

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ М. В. ЛОМОНОСОВА»

На правах рукописи



Джайн Екатерина Александровна

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

3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация

на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:

доктор фармацевтических наук, доцент
Балабаньян Вадим Юрьевич

Москва-2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1 ВИЧ-инфекция – актуальная проблема современной медицины	15
1.2 Современные направления антиретровирусной терапии.....	26
1.3 Подходы к созданию новых ненуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы	36
1.4 Контроль качества инновационных препаратов.....	41
1.5 Заключение	47
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	49
2.1 Исследуемый препарат	49
2.1.1 Субстанция	49
2.1.2 Готовое лекарственное средство	50
2.2 Подтверждение структуры и характеристика субстанции VMU-2012-05 различными физико-химическими методами анализа.....	51
2.3 Получение и аттестация стандартного образца субстанции VMU-2012-05	60
2.4 Валидация методики ВЭЖХ-УФ.....	60
2.5 Разработка проекта спецификации и методов контроля качества субстанции VMU-2012-05	64
2.6 Изучение стабильности субстанции VMU-2012-05	65
2.7 Изучение механизма действия субстанции VMU-2012-05	67
2.7.1 Исследование ингибирующей активности субстанции VMU-2012-05 в отношении обратной транскриптазы ВИЧ дикого типа	67
2.7.2 Исследование ингибирующей активности субстанции VMU-2012-05 в отношении мутантных форм обратной транскриптазы ВИЧ-1, соответствующих лекарственно-устойчивым штаммам вируса.....	70
2.8 Изучение специфической фармакологической активности VMU-2012-05 в отношении клеток, инфицированных ВИЧ-1	71
2.8.1 Определение инфекционности наработанного вируса.....	72
2.8.2 Определение цитотоксичности субстанции VMU-2012-05	73

2.8.3 Оценка способности субстанции VMU-2012-05 подавлять репродукцию ВИЧ в культуре клеток	74
2.8.4 Исследование противовирусной активности лекарственного средства на основе субстанции VMU-2012-05 в отношении ВИЧ-1, резистентного к нуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы вируса.....	76
2.9 Оценка токсичности субстанции VMU-2012-05 и ЛС на ее основе при однократном и многократном введениях экспериментальным животным	78
2.9.1 Изучение токсичности при однократном введении субстанции VMU-2012-05.....	79
2.9.2 Изучение токсичности при однократном введении ЛС на основе субстанции VMU-2012-05	81
2.9.3 Изучение токсичности при многократном введении ЛС на основе субстанции VMU-2012-05	82
2.10 Изучение генотоксичности и прогноз канцерогенности субстанции VMU-2012-05.....	87
2.10.1 Изучение мутагенных свойств ЛС на основе VMU-2012-05 в тесте по учету микроядер в эритроцитах крови мышей.....	89
2.10.2 Изучение генотоксичности ЛС на основе VMU-2012-05 в тесте «ДНК-комет» in vivo	92
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	98
3.1 Подтверждение структуры и характеристика субстанции VMU-2012-05 различными физико-химическими методами анализа.....	98
3.2 Аттестация и разработка спецификации на стандартный образец VMU-2012-05.....	122
3.3 Разработка проекта спецификации и методов контроля качества субстанции VMU-2012-05	123
3.4 Результаты испытаний стабильности субстанции VMU-2012-05	132
3.5 Механизм действия субстанции в отношении обратной транскриптазы ВИЧ-1	136

3.5.1 Результаты изучения ингибирующей активности VMU-2012-05 в отношении ОТ ВИЧ дикого типа и мутантных форм	136
3.5.2 Результаты изучения ингибирующей активности субстанции в отношении мутантных форм обратной транскриптазы ВИЧ-1	138
3.6 Результаты изучения специфической фармакологической активности субстанции в отношении ВИЧ-1	142
3.6.1 Результаты исследования цитотоксичности субстанции VMU-2012-05 методом МТТ-тест	142
3.6.2 Результаты изучения антиретровирусной активности субстанции VMU-2012-05.....	143
3.6.3 Результаты изучения противовирусной активности субстанции VMU-2012-05 в отношении штамма ВИЧ-1, резистентного к нуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы вируса.....	144
3.7 Параметры токсичности субстанции и ЛС на ее основе при однократном и многократном введениях экспериментальным животным	146
3.7.1 Результаты изучения токсичности при однократном введении субстанции VMU-2012-05	146
3.7.2 Результаты изучения токсичности при однократном введении ЛС на основе субстанции VMU-2012-05	154
3.7.3 Результаты изучения токсичности при многократном введении ЛС VMU-2012-05 на основе субстанции	156
3.8 Результаты изучения генотоксичности ЛС на основе VMU-2012-05 в тесте по учету микроядер в эритроцитах периферической крови мышей	170
3.9 Результаты исследования прогноза канцерогенности ЛС на основе VMU-2012-05 в тесте «ДНК-комет»	171
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	173
ВЫВОДЫ	191
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	193
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	194
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	198

