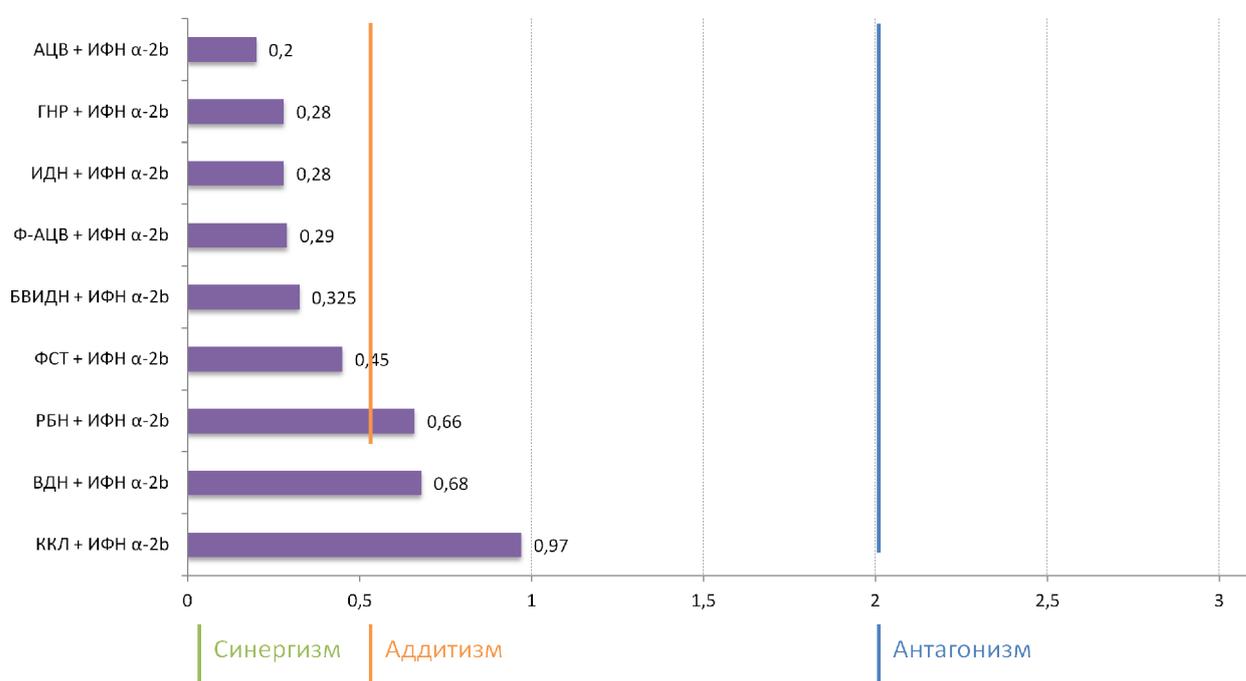
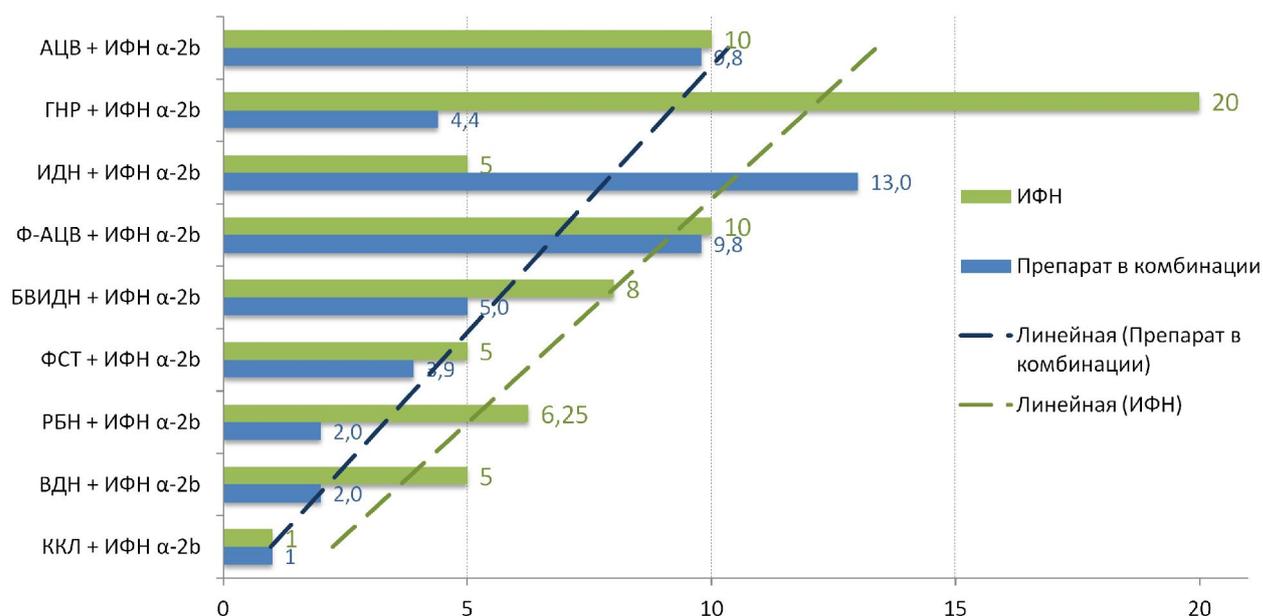


Рисунок 3. Значение ФИК для комбинаций различных противовирусных ЛП и рекомбинантного ИФН альфа-2b



При комбинированном использовании препаратов достижение противовирусного эффекта происходит при снижении ИД₅₀ соединений в несколько раз.

Рисунок 4. Снижение ИД₅₀ отдельных компонентов в комбинации

Представленные на рис. 3 и 4 данные однозначно указывают на то, что при комбинированном использовании препаратов достижение противовирусного эффекта происходит при снижении концентрации соединений, что имеет явное преимущество перед использованием ЛП по отдельности.

Определение противогрибковой активности *in vitro*. При изучении противогрибковой активности фиксированной комбинации ИФН альфа-2b и кетоконазола в отношении эталонного штамма *S. albicans* показано, что минимальная подавляющая концентрация (МПК) для кетоконазола равна 0,04 мкг/мл, МПК фиксированной комбинации ИФН альфа-2b и кетоконазола составила 0,04 мкг/мл. При оценке противогрибковой активности кетоконазола в отношении клинических изолятов *S. albicans*, выделенных от больных с дисбиозом кишечника, около 22,5 % клинических изолятов были высоко чувствительны к кетоконазолу, МПК составила 0,02 мкг/мл. Около 8,8 % клинических изолятов имели чувствительность к кетоконазолу при концентрации 0,09 мкг/мл, около 10,8 % — при 0,19 мкг/мл и 16,7 % — при 0,78 мкг/мл. Полученные данные свидетельствуют о высокой активности комбинации ИФН альфа-2b и кетоконазола в отношении грибов рода *S. albicans*, при этом активность ЛП сопоставима с активностью субстанции кетоконазола.

Результаты сравнительных фармакокинетических исследований

Результаты сравнительного изучения биодоступности ИФН альфа-2b при его ректальном введении кроликам в виде суппозиторий и через катетер представлены в таблице 7.

Таблица 7. Фармакокинетические параметры ИФН альфа-2b при введении кроликам через ректальный катетер и в виде суппозиторий

Возраст животных	Введение через ректальный катетер			Введение в виде суппозиторий		
	$\times 10^3$ AUC ЕД \times мин/мл	$\times 10^6$ AUC ЕД \times мин/мл	MRT мин	$\times 10^3$ AUC ЕД \times мин/мл	$\times 10^6$ AUC ЕД \times мин/мл	MRT мин
Половозрелые	5,97 \pm 0,69	0,997 \pm 0,15	163,8 \pm 6,97	7,4 \pm 0,45	1,3 \pm 0,09	175,04 \pm 4,89
Неполовозрелые	4,96 \pm 0,24	0,865 \pm 0,044	175,9 \pm 10,0	7,58 \pm 0,34	1,58 \pm 0,12	208,6 \pm 10,0

Показано, что AUC и среднее время удержания вещества (MRT) для взрослых и новорожденных кроликов при введении препарата в виде суппозиторий имеют большее значение по сравнению с этими же параметрами при введении субстанции катетером. $T_{1/2}$ ИФН альфа-2b из организма кроликов во всех случаях были приблизительно одинаковыми. C_{max} ИФН альфа-2b в крови во всех случаях была также приблизительно одинаковой и составляла 26–32 мкг/мл. Таким образом, сравнительный анализ основных фармакокинетических параметров ЛП ИФН альфа-2b показал, что его применение в виде суппозиторий имеет явное преимущество перед применением с помощью ректального катетера.

