

Эффективность и безопасность нового препарата для лечения рассеянного склероза «пегилированный интерферон бета-1а человека» на обезьянах в сравнении с немодифицированным интерфероном бета-1а

Н. А. Спирина¹, Я. Ю. Устюгов¹, А. А. Александров¹, М. В. Артюхова¹, А. Б. Джелиа²

¹ ЗАО «Биокад», п. Любучаны, Чеховский район, Московская область, Россия

² Научно-исследовательский институт Экспериментальной патологии и терапии Академии наук Абхазии, Республика Абхазия, г. Сухум, гора Трапеция

Поступила 12.04.2016. Принята к публикации 22.04.2016.

В статье представлены результаты исследований эффективности и безопасности препарата пролонгированного действия для лечения рассеянного склероза на основе рекомбинантного человеческого интерферона бета-1а «Пегилированный интерферон бета-1а человека» (ПЭГ ИФН бета-1а) на макаках резус (*Macaca mulatta*) при подкожном и внутримышечном введении. Использовались следующие дозы: максимально переносимая доза — $3,0 \cdot 10^6$ МЕ/кг, промежуточная доза — $1,5 \cdot 10^6$ МЕ/кг и минимальная доза, эквивалентная терапевтической для человека немодифицированного интерферона бета-1а — $0,3 \cdot 10^6$ МЕ/кг. Проводилась количественная оценка фармакодинамических параметров препарата ПЭГ ИФН бета-1а при однократном подкожном и внутримышечном введении. Оценивались уровень и характер патологических изменений внутренних органов (систем внутренних органов) экспериментальных животных, вызванных многократными подкожными и внутримышечными введениями ПЭГ ИФН бета-1а. На основании данных исследований препарата ПЭГ ИФН бета-1а на макаках резус показано, что препарат эффективен (как при однократном подкожном, так и при однократном внутримышечном введении) и не оказывает токсического действия (как при многократном подкожном, так и при многократном внутримышечном введении) при использовании в предполагаемой терапевтической дозе $0,3 \cdot 10^6$ МЕ/кг.

Ключевые слова: интерферон бета-1а; пегилированный интерферон бета-1а; рассеянный склероз; фармакодинамика; безопасность; эффективность; токсичность.

Библиографическое описание: Спирина НА, Устюгов ЯЮ, Александров АА, Артюхова МВ, Джелиа АБ. Эффективность и безопасность нового препарата для лечения рассеянного склероза «пегилированный интерферон бета-1а человека» на обезьянах в сравнении с немодифицированным интерфероном бета-1а. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2016; 16 (2): 108–114.

Рассеянный склероз (РС) — наиболее распространенное (более 2 миллионов человек в мире и более 150000 в России) хроническое прогрессирующее заболевание, обусловленное развитием очагов демиелинизации в белом веществе центральной нервной системы, часто встречающееся в возрасте от 15 до 40 лет. Является одной из самых социально и экономически значимых проблем современной неврологии вследствие характера течения болезни и возможностей патогенетической терапии РС.

В связи с особенностями применения уже используемых препаратов и их комбинаций [1], изменяющих течение рассеянного склероза (ПИТРС), такими как малое влияние на прогрессирование инвалидизации, необходимость частых инъекций в течение многих лет, наличие ряда побочных действий [2] — существует необходимость создания новых препаратов для предупреждения обострений, увеличения периода ремиссий и замедления болезни. Таким образом, цель настоящих исследований состояла в экспериментальном доказательстве более выраженной эффективности и сравнимой безопасности препарата ПЭГ ИФН бета-1а при использовании в дозе $0,3 \cdot 10^6$ МЕ/кг в сравнении с немодифицированным ИФН бета-1а.

Материалы и методы

1. Экспериментальные животные. В соответствии с методическими рекомендациями и источниками литературы, описывающими проведение соответствующих исследований, определялись объем, схема и процедура проведения

экспериментов по определению степени повреждающего действия препарата ПЭГ ИФН бета-1а при его многократном введении [3–7]. Согласно требованиям нормативных документов [5], исследование препарата проводилось на животных, чувствительных к его действию — макака резус (*Macaca mulatta*), здоровых особях по данным гематологического анализа крови и наблюдения за общим состоянием, функцией пищеварительного тракта, температурой тела и в количестве, достаточном для регистрации изучаемых эффектов: 67 обезьян (34 обезьяны в эксперименте с многократным введением и 33 обезьяны в эксперименте с однократным введением возрастающих доз препаратов). В таблице 1 показано разделение обезьян по группам для экспериментов.

2. Препараты. Препараты животным вводили подкожно (в область холки) и внутримышечно (в область бедра) в виде свежеприготовленных растворов. При многократном введении частота инъекций составляла один раз в 2 недели, в течение 12 недель. Клинические наблюдения и тесты проводили на протяжении трех месяцев (90 дней) от начала инъекций. Продолжительность хронического токсикологического эксперимента составляла 90 дней с последующим 4-недельным наблюдением (общая продолжительность эксперимента — 120 дней). У животных групп однократного введения тесты проводились в течение 2 недель.

Плацебо — в состав препарата-плацебо входили: ацетат натрия до концентрации 3,14 мМ, ЭДТА до концен-

трации 0,15 мМ, Твин до концентрации 80 мг/л, маннитол до концентрации 54 мг/мл.