ПРИЛОЖЕНИЕ А (справочное). Акт внедрения	233
ПРИЛОЖЕНИЕ Б (справочное). Протокол предварительной (частичной) валидации методик контроля качества фармацевтической субстанции	234
ПРИЛОЖЕНИЕ В (справочное). Химическая схема производства.....	235

ВВЕДЕНИЕ

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) [19] 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% [18]). Согласно данным Федерального научно-методического Центра по профилактике и борьбе со СПИДом [8] 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 [51, 66].

В настоящее время наиболее оптимальным методом лечения ВИЧ-инфекции является высоко активная антиретровирусная терапия, подразумевающая одновременное использование нескольких веществ с различными механизмами действия: обязательно один или больше нуклеозидный ингибитор обратной транскриптазы (НИОТ) ВИЧ в сочетании с ненуклеозидными ингибиторами обратной транскриптазы (ННИОТ) ВИЧ и/или ингибиторами других классов [174].

Однако применение всех этих соединений имеет ограничения, главными из которых являются образование в процессе терапии устойчивых форм вируса, что делает необходимой постоянную смену препаратов, и побочные действия, в ряде случаев приводящие к преждевременной отмене терапии. Таким образом, поиск новых соединений, обладающих анти-ВИЧ активностью как в отношении дикого

штамма ВИЧ-1, так и в отношении резистентных изолятов вируса, с целью создания лекарственных анти-ВИЧ препаратов представляет крайне важную и перспективную проблему современной вирусологии и медицинской химии [261].

К настоящему моменту описано более 50 классов соединений различной химической структуры, проявивших себя в качестве ННИОТ ВИЧ [250], всего шесть из них утверждены и используются как лекарственные средства. Применение препаратов первого поколения (эфавиренз и невирапин) крайне быстро приводит к появлению резистентных штаммов вируса с мутациями в обратной транскриптазе (ОТ) (Y188C, Y181C, K103N, L100A, V106A, G190A, K103N+Y181C и др.), нечувствительных к терапии. Препараты второго поколения (этравирин, рилпивирин, доравирин и элсульфавирин) эффективно ингибируют фермент с такими мутациями, но вызывают появление собственных резистентных штаммов. Кроме того, все существующие ННИОТ обладают токсичностью и побочными эффектами. Таким образом, сохраняется потребность в новых, эффективных и малотоксичных ННИОТ ВИЧ, с профилями резистентности, отличающимися от существующих.

Степень разработанности темы исследования

В результате многолетних исследований, проведенных на кафедре фармацевтической и токсикологической химии ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России в сотрудничестве с учеными Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН был открыт новый класс высокоактивных ненуклеозидных ингибиторов вирусной репродукции, обладающих способностью подавлять репродукцию ВИЧ-1 *in vitro* в наномолярном диапазоне концентраций, – пиримидиновые производные бензофенона [219]. Приоритет и научная новизна полученных высокоактивных анти-ВИЧ-1 соединений подтверждены патентом РФ № 2489427 (2013) [6]. Как показали исследования, проведенные в Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта под руководством чл.-корр. РАН Кочеткова С.Н., соединения данного класса эффективно подавляют активность

ОТ как дикого штамма ВИЧ-1, так и большинства исследованных мутантных форм (L100I, K103N, Y181C, Y188L, G190A, K103N/Y181C) [261]. Эти положительные качества новых пиримидиновых производных бензофенона объясняются прежде всего тем, что данные соединения имеют не жесткую структуру (как у нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы ВИЧ-1 первого поколения, в частности, невирапина), а имеют гибкий и подвижный линкер, связывающий собственно бензофеноновый фрагмент с гетероциклом. Эти соединения обладают повышенной конформационной подвижностью, и, как показали результаты их докинга в область связывания ОТ ВИЧ-1, они могут по-разному взаимодействовать с аминокислотами ее аллостерического центра, прежде всего с консервативными участками Pro236, Asn103 и Tyr188, что обеспечивает улучшенный профиль резистентности по сравнению с применяющимися в клинике аналогами – ННИОТ ВИЧ-1 первого и второго поколения.

