

На правах рукописи



Джайн Екатерина Александровна

**Стандартизация и фармакологическое изучение оригинального нуклеозидного
ингибитора обратной транскриптазы ВИЧ-1 – VMU-2012-05**

3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата фармацевтических наук

Москва – 2024

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Научный руководитель:

доктор фармацевтических наук, доцент

Балабаньян Вадим Юрьевич

Официальные оппоненты:

Куркин Денис Владимирович – доктор фармацевтических наук, доцент, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет медицины» Министерства здравоохранения Российской Федерации, научно-образовательный институт фармации им. К.М. Лакина, директор

Лякина Марина Николаевна – доктор фармацевтических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Институт фармакопеи и стандартизации в сфере обращения лекарственных средств, консультант

Ведущая организация: федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы»

Защита диссертации состоится «28» мая 2024 г. в 12.00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.001.20 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной научной библиотеке при ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, Zubovskiy bulvar, d. 37/1 и на сайте организации: <https://www.sechenov.ru>.

Автореферат разослан « _____ » _____ 2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор



Дроздов Владимир Николаевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) является этиологическим агентом одного из широко распространенных и наиболее опасных для жизни человека заболеваний – синдрома приобретенного иммунодефицита (СПИД). По данным объединенной программы ООН по ВИЧ/СПИДу (UNAIDS) в конце 2021 г. в мире насчитывалось около 38,4 (33,9 - 43,8) миллионов ВИЧ-инфицированных, из которых ~75% получали антиретровирусную терапию (в России ~84%). Согласно данным Федерального научно-методического Центра по профилактике и борьбе со СПИДом на 31 декабря 2021 г. в России проживало 1 137 596 граждан с лабораторно подтвержденным диагнозом ВИЧ-инфекции. В соответствии с данными Европейского центра профилактики и контроля заболеваний новые случаи инфицирования в Российской Федерации составили 55% всех случаев в Европейском регионе ВОЗ и 70% случаев, зарегистрированных на востоке (HIV/AIDS surveillance in Europe 2022-2021 data, 2022).

Оптимальным методом лечения ВИЧ-инфекции является высокоактивная антиретровирусная терапия, подразумевающая одновременное использование нескольких лекарственных препаратов с различными механизмами действия: нуклеозидный ингибитор обратной транскриптазы (НИОТ) ВИЧ в сочетании с ненуклеозидными ингибиторами обратной транскриптазы (ННИОТ) ВИЧ и/или ингибиторами других классов (Rosas M. et al., 2022).

Однако применение большинства антиретровирусных препаратов имеет ограничения, главными из которых являются образование в процессе терапии устойчивых форм вируса, что делает необходимой постоянную смену препаратов, и сопутствующие побочные эффекты, в ряде случаев приводящие к преждевременной отмене терапии (Shin Y. H. et al., 2021). Таким образом, поиск новых соединений, обладающих анти-ВИЧ активностью как в отношении дикого штамма ВИЧ-1, так и в отношении резистентных изолятов штаммов вируса, с целью создания лекарственных анти-ВИЧ препаратов представляет крайне важную и перспективную проблему современной вирусологии и медицинской химии.

Степень разработанности темы исследования

В результате многолетних исследований, проведенных на кафедре фармацевтической и токсикологической химии ФГБОУ ВО ВолГМУ Минздрава России в сотрудничестве с учеными Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН был выявлен новый класс ненуклеозидных ингибиторов вирусной репродукции, обладающих способностью подавлять репродукцию ВИЧ-1 *in vitro* в наномолярном диапазоне концентраций, – пиримидиновые производные бензофенона (Novikov M. S. et al., 2011). Новизна полученных

высокоактивных анти-ВИЧ-1 соединений подтверждена патентом РФ на изобретение № 2489427 (бюллетень № 22, 2013). Проведенные пилотные исследования показали, что соединения данного класса способны подавлять активность ОТ (обратной транскриптазы) как дикого штамма ВИЧ-1, так и некоторых исследованных мутантных форм (L100I, K103N, Y181C, Y188L, G190A, K103N/Y181C) (Geisman A. N. et al., 2016).

В ходе оптимизации химической структуры пиримидиновых производных бензофенона было синтезировано соединение-лидер – VMU-2012-05 (Озеров А. А. и др., 2012), что позволило инициировать разработку технологии получения субстанции, исследования по стандартизации и доклиническому изучению субстанции VMU-2012-05 и готового лекарственного средства (ЛС) на ее основе.

Цель и задачи исследования

Целью настоящей работы явилась стандартизация, изучение фармакодинамики и токсичности субстанции VMU-2012-05 и готового лекарственного средства на ее основе.

Задачи исследования:

1. Провести комплексное изучение структуры и физико-химических свойств субстанции VMU-2012-05.
2. Разработать проект спецификации и методы контроля качества на субстанцию VMU-2012-05.
3. Изучить ингибиторную активность субстанции VMU-2012-05 в отношении обратной транскриптазы ВИЧ-1 дикого типа и ряда ее мутантных форм.
4. Исследовать антиретровирусную активность субстанции VMU-2012-05 на культурах клеток, инфицированных диким и мутантным штаммами ВИЧ-1.
5. Определить параметры токсичности субстанции VMU-2012-05 и готового лекарственного средства (ЛС) на ее основе при однократном и многократном введениях экспериментальным животным.
6. Изучить потенциальную генотоксичность субстанции VMU-2012-05 в тестах по учету микроядер и ДНК-комет *in vivo*.

Научная новизна

Установлены параметры, определяющие эффективность, безопасность и качество субстанции VMU-2012-05.

Разработаны методы контроля качества и проект спецификации на субстанцию VMU-2012-05.

Изучен механизм действия субстанции VMU-2012-05. Показано, что соединение является ингибитором обратной транскриптазы ВИЧ-1 как дикого типа, так и ряда ее мутантных форм.

Установлена антиретровирусная активность субстанции VMU-2012-05 на культурах клеток, инфицированных диким и мутантным штаммом ВИЧ-1. В отличие от препарата сравнения эфавиренз, субстанция VMU-2012-05 способна полностью подавлять репродукцию ВИЧ-1_{RES}, резистентного к препаратам класса ННИОТ.

Определены параметры токсичности субстанции VMU-2012-05 и ЛС на ее основе при однократном и многократном пероральном введениях на грызунах (мыши, крысы) и не грызунах (кролики). Субстанция была отнесена к 4-му классу малотоксичных веществ по классификации Hodge и Sterner (ЛД₅₀ 500-5000 мг/кг при однократном в/ж введении), к 3-му классу умеренно токсичных веществ по ГОСТ 12.1.007–76 (ЛД₅₀ 151-5000 мг/кг при в/ж введении) и к 5-му классу опасности по классификации GHS OECD (ЛД₅₀ в/ж >2000 мг/кг). Установлен уровень доз, не вызывающих нежелательных эффектов (NOAEL), который для крыс составил 9 мг/кг (1 ВТД), для кроликов – 4 мг/кг (1 ВТД).

Установлено, что субстанция VMU-2012-05 не обладает генотоксичностью.

Теоретическая и практическая значимость работы

Показана принципиальная возможность создания оригинальных ингибиторов ОТ на основе пиримидиновых производных бензофенонов. Проведено комплексное фармацевтическое и фармакологическое изучение субстанции оригинального ННИОТ ВИЧ-1 из группы производных бензофенона и ЛС на ее основе. Установленные параметры противовирусной активности и благоприятный профиль безопасности позволяют рассматривать исследуемую субстанцию в качестве перспективного лекарственного кандидата для создания антиретровирусного препарата.

Полученные в результате настоящей работы данные вошли в состав регистрационного досье на оригинальный отечественный препарат для лечения ВИЧ-инфекции (акт внедрения № 15 от 20.05.2022).

Методология и методы исследования

Объектом исследования явилась субстанция VMU-2012-05 (1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил).

Методология включала изучение физико-химических характеристик субстанции, разработку подходов к стандартизации и установление показателей качества, определение специфической фармакологической активности и механизма действия, а также оценку профиля безопасности субстанции и лекарственного средства.