Изучена фармакокинетика при ректальном введении кроликам комбинации ИФН альфа-2b с кетоконазолом. Установлено, что кетоконазол после ректального введения достаточно быстро поступает в системный кровоток (уже через 2 ч после введения достигается C_{max}). С увеличением дозы средние значения C_{max} и AUC пропорционально увеличиваются. Усредненные значения концентрации кетоконазола после его ректального введения в суппозиториях, содержащих 50, 100, 200 мг кетоконазола и 500 тыс. МЕ ИФН альфа-2b, и соответствующие фармакокинетические профили, рассчитанные по параметрам, показаны на рис. 5.

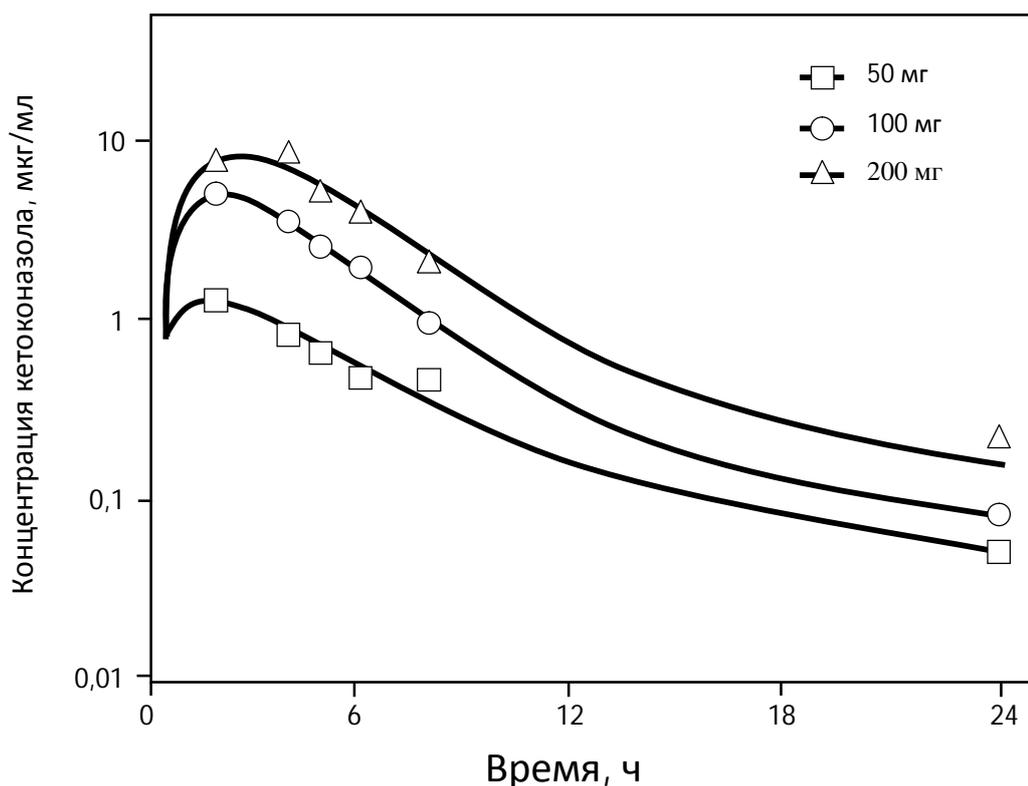


Рисунок 5. Усредненные фармакокинетические профили кетоконазола после ректального введения в суппозиториях с разной концентрацией кетоконазола (50, 100 и 200 мг) и 500 тыс. МЕ ИФН альфа-2b.

Сравнение фармакокинетических параметров кетоконазола при введении ректально и в виде таблеток показало, что средние значения C_{\max} и AUC в случае таблеток примерно в 2 раза выше, чем для суппозитория (22,6 против 10,5 мкг/л и 146 против 70,9 мкг×ч/мл соответственно). Величина отношения среднего значения $AUC_{24\text{ ч}}$ для суппозитория, содержащих 200 мг кетоконазола, к таковой для таблеток (относительная биодоступность) составляет около 50 %. Усредненные фармакокинетические профили кетоконазола после ректального введения в форме суппозитория и в форме таблеток в дозировке 200 мг приведены на рис. 6.

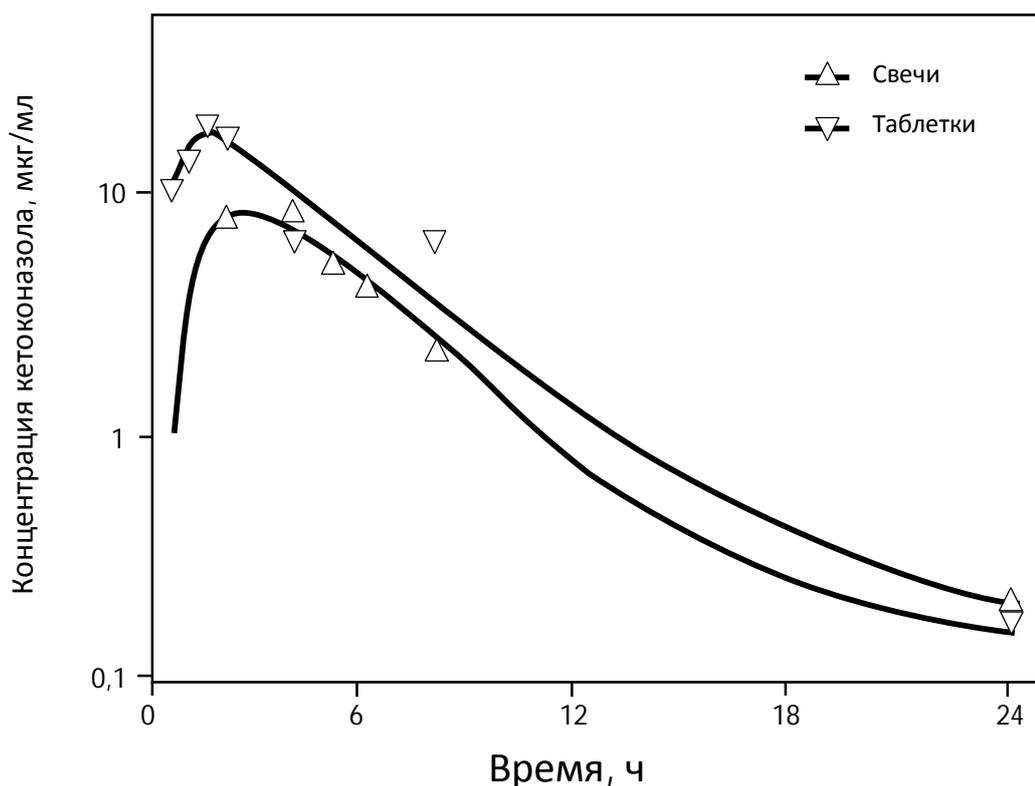


Рисунок 6. Усредненные фармакокинетические профили кетоконазола после ректального (суппозитории) и перорального (таблетки) введения в дозе 200 мг.

Таким образом, при ректальном введении кетоконазол быстро поступает в системный кровоток и его фармакокинетика при этом линейна. На фармакокинетический профиль кетоконазола при ректальном введении не оказывают влияние другие компоненты ЛП. При ежедневном ректальном введении кетоконазола в дозе 100 мг в крови животного не происходит кумуляции. Биодоступность кетоконазола при ректальном введении составляет около 50 % относительно таблеток.

Результаты изучения фармакокинетики при п/к и в/в введении ЛП ПЭГ ИФН альфа-2b на крысах представлены на рис. 7 и 8 и в табл. 8.