Препарат «ПЭГ ИФН бета-1а человека» был получен в «Биокад» путем присоединения активированного полиэтиленгликоля (ПЭГ) («LaysanBio», США) к высокоочищенному рекомбинантному ИФН бета-1а человека с последующей очисткой ПЭГ ИФН бета-1а методом ионообменной хроматографии. Серия препарата 300812.

Препарат, являющийся стандартом терапии РС, Неиммобилизованный ИФН бета-1а человека был получен в «Биокад» биосинтетическим путем с использованием технологии рекомбинантной ДНК, в культуре клеток яичника китайского хомячка. Серия: 100020812Р, срок годности — 1 год.

3. Исследование фармакодинамики (эффективности) ПЭГ ИФН бета-1а. Оценку фармакодинамической активности проводили по уровню неоптерина (как чувствительного и надежного маркера для мониторинга эффективности лечения ИФН бета-1а, аналогично определяемый в рамках проведения клинических исследований [8, 9]) в сыворотке крови приматов. Все процедуры выполняли в соответствии с инструкцией производителя использованной тест-системы («IBL», Германия).

На рисунке 1 показано, что при однократном подкожном и внутримышечном введениях препарата ПЭГ ИФН бета-1а, значения максимальной концентрации (C_{max}) и площади под кривой изменения концентрации во време-

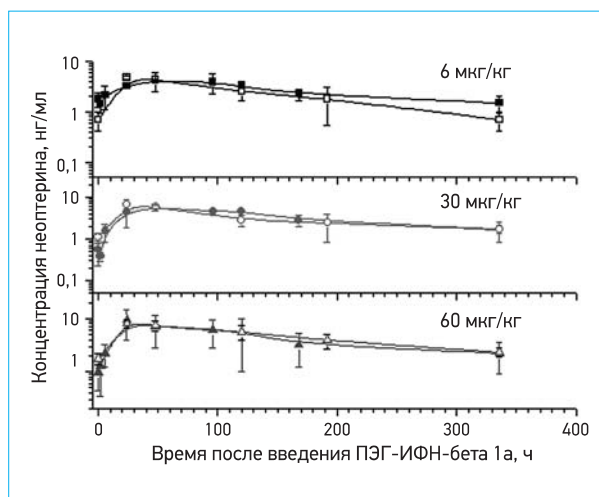


Рис. 1. Изменение концентрации неоптерина в сыворотке крови обезьян после однократного подкожного (закрытые символы) и внутримышечного введения (открытые символы) препарата ПЭГ ИФН бета-1а в различных дозах.

ни ($AUC_{(0-336)}$) для неоптерина были примерно одинаковы и увеличивались при повышении дозы.

4. Прижизненные манипуляции с животными. За животными наблюдали на протяжении 6 часов после введения препарата. Ежедневно проводился клинический ос-

Таблица 1. Дизайн исследований

Группа	Пол	Количество животных в группе	Препарат	Доза, МЕ/кг	Объем введения, мл	Режим введения
Однократное введение						
1	♂	3	ПЭГ ИФН бета-1а	0,3·10 ⁶	6	Подкожно
2	♂	3	ПЭГ ИФН бета-1а	1,5·10 ⁶	6	Подкожно
3	♀	3	ПЭГ ИФН бета-1а	3,0·10 ⁶	6	Подкожно
4	♂	3	ПЭГ ИФН бета-1а	0,3·10 ⁶	6	Внутримышечно
5	♂	3	ПЭГ ИФН бета-1а	1,5·10 ⁶	6	Внутримышечно
6	♀	3	ПЭГ ИФН бета-1а	3,0·10 ⁶	6	Внутримышечно
7	♂	3	ИФН бета-1а	1,5·10 ⁶	6	Подкожно
8	♀	3	ИФН бета-1а	3,0·10 ⁶	6	Внутримышечно
Многократные введения						
1	♀	2	Плацебо	0	6	1 раз в две недели, подкожно
2	♂	2	ПЭГ ИФН бета-1а	0,3·10 ⁶	6	1 раз в две недели, подкожно
3	♂	3	ПЭГ ИФН бета-1а	1,5·10 ⁶	6	1 раз в две недели, подкожно
4	♀	3	ПЭГ ИФН бета-1а	3,0·10 ⁶	6	1 раз в две недели, подкожно
5	♀	3	ИФН бета-1а	3,0·10 ⁶	6	1 раз в две недели, подкожно
6	♂	3	ПЭГ ИФН бета-1а	0,3·10 ⁶	6	1 раз в две недели, внутримышечно
7	♂	3	ПЭГ ИФН бета-1а	1,5·10 ⁶	6	1 раз в две недели, внутримышечно
8	♀	3	ПЭГ ИФН бета-1а	3,0·10 ⁶	6	1 раз в две недели, внутримышечно

мотор, обезьян взвешивали до введения препаратов и 1 раз каждые 2 недели в ходе эксперимента. В течение всего срока эксперимента во всех группах обезьян гибель животных не наблюдалась. Введение препарата ПЭГ ИФН бета-1а и немодифицированного препарата ИФН бета-1а не оказывало местно-раздражающего действия. При многократном подкожном и внутримышечном введении экспериментальным приматам исследуемого препарата в дозе $0,3 \cdot 10^6$ МЕ/кг, а также при внутримышечном введении в дозе $1,5 \cdot 10^6$ МЕ/кг клинических проявлений интоксикации не наблюдалось. Оценка общего состояния животных, получавших многократно препарат ПЭГ ИФН бета-1а и препарат, являющийся стандартом терапии РС, в максимальной дозе, показала развитие клинических симптомов интоксикации: снижение активности и контактности с экспериментатором, снижение аппетита, функциональные нарушения желудочно-кишечного тракта и потерю массы тела. Полученные результаты согласуются с данными применения немодифицированных препаратов ИФН бета-1а в клинике [10].