Дальнейший рациональный дизайн соединений данного класса позволил существенно упростить их химическое строение при значительном увеличении анти-ВИЧ-1 активности *in vitro*. Соединение-лидер в этом ряду – VMU-2012-05 – имеет величину ингибиторной концентрации EC₅₀, равную таковой эфавиренза (0,002 μ M) при сохранении активности в отношении ОТ ВИЧ-1 всех исследованных мутантных форм [73, 74, 75, 77, 82, 83, 96, 152, 220].

Цели и задачи исследования

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

В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

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 [174].

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) [261].

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 (приложение А).

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.

В ходе исследования использовали современные инструментальные физико-химические методы анализа свойств субстанции. Антиретровирусная активность субстанции оценивалась радио-лигандным методом.

Использовали биохимические, фармакологические методы и методы, применяемые в токсикологических исследованиях.

Положения, выносимые на защиту

Параметры, определяющие качество субстанции VMU-2012-05.

Субстанция VMU-2012-05 является ингибитором обратной транскриптазы ВИЧ-1 дикого типа и ряда ее мутантных форм.

Субстанция VMU-2012-05 проявляет антиретровирусную активность на культурах клеток, инфицированных диким и мутантным штаммами ВИЧ-1.

Субстанция VMU-2012-05 и ЛС на ее основе обладают благоприятным профилем безопасности при однократном и многократном введениях экспериментальным животным.

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, а именно пункту 3 «Изыскание, дизайн *in silico*, конструирование базовых структур, воздействующих на фармакологические мишени. Выявление фармакологически активных веществ среди природных и впервые синтезированных соединений, продуктов биотехнологии, генной инженерии и других современных технологий на

экспериментальных моделях *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo*», пункту 5 «Исследование механизмов действия фармакологических веществ в экспериментах на животных, на изолированных органах и тканях, а также на культурах клеток», пункту 6 «Изучение фармакодинамики, фармакокинетики и метаболизма лекарственных средств. Установление связей между дозами, концентрациями и эффективностью лекарственных средств. Экстраполяция полученных данных с биологических моделей на человека» и пункту 7 «Экспериментальное (доклиническое) изучение безопасности фармакологических веществ – токсикологические исследования, включающие изучение токсичности потенциальных лекарственных препаратов и их готовых лекарственных форм при однократном и многократном введениях на животных, а также оценку возможных специфических видов токсичности и проявление нежелательных побочных эффектов (генотоксичность, эмбриотоксичность, тератогенность, влияние на репродуктивную функцию, аллергизирующее действие, иммунотоксичность и канцерогенность)», а также паспорту научной специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия, а именно пункту 2 «Формулирование и развитие принципов стандартизации и установление нормативов качества, обеспечивающих терапевтическую активность и безопасность лекарственных средств» и пункту 3 «Разработка новых, совершенствование, унификация и валидация существующих методов контроля качества лекарственных средств на этапах их разработки, производства и потребления».

Личный вклад автора

Автором был проведен обзор актуальной литературы, составлен план исследований, при личном участии проведена основная часть экспериментальных работ, представленных в диссертации, проанализированы полученные результаты и подготовлены публикации. Изучение механизма действия исследуемой субстанции *in vitro* 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 (ФГБУН ИМБ им. В.А. Энгельгардта РАН). 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».

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 ННИОТ 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, фармакогнозии и организации фармацевтического дела МГУ им. М.В. Ломоносова (протокол № 6 от 20.09.2023).

Публикации по теме диссертации

По результатам исследования автором опубликовано 11 печатных работ, в том числе: 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 диссертации

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

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 ВИЧ-инфекция – актуальная проблема современной медицины

ВИЧ-инфекция является одной из наиболее актуальных глобальных проблем современной медицины [15, 60, 79, 99, 105, 107, 122, 154, 202, 280]. По приблизительным оценкам, за время пандемии ВИЧ-инфекцией заразились от 55 до 100 млн. человек, а количество умерших пациентов за этот период (по состоянию на середину 2021 г.) составило по данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) до 40,1 (33,6 - 48,6) млн. человек [10]. В России за период пандемии ВИЧ-инфекции с 1987 года по 31 декабря 2021 г. было выявлено 1 562 570 случаев ВИЧ-инфекции [8], она считается одной из наиболее разрушительных в истории человечества по значимости и величине медицинских и социально-экономических потерь, в связи с чем, борьба с данным заболеванием относится к приоритетам в области устойчивого развития [28].

Согласно определению, ВИЧ-инфекция представляет собой антропонозное хроническое медленно прогрессирующее инфекционное заболевание, возбудителем которого является вирус иммунодефицита человека (ВИЧ). ВИЧ-инфекция характеризуется первичным поражением иммунной системы с формированием синдрома приобретенного иммунодефицита (СПИД), что в свою очередь обуславливает развитие широкого спектра оппортунистических инфекционных заболеваний, злокачественных новообразований, аутоиммунных заболеваний и дистрофических процессов, которые в большинстве случаев и определяют прогноз заболевания [70, 78, 79].