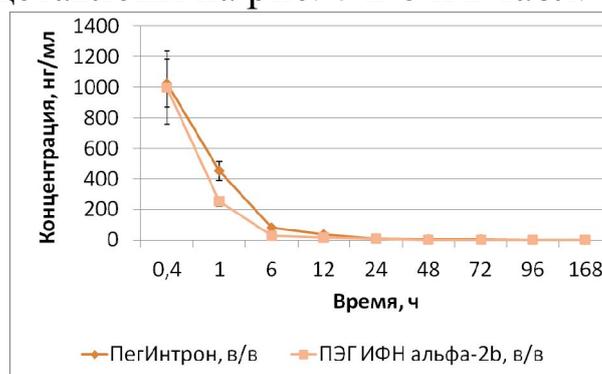
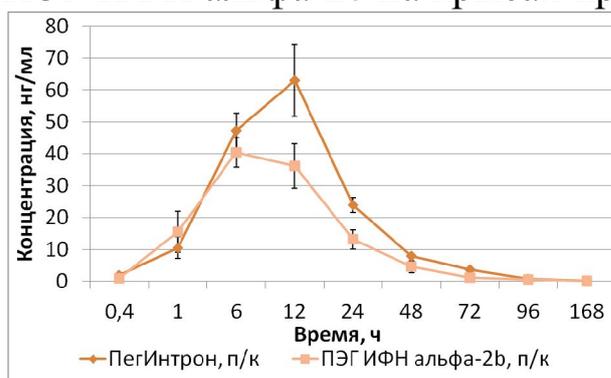


Рисунок 7. Фармакокинетический профиль ЛП ПегИнтрон® и ПЭГ ИФН альфа-2b при п/к введении крысам

Рисунок 8. Фармакокинетический профиль ЛП ПегИнтрон® и ПЭГ ИФН альфа-2b при в/в введении крысам

C_{\max} ИФН альфа-2b наблюдали при в/в введении ПегИнтрона и ПЭГ ИФН альфа-2b через 15 минут ($1027,1 \pm 155,0$ нг/мл и $999,1 \pm 241,8$ нг/мл соответственно).

Таблица 8. Концентрация ИФН в сыворотке крови крыс, нг/мл при п/к и в/в введении ЛП пэгилированных ИФН альфа-2b

Время забора крови, ч	ПегИнтрон, п/к	ПЭГ ИФН альфа-2b, п/к	ПегИнтрон, в/в	ПЭГ ИФН альфа-2b, в/в
0,4	$1,9 \pm 0,9$	$1,0 \pm 0,2$	$1027,1 \pm 155,0$	$999,1 \pm 241,8$
1	$10,5 \pm 3,4$	$15,6 \pm 6,4$	$452,3 \pm 62,6$	$253,1 \pm 29,4$
6	$47,2 \pm 5,6$	$40,5 \pm 4,7$	$81,6 \pm 15,5$	$29,0 \pm 3,5$
12	$63,1 \pm 11,3$	$36,2 \pm 7,0$	$36,4 \pm 4,1$	$15,8 \pm 2,0$
24	$23,9 \pm 2,3$	$13,2 \pm 3,0$	$10,6 \pm 2,9$	$7,8 \pm 1,4$
48	$8,0 \pm 0,2$	$4,6 \pm 1,9$	$5,8 \pm 0,7$	$2,9 \pm 0,6$
72	$3,7 \pm 0,3$	$1,2 \pm 0,3$	$5,2 \pm 4,0$	$0,8 \pm 0,2$
96	$0,7 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,1$
168	$0,2 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,1$	$0,1 \pm 0,03$	$0,1 \pm 0,03$

Установлено, что при внутривенном введении препаратов, начиная с первого часа, концентрация ИФН альфа-2b снижалась ($452,3 \pm 62,6$ нг/мл в группе ПегИнтрон и $253,1 \pm 29,4$ нг/мл в группе ПЭГ ИФН альфа-2b) и продолжала снижаться дальше. В последней временной точке (168 ч) его концентрация составила в обеих группах одинаковое значение: $0,1 \pm 0,03$ нг/мл.

При п/к введении ПегИнтрона C_{\max} ИФН наблюдали в точке 12 ч ($63,1 \pm 11,3$ нг/мл), а ПЭГ ИФН альфа-2b — в точке 6 ч ($40,5 \pm 4,7$ нг/мл), однако статистически достоверных межгрупповых различий в этих временных точках не обнаружено (6 и 12 ч). Достигнув C_{\max} при п/к введении, концентрация ИФН альфа-2b также снижалась, и в точке 168 ч составил $0,2 \pm 0,1$ нг/мл в обеих группах.

Таким образом, можно сделать заключение, что фармакокинетический профиль тестируемого препарата ПЭГ ИФН альфа-2b сопоставим с ЛП сравнения ПегИнтрон.

Результаты исследования фармакокинетики ЛП ПегИнтрона и ПЭГ ИФН альфа-2b при п/к введении обезьянам представлены в табл. 9.

Таблица 9. Концентрация ИФН в сыворотке крови обезьян после п/к введения препаратов пэгилированного ИФН, нг/мл

Время забора крови, ч	ПЭГ ИФН альфа-2b		ПегИнтрон	
	Животное № 37273	Животное № 37009	Животное № 37654	Животное № 36846
0	14,8	0,0	0,0	0,0
1	56,5	247,2	141,0	9,5
3	192,4	769,4	492,8	279,3
6	277,7	821,4	388,4	364,0
12	119,6	490,6	237,2	286,7
24	91,8	144,5	247,4	252,2
48	55,8	96,0	88,1	81,4
72	63,4	34,3	36,0	34,6
96	29,4	12,8	38,0	21,7
120	13,5	4,8	0,7	3,4
168	24,6	0,0	10,2	0,0

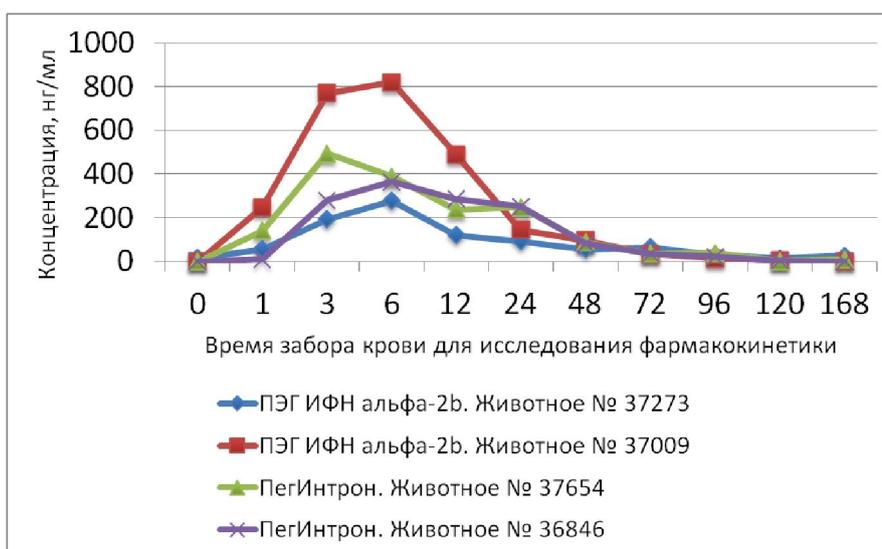


Рисунок 9. Фармакокинетический профиль препаратов ПэгИнтрон[®] и ПЭГ ИФН альфа-2b при п/к введении ЛП обезьянам

Показано, что C_{max} достигается через 6 ч после введения.

Фармакокинетический профиль тестируемого ЛП ПЭГ ИФН альфа-2b сопоставим с профилем ЛП сравнения ПэгИнтрон.

При доклинической оценке безопасности ЛП в ЕС обязательным является проведение токсикокинетических исследований. Основной целью является описание системной экспозиции препарата у животных с учетом уровня токсических и нетоксических доз и продолжительности эксперимента. Данный вид исследований проводится параллельно с проведением токсикологических экспериментов.

Исследование фармакокинетики *in vivo* является распространенным методом оценки ЛП. Однако в случае биоаналогов не всегда данные, полученные на животных, могут быть эквивалентны данным, полученным на людях. В случае препаратов рекомбинантного ИФН альфа-2b исследование фармакокинетики на животных с определением основных фармакодинамических маркеров — 2',5'-олигоденилатсинтетазы, β_2 -микроглобулина, неоптерина возможно только при применении доз выше 9 млн. МЕ, как описано выше.

Результаты сравнительных токсикологических исследований

Результаты токсикологического изучения ИФН альфа-2b в ЛФ суппозитории ректальные представлены в табл. 10.