В ходе исследования использовали современные инструментальные физико-химические методы анализа свойств субстанции. Антиретровирусная активность субстанции оценивалась радио-лигандным методом. Также в работе использовали биохимические, фармакологические методы и методы, применяемые в токсикологических исследованиях.

Положения, выносимые на защиту

1. Параметры, определяющие качество субстанции VMU-2012-05.
2. Субстанция VMU-2012-05 является ингибитором обратной транскриптазы ВИЧ-1 дикого типа и ряда ее мутантных форм.
3. Субстанция VMU-2012-05 проявляет антиретровирусную активность на культурах клеток, инфицированных диким и мутантным штаммами ВИЧ-1.
4. Субстанция VMU-2012-05 и готовое лекарственное средство на ее основе обладают благоприятным профилем безопасности при однократном и многократном введениях экспериментальным животным.
5. Субстанция VMU-2012-05 не обладает генотоксичностью в тестах по учету микроядер и ДНК-комет *in vivo*.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертационная работа соответствует паспорту научной специальности 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология – пункты паспорта специальности 3, 5, 6 и 7, а также паспорту научной специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия – пункты паспорта специальности 2 и 3

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов обоснована использованием достаточного числа повторностей и контролей, использованием современных методов исследований, а также статистической обработкой данных.

Основные результаты диссертационной работы были представлены на 5 международных и российских конференциях: Student Conference Life Sciences in the 21st Century: Looking into the Future (Москва, 2018), XXV Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2018» (Москва, 2018), VIII Всероссийская научная конференция студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» (Санкт-Петербург, 2018), VII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Перспективы внедрения инновационных технологий в медицине и фармации» (Орехово-Зуево, 2020), XXVII Российский национальный конгресс «Человек и лекарство» (Москва, 2020).

Результаты работы вошли в состав регистрационного досье на оригинальный отечественный НИИОТ для лечения ВИЧ-инфекции. Работа была выполнена в рамках Государственного контракта Министерства образования и науки Российской Федерации на выполнение прикладных научных исследований № 14.N08.11.0154 от 02.06.2017 «Доклинические исследования лекарственного средства на основе пиримидинового производного бензофенона для лечения ВИЧ-1 инфекции».

Апробация диссертации была проведена на расширенном заседании кафедр фармакологии и фармацевтической химии и организации фармацевтического дела МГУ им. М.В. Ломоносова (протокол № 6 от 20.09.2023).

Личный вклад автора

Автором был самостоятельно проведен обзор актуальной литературы, составлены планы исследований, определены цели и задачи работы, при личном участии проведена основная часть экспериментальных работ, представленных в диссертации, проанализированы и обобщены полученные результаты, сформулированы выводы и подготовлены публикации. Вклад автора является определяющим и заключается в непосредственном участии на всех этапах исследования. Изучение механизма действия исследуемой субстанции проводилось в сотрудничестве с лабораторией молекулярных основ действия физиологически активных соединений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук. Исследование на культуре клеток, инфицированных ВИЧ, проводилось в сотрудничестве с Федеральным бюджетным учреждением науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор») Роспотребнадзора. Выполнение токсикологических исследований проводилось в сотрудничестве с отделом лекарственной токсикологии АО «НПО «Дом Фармации».

Публикации по теме диссертации

По результатам диссертационной работы опубликовано 11 печатных научных работ, из которых 2 научные статьи в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий Сеченовского Университета/Перечень ВАК при Минобрнауки России, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук; 5 статей в изданиях, индексируемых в международных базах Web of Science, Scopus, PubMed; 4 публикации в сборниках материалов всероссийских научных конференций, в том числе с международным участием.

Структура и объем работы

Диссертационная работа изложена на 237 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы и экспериментальной части, включающей описание материалов и методов исследования, результаты исследований и их обсуждение, а также выводов, заключения, списка литературы и приложений. Работа включает 53 таблицы и 48 рисунков. Список литературы содержит 283 источника, из них 211 на иностранном языке.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объект исследования

Исследования были проведены на образцах субстанции, предоставленных профессором Озеровым А.А., д.х.н, заведующим кафедрой фармацевтической и токсикологической химии ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России, а также на опытно-промышленных образцах субстанции, предоставленных АО НПО «Дом Фармации».

Наименование по IUPAC: 1-[2-(2-Бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил. Шифр субстанции: VMU-2012-05. Соединение относится к химическому классу арилоксиалкильных производных нуклеиновых оснований.

Относительная пространственная структура соединения представлена на рисунке 1:

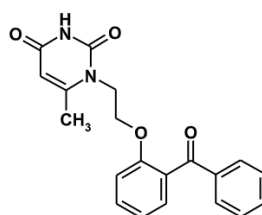


Рисунок 1 - Относительная пространственная структура соединения

Брутто-формула: $C_{20}H_{18}N_2O_4$. Молекулярная масса: 350,368 г/моль.

Фармацевтическая субстанция «VMU-2012-05» (далее – VMU-2012-05) представляет собой кристаллический порошок от кремового до светло-коричневого цвета. Практически нерастворим в воде, этаноле, гексане, очень мало растворим в метаноле, мало растворим в хлороформе. Готовое лекарственное средство на основе субстанции 1-[2-(2-Бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил - таблетки для приема внутрь, 50 мг. Образцы таблеток предоставлены АО НПО «Дом Фармации».

<u>Состав на одну таблетку</u>	
<i>Действующее вещество:</i>	
1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил	50,0 мг
<i>Вспомогательные вещества:</i>	
Повидон (USP, Ph. Eur.)	200,0 мг
Лактозы моногидрат (USP, Ph. Eur.)	59,0 мг
Целлюлоза микрокристаллическая (USP, Ph. Eur.)	29,0 мг
Кросповидон (USP, Ph. Eur.)	40,0 мг
Карбоксиметилкрахмал натрия (USP, Ph. Eur.)	16,0 мг
Кремния диоксид коллоидный безводный (USP, Ph. Eur.)	4,0 мг
Магния стеарат (USP, Ph. Eur.)	2,0 мг
Масса таблетки:	400,0 мг

Методы исследования

Подтверждение структуры и характеристика субстанции VMU-2012-05.

Спектроскопию ядерного магнитного резонанса (ЯМР) проводили на ЯМР-спектрометре Bruker Avance-IIIHD 500 (Bruker, Германия), рабочая частота ^1H 500.13Mhz, ^{13}C 125.76Mhz с азотным криодатчиком Bruker Prodigy. Для подтверждения строения углеродного скелета регистрировали спектры ^{13}C в фазочувствительном варианте JMOD (CH_3 , CH – сигналы с отрицательными фазами, CH_2 , C – сигналы с положительными фазами).

Для высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС) использовали систему, состоящую из жидкостного хроматографа Dionex Ultimate 3200 (Thermo Fisher Scientific, США) и тройного квадрупольного масс-спектрометра ABSciex Qtrap 3200 (AB SCIEX, США), оснащенного электрораспылительной ионизацией. Хроматографическое разделение проводили на колонке Acclaim RSLC (150×2.1 мм, 3 мкм). В качестве подвижной фазы использовали смесь 0.1% муравьиной кислоты в воде (А) и ацетонитрил (Б). Разделение проводили при скорости потока 0.4 мл/мин в изократическом режиме при соотношении растворителей А:Б = 60:40. Масс-спектрометрическое (МС) детектирование проводили в режиме регистрации положительно заряженных ионов в диапазоне M/z от 80 до 1700 Да. Температура колонки составила 35°C. Объем ввода пробы 20 мкл.

Регистрацию спектра в средней инфракрасной области проводили на ИК-Фурье спектрометре Vertex 70 (Bruker Optik GmbH, Германия), используя технику прессования в таблетку с KBr. Диапазон регистрации спектра: 4000–400 cm^{-1} , разрешение 2 cm^{-1} , число сканирований фона и образца — 128, апертура пучка 4 мм, аподизирующая функция Blackman-Harris 3-Term, фазовое разрешение 4, фазовая коррекция Mertz, фактор заполнения интерферограммы нулями 2.

Рентгенодифракционное исследование соединения VMU-2012-05 проводили на дифрактометре Bruker APEX II (Bruker, Германия) $\text{MoK}\alpha$ -излучение, графитовый монохроматор, ω -сканирование. Структуры расшифрованы прямым методом и уточнены методом наименьших квадратов в анизотропном полноматричном приближении по F^2_{hk} . Атомы водорода рассчитаны геометрически и уточнены с наложением ограничений на длины связей C-H и их изотропные параметры смещений.