Результаты клинических лабораторных исследований (гематология, биохимия) и коагулометрии, полученные в течение всего срока эксперимента и представленные в таблице 2, свидетельствуют о том, что подкожное и внутримышечное введение препарата ПЭГ ИФН бета-1а не влияет на показатели гемостаза, количество эритроцитов, тромбоцитов, скорость оседания эритроцитов [11], но сопровождается незначимым снижением уровня гемоглобина, а при использовании максимальных доз и уровня сывороточного железа. Также установлено, что препарат ПЭГ ИФН бета-1а оказывает действие на сезонную динамику клеток белой крови, опосредуя более низкое значение, характеризующее увеличение числа лейкоцитов в сравнении с фоновыми показателями. Для оценки влияния многократного введения обоих исследуемых препаратов на свертывающую систему крови определяли показатели активированного частичного тромбопластинового времени, концентрации фибриногена и протромбинового времени. Все показатели находились в пределах нормальных значений.

Влияние на сердечно-сосудистую систему определяли по биохимическим показателям (активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ), аспартатаминотрансферазы (АСТ)) в сыворотке крови обезьян. Биоэлектрическую активность сердца исследовали с использованием кардиографа «Полли-Спектр» («Нейрософт», Россия). Применяли комбинацию из 6 стандартных дипольных отведений — трех нормальных (I, II, III) и трех усиленных (aVR, aVL, aVF). Электроды-зажимы размещали на локтевом сгибе (передние конечности) и на области сгибателя коленного сухожилия (задние конечности). На область кожи, куда помещали электрод, наносили гель электродный контактный. У животных сохранялся синусовый правильный ритм сердцебиения, признаков эктопических аритмий и электрокардиографических нарушений внутрисердечной проводимости не выявлено. Частота сердечных сокращений у всех животных находилась в пределах нормы.

Для оценки возможного повреждающего действия препарата ПЭГ ИФН бета-1а на печень проводили изучение биохимических показателей сыворотки крови, характеризующих белковую и ферментативную функции печени с помощью стандартных наборов реагентов на биохимическом анализаторе Humalyzer 3000 («Human GmbH», Германия). Многократное подкожное и внутримышечное введение исследуемого препарата во всех дозах и препарата,

являющегося стандартом терапии РС, в дозе $3,0 \cdot 10^6$ МЕ/кг не вызывало изменения содержания общего белка, билирубина и щелочной фосфатазы в сыворотке крови обезьян, однако сопровождалось изменением уровня трансаминаз при введении максимальных доз (наблюдалось повышение показателя АСТ и снижение уровня аланинаминотрансферазы (АЛТ)), что согласуется с данными применения немодифицированных препаратов ИФН бета-1а в клинических исследованиях [12].

Влияние на функцию мочевыделительной системы определяли по биохимическим показателям (мочевина, креатинин, концентрация Na, K) и общим анализом мочи (цвет/характер, pH, скрытую кровь, уробилиноген, глюкозу, билирубин, белок, кетоны, нитриты, лейкоциты). Образцы мочи анализировали на автоматическом анализаторе мочи DocUReader («77 Elektronika Kft.» Венгрия). Результаты исследований показали, что многократное подкожное и внутримышечное введение обоих препаратов не вызывает изменений уровней всех перечисленных показателей. В течение всего срока эксперимента показатели скорости диуреза и объема мочи у животных контрольной и экспериментальных групп не отличались. Таким образом, антидиуретическое действие исследуемого препарата и препарата, являющегося стандартом терапии РС, не установлено.

Оценку влияния препаратов на центральную нервную систему (ЦНС) проводили по поведенческим реакциям и эмоциональной активности животных: обращали внимание на возбудимость, реактивность, агрессивность, пугливость, двигательную, спонтанную и нервно-мышечную активность, рефлекс «позы» и способность сохранять неудобное положение тела.

5. Патоморфологические и гистологические исследования. На 12-й неделе эксперимента эвтаназии подвергли по одному животному из групп с дозой $3,0 \cdot 10^6$ МЕ/кг (немодифицированный препарат ИФН бета-1а, ПЭГ ИФН бета-1а подкожно, ПЭГ ИФН бета-1а внутримышечно) и группы контроль-плацебо. На 16 неделе — 8 животных по самке и самцу из групп, перечисленных выше. Эвтаназию осуществляли путем внутривенного введения препарата Листенон. Патоморфологическое исследование включало в себя некропсию, макроскопическое исследование, взвешивание и гистологическое исследование внутренних органов (срезы окрашивали стандартно — гематоксилином и эозином, исследовали световой микроскопией).