Таблица 10. Изучение общетоксического действия, репродуктивной токсичности, алергизирующего действия и влияния на иммунологический статус ЛП ИФН альфа-2b, суппозитории ректальные

<p>Острая токсичность. Крысы (в т.ч. неполовозрелые), однократно в максимально возможной дозе для ректального введения 72800000 МЕ/кг). Резорбтивно-токсического и местнораздражающего действия не отмечено.</p>	<p>Субхроническая токсичность. Кролики (ректально, 30 дней в дозе 2000000 МЕ/кг). Отмечено снижение количества эритроцитов и тромбоцитов. ЛП не оказывал общетоксического и местнораздражающего действия.</p>	<p>Аллергенность. В опытах на неполовозрелых морских свинках алергизирующего действия не выявлено (реакция общей анафилаксии, реакция гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) при внутрикожном и конъюнктивальном введении).</p>
<p>Иммунотоксичность. В рамках изучения субхронической токсичности при ректальном введении кроликам не отмечено влияния на реакцию бласттрансформации культивируемых <i>in vitro</i> лимфоцитов на Т- и В-клеточные митогены (фитогемагглютинин, конканавалин А, декстрансульфат), систему комплемента.</p>	<p>Репродуктивная токсичность. <u>Эмбриотоксическое действие.</u> Крысы (ректально, в дозах по ИФН 4286 МЕ; 14286 МЕ и 285720 МЕ). ЛП не влиял на течение беременности, не вызывал нарушений развития плода.</p> <p>Влияние на <u>постнатальное развитие.</u> Крысы (ректально по ИФН 285720 МЕ). ЛП не влиял на физическое развитие, сенсорно-двигательные рефлексы, эмоциональное поведение, координацию движений, обучаемость, память.</p>	

Установлено, что при однократном и многократном введении половозрелым и неполовозрелым животным ЛП ИФН альфа-2b, суппозитории ректальные, не оказывает резорбтивно-токсического и местнораздражающего действия, не обладает репротоксическими, алергизирующими и иммунотоксическими свойствами.

Исследования поведенческих реакций крыс под влиянием ИФН альфа-2b, суппозитории ректальные. Тестируемый ЛП или плацебо вводили животным ректально в дозе 285 720 МЕ/кг массы тела однократно и в течение 30 дней. На протяжении всего периода введения ЛП у животных не отмечено озноба, изменения температуры тела. ЛП также не влиял на поведение животных в тесте «открытое поле», не оказывал влияния на обучаемость животных, как в случае однократного, так и в случае длительного введения, не обладал ни анксиолитическим, ни анксиогенным действием. Таким образом, ЛП не изменял поведенческие реакции крыс, что косвенно может свидетельствовать об отсутствии у него влияния на настроение.

Результаты токсикологического изучения ИФН альфа-2b, гель для наружного и местного применения, представлены в табл. 11.

Таблица 11. Изучение общетоксического, алергизирующего действия и влияния на иммунологический статус ЛП ИФН альфа-2b, гель для наружного и местного применения

<p>Острая токсичность. Неполовозрелые мыши (внутрибрюшинно, 7,2 млн. МЕ/кг), гибели не отмечено, отмечена кратковременная лейко- и тромбоцитопения, анемия</p>	<p>Субхроническая токсичность. Крысы в т.ч. неполовозрелые (накожно, соответственно, до 500 мг/кг и 250 мг/кг 3 раза в сутки в течение 30 дней). Резорбтивно-токсического и местнораздражающего действия не отмечено. Раздражающее действие также не отмечено при однократном накожном нанесении крысам (в т.ч. неполовозрелым в дозе 2500 мг/кг и 1250 мг/кг соответственно), морским свинкам (в дозе 2500 мг/кг); при однократном введении геля в конъюнктивальный мешок кроликам (в дозе 70 мг) не выявлено гиперемии, отека сосудов конъюнктивы, склеры и роговицы.</p>
<p>Аллергенность. Неполовозрелые морские свинки (кожные и конъюнктивальные пробы, анафилактическая активность). Алергизирующего действия не отмечено.</p>	<p>Влияние на иммунокомпетентные органы. При изучении субхронической токсичности на неполовозрелых животных ЛП не влиял на массу тимуса и селезенки.</p>

Установлено, что ИФН альфа-2b, гель для наружного и местного применения, при однократном и многократном нанесении половозрелым и неполовозрелым животным не обладает резорбтивно-токсическим, местнораздражающим и аллергизирующим действием.

Результаты токсикологического изучения ИФН альфа-2b, капли глазные, представлены в табл. 12.

Таблица 12. Изучение общетоксического действия препарата ИФН альфа-2b, капли глазные

<p>Субхроническая токсичность. ЛП вводили половозрелым и неполовозрелым кроликам в течение 30 дней, путем закапывания в один глаз при помощи микропипетки с объемом подачи 10 мкл (1 капля). Половозрелые животные получали ЛП в суточной дозе 30 мкл/кг и 150 мкл/кг, неполовозрелые — 60 мкл/кг и 300 мкл/кг. Не отмечено влияния на физиологические, биохимические, гематологические и патоморфологические показатели. Отличий в переносимости ЛП половозрелыми и неполовозрелыми кроликами не установлено.</p>	<p>Местнораздражающее действие. При глазной инстилляцией ЛП в течение 30 дней половозрелым и неполовозрелым кроликам в суточных дозах до 150 мкл/кг и 300 мкл/кг соответственно, не отмечено слезотечения, отека, гиперемии сосудов конъюнктивы и склеры.</p>
---	--

Установлено, что препарат ИФН альфа-2b, капли глазные, при многократной глазной инстилляцией половозрелым и неполовозрелым кроликам не обладает резорбтивно-токсическим и местнораздражающим действием.

Результаты токсикологического изучения ИФН альфа-2b, раствор для местного применения, представлены в табл. 13.

Таблица 13. Изучение общетоксического, аллергизирующего действия и влияния на иммунологический статус ЛП ИФН альфа-2b, раствор для местного применения

<p>Острая токсичность. <u>Интраназально:</u> мыши - до 5000 мкл/кг, крысы (в т.ч. неполовозрелые) - до 2500 мкл/кг. <u>Интравагинально:</u> крысы - до 2500 мкл/кг. Гибели животных, токсических эффектов не отмечено.</p>	<p>Субхроническая токсичность. <u>Интраназально:</u> крысы (в т.ч. неполовозрелые) - до 240 мкл/кг (превышает терапевтическую дозу более чем в 5 раз) в течение 14 дней. <u>Интравагинально:</u> половозрелые крысы - до 1400 мкл/кг (10-кратная терапевтическая доза) в течение 14 дней. Физиологические, биохимические и патоморфологические показатели не отличались от контроля. Отличий в токсическом действии ЛП на неполовозрелых животных от половозрелых не отмечено. Местнораздражающего действия не зафиксировано.</p>
<p>Аллергенность. Мыши</p>	<p>Иммунотоксичность. При оценке влияния на фа-</p>

(реакция ГЗТ, активной и пассивной кожной анафилаксии), крысы (реакция дегрануляции тучных клеток): токсических эффектов не отмечено	гоцитарное, клеточное и гуморальное звенья иммунитета и систему комплемента токсических эффектов не отмечено.
--	---

Установлено, что ЛП ИФН альфа-2b, раствор для местного применения, при интраназальном и интравагинальном введении не оказывает резорбтивно-токсического и местнораздражающего действия, не обладает аллергизирующими свойствами, не влияет на фагоцитарное, клеточное и гуморальное звенья иммунитета, систему комплемента.

Результаты токсикологического изучения ИФН альфа-2b, раствор для местного применения, при интрауретральном введении животным представлены в табл. 14.

Таблица 14. Изучение общетоксического действия ИФН альфа-2b, раствор для местного применения, при интрауретральном введении

Острая токсичность. При однократном интрауретральном введении (кролики-самцы, 0,3 мл/животное или 12000 МЕ/животное) резорбтивно-токсического и местнораздражающего действия не отмечено	Субхроническая токсичность. При интрауретральном введении (кролики-самцы, 0,3 мл/животное/сутки в течение 30 дней) не отмечено влияния на общее состояние животных, состав периферической крови, мочи, состав сыворотки крови, состояние внутренних органов, а также местнораздражающего действия
---	--

Примечание: доза 0,3 мл/животное обеспечивала избыточное заполнение уретры.

Установлено, что при однократном и многократном интрауретральном введении кроликам ИФН альфа-2b, раствор для местного применения, не обладал резорбтивно-токсическим и местнораздражающим действием.

Результаты токсикологического изучения ИФН альфа-2b, суппозитории вагинальные, при интравагинальном введении животным представлены в табл. 15.

Таблица 15. Изучение общетоксического действия ИФН альфа-2b, суппозитории вагинальные

Острая токсичность. При интравагинальном введении мышам (4500 мг/кг) и крысам (3000 мг/кг) резорбтивно-	Субхроническая токсичность. При интравагинальном введении крысам (50, 250 и 500 мг/кг) в течение 60 дней ЛП не обладал токсическим воздействием на ор-
--	---

токсического и местнораздражающего действия не отмечено	ганизм животных, не оказывал местнораздражающего действия
---	---

Установлено, что ЛП ИФН альфа-2b, суппозитории вагинальные, при однократном и многократном интравагинальном введении животным не оказывал резорбтивно-токсического и местнораздражающего действия.