Со времени открытия ВИЧ в 1983 году, за прошедшие десятилетия достигнуты большие успехи в области изучения молекулярной биологии и генетики ВИЧ. Расшифрованы ключевые звенья иммунопатогенеза ВИЧ-инфекции, описан патогенез большинства ВИЧ-индикаторных заболеваний [148, 244]. Разработаны и внедрены в большинстве стран мира с охватом широких групп населения высокоэффективные методы выявления ВИЧ-инфекции.

Значительным достижением является разработка и внедрение в клиническую практику антиретровирусной терапии (АРТ), что позволило кардинально изменить прогноз при ВИЧ-инфекции [106, 138, 143, 228, 254, 268]. К настоящему времени ожидаемая продолжительность жизни большинства пациентов с ВИЧ-инфекцией фактически соответствует таковой для общей популяции [153].

Несмотря на значительные достижения последних лет, ВИЧ-инфекция по-прежнему остается одной из важнейших причин заболеваемости и смертности населения в подавляющем большинстве стран мира. По приблизительным оценкам, по состоянию на 2021 год общее количество пациентов, живущих с ВИЧ, составило около 38,4 млн. человек. Следует отметить, что в последние годы в мире в целом наблюдается отчетливая положительная динамика в области заболеваемости и смертности от ВИЧ-инфекции. Так, в 2021 году оценочное количество новых случаев ВИЧ-инфекции в мире составило 1,5 (1,1 - 2,0) млн. человек, в то время как в 2010 году было зарегистрировано 2,2 (1,7 - 2,9) млн., а в 2000 – 2,9 (2,2 - 3,9) млн. Еще более значительна положительная динамика общемировых случаев смертности от ВИЧ-инфекции: в 2021 году было зарегистрировано около 650 (510 - 860) тыс. случаев летальных исходов, в 2010 году - 1,4 (1,1 - 1,8) млн. случаев, в 2000 году – около 1,7 (1,3 - 2,2) млн. [19].

В настоящее время общемировой тенденцией в области эпидемиологии ВИЧ является увеличение абсолютного количества числа людей, живущих с ВИЧ-инфекцией, на фоне постепенного снижения заболеваемости и смертности. Количество людей, живущих с ВИЧ, в настоящее время составляет более 38 млн. человек, в то время как еще в 2010 году их было около 30,8 млн. Безусловно, важнейшей причиной снижения смертности от ВИЧ (кроме уменьшения количества первичных случаев инфицирования) является активное практическое внедрение АРТ. Так, в 2021 году АРТ в мире получали около 28,7 млн. человек. Для сравнения этот показатель в 2010 году составлял около 7,8 млн. человек [19].

В 2021 году Координационный совет программы UNAIDS принял новую Глобальную стратегию по СПИДу на 2021–2026 гг. [20] «95-95-95», согласно которой у 95% людей, живущих с ВИЧ, должна быть диагностирована ВИЧ-

инфекция (знают свой ВИЧ-статус), 95% из них должны получать АРТ, и у 95% из них необходимо добиться подавления вирусной нагрузки [16, 19]. Реализация данной стратегии в долгосрочной перспективе позволит добиться снижения смертности от ВИЧ-инфекции и уменьшить показатели заболеваемости за счет снижения контагиозности людей с ВИЧ-инфекцией с подавленной вирусной нагрузкой. По состоянию на 2021 год, ВИЧ-инфекция диагностирована у ~85% (75 - 97%) людей, живущих в ВИЧ (знали свой статус), при этом АРТ получали ~88% (78 - 98%) и у ~92% (81 - 98%) пациентов, получающих АРТ, удалось добиться подавления вирусной нагрузки. В то же время необходимо отметить, что удельный вес пациентов с ВИЧ-инфекцией, получающих АРТ, сильно варьирует в разных регионах мира. Максимальные показатели характерны для стран Западной Европы и Северной Америки, минимальные – для стран Ближнего Востока и Северной Африки, Восточной Европы и Центральной Азии, стран Западной и Центральной Африки [19]. В ряде стран мира к 2019 году удалось превысить 90%-й показатель по всем трем ключевым индикаторам, что, безусловно, подтверждает реалистичность данной стратегии.