Результаты и обсуждение

Исходя из результатов исследований ФД, препарат ПЭГ ИФН бета-1а в эффективности не уступает препарату, являющемуся стандартом терапии РС, но превосходит его по длительности действия. Таким образом, активность нового препарата пролонгированного действия, оцененная по уровню неоптерина, характеризуется продолжительностью действия, в 6 раз превышающей продолжительность действия немодифицированного препарата.

Анализ данных гематологии показал, что подкожное и внутримышечное введение препарата ПЭГ ИФН бета-1а сопровождается проявлением функциональной активности исследуемого препарата, так как известно, что связывание интерферона со своим рецептором на поверхности клеток крови опосредует антипролиферативный эффект и сопровождается снижением общего количества лейкоцитов в периферической крови [13].

Таблица 2. Результаты гематологических и клинико-биохимических анализов крови

Сроки исследования	Контроль (плацебо)	ПЭГ-ИФН бета-1а, МЕ/кг						ИФН бета-1а, МЕ/кг
		п/к введение			в/м введение			
		0,3·10 ⁶	1,5·10 ⁶	3,0·10 ⁶	0,3·10 ⁶	1,5·10 ⁶	3,0·10 ⁶	3,0·10 ⁶
СОЭ, мм/ч								
Фон	4,8 ± 0,8	4,3 ± 1,9	6,8 ± 3,3	5,3 ± 1,2	4,7 ± 1,8	11,0 ± 7,0	4,3 ± 0,6	5,0 ± 0,7
6 нед	3,3 ± 1,1	3,0 ± 0,6	6,2 ± 1,0	3,3 ± 0,3	4,0 ± 0,6	3,3 ± 0,3	4,2 ± 0,4	3,5 ± 0,6
12 нед	3,8 ± 0,3	3,7 ± 0,3	3,2 ± 0,5	3,0 ± 0,0	3,3 ± 0,3	4,7 ± 0,9	2,3 ± 0,2	5,2 ± 0,8
16 нед	7,3 ± 1,8	6,7 ± 0,9	3,6 ± 0,2	4,0 ± 1,2	3,7 ± 0,9	4,3 ± 1,2	2,0 ± 0,8	3,8 ± 0,9
Эритроциты × 10 ¹² /л								
Фон	5,5 ± 0,4	5,7 ± 0,5	4,6 ± 0,4	5,0 ± 0,4	5,2 ± 0,5	5,2 ± 0,5	5,1 ± 0,4	5,2 ± 0,2
6 нед	5,2 ± 0,1	6,1 ± 0,1	5,4 ± 0,1	5,5 ± 0,1	5,4 ± 0,2	5,3 ± 0,2	5,0 ± 0,1	5,3 ± 0,2
12 нед	5,7 ± 0,3	6,1 ± 0,2	5,9 ± 0,1	5,4 ± 0,1	5,6 ± 0,1	5,6 ± 0,5	4,2 ± 0,2	5,4 ± 0,2
16 нед	5,5 ± 0,1	6,0 ± 0,1	5,6 ± 0,3	5,6 ± 0,1	5,6 ± 0,2	5,6 ± 0,1	4,3 ± 0,2	5,2 ± 0,2
Гемоглобин, г/л								
Фон	142,5 ± 4,3	158,7 ± 8,4	125,3 ± 25,6	138,7 ± 4,8	138,7 ± 11,0	143,3 ± 1,3	141,0 ± 7,0	138,0 ± 2,6
6 нед	133,3 ± 5,7	145,7 ± 3,7	117,3 ± 25,2	138,7 ± 3,7	130,3 ± 5,3	134,7 ± 2,4	118,5 ± 4,9*	129,7 ± 3,6
12 нед	146,8 ± 8,4	146,3 ± 5,2	115,7 ± 20,5	129,0 ± 3,0	134,3 ± 7,5	138,0 ± 12,9*	110,0 ± 11,7*	132,5 ± 6,3
16 нед	146,7 ± 1,5	141,0 ± 2,5	114,0 ± 14,7	131,0 ± 2,5	132,0 ± 9,3	135,3 ± 2,2	112,8 ± 11,8	121,4 ± 7,4
Количество лейкоцитов × 10 ⁹ /л								