Результаты токсикологического изучения ИФН альфа-2b, мазь, представлены в табл. 16.

Таблица 16. Изучение общетоксического, аллергизирующего действия и влияния на иммунологический статус ИФН альфа-2b, мазь

<p>Субхроническая токсичность. Кролики (накожно до 300 мг/кг 3 раза в день в течение 30 дней). Резорбтивно-токсического и местнораздражающего действия не отмечено.</p> <p>Раздражающее действие (дополнительные исследования; кролики, морские свинки: накожно 10 г/кг, однократно). Не отмечено образования эритемы, утолщения кожной складки и других признаков воспаления. При нанесении кроликам 50 мг мази на слизистую оболочку глаза ЛП не вызывал гиперемии, отечности конъюнктивы, склеры и роговицы</p>	<p>Аллергенность. Использованы методы: ГЗТ (мыши, сенсibilизация 15000 и 150000 МЕ/кг, терапевтическая и в 10 раз превышающая терапевтическую), реакция активной кожной анафилаксии (мыши, сенсibilизация 15000 и 150000 МЕ/кг, терапевтическая и в 10 раз превышающая терапевтическую), эпикутанная сенсibilизация (крысы, сенсibilизация ИФН в дозах 15000 и 150000 МЕ/кг: реакции специфического лизиса лейкоцитов и дегрануляции тучных клеток). Аллергизирующего действия не отмечено</p>
<p>Иммунотоксичность. По окончании изучения субхронической токсичности при накожном нанесении мази определяли уровень неспецифической резистентности животных (по фагоцитарной активности нейтрофилов) и уровень комплемента в сыворотке крови. Токсические эффекты не выявлены</p>	

Установлено, что ИФН альфа-2b, мазь, не обладает резорбтивно-токсическим, местнораздражающим, аллергизирующим и иммунотоксическим действием.

Результаты проведенных токсикологических исследований подтверждают безопасность ИФН альфа-2b: по данным всех проведенных токсикологических исследований ИФН альфа-2b характеризуется низкой степенью токсичности вне зависимости от ЛФ.

Экспериментальное изучение общетоксического и местнораздражающего действия комбинации ИФН альфа-2b и кетоконазола, суппозитории ректальные и вагинальные, на половозрелых животных при ректальном введении. Исследуемый ЛП или плацебо вводили животным ректально в виде подогретой до 35 С

суппозиторной массы 2 раза в день в течение 30 дней в разовых дозах 25 мг/кг (12 500 МЕ/кг ИФН альфа-2b и 5 мкг/кг кетоконазола) и 250 мг/кг (125 000 МЕ/кг ИФН альфа-2b и 50 мкг/кг кетоконазола) массы тела. В результате проведенного исследования установлено, что при однократном введении ЛП кроликам в дозе 1000 мг/кг (500 000 МЕ/кг ИФН альфа-2b и 200 мкг/кг кетоконазола) ректально не обнаружено общетоксического и местнораздражающего действия. При повторном многократном введении доз 25 мг/кг (12500 МЕ/кг ИФН альфа-2b и 5 мкг/кг кетоконазола) и 250 мг/кг (125 000 МЕ/кг ИФН альфа-2b и 50 мкг/кг кетоконазола) в течение 30 дней не отмечено изменений в поведении животных, в состоянии кожного покрова и видимых слизистых оболочек, не выявлено изменений в показателях крови и мочи. По полученным данным было сделано заключение о том, что комбинация ИФН альфа-2b с кетоконазолом, суппозитории, при многократном введении не оказывала местнораздражающего и общетоксического действия.

Экспериментальное изучение общетоксического и местнораздражающего действия комбинации ИФН альфа-2b и кетоконазола, суппозитории ректальные и вагинальные, на половозрелых животных при интравагинальном введении. Исследуемый ЛП или плацебо вводили животным интравагинально в виде подогретой до 35 С суппозиторной массы 2 раза в день в течение 30 дней в разовой дозе 3000 мг/кг (470 000 МЕ/кг ИФН альфа-2b и 200 мкг/кг кетоконазола). По полученным данным было сделано заключение о том, что комбинация ИФН альфа-2b с кетоконазолом, суппозитории, при многократном введении крысам интравагинально не оказывал местнораздражающего и общетоксического действия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проделанной работы была разработана комплексная программа проведения качественных доклинических исследований биоаналогов рекомбинантного ИФН альфа-2b, которая включает:

1. Качество:

1.1. Подлинность: (оценка специфической активности биологическим методом (реакция нейтрализации противовирусной активности), электрофорез в ПААГ, изоэлектрическое фокусирование, пептидное картирование).

1.2. Сравнительный профиль примесей (электрофорез в ПААГ, ВЭЖХ).

2. Фармакодинамические исследования:

2.1. Исследования *in vitro*:

С целью выявления различий в биологической активности между аналогичным ЛП и ЛП сравнения необходимо представить результаты ряда сравнительных исследований (например, исследования связывания с рецептором, противовирусных эффектов на культуре клеток, антипролиферативных эффектов на клеточных линиях опухолей человека), результаты большинства из которых могут быть доступны по итогам изучения качества. Сравнительные исследования должны проводиться на основе адекватных, современных валидированных методов.

2.2. Исследования *in vivo*:

Для подтверждения сопоставимости по исследуемым показателям фармакодинамическую активность биологически аналогичного ЛП и ЛП сравнения можно количественно сравнить на:

- подходящих фармакодинамических моделях на животных, например, путем оценки фармакодинамических маркеров, как то активность сывороточной 2',5'-олигоденилатсинтетазы.

или

- подходящих опухолевых моделях на животных (например, бестимусных мышцах, являющихся носителями ксенотрансплантатов опухоли человека).

или

- подходящих вирусных моделях на животных.

3. Сравнительные фармакокинетические исследования ИФН альфа-2b на животных не проводятся, так как они обладают низкой прогностической ценностью. Полноценные фармакокинетические исследования рекомендуется проводить в ходе I фазы клинических исследований.

4. Токсикологические исследования:

Необходимо представить результаты, как минимум, одного исследования субхронической токсичности при многократном введении на животных.

При проведении исследований токсичности при многократном введении необходимо предусмотреть проведение надлежащих токсикокинетических исследований и изучение иммуногенности.

Необходимо представить результаты исследования местной переносимости на не менее чем одном виде животных. Исследование

местной переносимости может составлять часть исследований токсичности при многократном введении, описанных выше.

При доклиническом изучении биологически аналогичных ЛП, содержащих ИФН альфа, результаты исследований фармакологической безопасности, репродуктивной токсичности, мутагенности и канцерогенности, как правило, представлять не требуется.

Схема подтверждения биологической аналогичности ЛП ИФН альфа-2b на этапе изучения качества и доклинических исследований представлена на рис. 10.

Программа апробирована при проведении доклинических исследований ЛП ИФН альфа-2b, комбинации ИФН альфа-2b и кетоконазола и ПЭГ-ИФН альфа-2b. Разработаны протоколы клинических исследований I фазы для комбинации ИФН альфа-2b с кетоконазолом и ПЭГ-ИФН альфа-2b. Предполагается, что результаты клинических исследований будут получены в 2013-2014 гг.