Россия в последние годы стабильно относится к числу регионов мира с наиболее напряженной эпидемиологической обстановкой по ВИЧ-инфекции. По оценкам, в нашей стране эпидемия ВИЧ-инфекции развивается крайне быстрыми темпами. В период с 2010 по 2019 гг. наблюдался непрерывный рост показателя заболеваемости ВИЧ-инфекции, который только в последние годы сменился относительной стабилизацией на показателях, составляющих около 40 новых случаев на 100 000 населения в год. На этом фоне наблюдается непрерывный рост зарегистрированных пациентов с ВИЧ-инфекцией. Так, в 2000 году данный показатель составлял 53,4 на 100 тыс. населения, в 2010 году – 261 на 100 тыс., в 2019 году – 509,3 на 100 тыс., в 2020 году – 576,3 на 100 тыс., а в 2021 году – 583,9 на 100 тыс. [37]. Также наблюдается и постоянный рост смертности населения от ВИЧ-инфекции, например, на ~5,9% в 2021 г. (34093 случая) по сравнению с 2020 г. (32208 случаев) [8]. Более чем в половине случаев причиной

смерти людей, инфицированных ВИЧ, является собственно ВИЧ-инфекция и ассоциированные с ней заболевания.

По состоянию на 31.12.2021 в России проживало 1 137 596 человек с диагнозом «ВИЧ-инфекция» (подтвержденных в иммунном блоте).

Показатель заболеваемости ВИЧ-инфекцией (число новых выявленных случаев в пересчете на численность населения) в 2021 г. составил 48,7 на 100 тыс. населения по предварительным данным. В 2021 г. показатель заболеваемости, превышающий среднероссийское значение, имели 30 субъектов федерации: Иркутская область (зарегистрировано 99,6 новых случаев ВИЧ-инфекции на 100 тыс. населения), Челябинская (97,4), Свердловская (95,7) области, Красноярский край (95,0), Оренбургская область (94,9), Пермский край (93,5), Томская (88,5), Новосибирская (84,1), Кемеровская (83,2), Тюменская (76,6) области, Алтайский край (76,4), Курганская (70,6), Самарская (68,3) области, Удмуртская Республика (66,4), Омская (61,3), Ульяновская (58,4) области, Ханты-Мансийский автономный округ (58,3), Ямало-Ненецкий автономный округ (57,3), Тверская область (55,6), Республика Хакасия (53,6), Республика Крым (53,3), г. Севастополь (52,7), Республика Бурятия (51,0), Мурманская область (50,7), Приморский край (50,4), г. Москва (50,2), Чукотский Автономный округ (50,1), Московская область (50,0), Республика Башкортостан (49,3), Нижегородская область (49,2). В указанных регионах проживало 50,7% всего населения страны, и было зарегистрировано 70,2% всех новых случаев ВИЧ-инфекции в 2021 г. [8].

Пораженность ВИЧ-инфекцией составила 782,0 на 100 тыс. населения, при этом в целом ряде регионов этот показатель превышает 1000 на 100 тыс. населения¹.

¹ Пораженность ВИЧ-инфекцией - показатель, отражающий общее количество людей, живущих с ВИЧ/СПИДом среди определенной группы населения [на определенной территории] в определенный момент времени. Измеряется отношением числа лиц, имеющих ВИЧ-инфекцию, к численности данной группы населения в это же время, отнесенному к определенному количеству населения (обычно 100000 или 100) [23].

Максимальные показатели пораженности зарегистрированы в Кемеровской (2069,7 на 100 тыс.), Иркутской (2042,5 на 100 тыс.) и Свердловской (18908 на 100 тыс.) областях [8].

В последние годы в Российской Федерации ВИЧ-инфекция выявляется среди населения наиболее активного трудоспособного возраста. В 2021 г. ВИЧ-инфекция диагностировалась у россиян в возрасте 30–39 лет в 39,9% случаев, 40–49 лет – в 31,2%, 20–29 лет – в 11,8%. Доля пожилых возросла, а молодежи в возрасте 15–20 лет снизилась в 2021 г. до 0,8% [8].

С практической точки зрения крайне важно учитывать, что до настоящего времени в нашей стране остаются достаточно низкими показатели охвата ВИЧ-инфицированных диспансерным наблюдением и АРТ. В 2021 г. на диспансерном учете состояло 803 796 больных, то есть 68,6% от числа россиян, живших с диагностированной ВИЧ-инфекцией (в 2020 г. – 69,5%). Получали антиретровирусную терапию в 2021 г. 660 821 пациентов (включая 58 105 больных, находившихся в местах лишения свободы). Охват лечением в 2021 г. составил 82,2% от числа состоявших на диспансерном наблюдении и 56,4% от числа живших с диагнозом ВИЧ-инфекция. У 527 705 больных, то есть у 79,9% получавших АРТ, и у 46,4% известных россиян, живущих с ВИЧ, была достигнута неопределяемая вирусная нагрузка [8].