Фон	6,7 ± 0,8	9,9 ± 2,1	8,5 ± 2,8	8,1 ± 0,6	11,8 ± 3,9	12,8 ± 2,6	10,6 ± 1,0	6,9 ± 0,6
6 нед	7,1 ± 0,3	8,4 ± 1,5	9,5 ± 2,9	7,3 ± 1,0	11,4 ± 2,2	8,7 ± 1,9	9,6 ± 1,4	6,4 ± 0,6
12 нед	9,6 ± 1,1	9,1 ± 0,2	12,3 ± 0,7	9,4 ± 0,9	10,4 ± 1,7	10,4 ± 3,2	9,4 ± 1,0	11,8 ± 2,4*
16 нед	7,3 ± 0,4	6,7 ± 1,3	9,3 ± 0,3	8,8 ± 1,7	10,6 ± 1,3	10,8 ± 2,0	8,9 ± 2,1	9,7 ± 0,8*
Количество нейтрофилов × 10 ⁹ /л								
Фон	46,8 ± 5,5	68,7 ± 6,4	63,7 ± 4,7	59,8 ± 5,3	53,7 ± 8,9	59,7 ± 8,0	61,7 ± 6,7	54,8 ± 4,8
6 нед	53,3 ± 2,1	56,7 ± 8,7	53,0 ± 11,4	45,8 ± 6,6	52,3 ± 8,8	58,3 ± 4,3	45,2 ± 10,6	38,3 ± 9,2
12 нед	50,8 ± 7,9	57,3 ± 7,7	54,3 ± 3,8	54,0 ± 2,2	55,3 ± 3,0	51,0 ± 3,6	45,0 ± 2,4	47,8 ± 6,6
16 нед	32,5 ± 13,7	57,3 ± 3,4	49,7 ± 4,9	40,2 ± 6,3	50,3 ± 9,8	44,3 ± 3,8	40,5 ± 12,5	51,2 ± 4,0
Количество лимфоцитов × 10 ⁹ /л								
Фон	38,5 ± 2,8	20,7 ± 3,9	26,0 ± 4,2	41,0 ± 8,8	33,0 ± 6,8	40,3 ± 4,8	27,3 ± 7,3	36,2 ± 5,3
6 нед	36,5 ± 2,8	32,0 ± 5,9	32,3 ± 5,0	45,8 ± 7,3	35,3 ± 9,9	42,7 ± 2,6	36,0 ± 8,7	38,8 ± 8,9
12 нед	39,3 ± 5,7	30,0 ± 9,7	35,7 ± 2,8	34,8 ± 3,2	31,0 ± 3,5	32,0 ± 3,2	29,7 ± 3,6	39,2 ± 6,0
16 нед	43,3 ± 8,3	27,3 ± 3,7	29,3 ± 1,7	50,0 ± 5,9	38,0 ± 7,5	32,0 ± 8,1	39,0 ± 9,5	40,4 ± 3,6
Количество моноцитов × 10 ⁹ /л								
Фон	10,0 ± 2,4	6,3 ± 1,3	7,0 ± 0,6	8,0 ± 1,9	6,3 ± 2,4	7,7 ± 2,0	7,0 ± 0,6	6,2 ± 1,8
6 нед	5,3 ± 1,1	7,7 ± 2,3	2,7 ± 0,3	4,8 ± 0,5	4,7 ± 1,2	5,7 ± 1,3	4,5 ± 1,1	5,0 ± 1,0
12 нед	5,0 ± 1,7	8,0 ± 3,5	4,3 ± 0,3*	6,7 ± 2,3	7,3 ± 2,0	8,7 ± 0,7	5,7 ± 1,5	6,8 ± 2,1
16 нед	6,0 ± 2,5	13,7 ± 0,9*	7,0 ± 2,5	8,0 ± 0,7	6,3 ± 2,3	5,7 ± 1,5	6,6 ± 1,5	4,0 ± 1,4
Количество эозинофилов × 10 ⁹ /л								
Фон	4,0 ± 2,1	3,3 ± 3,3	3,3 ± 0,9	0,5 ± 0,0	7,0 ± 0,4	1,0 ± 0,0	3,2 ± 0,8	2,3 ± 1,0
6 нед	4,8 ± 1,8	3,3 ± 2,3	4,3 ± 0,9	2,2 ± 0,2	7,3 ± 0,3	0,7 ± 0,0	3,7 ± 1,1	11,8 ± 9,7
12 нед	5,0 ± 2,1	4,7 ± 1,7	4,7 ± 0,7*	4,2 ± 1,0*	6,3 ± 1,2	0,7 ± 0,0	2,3 ± 0,7	1,0 ± 0,2
16 нед	6,7 ± 1,7	1,3 ± 0,3	10,0 ± 1,5	5,0 ± 2,0*	5,0 ± 0,6	2,7 ± 0,7	1,8 ± 0,4	3,0 ± 1,0
Количество базофилов × 10 ⁹ /л								
Фон	0,8 ± 0,5	0,7 ± 0,7	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,8 ± 0,2	0,5 ± 0,0
6 нед	0,3 ± 0,3	0,3 ± 0,4	1,0 ± 0,4	0,0 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,5 ± 0,3	0,3 ± 0,0
12 нед	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,5 ± 0,3	0,2 ± 0,0
16 нед	0,7 ± 0,7	0,0 ± 0,0	0,7 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,4 ± 0,4