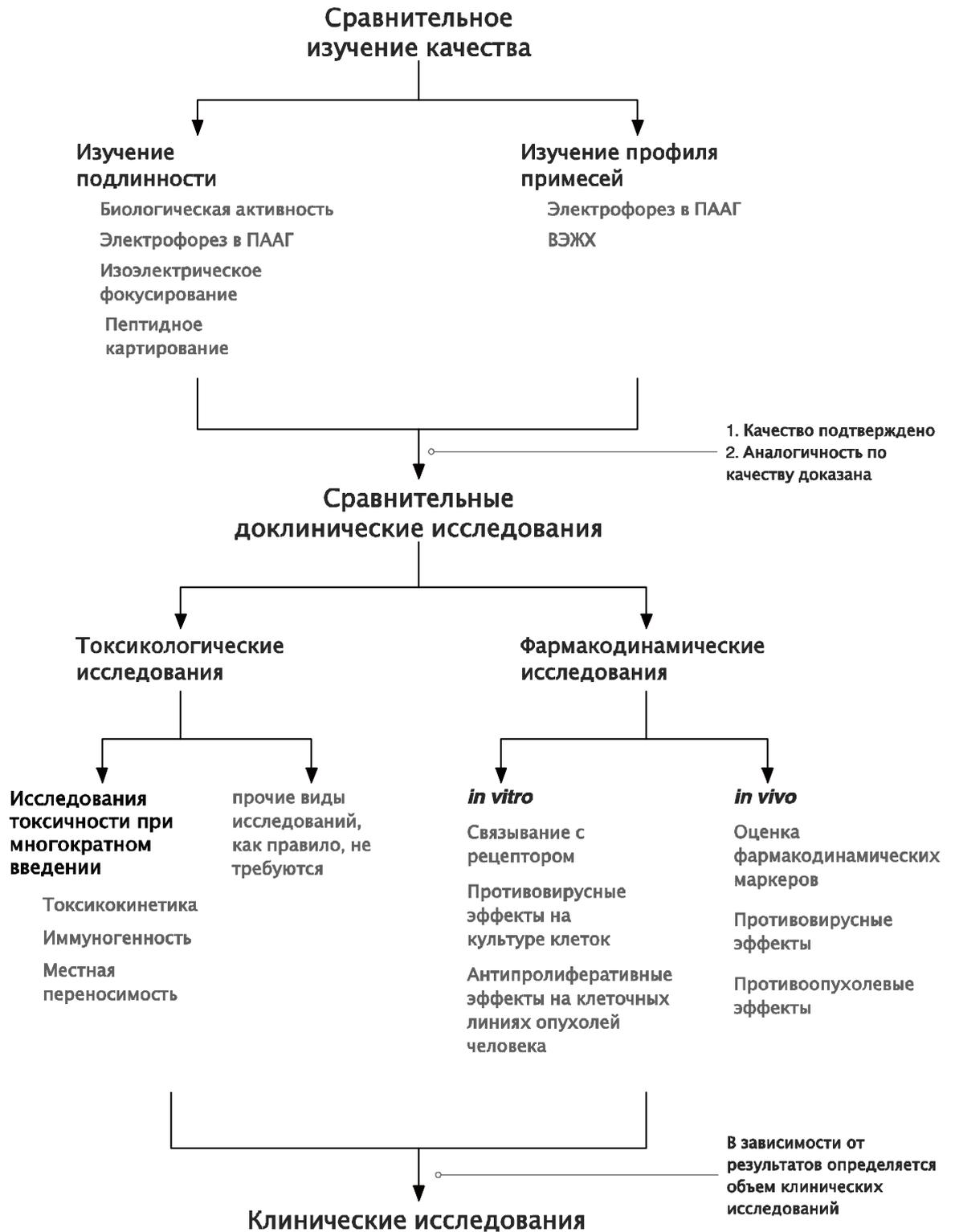


Рисунок 10. Схема подтверждения биологической аналогичности ЛП ИФН альфа-2b на этапе изучения качества и доклинических исследований

ВЫВОДЫ

1. Впервые разработана комплексная программа качественных доклинических исследований биологически аналогичных ЛП рекомбинантного ИФН альфа-2b. Включенные в нее методики по подтверждению качества, эффективности и безопасности являются базовыми для подтверждения биологической аналогичности и достаточными при планировании и проведении надлежащего изучения новых субстанций и ЛП рекомбинантного ИФН альфа-2b.

2. При доклинических исследованиях качества (подлинность, специфические и неспецифические примеси) биологически аналогичных ЛП рекомбинантного ИФН альфа-2b обосновано применение ВЭЖХ, электрофореза в ПААГ, методов пептидного картирования и изоэлектрофокусирования, позволяющих определить подлинность субстанции ИФН альфа-2b и ЛП, полученных на ее основе. При оценке специфических и неспецифических примесей в образцах площадь основного пика составила 98,46-98,69 %. Площадь дополнительных пиков не превышала 2 %, что соответствует международным требованиям.

3. При установлении подлинности активной субстанции ЛП ИФН альфа-2b, предназначенных для наружного и местного применения, следует использовать биологический метод оценки противовирусной активности и метод нейтрализации противовирусной активности в связи с малой концентрацией активного компонента. Установлен диапазон доз ингибирующего эффекта на ЦПД различных вирусов в культуре клеток в зависимости от ИМЗ (от 0,01 до 0,1 БОЕ/Кл). Одновременно с определением специфической активности необходимо проведение реакции нейтрализации противовирусной активности анти-альфа-интерфероновым иммуноглобулином.

4. Подтверждена *in vivo* противовирусная активность изученных ЛФ ИФН альфа-2b на экспериментальной модели генитального герпеса (морские свинки) и герпетического кератита (кролики) на основе оценки различий в площади поверхности поражения (%), интенсивности признаков воспаления (баллы, тест Манна-Уитни, $p < 0,05$), сроков полной эпителизации слизистой оболочки (дни, t-тест, $p < 0,05$), индексе роговичной патологии (баллы, тест Манна-Уитни, $p < 0,05$), степени помутнения роговицы

(баллы, тест Манна-Уитни, $p < 0,05$), сроках полной эпителизации роговицы (дни, t-тест, $p < 0,05$).

5. Установлена безопасность исследованных фармацевтических субстанций и готовых ЛФ рекомбинантного ИФН альфа-2b на различных видах лабораторных животных при сравнительных доклинических исследованиях общетоксических свойств в условиях острых и хронических экспериментов, в т.ч. местнораздражающего действия при различных путях введения. Показана нецелесообразность изучения острой токсичности и экспериментов на неполовозрелых животных (в дозах до 70 млн. МЕ/кг), что позволяет сократить количество лабораторных животных и затраты на исследования до 20 %.

6. При сравнительных доклинических исследованиях специфических видов токсичности ЛП рекомбинантного ИФН альфа-2b установлена их идентичная иммуногенность (базовый показатель биоаналогичности) и показана нецелесообразность изучения влияния на репродуктивную функцию и эмбриотоксичность, что позволяет сократить количество лабораторных животных и затраты на исследования до 30 %.

7. Определены в эксперименте основные фармакокинетические параметры: C_{\max} (при п/к введении крысам: 6 ч - $40,5 \pm 4,7$ нг/мл; обезьянам: 6 ч - 277,7 и 821,4 нг/мл), AUC (у крыс в дозе от 4914 до 29400 мкг/м² $AUC_{0-\infty}$ - от $1,06 \times 10^6$ до $6,38 \times 10^6$ ЕД×ч/мл; у обезьян - в дозе от 1413 до 14126 мкг/м² - от $0,39 \times 10^6$ до $6,18 \times 10^6$), средний $T_{1/2}$ из плазмы (у крыс - $20 \pm 2,2$ ч, обезьян - $30 \pm 3,1$ ч). Показана нецелесообразность изучения фармакокинетики биоаналогов ИФН альфа-2b на животных ввиду высокой вариабельности и линейности фармакокинетических параметров.

8. Впервые методом определения ФИК и оценки ИД₅₀ отдельных компонентов определены фармакодинамические параметры новых комбинаций рекомбинантного ИФН альфа-2b с др. химиотерапевтическими ЛП *in vitro* на моделях герпетической, гриппозной, аденовирусной и грибковой инфекции (ИФН альфа-2b + ацикловир – ФИК = 0,2, снижение ИД₅₀ в ~10 и ~9,8 раза для каждого компонента комбинации соответственно; ИФН альфа-2b + ганцикловир – ФИК = 0,8, снижение ИД₅₀ в ~20 и ~4,4 раза для каждого компонента комбинации соответственно). Для комбина-

ции с кетоконазолом синергизма, аддитивизма и антагонизма не выявлено (ФИК = 1,0).

9. Впервые изучены фармакологические свойства новой фиксированной комбинации ИФН альфа-2b с кетоконазолом и нового биоаналога ИФН альфа-2b, ковалентно связанного с одной линейной молекулой монометоксиполиэтиленгликоля (ПЭГ ИФН альфа-2b). По разработанной программе проведено доклиническое изучение фармакодинамики, безопасности и фармакокинетики указанных биоаналогов, необходимое для обоснования сокращенной программы доклинических и клинических исследований.

10. По результатам сравнительного изучения качества и доклинических исследований разработаны программы дальнейшего изучения ЛП пэгилированного ИФН альфа-2b и комбинации ИФН альфа-2b с кетоконазолом, начинающиеся с I фазы клинических исследований.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Сформулированы общие принципы стандартизации и проведения фармацевтических, фармакодинамических, фармакокинетических, токсикологических доклинических исследований моно- и поликомпонентных биоаналогов (в нашем случае противовирусных ИФН альфа-2b-содержащих ЛП), которые предлагается использовать при планировании исследований.

2. По итогам исследования разработана программа качественных доклинических исследований биологически аналогичных ЛП рекомбинантного ИФН альфа-2b. Разработаны методические рекомендации по планированию и проведению указанных исследований в РФ.