Проблема ВИЧ-инфекции носит не только медицинский, но и социально-экономический характер. По данным доклада Аналитического центра при Правительстве Российской Федерации (2020) общий объем расходов консолидированных бюджетов субъектов Российской Федерации на реализацию мер по противодействию распространению ВИЧ-инфекции (с учетом межбюджетных трансфертов из федерального бюджета) вырос с 20,3 млрд руб. в 2010 году до 63,4 млрд руб. в 2019 году (в 3,1 раза) [79].

Первые случаи заболевания, известного в настоящее время как СПИД, были описаны в 1981 году у мужчин-гомосексуалистов с саркомой Капоши и пневмоцистной пневмонией. В 1982 году был предложен термин СПИД. ВИЧ как ранее неизвестный вирус, вызывающий синдром иммунодефицита, впервые был

выделен французским вирусологом Л. Монтанье (Институт Пастера, Франция) и американским ученым Р. Галло (Национальный Институт рака, США) в 1983 году (Нобелевская премия в области физиологии и медицины, 2008). В 1986 году данный вирус, первоначально названный лимфотропным вирусом, получил свое современное название. В нашей стране первый случай ВИЧ-инфекции был описан в 1985 году [79].

С таксономической точки зрения, ВИЧ относится к роду *Lentivirus*, который относится к семейству *Retroviridae*. Выделяют 2 вида ВИЧ: ВИЧ-1 и ВИЧ-2 [60, 107, 221]. Оба этих вируса могут вызывать иммунодефицит у человека, однако абсолютное большинство случаев ВИЧ-инфекции в мире обусловлено ВИЧ-1. ВИЧ-1 подразделяется на несколько групп, среди которых наиболее распространенной является группа М (от англ. main – основной), гораздо реже в отдельных регионах выявляются группы О, N и Р. Группа М в свою очередь делится на несколько клад (подтипов) – А, В, С и др. [99, 102, 148, 154, 223]. Показано, что для разных подтипов ВИЧ-1 характерна разная скорость прогрессирования заболевания. Например, при ВИЧ-1А развитие иммунодефицита наблюдается в среднем через 8 лет, в то время как при ВИЧ-1С – через 5-6 лет [165]. В мире около половины случаев ВИЧ-инфекции связаны с ВИЧ-1С, на долю ВИЧ-1А и ВИЧ-1В приходится около 12% и 11% соответственно, на долю ВИЧ-1G и ВИЧ-1D – 5% и 2% соответственно. На долю рекомбинантных форм ВИЧ-1 приходится около пятой части случаев заражения, при этом в настоящее время среди них доминируют CRF02_AG и CRF01_AE, составляющие соответственно 8% и 5% [149]. Различные подтипы ВИЧ-1 представлены с различной частотой в разных регионах мира [101]. В странах Западной Европы и Северной Америки доминирует подтип ВИЧ-1В. В России и странах бывшего Советского Союза наиболее широко распространен подтип А [62, 63, 69, 85, 102, 223].

ВИЧ – РНК-содержащий вирус. Наиболее яркой молекулярно-генетической особенностью данного вируса, как и других ретровирусов, является наличие фермента обратной транскриптазы (ОТ) или ревертазы, которая обеспечивает

синтез ДНК на базе РНК вируса с последующей интеграцией ДНК в геном клеток-хозяина. Со структурной точки зрения, вирионы ВИЧ имеют сферическую форму и состоит из суперкапсида, слоя матриксного белка p17 и нуклеокапсида (рисунок 1). Суперкапсид представлен липидным бислоем, в состав которого входят 72 грибоподобных комплекса, каждый из которых образован тремя молекулами gp 120 (образуют «шляпку») и тремя молекулами gp 40 (образуют «ножку»). Гликопротеин gp 120 обуславливает тропность ВИЧ к лимфоцитам, так как за счет этого гликопротеина происходит связывание вирусных частиц с рецептором CD4 на поверхности CD4+-лимфоцитов. В состав капсида входит белок p24. Внутри капсида находятся геном вируса (две молекулы одноцепочечной плюс-РНК, длина генома около 9000 нуклеотидов), белок p7,