Высокоэффективную жидкостную хроматографию с ультрафиолетовым детектированием (ВЭЖХ-УФ) проводили на хроматографе высокого давления LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония) с диодно-матричным детектором и колонкой Luna C₁₈ (2) 4,6x150 мм (размер частиц сорбента 5 мкм) (Phenomenex Inc., США) с предколонкой размером 3,0 мм, заполненной тем же сорбентом. В качестве подвижной фазы А использовали 0,03%

раствор трифторуксусной кислоты, качестве подвижной фазы Б - ацетонитрил для жидкостной хроматографии. Скорость потока - 1,0 мл/мин, температура колонки - комнатная, УФ детекцию проводили при длине волны 254 нм. Объем вводимой пробы - 20 мкл, Время хроматографирования - 20 мин.

Проект спецификации на субстанцию VMU-2012-05 разрабатывали по показателям «описание», «растворимость», «подлинность», «температура плавления», «родственные примеси», «сульфатная зола», «тяжелые металлы», «потеря в массе при высушивании», «остаточные органические растворители», «микробиологическая чистота», «количественное определение», «упаковка», «маркировка», «хранение», «срок годности». Устанавливали соответствие параметров субстанции требованиям проекта спецификации.

Определение ингибирующей активности VMU-2012-05 в отношении обратной транскриптазы ВИЧ дикого типа и ее мутантных форм.

Для экспрессии гетеродимера дикого типа обратной транскриптазы ВИЧ-1 использовались клетки *E.coli* штамма M15[pRep4] (Qiagen, Германия), которые трансформировали плазмидой рbHRT-PROT. Мутантные формы белка с аминокислотными заменами L100I, K103N, V106A, Y181C, G190A были получены с помощью сайт-специфического мутагенеза, так как они широко представлены у пациентов с устойчивостью ННИОТ. В отличие от экспрессии ОТ ВИЧ-1 дикого типа для экспрессии мутантных форм обратной транскриптазы ВИЧ-1 использовались клетки *E.coli* штамма Rosetta(DE3) (Qiagen, Германия), трансформированные целевыми плазмидами. Проводили выделение обратной транскриптазы ВИЧ-1, очистку и определение концентрации и чистоты фермента.

Ингибирующую активность VMU-2012-05 в отношении обратной транскриптазы ВИЧ-1 дикого типа изучали в диапазоне концентраций от 0,05 – 1 мкМ, в отношении ее мутантных форм – в диапазоне концентраций от 0,1 – 20 мкМ. В качестве положительного контроля была использована субстанция препарата эфавиренз (Merck, Германия).

Определение активности ОТ ВИЧ-1 проводили в системе, основанной на «активированной» дезоксирибонуклеиновой кислоте (ДНК), которая получается в результате расщепления ДНК неспецифическими нуклеазами. Активированная ДНК представляет собой спектр различных праймер-матричных комплексов 30-300 п.н. длиной. В данной системе активность ОТ определялась на основе включения в полинуклеотиды радиоактивно-меченного [α - 32 P]dAMP. Отделение меченых продуктов реакции от невключенного [α - 32 P]dAMP проводили осаждением длинных олиго- и полинуклеотидов на анионообменных целлюлозных фильтрах Whatmann DE81 и отмывкой 10% и 5% растворами трихлоруксусной кислоты. Количественное измерение радиоактивности (включенного в ДНК [32 P]-меченного нуклеотида) проводили измерением сорбированной радиоактивности в сцинтилляторе Ultima Gold

(PerkinElmer, США) в счетчике Tri-Carb Liquid Scintillation Analyzer (PerkinElmer, США). Константу ингибирования для субстанции определяли по методу Диксона, то есть на основании зависимости обратной скорости ферментативной реакции в присутствии ингибитора от его концентрации. Анализ полученных констант в случае мутантных форм ОТ ВИЧ-1 с константой ингибирования вещества в отношении фермента дикого типа было выполнено программой StatPlus (Ванкувер, Канада) при помощи критерия Стьюдента.

Изучение антиретровирусной активности VMU-2012-05 на культуре клеток, инфицированных диким и мутантным штаммами ВИЧ-1.

Для исследования противовирусного действия субстанции в отношении дикого штамма ВИЧ-1 клетки МТ-4 инфицировали штаммом ВИЧ-1 субтипа А из лабораторной коллекции ФБУН ГНЦ ВБ Вектор.

Для исследования противовирусного действия субстанции в отношении штамма ВИЧ, резистентного к ННИОТ, использовали первичные клетки периферической крови человека (МПК здоровых доноров), инфицированные мутантным штаммом ВИЧ-1_{RES}. Данный штамм ВИЧ-1 (депонирован в коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора) содержит в области гена *pol* следующий набор мутаций: L74V, M184V, K103N и N221Y. Указанные мутации наиболее часто возникают при приеме антиретровирусных препаратов.

Противовирусную активность соединений оценивали после 5 суток (для дикого штамма ВИЧ-1 субтипа А) и 11 суток (для мутантного штамма ВИЧ-1_{RES}) инкубирования двумя методами: колориметрическим тестом для оценки метаболической активности клеток (МТТ-тест) и иммуноферментным анализом (ИФА). В первом случае оценивали концентрации живых клеток, не разрушенных ВИЧ-1, в присутствии вируса и исследуемых соединений. По результату определения концентрации живых клеток в экспериментальных лунках (с добавлением препаратов) и в контрольных лунках, содержащих культуру клеток МТ-4, инфицированную ВИЧ-1 по литическому типу, определяли 50% противовирусную активность препарата IC₅₀ (концентрация препарата, при которой ингибируется размножение ВИЧ-1 и защищены от ВИЧ остаются 50% клеток). Методом ИФА определяли способность субстанций блокировать размножение ВИЧ по степени снижения репродукции вирусного белка p24 в культуральной жидкости. Для количественного определения белка p24 ВИЧ-1 использовали иммуноферментные наборы Вектор ВИЧ-1 p24-антиген-подтверждающий тест производства ЗАО ВекторБест. Данные оптической плотности для каждого разведения субстанций (540-690 нм) в тесте «токсичность» или «противовирусная активность» вводили в программу, которая строит графики зависимости оптической плотности раствора от концентрации соединений с использованием 4-параметрового алгоритма. Одновременно программа автоматически

рассчитывает значение CC_{50} или IC_{50} при условии, если кривая зависимости получается S-образной формы.

Доклинические токсикологические исследования субстанции VMU-2012-05 и ЛС на ее основе.

Планирование и проведение всей работы осуществлялось в соответствии с требованиями МЗ РФ и международными стандартами в области доклинического изучения безопасности новых фармакологических средств – системы GLP (Good Laboratory Practice) (ГОСТ 33044-2014; Решение от 03.11.2016 № 81).

Определение параметров токсичности субстанции VMU-2012-05 и ЛС на ее основе проводили при однократном и многократном внутрижелудочном введении на нескольких видах лабораторных животных (мыши, крысы, кролики) в соответствии с требованиями действующих регуляторных документов (Руководство..., Ч. 1, 2012; OECD № 420, 17.12.2001) и принципами биоэтики, изучение генотоксичности ЛС проводили в тестах по учету микроядер (OECD № 474, 29.07.2016) и ДНК-комет *in vivo* (OECD № 489, 29.07.2016).

С учетом коэффициентов межвидового пересчета доз, ВТД для крысы составило 9 мг/кг, для кролика – 4 мг/кг. В исследовании токсичности при многократном введении тестируемый объект вводили крысам внутрижелудочно в трех дозах: 9 мг/кг (1 ВТД), 45 мг/кг (5 ВТД), 90 мг/кг (10 ВТД). Кроликам препарат вводили перорально в дозах 4 мг/кг (1 ВТД), 20 мг/кг (5 ВТД), 40 мг/кг (10 ВТД). Период введения крысам составил 90 дней, кроликам – 28 дней. На 91-й день эксперимента (крысы) или на 29-й день (кролики) эвтаназии в CO_2 -камере подвергали 50% животных каждой группы (основные группы), эвтаназию оставшихся животных проводили через 30 дней отсроченного наблюдения (группы отсроченного наблюдения).