3. Полученные данные об эффективности комбинаций рекомбинантного ИФН альфа-2b и ЛП др. фармакотерапевтических групп позволяют предложить новые комбинированные схемы терапии вирусных и вирусно-бактериальных инфекций.

4. Для повышения конкурентных преимуществ отечественных ЛП рекомендуется проводить их доклинические исследования на основе требований надлежащей лабораторной практики, с учетом не только отечественных, но и международно-признанных нормативных документов. Необходим контроль методик организации исследований, личного состава исследователей, помещений, в которых проводятся доклинические исследования и содержатся животные, качества

животных, условий их содержания, лабораторного или экспериментального оборудования и его калибровки, испытуемого и контрольного вещества, их чистоты, способов введения, составления и проведения подробной стандартной методики экспериментальных работ и порядка проведения исследований, регистрации данных и оформления отчета, а также их хранения, требований к службе контроля качества исследований, включая гуманное обращение с животными.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Калетра (лопинавир/ритонавир) — новый ингибитор ВИЧ-протеаз / Ершов Ф.И., Касьянова Н.В., Васильев А.Н. // Антибиотики и химиотерапия — 2002 г. — том 47, № 11 — С.27-29.

2. Новый анти-ВИЧ препарат — Агенераза (ампренавир) / Ершов Ф.И., Касьянова Н.В., Васильев А.Н. // Антибиотики и химиотерапия — 2002 г. — том 47, № 8 — С.29-31.

3. Методические указания по определению индивидуальной чувствительности организма к интерферонам, другим цитокинам и индукторам интерферона / Ершов Ф.И., Мезенцева М.В., Васильев А.Н., и др. // Ведомости Научного центра экспертизы и государственного контроля лекарственных средств. — 2002. — №1. — С. 22–26.

4. Методические указания по проведению доклинических исследований цитокин-индуцирующей активности противовирусных препаратов / Ершов Ф.И., Мезенцева М.В., Васильев А.Н. и др. // Ведомости Научного центра экспертизы и государственного контроля лекарственных средств. — 2002. — №1. — С. 26-29.

5. Тризивир (абакавир, ламивудин, зидовудин) — новый препарат для лечения ВИЧ-инфекции / Ершов Ф.И., Касьянова Н.В., Васильев А.Н. // Новые лекарства — 2003. — №4. — С. 15–18.

6. Методические указания по изучению специфической противовирусной активности фармакологических веществ / Ершов Ф.И., Наровлянский А.Н., Васильев А.Н. и др. // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Под общей редакцией член-корр. РАМН, проф. Р.У Хабриева. — 2 изд., перераб. и доп. — М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. — С.532-557.

7. Вопросы рационального использования противовирусных лекарственных средств / Васильев А.Н. // Тез. докл. XIV Российского национального конгресса «Человек и лекарство». — Москва, 16–20 апреля 2007 г. — ООФ «Здоровье человека». — 2007. — С.535.

8. Глоссарий терминов, наиболее часто используемых в процессе экспертной оценки и регистрации лекарственных средств. Буданов С.В., Кукес В.Г., Васильев А.Н., и др. // Проект. — М. — Издательский дом «Русский врач». — 2007. — 68 с.

9. Доклинические и клинические исследования лекарств — современные требования, подходы к экспертизе / Васильев А.Н. // Материалы Всероссийской конф. по вопросам государственного регулирования в сфере обращения лекарственных средств и медицинских изделий. — М. — Минздрава. Росздравнадзор. — 2007. С. 37–44.

10. Местная терапия простого герпеса: PRO и CONTRA / Халдин А.А., Самгин М.А., Баскакова Д.В., Васильев А.Н. // Российский журнал кожных и венерических болезней. Приложение «Герпес». — 2007. — №2. С.4–10.

11. Мониторинг безопасности проведения клинических исследований лекарственных средств / Сюбаев Р.Д., Енгальчева Г.Н., Васильев А.Н., и др. // Шестая международная конференция «Клинические исследования лекарственных средств» 12 октября 2007 г. — Матер. конф. — Москва, Россия. — РАМН, Минздрава, РАН. — С. 109–110.

12. Новый подход в профилактике и лечении ассоциированных грибковых инфекций различной локализации / Васильев А.Н., Малиновская В.В., Бойков С.С., Парфенов В.В., Мороз А.Ф. // Ведомости научного центра экспертизы средств медицинского применения. — 2007. — №3. С.44–48.

13. Новый подход в профилактике и лечении ассоциированных грибковых инфекций различной локализации / Васильев А.Н., Малиновская В.В., Парфенов В.В., Мороз А.Ф., Налетова Е.Г. // Тез. Докл. Международная конференция 50-я годовщина открытия интерферона — Оксфорд, Англия, 16 — 19 сентября 2007.

14. Применение Виферона при тяжелых формах вульгарных угрей у мужчин / Корнева Л.В., Малиновская В.В., Молочков А.В., Васильев А.Н. // Тез. докл. XIII Российского национального конгресса «Человек и лекарство». — Москва, 16–20 апреля 2007 г. — ООФ «Здоровье человека». — 2007. — С.120.

15. Рекомендуемый объем исследований эффективности современных противовирусных ЛП / Васильев А.Н., Буданов С.В. // Тез. докл. XIV Российского национального конгресса «Человек и лекарство». — Москва, 16–20 апреля 2007 г. — ООФ «Здоровье человека». — 2007. — С.535–536.

16. Роль системы изопреноидов в противовирусном иммунитете / Наровлянский А.Н., Васильев А.Н., Савойская С.Л. и др. // В книге:

Интерферону — 50 лет. — Матер. научно-практ. конф. — 19-20 ноября 2007 г. — Москва. — 2007. — С.106-125.

17. Система изопреноидов: роль в противовирусном иммунитете / Наровлянский А.Н., Васильев А.Н. и др. // Ведомости научного центра экспертизы средств медицинского применения. — 2007. — №3. С.66-77.

18. Фармакологические особенности комплексного препарата Виферон / Васильев А.Н., Малиновская В.В., Парфенов В.В. // Вестник педиатрической фармакологии и нутрициологии. — 2007. — Том 4. №1. — С.42-45.

19. Терапия рецидивирующей генитальной формы герпесвирусной инфекции у женщин / Васильев А.Н., Каграманова Ж.А., Малиновская В.В., Парфенов В.В., Выжлова Е.Н., Серова Е.В. // Лечащий врач. — 2012. — №5. С.68-70.

20. Применение препарата Виферон, мазь, для профилактики ОРВИ у детей / Макарова З.С., Васильев А.Н., Доскин В.А., Малиновская В.В., Парфенов В.В., Мешкова Е.Н. // Антибиотики и химиотерапия — 2008 г. — том 53, № 3-4 — С.9-12.

21. Применение препарата Виферон, суппозитории, при гриппе у взрослых больных / Гатич Р.З., Колобухина Л.В., Васильев А.Н., и др. // Антибиотики и химиотерапия — 2008 г. — том 53, № 3-4 — С.13-17.

22. Применение сверхмалых доз антител к гамма-интерферону в лечении и профилактике вирусных инфекций / Васильев А.Н., Сергеева С.А., Качанова М.В. и др. // Антибиотики и химиотерапия — 2008 г. — том 53, № 3-4 — С. 32-35.

23. Противовирусная и иммуномодулирующая активность полипренилфосфатов при вирусных инфекциях / Васильев А.Н., Ожерелков С.В., Козлов В.В. и др. / Антибиотики и химиотерапия — 2008 г. — том 53, № 3-4 — С.3-8.

24. Разработка гармонизированных требований к экспресс-отчетам о клинических исследованиях / Васильев А.Н., Сюбаев Р.Д., Верстакова О.Л. и др. // Тез. докл. XV Российского национального конгресса «Человек и лекарство». — Москва, 14-18 апреля 2008 г. — С.530.

25. Разработка гармонизированных требований к периодическим отчетам о клинических исследованиях / Енгальчева Г.Н., Сюбаев Р.Д., Васильев А.Н. и др. // Тез. докл. XV Российского национального конгресса «Человек и лекарство». — Москва, 14-18 апреля 2008 г. — С.538.

26. Фортепреп — новый перспективный антигерпесный и иммуномодулирующий препарат на основе полипренилфосфатов / Наровлянский А.Н., Парфенова Т.М., Васильев А.Н. и др. // Россий-

ский иммунологический журнал РАН. — 2008. — Том 2(11), Номер 2-3 –С.256.