Таблица 2 (окончание)

Сроки исследования	Контроль (плацебо)	ПЭГ-ИФН бета-1а, МЕ/кг						ИФН бета-1а, МЕ/кг
		п/к введение			в/м введение			
		0,3·10 ⁶	1,5·10 ⁶	3,0·10 ⁶	0,3·10 ⁶	1,5·10 ⁶	3,0·10 ⁶	
Железо, мкМ/л								
Фон	16,9 ± 4,4	28,5 ± 1,7	36,5 ± 14,9	28,1 ± 6,7	30,0 ± 11,7	17,2 ± 1,8	28,8 ± 5,6	20,3 ± 8,1
6 нед	24,9 ± 9,0	33,3 ± 4,1	27,7 ± 9,0	19,3 ± 6,2	30,1 ± 8,7	26,0 ± 3,4	16,9 ± 4,7	27,7 ± 6,1
12 нед	28,8 ± 4,2	32,0 ± 4,0	40,9 ± 11,5	24,3 ± 6,5	17,2 ± 7,7	29,2 ± 3,6*	15,6 ± 4,8	21,9 ± 4,5
16 нед	29,7 ± 3,0	40,5 ± 3,9	38,8 ± 12,1	27,5 ± 8,2	36,5 ± 10,4	35,5 ± 0,5	23,2 ± 7,8	40,4 ± 8,7
Аспаратаминотрансфераза, Е/л								
Фон	29,9 ± 5,5	40,7 ± 10,2	20,7 ± 9,5	45,0 ± 2,5	45,6 ± 4,6	40,4 ± 4,2	58,1 ± 7,8	33,9 ± 6,7
6 нед	27,9 ± 4,8	51,9 ± 11,7	35,1 ± 3,8	33,6 ± 3,7	28,6 ± 5,4	32,4 ± 7,7	39,9 ± 3,8	40,1 ± 6,8
12 нед	33,8 ± 3,2	49,4 ± 8,1	39,7 ± 1,1	33,8 ± 3,1	27,1 ± 1,3	36,2 ± 13,6	38,8 ± 4,3	46,8 ± 4,1
16 нед	49,0 ± 2,1	60,1 ± 17,5	45,2 ± 68,1	36,2 ± 3,6	41,4 ± 7,7	53,4 ± 4,5	64,8 ± 15,4	61,3 ± 3,8*
Аланинаминотрансфераза, Е/л								
Фон	8,1 ± 2,7	15,2 ± 1,1	9,5 ± 5,3	9,8 ± 1,1	15,9 ± 0,9	20,2 ± 2,9	10,4 ± 1,0	10,2 ± 3,7
6 нед	12,6 ± 4,4	13,4 ± 5,1	11,5 ± 4,6	8,2 ± 0,5	8,6 ± 2,0	11,2 ± 2,5	16,9 ± 4,7	17,1 ± 3,6
12 нед	11,3 ± 2,1	19,2 ± 3,9	16,0 ± 2,9	13,2 ± 1,7	12,3 ± 3,2	14,2 ± 2,9	15,6 ± 4,8	25,1 ± 9,2
16 нед	12,4 ± 3,5	15,9 ± 11,9	20,7 ± 4,4	17,0 ± 4,2	20,0 ± 2,2	31,3 ± 2,1	23,2 ± 7,8	31,0 ± 5,9*
Белок общий, г/л								
Фон	90,1 ± 6,1	78,3 ± 9,3	79,7 ± 8,0	90,6 ± 5,0	62,7 ± 0,1	76,4 ± 5,3	88,2 ± 4,1	77,8 ± 3,9
6 нед	82,7 ± 5,9	77,9 ± 11,7	73,2 ± 4,5	79,6 ± 3,5	76,0 ± 7,4	65,6 ± 5,8	80,0 ± 3,6	79,7 ± 3,2
12 нед	95,6 ± 3,2	78,9 ± 7,4	66,9 ± 1,8	76,3 ± 28	76,0 ± 6,5	71,2 ± 5,2	80,1 ± 3,7	78,7 ± 2,7
16 нед	89,8 ± 2,1	75,1 ± 8,7	65,5 ± 2,8	83,3 ± 4,2	75,0 ± 5,1	71,2 ± 2,6	73,4 ± 5,0	83,3 ± 4,7
Щелочная фосфатаза, Е/л								
Фон	186,0 ± 92,9	187,0 ± 103,9	200,6 ± 26,2	263,2 ± 50,2	203,0 ± 30,8	329,0 ± 57,4	270,8 ± 93,4	141,0 ± 29,2
6 нед	168,9 ± 52,1	169,2 ± 22,9	196,1 ± 25,7	138,1 ± 36,9	176,2 ± 33,9	324,3 ± 106,6	175,4 ± 64,5	148,2 ± 26,5
12 нед	124,6 ± 29,2	147,6 ± 34,6	112,2 ± 58,3	154,4 ± 43,8	126,4 ± 22,5	287,3 ± 89,7	201,4 ± 100,9	131,4 ± 17,6
16 нед	116,3 ± 25,7	134,8 ± 29,1	96,6 ± 38,3	162,3 ± 70,0	131,1 ± 20,4	452,0 ± 64,0	236,5 ± 97,2	136,5 ± 17,9
Билирубин общий, мкМ/л								
Фон	2,5 ± 0,6	8,0 ± 4,2	6,3 ± 1,9	9,4 ± 4,7	4,1 ± 2,4	3,5 ± 0,9	11,1 ± 3,6	5,6 ± 2,6
6 нед	0,9 ± 0,5	7,0 ± 3,3	3,1 ± 1,4	5,5 ± 3,2	5,2 ± 1,7	5,6 ± 1,6	4,4 ± 1,4	8,6 ± 4,0
12 нед	1,7 ± 0,4	7,1 ± 2,2	3,5 ± 1,5	7,2 ± 1,6	7,6 ± 2,8	4,6 ± 2,2	6,5 ± 2,6	10,7 ± 2,8
16 нед	0,3 ± 0,3	6,3 ± 3,8	4,7 ± 1,2	6,7 ± 2,2	8,7 ± 4,8	3,3 ± 0,3	3,5 ± 0,7	6,5 ± 1,2

* $p \leq 0,05$ по отношению к фоновому показателю.