Все исследования рассмотрены локальной биоэтической комиссией АО «НПО «Дом Фармации» и одобрены для проведения. Протоколы исследований также одобрены данной комиссией: токсичность субстанции при однократном введении на мышах и крысах - протокол БЭК №1.41/17 от 07.07.2017, токсичность ЛС при однократном введении на мышах и крысах - протокол БЭК №5.3/18 от 17.01.2018, токсичность ЛС при многократном введении на крысах и кроликах – протокол БЭК № 6.3/18 от 17.01.2018, генотоксичность в тесте по учету микроядер (мыши) и ДНК-комет (крысы) – протоколы БЭК № 4.3/18 от 17.01.2018 и БЭК № 3.3/18 от 17.01.2018.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Подтверждение структуры вещества VMU-2012-05 методом ЯМР-спектроскопии.

Теоретическая формула VMU-2012-05 подтверждена ЯМР-спектрами.

В спектрах ЯМР ^1H и ^{13}C наблюдаются сигналы соответствующих структурных фрагментов молекулы. Для подтверждения строения углеродного скелета были зарегистрированы спектры ЯМР ^{13}C в фазочувствительном варианте JMOD (сигналы C, CH₂ направлены вверх, сигналы CH, CH₃ вниз).

Подтверждение структуры вещества VMU-2012-05 методом ВЭЖХ-МС.

Экспериментально определенное соотношение масса к заряду соответствует расчетному - 351, что подтверждено соответствующим масс-спектром. Молекулярный ион $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 351 в режиме регистрации положительных ионов.

Подтверждение структуры вещества VMU-2012-05 методом ИК-спектроскопии.

ИК спектр субстанции, зарегистрированный в таблетке KBr в области 4000 - 400 cm^{-1} , по положению и относительной интенсивности полос поглощения должен соответствовать ИК спектру стандартного образца, зарегистрированному в идентичных условиях.

Подтверждение структуры вещества VMU-2012-05 методом рентгенографии.

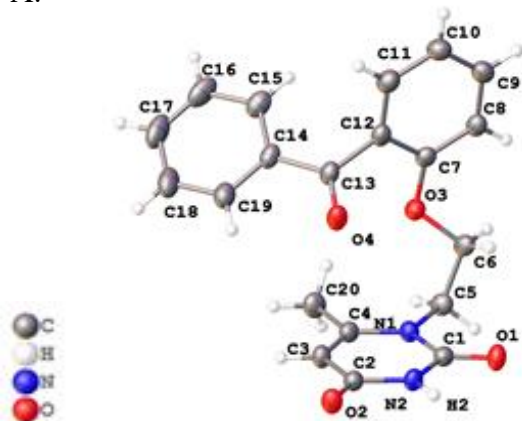
Общий вид молекулы и кристаллической упаковки показан на рисунке 2.

Характеризация основного вещества и примесей методом ВЭЖХ-УФ.

Чистота субстанции, определенная методом ВЭЖХ-УФ, составила 99,3% (рисунок 3).

Установлены и идентифицированы 3 основные примеси, определены их относительные времена удерживания по VMU-2012-05 (RRT) - таблица 1.

А.



Б.

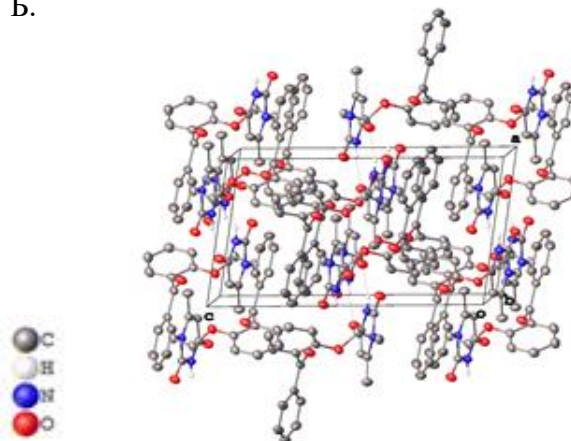


Рисунок 2 - А - Общий вид молекулы VMU-2012-05 в представлении атомов эллипсоидами анизотропных смещений, Б - Кристаллическая упаковка VMU-2012-05

Разработка спецификации и методов контроля качества на субстанцию VMU-2012-05.

Разработан проект спецификации и методы контроля качества субстанции VMU-2012-05 (таблица 2).

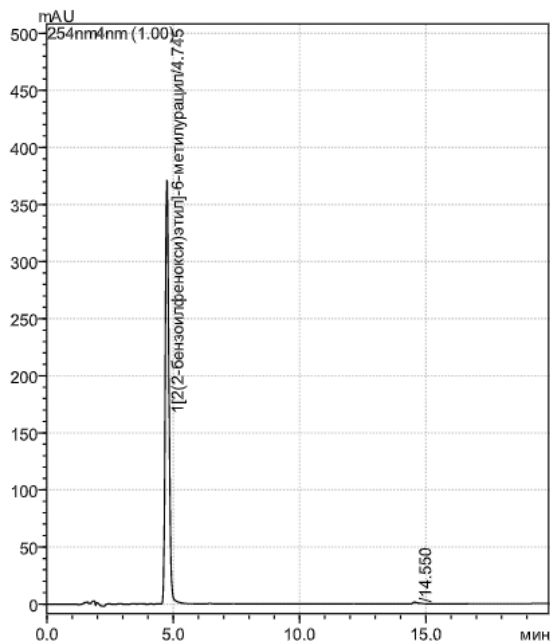


Рисунок 3 - ВЭЖХ-УФ спектр субстанции VMU-2012-05

Таблица 1 - Примеси и их относительные времена удерживания по VMU-2012-05 (RRT)

Химическое название	RRT
Примесь А. 3-бензоил-6-метилурацил	0,71±0,05
Примесь В. 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-3-бензоил-6-метилурацил	2,48±0,05
Примесь С. 1,3-ди[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил	3,03±0,05

Изучение ингибирующей активности субстанции VMU-2012-05 в отношении дикого типа и мутантных форм обратной транскриптазы ВИЧ-1.

Установлена константа ингибирования ОТ ВИЧ дикого типа: $K_i = 0,23 \pm 0,04 \mu\text{M}$ (таблица 3).

Было показано, что субстанция VMU-2012-05 эффективно ингибирует ОТ ВИЧ дикого типа – ключевой фермент репликации вируса. Установлена статистическая достоверность увеличения констант ингибирования в случае мутантных форм ОТ ВИЧ-1 (таблица 4).

Исследуемое вещество ингибирует мутантные формы ОТ ВИЧ-1 L100I, K103N, V106A и K103N/Y181C в концентрации 20 мкМ с эффективностью 38%, 33%, 22% и 35% соответственно (уровень подавления активности ОТ). Усиления ингибирования данных мутантных форм ОТ ВИЧ-1 при более высоких концентрациях VMU-2012-05 не наблюдается, что, скорее всего, связано с достижением предела растворимости соединения в реакционной смеси, содержащей 10% диметилсульфоксида (ДМСО).

В ходе проведенных экспериментов установлено, что исследуемое соединение является ингибитором ОТ ВИЧ-1 дикого типа и ряда ее мутантных форм. Субстанция VMU-2012-05 ингибирует ДНК-полимеразную активность ОТ ВИЧ-1 в более высоких концентрациях, чем эфавиренз. Для ОТ ВИЧ-1 дикого типа константа ингибирования составила 0,23 мкМ. На ОТ ВИЧ-1 с мутацией G190A константа ингибирования VMU-2012-05 составила 8,3 мкМ, на ОТ ВИЧ-1 с мутацией Y181C – 11,7 мкМ, а на ОТ ВИЧ-1 с мутациями L100I, K103N, V106A и двойном мутанте K103N/Y181C более 20 мкМ.