27. Виферонотерапия и ее эффективность у беременных со смешанной урогенитальной инфекцией / Новикова С.В., Шугинин И.О., Васильев А.Н. и др. // Тез. докл. XVI Российского национального конгресса «Человек и лекарство». — Москва, 6-10 апреля 2009 г. — С.399-400.

28. Иммуномодулирующая активность полипренилфосфат — содержащих препаратов при герпетической инфекции / Васильев А.Н., Наровлянский А.Н., Ожерелков С.В. и др. / Актуальные вопросы эпидемиологии инфекционных болезней. Сборник научных трудов (выпуск 9) — 2009 г. — С.237.

29. Интерфероны первого типа — индукция и механизмы противовирусного действия / Васильев А.Н., Малиновская В.В., Парфенов В.В., Дмитриева Е.В. // Антибиотики и химиотерапия — 2009 г. — том 54. — № 7–8. — С. 50–55.

30. Критерии оценки безопасности внесения изменений в состав вспомогательных веществ зарегистрированного лекарственного средства / Верстакова О.Л., Сюбаев Р.Д., Васильев А.Н., Енгальчева Г.Н. // Тез. докл. XVI Российского национального конгресса «Человек и лекарство». — Москва, 6-10 апреля 2009 г. — С.630.

31. Местное применение препарата интерферона в лечении стенозирующего ларинготрахеобронхита у детей / Васильев А.Н., Малиновская В.В., Кладова О.В., и др. // Тез. докл. XVI Российского национального конгресса «Человек и лекарство». — Москва, 6-10 апреля 2009 г. — С.424-425.

32. Методическое пособие по исследованию антиоксидантных свойств ЛП // Бердников Н.Г., Буданов С.В., Васильев А.Н. и др. / Под редакцией профессора Юргеля Н.В., доктора биологических наук Новикова К.Н.. — М. — Издательский дом «Русский врач». — 2009. — 36 с.

33. Методические рекомендации по подготовке текста инструкции по медицинскому применению ЛП. / Юргель Н.В., Давыдова К.С., Васильев А.Н. и др. // Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения и социального развития. — М. — 2009. — 47с.

34. Опыт применения Виферона-геля для профилактики и лечения ларинготрахеитов у детей дошкольного возраста / Каюмова Д.А., Кулагина М.Г., Боровикова Е.В., Васильев А.Н. // Тез. докл. XVI Российского национального конгресса «Человек и лекарство». — Москва, 6-10 апреля 2009 г. — С.439.

35. Препарат Виферон, суппозитории, в терапии рецидивирующей герпесвирусной инфекции у женщин / Васильев А.Н., Каграманова Ж.А., Малиновская В.В., Парфенов В.В. // Антибиотики и химиотерапия — 2009 г. — том 54, № 5-6 — С.54–58.

36. Разработка новых методических документов по доклинической оценке эффективности и безопасности новых лекарственных средств / Васильев А.Н., Верстакова О.Л., Сюбаев Р.Д., Крутикова Н.М. // Тез. докл. XVI Российского национального конгресса «Человек и лекарство». — Москва, 6-10 апреля 2009 г. — С.53.

37. Разработка унифицированных требований к отчетам о безопасности клинических исследований / Енгальчева Г.Н., Сюбаев Р.Д., Васильев А.Н., Буданов С.В. // Тез. докл. XVI Российского национального конгресса «Человек и лекарство». — Москва, 6-10 апреля 2009 г. — С.656.

38. Совершенствование экспериментальной и экспертной оценки новых лекарственных средств, полученных с помощью новых технологий / Сюбаев Р.Д., Верстакова О.Л., Васильев А.Н. // Тез. докл. XVI Российского национального конгресса «Человек и лекарство». — Москва, 6-10 апреля 2009 г. — С.744.

39. Эффективность анаферона в комплексной терапии генитального герпеса / Зуйкова И.Н., Васильев А.Н., Шульженко А.Е. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины — 2009 г. — приложение к №8 — С.45-49.

40. Эффективность терапии рецидивирующей генитальной формы герпесвирусной инфекции препаратом Виферон, гель для местного применения, у женщин / Васильев А.Н., Каграманова Ж.А., Малиновская В.В. и др. // Клиническая дерматология и венерология — 2009 г. — № 4 — С.88-91.

41. Оценка влияния антиоксидантов на специфическую противовирусную активность интерферона альфа-2b человеческого рекомбинантного в отношении вируса простого герпеса в культуре клеток / Васильев А.Н. // Антибиотики и химиотерапия — 2010 г. — том 55, № 7-8 — С.20-25.

42. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / Асташкин Е.И., Ачкасов Е.Е., Васильев А.Н. и др. // Рекомендовано Учебно-методическим объединением по медицинскому и фармацевтическому образованию вузов России в качестве учебного пособия для системы медицинского и фармацевтического послевузовского образования. — М. — Профиль-2С. — 2010. — 358с.

43. Информационное обеспечение безопасности комбинированной фармакотерапии / Сюбаев Р.Д., Васильев А.Н., Яворский А.Н., Енгальчева Г.Н. // Ремедиум — 2011 г., №4 — С.81-82.

44. Противовирусная активность антиоксидантов и их комбинаций с интерфероном альфа-2b человеческим рекомбинантным в отношении вируса гриппа птиц А/Н5N1 / Васильев А.Н., Дерябин П.Г., Галегов Г.А. // Цитокины и воспаление — 2011 г. — том 10, №2 — С.32-37.

45. Антивирусная активность рекомбинантного интерферона альфа-2b в комбинации с некоторыми антиоксидантами / Васильев А.Н., Дерябин П.Г., Галегов Г.А. // Антибиотики и химиотерапия — 2012 г. — том 56. — № 9–10. — С. 27–32.

46. Современные аспекты герпесвирусной инфекции. Эпидемиология, клиника, диагностика, лечение и профилактика. Методические рекомендации №23 Правительство Москвы, Департамент здравоохранения / Каржас Н.В., Малышев Н.А., Рыбалкина Т.Н., Васильев А.Н. и др. // М. : Спецкнига — 2012 г. — 128 с.

47. Качественные доклинические исследования — необходимый этап разработки и внедрения в клиническую практику новых ЛП / Васильев А.Н. // Антибиотики и химиотерапия — 2012 г. — том 57. — № 1–2 — С.41-50.

48. Изучение токсичности и защитных свойств интерферона альфа-2b с антиоксидантами и специфических противовирусных химиопрепаратов при герпесвирусных инфекциях *in vitro* и *in vivo* / Васильев А.Н., Климова Р.Р., Тюленев Ю.А. // Эпидемиология и инфекционные болезни. — 2012 г. — № 2. — С. 29–35.

49. Совершенствование диагностики герпесвирусных инфекций / Васильев А.Н., Федорова Н.Е., Климова Р.Р., Адиева А.А., // Клиническая лабораторная диагностика. — 2012 г. — № 6. — С. 52–55.

50. Методические рекомендации по составлению, изложению и оформлению инструкции по применению ЛП (утверждены Минздравсоцразвития в 2012 г.).

51. Методические рекомендации по общим принципам проведения клинических исследований, МР № 10-02/02/10-2012, Москва 2012.

52. Методические рекомендации по составлению протокола контролируемого клинического исследования ЛП (выбор контрольной группы), МР № 11-02/02/10-2012, Москва 2012.

53. Рациональный выбор наименований лекарственных средств: Методические рекомендации. — М.: ФГБУ «НЦЭСМП» Минздравсоцразвития России, 2012. — 35 с.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

AUC	Площадь под фармакокинетической кривой «концентрация–время»
CHMP	Committee for Medicinal Products for Human Use
C_{\max}	Максимальная концентрация
EDQM	European Directorate for the Quality of Medicines
EMA	European Medicines Agency
MRT	Среднее время удержания вещества
БОЕ	Бляшкообразующая единица
ВЭЖХ	Высокоэффективная жидкостная хроматография
ГЗТ	Гиперчувствительность замедленного типа
ГФ	Государственная фармакопея
ИД	Ингибирующее действие
ИМЗ	Инфекционная множественность заражения
ИФН	Интерферон
ЛП	Лекарственный препарат
ЛФ	Лекарственная форма
МПК	Минимальная подавляющая концентрация
ПААГ	Полиакриламидный гель
ПЭГ	Полиэтиленгликоль
ПЭГ-ИФН	Пэгилированный интерферон
ТЦИД	Тканевая цитопатическая инфекционная доза
ФИК	Фракционный ингибирующий коэффициент
ЦПД	Цитопатическое действие
ЭД	Эффективная доза