Оценка сывороточных биохимических маркеров и общих анализов мочи показала, что многократное введение ПЭГ ИФН бета-1а во всех исследуемых дозах не влияет на белково-образующую функцию печени, липидно-углеводный обмен и работу мочевыделительной системы как при подкожном, так и при внутримышечном введении, что в равной степени справедливо для самок и самцов *M. mulatta*. Однако многократное подкожное и внутримышечное введение препарата ПЭГ ИФН бета-1а и ИФН бета-1а сопровождается изменением уровня анализируемых трансаминаз. Изменения носили дозозависимый характер, наиболее выраженный в группах приматов, получавших максимальную дозу. Отмечено, что немодифицированный препарат ИФН бета-1а в большей степени влиял на уровень оцениваемых трансаминаз при использованной схеме эксперимента.

Отсутствие электрокардиографических признаков нарушений биоэлектрической активности сердца и значимо-

го повышения уровня оцениваемых ферментов (ЛДГ, АСТ) в сыворотке крови приматов, получавших исследуемый препарат во всех дозах и способах введения, позволяет исключить его повреждающее действие на сердечно-сосудистую систему.

Многократное подкожное (в дозах 1,5·10⁶ МЕ/кг и 3,0·10⁶ МЕ/кг) и внутримышечное (в дозе 3,0·10⁶ МЕ/кг) введения исследуемого препарата сопровождалось снижением активности и контактности с экспериментатором.

Данные макроскопического и гистологического исследований позволяют сделать заключение, что многократное введение препарата ПЭГ ИФН бета-1а и немодифицированного препарата не вызывает дистрофических, деструктивных, очаговых склеротических изменений в паренхиматозных тканях и строме изучаемых органов.

Разработанный компанией «Биокад» препарат ПЭГ ИФН бета-1а для лечения РС обладает более продолжительным действием и сопоставимым уровнем безопасно-

сти в сравнении с немодифицированным препаратом, что позволит сделать его применения более удобным для пациентов.

Выводы

1. ПЭГ ИФН бета-1а в дозе, эквивалентной терапевтической дозе немодифицированного ИФН бета-1а для человека, столь же эффективен, как и препарат, являющийся стандартом терапии РС, но превосходит таковой по длительности действия.
2. Установлено, что ПЭГ ИФН бета-1а при подкожном и внутримышечном введении в дозе $0,3 \cdot 10^6$ МЕ/кг не оказывает токсического воздействия на организм экспериментальных животных.

Литература

1. Limmroth V, Putzki N, Kachuck NJ. The interferon beta therapies for treatment of relapsing remitting multiple sclerosis: are they equally efficacious? A comparative review of open label studies evaluating the efficacy, safety, or dosing of different interferon beta formulations alone or in combination. *Ther Adv Neurol Disord.* 2011; 4(5): 281–96.
2. Walther EU, Hohlfeld R. Multiple sclerosis: side effects of interferon therapy and their management. *Neurology* 1999; 53: 1622–7.
3. ГОСТ Р 53434–2009. Принципы надлежащей лабораторной практики.
4. Об утверждении Правил лабораторной практики. Приказ Министерства здравоохранения и социального развития РФ № 708н от 23 августа 2010 г.
5. Миронов АН, ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. М.: Гриф и К; 2012.
6. Draft consensus guideline Addendum to ICH S6 — Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals; 2009.
7. ICH S6 — Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals; 1997.
8. Rejdak K, Leary SM, Stelmasiak Z, et al. Urinary nitric oxide metabolites and neopterin as markers of longitudinal interferon beta-1a treatment in primary progressive multiple sclerosis patients. *Journal of the neurological sciences* 2005; 238: 244.
9. Bagnato F, Durastanti V, Finamore L, Volante G, Millefiorini E. Beta-2 microglobulin and neopterin as markers of disease activity in multiple sclerosis. *Neurol Sci* 2003; 24: 301–4.
10. Matson MA, Zimmerman TR, Tuccillo D, Tang Y, Deykin A. Dose titration of intramuscular interferon beta-1a reduces the severity and incidence of flu-like symptoms during treatment. *Curr Med Res Opin.* 2011; 27(12): 2271–8.
11. Куксова МИ. Кроветворная система обезьян в норме и патологии. М.: Медицина; 1972.
12. Tremlett HL, Oger J. Elevated aminotransferases during treatment with interferon-beta for multiple sclerosis: actions and outcomes. *Mult Scler.* 2004; 10: 298–301.
13. Kamphuis E, Junt T, Waibler Z, Forster R, Kalinke U. Type I interferons directly regulate lymphocyte recirculation and cause transient blood lymphopenia. *Blood* 2006; 108: 3253–61.

Об авторах

ЗАО «Биокад», Отдел экспериментальной биологии. Российская Федерация, 142380, Московская область, Чеховский район, п. Любучаны.

Спирина Наталья Александровна. Научный сотрудник.

Устюгов Яков Юрьевич. Руководитель отдела.

Александров Алексей Александрович. Старший научный сотрудник.

Артюхова Марина Владимировна. Научный сотрудник.

Научно-исследовательский институт экспериментальной патологии и терапии Академии наук Абхазии, Республика Абхазия, г. Сухум, гора Трапезия.