Таблица 2 – Проект спецификации на фармацевтическую субстанцию «VMU-2012-05, субстанция-порошок»

ПОКАЗАТЕЛЬ	МЕТОД	НОРМЫ
Описание	Визуальный	Кристаллический порошок от кремового до светло-коричневого цвета
Растворимость	ГФ РФ; Фармакопея ЕАЭС	Практически нерастворим в воде, этаноле, гексане, очень мало растворим в метаноле, мало растворим в хлороформе
Подлинность	ИК- спектрометрия	ИК спектр субстанции, зарегистрированной в таблетке КВг в области от 4000 до 400 см ⁻¹ , по положению и относительной интенсивности полос поглощения должен соответствовать ИК спектру стандартного образца, зарегистрированному в идентичных условиях
	ВЭЖХ	Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора, должно соответствовать времени удерживания пика VMU-2012-05 на хроматограмме стандартного раствора
Температура плавления	ГФ РФ; Фармакопея ЕАЭС	От 227 до 229 °С
Родственные примеси	ВЭЖХ; Фармакопея ЕАЭС	Примесь А, не более 0,15 % Примесь В не более 0,15 % Примесь С не более 0,15 % Единичная неидентифицированная примесь – не более 0,1 % Сумма примесей – не более 1 %
Сульфатная зола	ГФ РФ; Фармакопея ЕАЭС	Не более 0,1 %
Тяжелые металлы	ГФ РФ; Фармакопея ЕАЭС	Не более 0,001 %
Потеря в массе при высушивании	ГФ РФ; Фармакопея ЕАЭС	Не более 0,5 %
Остаточные органические растворители	ГХ	Этанол – не более 0,5% Ацетонитрил – не более 0,04 % Хлороформ – не более 0,00006%
Микробиологическая чистота	ГФ РФ; Фармакопея ЕАЭС	Категория 2.2
Количественное определение	ВЭЖХ	От 98,0 % до 102,0 % C ₂₀ H ₁₈ N ₂ O ₄ в пересчете на безводное и свободное от органических растворителей вещество
Упаковка	По 100,0; 500,0; 1000 г в двойные пакеты, изготовленные из пленки полиэтиленовой.	
Хранение	В герметично закрытой упаковке в защищенном от света месте при температуре до 25 °С	
Маркировка	В соответствии с НД	
Срок годности	2 года	

Таблица 3 - Константы ингибирования ОТ ВИЧ дикого и мутантного штаммов

Обратная транскриптаза	K _i , μM (p)	
	Субстанция VMU-2012-05	Субстанция эфавиренз
Дикий тип	0,23 ± 0,04	0,011 ± 0,002
L100I	>20 (p<0,05)*	0,14± 0,01 (p<0,05)*
K103N	>20 (p<0,05)*	0,52± 0,1 (p<0,05)*
V106A	>20 (p<0,05)*	0,11± 0,01 (p<0,05)*
Y181C	12 ± 2,4 (p<0,05)*	0,053± 0,006 (p<0,05)*
G190A	8,3 ± 0,4 (p<0,05)*	0,091± 0,008 (p<0,05)*
K103N/Y181C	>20 (p<0,05)*	0,52± 0,08 (p<0,05)*

Примечание - * - отличия статистически значимы в сравнении с K_i фермента дикого типа по критерию Стьюдента при p<0,05.

Таблица 4 - Результаты изучения антиретровирусной активности субстанции VMU-2012-05 в отношении дикого штамма ВИЧ-1

Исследуемые субстанции	CC ₅₀ , мкг/мл	IC ₅₀ , мкг/мл (метод МТТ)	IC ₅₀ , мкг/мл (метод ИФА)	Индекс селективности (CC ₅₀ /IC ₅₀)
VMU-2012-05	>100	0,2	1,1	>500
Эфавиренз	10,7	0,001	0,001	10700

Согласно полученным результатам исследуемая субстанция, как и препарат сравнения эфавиренз, является ингибитором ОТ ВИЧ, при этом по ингибирующей активности, как в отношении фермента дикого типа, так и в отношении его исследованных мутантных форм уступает эфавирензу.

Изучение антиретровирусной активности VMU-2012-05 на культуре клеток, инфицированных диким и мутантными штаммами ВИЧ-1.

В результате исследований цитотоксичности субстанции методом МТТ-тест установлена 50% цитотоксическая концентрация (CC₅₀), которая для клеток МТ-4 составила более 100 мкг/мл. Результаты изучения антиретровирусной активности субстанции калориметрическим тестом показали, что 50% ингибирующая концентрация (IC₅₀) в отношении дикого штамма ВИЧ-1 составляет 0,2 мкг/мл, подавление степени репродукции вирусного белка р24, оцененное методом ИФА, происходит при 1,1 мкг/мл, индекс селективности (IS) препарата (CC₅₀ / IC₅₀) превышает 500, что свидетельствует о широте терапевтического действия исследуемого соединения.

Исследование противовирусной активности субстанции VMU-2012-05 в отношении штамма ВИЧ-1, резистентного к ННИОТ вируса, выявило 50% ингибирование вируса при концентрации, превышающей 0,04 мкг/мл, для эфавиренза – выше 0,12 мкг/мл.

При концентрации эфавиренза, превышающей 0,04 мкг/мл, на 7-е сутки начинало проявляться незначительное подавление репродукции ВИЧ-1 (на 38%), действие которого на 11 сутки культивирования уже не наблюдалось. Более существенное подавление репродукции ВИЧ-1_{RES}, достигающее 50%, наблюдалось при концентрации выше 0,12 мкг/мл на 4-е сутки. На 7-е сутки при всех исследованных концентрациях антиретровирусное достигало максимальных значений, приближающихся к 80% уровню подавления репродукции ВИЧ-1_{RES}. На 11-е сутки наблюдалось снижение эффективности препарата эфавиренз при всех исследованных концентрациях, максимальный уровень ингибирования регистрировался в диапазоне 40-60%. Увеличение концентрации препарата более чем на 5 порядков не позволило добиться полного ингибирования ВИЧ-1_{RES}.

При концентрации VMU-2012-05, превышающей 0,01 мкг/мл, происходило ингибирование репродукции ВИЧ-1, действие которого наблюдалось и на 11-е сутки культивирования. Для субстанции VMU-2012-05 выявлено 50% ингибирование вируса при концентрации, превышающей 0,04 мкг/мл. При концентрации 3,33 мкг/мл на 11-е сутки репродукция ВИЧ-1_{RES} не наблюдалась. 90% ингибирование вируса регистрировалось при концентрации выше 3,33 мкг/мл. Результаты исследования антиретровирусной активности VMU-2012-05 в отношении резистентного штамма ВИЧ-1_{RES} представлены на рисунке 4.

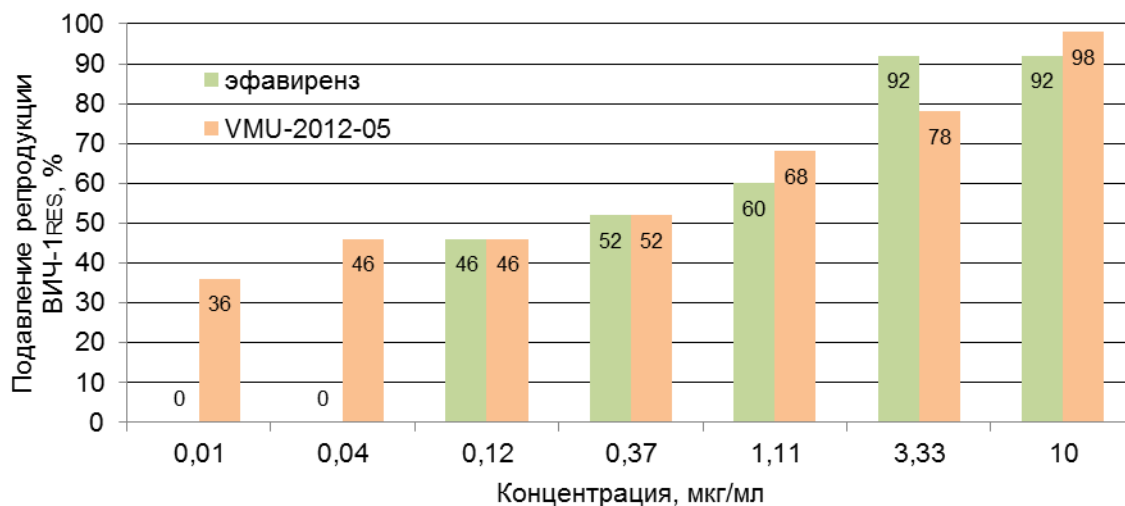
Таким образом, субстанция VMU-2012-05 проявляет антиретровирусную активность, зависящую от концентраций, которая в отношении резистентного штамма ВИЧ-1_{RES} сохраняется на протяжении всего периода культивирования (11 суток), в то время как препарат сравнения эфавиренз утрачивает свою активность к 11 суткам наблюдения.