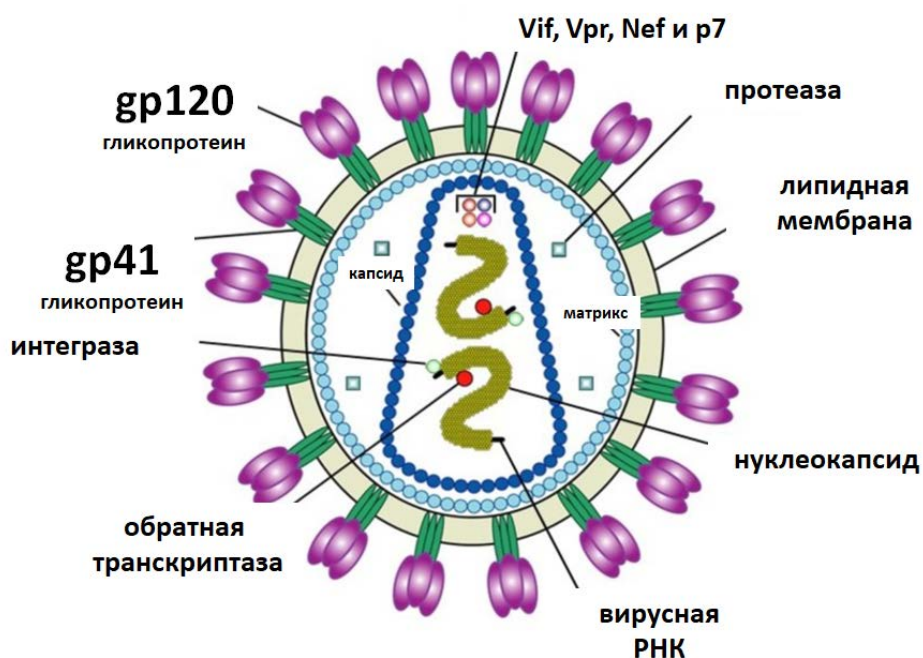


Рисунок 1 - Схема строения ВИЧ-1 (адаптировано из Z. Najimahdi, A. Zarghi, 2016)

ферменты (обратная транскриптаза, интеграза, протеаза) и затравочная тРНК. Следует также отметить, что внутри капсида присутствуют копии белка циклофилина А – пептидолпролилизомеразы, которая необходима для прикрепления белка p17 [60, 148, 195].

Геном ВИЧ содержит 3 структурных и 6 регуляторных генов, которые кодируют синтез 9 структурных и 6 регуляторных белков. К структурным генам относятся *gag*, *pol* и *env*, к регуляторным - *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr* и *vpu*. Характерной особенностью ВИЧ является высокая частота генетических изменений (частота ошибок составляет 10^{-3} — 10^{-4} ошибок на геном на цикл репликации) [195].

Для ВИЧ-инфекции характерен парентеральный путь передачи. Источником инфекции является больной человек, основными путями передачи – половой (гетеро- и гомосексуальные контакты), инъекционный (использование загрязненных игл или шприцов), гемотрансфузионный, инструментальный, трансплантационный, вертикальный (от матери к ребенку) [60, 154]. В настоящее время отмечается, что ВИЧ-инфекция вышла за пределы уязвимых групп населения, при этом в последние годы большинство людей заражаются ВИЧ-инфекцией при гетеросексуальных контактах, реже – при употреблении парентеральных наркотических веществ и гомосексуальных контактах. Случаи заражения ВИЧ-инфекцией при гемотрансфузиях и оказании медицинской помощи в настоящее время единичны (ВИЧ-инфекция в Российской Федерации на 31 декабря 2021 г.).

К настоящему времени жизненный цикл ВИЧ достаточно хорошо описан [60, 123, 139, 154, 155, 157, 258, 208]. После попадания в кровеносную систему, ВИЧ проникает внутрь CD4⁺-лимфоцитов. Ключевым этапом данного процесса являются взаимодействие gp120 с рецептором CD4 на поверхности T-лимфоцитов, что индуцирует серию конформационных изменений белка gp120 (которые позволяют ему связать также дополнительно молекулы корцептора CXCR4) [156]. На следующем этапе белок g41 сливается с мембраной лимфоцита и также подвергается конформационным изменениям, что обеспечивает возможность слияния цитоплазматической мембраны с мембраной вириона с попаданием содержимого вириона внутрь клетки и высвобождением молекул одноцепочечной РНК. Следующий ключевой этап – обратная транскрипция, которая завершается образованием двуцепочечной невстроенной ДНК. Её встраивание в геном клетки хозяина происходит только после активации

лимфоцита при контакте с антигенпрезентирующими клетками. После транспортировки вирусной ДНК в составе преинтеграционного комплекса в ядро происходит её встраивание в геном лимфоцитов при участии интегразы. Далее происходят транскрипция, сплайсинг, транспорт РНК из ядра в цитоплазму и трансляция с образованием вирусных белков, сборка и высвобождение из клетки образованных вирионов. Различные этапы жизненного цикла ВИЧ являются в настоящее время мишенями для всех основных групп лекарственных препаратов (рисунок 2).