Джелія А. Б. Младший научный сотрудник

Адрес для переписки: Спирина Наталья Александровна; spirina@biocad.ru

Efficacy and safety of the new drug against multiple sclerosis «PEGylated Interferon beta-1a Human» in monkeys compared with unmodified interferon beta-1a

N. A. Spirina¹, Ja. Ju. Ustjugov¹, A. A. Aleksandrov¹, M. V. Artjuhova¹, A. B. Dzhelija²

¹ CJSC "BIOCAD", Lyubuchany village, Chekhov district, Moscow region, Russia

² Research Institute of Experimental Pathology and Therapy, Academy of Sciences of Abkhazia, the Republic of Abkhazia, Sukhum, Trapecija Mountain

The article presents the results of studies on the safety and efficacy of long-acting drug for the treatment of multiple sclerosis on the basis of recombinant human interferon beta-1a «PEGylated interferon beta-1a Human» (PEG IFN beta-1a) in monkeys *Macaca mulatta* in subcutaneous and intramuscular injection. The following doses were used: the maximum tolerated dose — $3.0 \cdot 10^6$ IU/kg, the intermediate dose — $1.5 \cdot 10^6$ IU/kg and the minimum dose, which was equivalent to human therapeutic dose of unmodified interferon beta-1a — $0.3 \cdot 10^6$ IU/kg. Quantify the parameters of pharmacodynamics of the PEG IFN beta-1a after single subcutaneous and intramuscular administration of increasing doses of different groups of monkeys. Evaluated the level and nature of the pathological changes of internal organs (visceral systems) of experimental animals caused by repeated subcutaneous and intramuscular injections of PEG IFN-beta 1a. Based on these studies the drug PEG IFN beta-1a in rhesus monkeys indicated that the drug is efficient (both in single subcutaneous and intramuscular administration) and does not have toxic effects (both in multiple subcutaneous and intramuscular administration) when using a therapeutic dose $0.3 \cdot 10^6$ IU/kg.

Keywords: interferon beta-1a; PEGylated interferon beta-1a; multiple sclerosis; pharmacodynamics; safety; efficiency; toxicity.

For citation: Spirina NA, Ustjugov JaJu, Aleksandrov AA, Artjuhova MV, Dzhelija AB. Efficacy and safety of the new drug against multiple sclerosis «PEGylated Interferon beta-1a Human» in monkeys compared with unmodified interferon beta-1a. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2016; 16 (2): 108–114.

References

1. Limmroth V, Putzki N, Kachuck NJ. The interferon beta therapies for treatment of relapsing remitting multiple sclerosis: are they equally efficacious? A comparative review of open label studies evaluating the efficacy, safety, or dosing of different interferon beta formulations alone or in combination. *Ther Adv Neurol Disord.* 2011; 4(5): 281–96.
2. Walther EU, Hohlfeld R. Multiple sclerosis: side effects of interferon therapy and their management. *Neurology* 1999; 53: 1622–7.
3. State Standard P 53434 – 2009. Principles of Good Laboratory Practice (in Russian).
4. On approval of the Rules of laboratory practices. Order of the Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation dated August 23, 2010, № 708n (in Russian).
5. Mironov AN, ed. Guidelines for conducting pre-clinical trials of medicinal products. Moscow: Grif i K; 2012 (in Russian).
6. Draft consensus guideline Addendum to ICH S6 — Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals; 2009.
7. ICH S6 — Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals; 1997.
8. Rejdak K, Leary SM, Stelmasiak Z, et al. Urinary nitric oxide metabolites and neopterin as markers of longitudinal interferon beta-1a treatment in primary progressive multiple sclerosis patients. *Journal of the neurological sciences* 2005; 238: 244.
9. Bagnato F, Durastanti V, Finamore L, Volante G, Millefiorini E. Beta-2 microglobulin and neopterin as markers of disease activity in multiple sclerosis. *Neurol Sci* 2003; 24: 301–4.
10. Matson MA, Zimmerman TR, Tuccillo D, Tang Y, Deykin A. Dose titration of intramuscular interferon beta-1a reduces the severity and incidence of flu-like symptoms during treatment. *Curr Med Res Opin.* 2011; 27(12): 2271–8.
11. Kuksova MI. Hematopoietic system of monkeys in health and disease. Moscow: Meditsina; 1972 (in Russian).
12. Tremlett HL, Oger J. Elevated aminotransferases during treatment with interferon-beta for multiple sclerosis: actions and outcomes. *Mult Scler.* 2004; 10: 298–301.
13. Kamphuis E, Junt T, Waibler Z, Forster R, Kalinke U. Type I interferons directly regulate lymphocyte recirculation and cause transient blood lymphopenia. *Blood* 2006, 108: 3253–61.

Authors

CJSC «BIOCAD», Experimental Biology Department, Lyubuchany village, Chekhov district, Moscow region, 142380, Russian Federation.

Spirina NA. Researcher.

Ustjugov JaJu. Head of Department.

Aleksandrov AA. Senior Researcher.

Artjuhova MV. Researcher.

Research Institute of Experimental Pathology and Therapy, Academy of Sciences of Abkhazia, the Republic of Abkhazia, Sukhum, Trapecija Mountain.

Dzhelija AB. Junior Researcher.