Изучение параметров токсичности субстанции и ЛС на ее основе при однократном и многократном введениях экспериментальным животным.

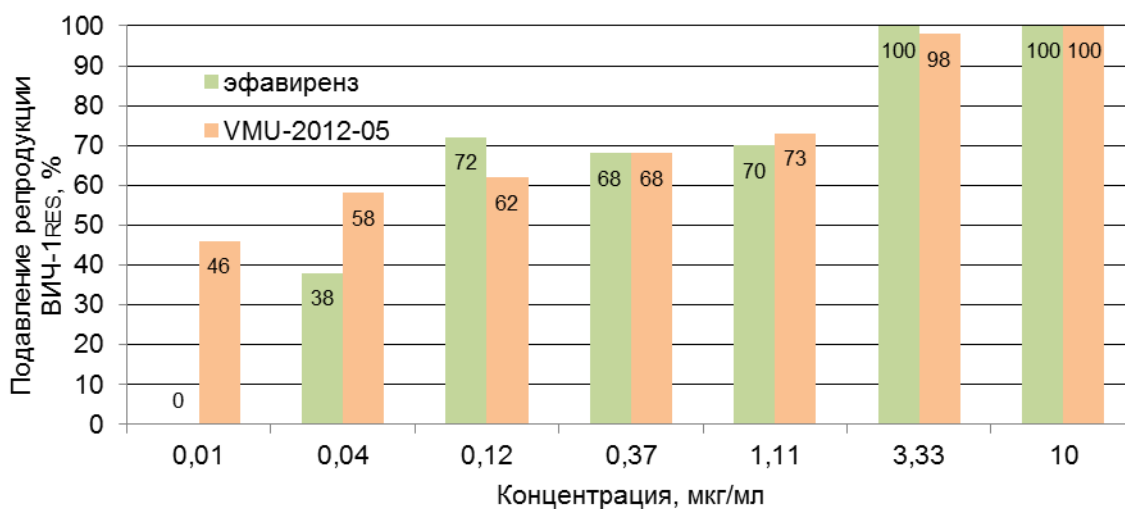
При внутрижелудочном введении субстанции и ЛС крысам и мышам гибели экспериментальных животных не было зафиксировано, доза 2000 мг/кг может рассматриваться как максимально переносимая. По результатам проведенной токсикометрии исследуемые объекты были отнесены к 4-му классу малотоксичных веществ по классификации Hodge и Sterner (ЛД₅₀ 500-5000 мг/кг при однократном в/ж введении), к 3-му классу умеренно токсичных веществ по ГОСТ 12.1.007-76 (ЛД₅₀ 151-5000 мг/кг при в/ж введении) и к 5-му классу опасности по классификации GHS OECD (ЛД₅₀ в/ж >2000 мг/кг).

Субстанция оказала местно-раздражающее действие на органы желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) у крыс при внутрижелудочном пути введения. Установлено, что основными органами-мишенями токсического действия препарата, выявленными при изучении токсичности при однократном введении на крысах, являются печень и органы ЖКТ (рисунок 5).

Сутки культивирования 4



Сутки культивирования 7



Сутки культивирования 11

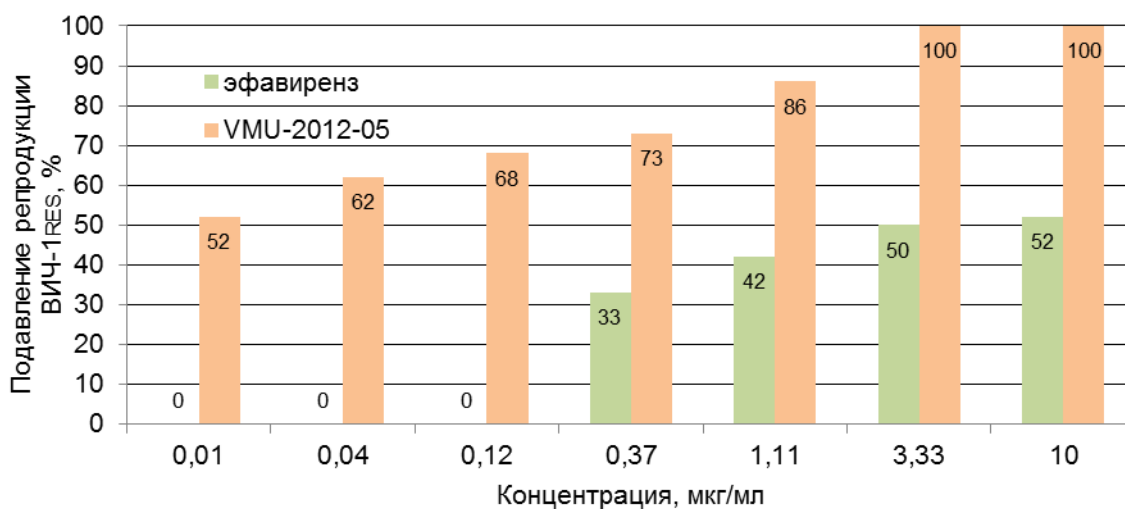


Рисунок 4 - Результаты исследования антиретровирусной активности VMU-2012-05 в отношении резистентного штамма ВИЧ-1RES

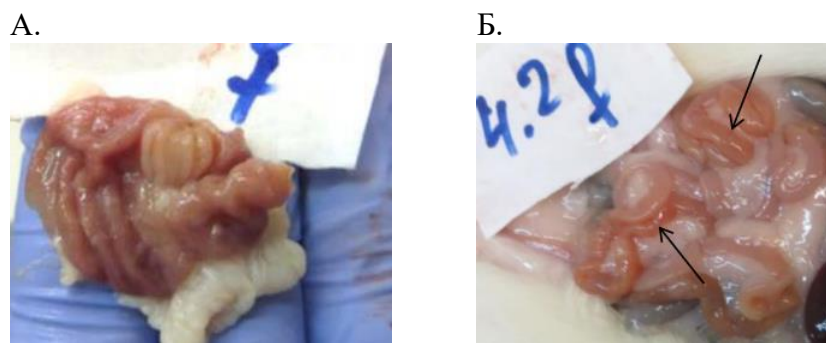


Рисунок 5 - А. Вскрытый желудок крысы, получавшей субстанцию в дозе 2000 мг/кг: слущивание эпителия, отёк слизистой оболочки, катаральный гастрит; Б. Вскрытая брюшная полость крысы, получавшей субстанцию в дозе 2000 мг/кг: стрелками указаны петли тонкой кишки, заполненные слизью, катаральный энтерит

У мышей патологоанатомическое исследование не показало признаков местно-раздражающего действия субстанции. ЛС также не оказало раздражающего действия в месте введения у обоих видов животных.

Для проведения токсичности при многократном введении ЛС на кроликах были выбраны следующие дозы: 4 мг/кг (1 ВТД), 20 мг/кг (5 ВТД) и 40 мг/кг (10 ВТД); на крысах - 9 мг/кг (1 ВТД), 45 мг/кг (5 ВТД) и 90 мг/кг (10 ВТД).

В ходе исследования установлен уровень доз, не вызывающих нежелательных эффектов (NOAEL), который для крыс составил 9 мг/кг (1 ВТД), для кроликов – 4 мг/кг (1 ВТД). Основными органами-мишенями при многократном введении препарата явились органы мужской репродуктивной системы (семенники, рисунки 6, 7) и печень (рисунки 8, 9).

Изменения в семенниках и печени были обнаружены только у одного вида животных (крысы) при введении препарата в дозах, превышающих терапевтическую: 45 мг/кг (5 ВТД) и 90 мг/кг (10 ВТД). Отклонения в биохимических показателях печеночной функции были обнаружены у обоих видов животных. Патологические изменения в 12,5-20% случаях встречались как в основных группах, так в группах отсроченного наблюдения.



Рисунок 6 - Эвисцерированные семенники самца крысы, получавшего ЛС в дозе 90 мг/кг: стрелкой указан уменьшенный в размерах семенник, односторонняя гипоплазия, 91-й день эксперимента

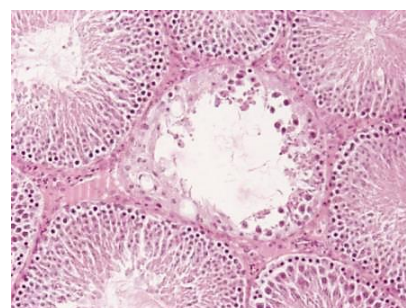


Рисунок 7 - Срез семенника самца крысы группы, получавшей ЛС в дозе 45 мг/кг, 91-й день эксперимента
Примечание - гипоплазия сперматогенного эпителия. Окраска - гематоксилин-эозин, ув. x 100

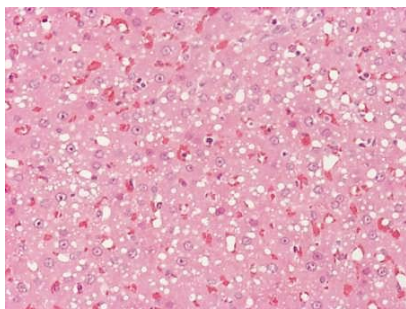


Рисунок 8 - Срез печени самца крысы группы, получавшей ЛС в дозе 90 мг/кг, 91-й день эксперимента

Примечание - мелкокапельная жировая дистрофия гепатоцитов. Окраска - гематоксилин-эозин, ув. x 200

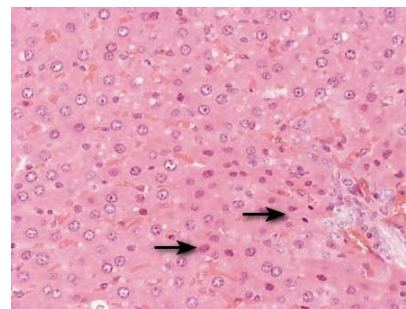


Рисунок 9 - Срез печени самки крысы группы, получавшей ЛС в дозе 90 мг/кг, отсроченное наблюдение, 121-й день эксперимента

Примечание - предположительно адаптические изменения гепатоцитов (стрелки). Окраска - гематоксилин-эозин, ув. x 200

По результатам оценки местно-раздражающего действия выявлен один случай катарального гастрита у крыс на фоне введения препарата в максимальной дозе. Невысокая частота выявления патологических изменений органов ЖКТ позволяет предположить, что препарат относительно безопасен для желудочно-кишечного тракта.

Изучение генотоксичности VMU-2012-05 в тестах *in vivo*.

В тесте по учету микроядер в эритроцитах мышей пятидневное внутрижелудочное введение ЛС на основе субстанции VMU-2012-05 в дозах 21 мг/кг (1 ВТД) и 210 мг/кг (10 ВТД) не повлияло на соотношение незрелых эритроцитов (полихроматофилов) к общему числу эритроцитов в процентах (%) на каждое экспериментальное животное. Тестируемое ЛС не оказало влияния на количество нормохроматофилов (зрелые формы) с микроядром и полихроматофилов с микроядром. Таким образом, результаты оценки генотоксичности VMU-2012-05 в тесте по учету микроядер позволяют сделать вывод об отсутствии у исследованного объекта генотоксичности. В ДНК-комет тесте ежедневное внутрижелудочное введение ЛС самцам и самкам аутбредных крыс на протяжении 14 дней в дозах 9, 45 и 90 мг/кг не оказало повреждающего действия на ДНК клеток костного мозга, печени, почек, селезенки и головного мозга в сравнении с позитивным контролем этилметансульфонатом.

На основании проведенных исследований по изучению генотоксических свойств в тестах по учету микроядер в эритроцитах крови мышей и ДНК-комет можно сделать прогноз об отсутствии канцерогенного потенциала у препарата на основе субстанции VMU-2012-05.

ВЫВОДЫ

1. Проведено комплексное изучение структуры и физико-химических свойств субстанции VMU-2012-05. Структура соединения подтверждена методами спектроскопии ядерного магнитного резонанса, рентгеноструктурного анализа, инфракрасной спектроскопии, масс-спектрометрии. Чистота субстанции VMU-2012-05 определена методами высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-селективным детектированием, а также высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектированием.

2. Разработаны проект спецификации и методы контроля качества субстанции VMU-2012-05. Установлены нормы по показателям «описание», «растворимость», «подлинность», «температура плавления», «родственные примеси», «сульфатная зола», «тяжелые металлы», «потеря в массе при высушивании», «остаточные органические растворители», «микробиологическая чистота», «количественное определение», «упаковка», «маркировка», «хранение», «срок годности»; установлено соответствие параметров субстанции требованиям проекта спецификации.

3. Установлено, что субстанция VMU-2012-05 является ингибитором обратной транскриптазы ВИЧ-1 как дикого, так и исследованных мутантных форм фермента. Так, константа ингибирования обратной транскриптазы ВИЧ-1 дикого типа для исследуемой субстанции составила 0,23 μM , а установленные константы ингибирования мутантных форм фермента лежали в диапазоне от 8,3 μM до 20 μM . При этом препарат сравнения эфавиренз (ННИОТ) обладал более высокой ингибирующей активностью как в отношении фермента дикого типа так и в отношении его исследованных мутантных форм (значения констант ингибирования лежали в диапазоне от 0,011 μM до 0,52 μM).

4. Выявлена выраженная антиретровирусная активность субстанции VMU-2012-05 в отношении клеток, инфицированных диким и мутантным штаммами ВИЧ-1. Установлено, что субстанция VMU-2012-05 в отличие от препарата сравнения эфавиренз способна полностью подавлять репродукцию ВИЧ-1_{RES}, резистентного к препаратам класса ННИОТ: для VMU-2012-05 установлено 50% ингибирование вируса при концентрации 0,04 мкг/мл, для эфавиренза – 0,12 мкг/мл. Субстанция VMU-2012-05 проявляет дозозависимую антиретровирусную активность в отношении резистентного штамма ВИЧ-1_{RES}, которая сохраняется на протяжении всего периода культивирования, в то время как препарат сравнения эфавиренз утрачивает антиретровирусную активность к 11 суткам наблюдения.

5. По результатам исследований токсичности при однократном введении мышам и крысам установлено, что субстанция VMU-2012-05 относится к 4 классу малотоксичных веществ по классификации Hodge и Sterner (LD_{50} 500-5000 мг/кг при однократном в/ж

введении), к 3 классу умеренно токсичных веществ по ГОСТ 12.1.007–76 (LD_{50} 151-5000 мг/кг при в/ж введении) и к 5 классу опасности по классификации GHS OECD (LD_{50} в/ж >2000 мг/кг). По результатам исследований токсичности при многократном введении крысам и кроликам установлен уровень доз, не вызывающих нежелательных эффектов (NOAEL), который для крыс составил 9 мг/кг (1 ВТД), для кроликов – 4 мг/кг (1ВТД). Основными органами-мишенями токсического действия препарата явились органы мужской репродуктивной системы и печень. Изменения в этих органах были обнаружены только у крыс при введении препарата в дозах, превышающих терапевтическую: 45 мг/кг (5 ВТД) и 90 мг/кг (10 ВТД).

6. В тесте по учету микроядер в эритроцитах мышей при пятидневном внутрижелудочном введении ЛС на основе субстанции VMU-2012-05 в дозах 21 мг/кг (1ВТД) и 210 мг/кг (10ВТД) установлено, что препарат не обладает генотоксичностью. В тесте «ДНК-комет» при ежедневном 14-дневном внутрижелудочном введении ЛС на основе субстанции VMU-2012-05 крысам в дозах 9 мг/кг (1ВТД), 45 мг/кг (5 ВТД) и 90 мг/кг (10 ВТД) не было выявлено повреждающего действия на ДНК клеток костного мозга, печени, почек, селезенки и головного мозга, что свидетельствует об отсутствии канцерогенного потенциала у субстанции VMU-2012-05.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе настоящего исследования было проведено комплексное фармацевтическое, фармакологическое и токсикологическое изучение субстанции оригинального нуклеозидного ингибитора обратной транскриптазы ВИЧ-1 – субстанции VMU-2012-05 и готового лекарственного средства на его основе. Современными инструментальными методами анализа изучены физико-химические свойства субстанции, получен и аттестован стандартный образец, разработаны методики контроля качества и проекты спецификаций на субстанцию и лекарственное средство. Установлено, что исследуемое соединение является ингибитором обратной транскриптазы ВИЧ-1 дикого типа и ряда ее мутантных форм. Показана антиретровирусная активность VMU-2012-05 на культуре клеток, инфицированных диким и мутантными штаммами ВИЧ-1 – субстанция VMU-2012-05 в отличие от препарата сравнения эфавиренз, способна полностью подавлять репродукцию ВИЧ-1_{RES}, резистентного к препаратам класса ННИОТ. Определены основные параметры острой и хронической токсичности субстанции и ЛС на ее основе, в экспериментах *in vivo* показано отсутствие мутагенных свойств и канцерогенности.

Таким образом, ЛС на основе исследованной субстанции представляет интерес для дальнейшей разработки оригинального антиретровирусного препарата, активного, в том числе, в отношении резистентных к ННИОТ штаммов ВИЧ-1. Необходимо отметить, что в настоящее

время осуществлен синтез субстанции на производственной площадке, а также наработаны образцы ЛС для проведения клинических исследований. Полученные в ходе проделанной работы результаты и разработанные на их основе документы вошли в состав регистрационного досье на оригинальный отечественный препарат для лечения ВИЧ-инфекции, а именно в разделы 3.2.S.3. «Описание характеристик АФС», 3.2.S.3. «Контроль качества АФС», 4.2.1. «Фармакология», 4.2.3. «Токсикология».

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Демченко, Д.В. Разработка и биофармацевтическая оценка таблеток на основе труднорастворимой субстанции 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил / Д.В. Демченко, **Е.А. Джайн (Корсакова)**, В.Ю. Балабаньян, М.Н. Макарова, В.Г. Макаров // **Разработка и регистрация лекарственных средств.** – 2020. Том 9, № 4, – С. 79-87. [Scopus].

2. Косман, В.М. Сравнительное исследование фармакокинетики субстанции 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила и твердых дисперсных систем на ее основе на кроликах / В.М. Косман, Д.В. Демченко, **Е.А. Джайн (Корсакова)**, В.Г. Макаров, В.Ю. Балабаньян // **Разработка и регистрация лекарственных средств.** – 2021. Том 10, № 2. – С. 106-111. [Scopus].

3. Гайдай, Е.А. Исследование специфических видов токсичности оригинального ненуклеозидного ингибитора обратной транскриптазы вируса иммунодефицита человека 1 типа (Retroviridae; Orthoretrovirinae; Lentivirus: Human immunodeficiency virus 1) на основе субстанции 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил / Е.А. Гайдай, К.Л. Крышень, **Е.А. Джайн (Корсакова)**, Д.В. Демченко, Д.Р. Каргопольцева, Е.А. Кательникова, Д.С. Гайдай, В.Ю. Балабаньян // **Вопросы вирусологии.** – 2021. Том. 66, № 4. – С. 279-288. [Scopus, Web of Science, Pubmed].

4. Vavilova, V.A. Experimental study of toxic properties of VMU-2012-05 drug – original non-nucleoside inhibitor of HIV-1 reverse transcriptase / V.A. Vavilova, E.V. Shekunova, **Е.А. Jain (Korsakova)**, V.Yu. Balabanyan, A.A. Ozerov, M.N. Makarova, V.G. Makarov // **Pharmacy & Pharmacology.** – 2021. Vol. 9, № 3. P. 205-221. [Scopus, Web of Science, Pubmed].

5. **Jain (Korsakova), Е.А.** Characterisation and study of 1- [2- (2-benzoylphenoxy) ethyl] -6-methyluracil mechanism of action / Е.А. Jain (Korsakova), D.V. Demchenko, A.A. Ozerov, M.N. Makarova, V.G. Makarov, V.Yu. Balabanyan // **Pharmacy & Pharmacology.** – 2021. Vol. 9, № 2. – P. 114-129. [Scopus, Web of Science, Pubmed].

6. Косман, В.М. Стандартизация готового лекарственного средства с оригинальной субстанцией производного бензофенона для лечения вич-1 инфекции / В.М. Косман, **Е.А.**

Джайн (Корсакова), Д.В. Демченко, В.Г. Макаров, В.Ю. Балабаньян // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2021. Том 24, № 1. – С. 4-10.

7. Косман, В.М. Исследование фармакокинетики оригинального лекарственного средства для лечения ВИЧ-1 инфекции / В.М. Косман, Д.В. Демченко, **Е.А. Джайн (Корсакова)**, В.Г. Макаров, В.Ю. Балабаньян // **Фармация.** – 2021. Том 70, № 4. – С. 48-56.

8. **Корсакова, Е.А.** Синтез, изучение структуры и фармакологической активности оригинального отечественного ингибитора обратной транскриптазы ВИЧ-1 из группы пиримидиновых производных бензофенона / Е.А. Корсакова // Материалы VIII Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего. – СПб.: Изд-во СПХФУ, 2018. – С. 71-74.

9. Тишков, Т.М. Химический анализ и дизайн лекарственной формы оригинального нуклеозидного ингибитора обратной транскриптазы ВИЧ / Т.М. Тишков, **Е.А. Джайн**, А.О. Кречетов, В.Ю. Балабаньян, А.А. Озеров, А.В. Погребняк // Материалы XXVII Российского национального конгресса «Человек и лекарство» – М.: Видокс, 2020. – С. 73.

10. **Джайн (Корсакова), Е.А.** Стандартизация готового лекарственного средства на основе субстанции VMU-2012-05 – оригинального нуклеозидного ингибитора обратной транскриптазы ВИЧ-1 / Е.А. Джайн (Корсакова), Д.В. Демченко, В.Ю. Балабаньян // Материалы VII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Перспективы внедрения инновационных технологий в медицине и фармации». – Орехово-Зуево: ГГТУ, 2020. – С. 103.

11. **Джайн (Корсакова), Е.А.** Доклиническое исследование общей токсичности препарата VMU-2012-05 – оригинального нуклеозидного ингибитора обратной транскриптазы ВИЧ-1 / Е.А. Джайн (Корсакова), Е.В. Шекунова, В.Ю. Балабаньян // Материалы VII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Перспективы внедрения инновационных технологий в медицине и фармации». – Орехово-Зуево: ГГТУ, 2020. – С. 104.

Автор выражает благодарности д.х.н., профессору Александру Александровичу Озерову за предоставленные образцы субстанции и методические советы по ее стандартизации; д.х.н. Игорю Александровичу Родину за техническую поддержку и консультативную помощь при проведении спектроскопии ЯМР и масс-спектрометрии; д.м.н, профессору Валерию Геннадьевичу Макарову за ценные советы и всестороннюю помощь при проведении токсикологических исследований; д.х.н. Анастасии Львовне Хандажинской за совместную работу по изучению механизма действия исследуемой субстанции в проведении ключевых экспериментов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВТД	- высшая терапевтическая доза	ФГБОУ	- федеральное государственное
		ВО	бюджетное образовательное учреждение
		ВолгГМУ	высшего образования «Волгоградский
		Минздрава	государственный медицинский
		России	университет» Министерства
			здравоохранения Российской Федерации
ГФ	- Государственная фармакопея	CC ₅₀	- (англ. median cytotoxic concentration) концентрация, при которой наблюдается гибель 50% клеток
ГХ	- газовая хроматография	GHS	- (англ. globally Harmonized System) согласованная на глобальном уровне система классификации и маркировки химических веществ
ЕАЭС	- Евразийский экономический союз	IC ₅₀	- (англ. median inhibitory concentration) концентрация, при которой вещество оказывает половину своего максимального ингибирующего действия
ЛД ₅₀	- средняя летальная доза, вызывающая гибель 50% экспериментальных животных	OECD	- (англ. Organisation for Economic Co-operation and Development) Организация экономического сотрудничества и развития