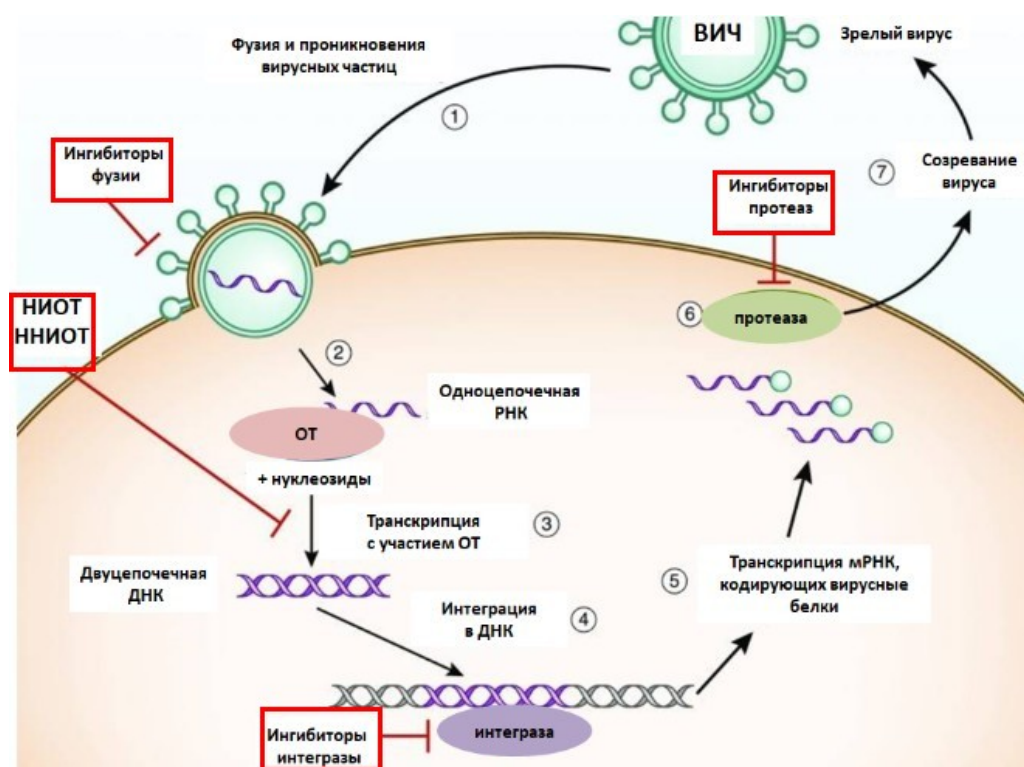


Рисунок 2 - Схема жизненного цикла ВИЧ и мишени для основных препаратов (адаптировано из M.G. Atta и соавт., 2019, с изменениями). НИОТ - нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы, ННИОТ - ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы, ОТ - обратная транскриптаза

Диагностика ВИЧ-инфекции основана на эпидемиологических, клинических и лабораторных данных [70]. При сборе эпидемиологического анамнеза решающее значение имеет выявление факторов, свидетельствующих об очень высоком, высоком, определенном риске или вероятности инфицирования ВИЧ. При клинической оценке учитывается наличие лимфаденопатии, а также

целого ряда заболеваний или состояний, наличие которых при исключении других причин указывает на высокую вероятность ВИЧ-инфекции (кандидоз трахеи, бронхов, пищевода, кокцидиоидомикоз, гистоплазмоз, саркома Капоши, лимфома Беркитта, первичная лимфома головного мозга, пневмоцистная пневмония, прогрессирующая мультифокальная лейкоэнцефалопатия, токсоплазмоз головного мозга и др.) [70, 78, 184]. Лабораторное подтверждение ВИЧ-инфекции включает обнаружение антител к ВИЧ, антигенов или генетического материала ВИЧ. Постановка диагноза СПИД у пациента с ВИЧ-инфекцией возможно при наличии у пациента как минимум одного СПИД-индикаторного заболевания, список которых утвержден Приказом Минздравсоцразвития России от 17 марта 2006 г. № 166. Следует отметить, что в нашей стране лидером по распространённости среди СПИД-индикаторных заболеваний является туберкулез различной локализации, далее по распространённости следуют синдром истощения, пневмоцистная пневмония, цитомегаловирусная инфекция и саркома Капоши [61].

Предложено несколько классификаций ВИЧ-инфекции, среди которых наибольшее распространение в мире имеют классификация ВОЗ (2005), основанная только на клинических признаках, а также классификация CDC (1993), учитывающая клинические и иммунологические признаки [61]. В нашей стране используется клиническая классификация ВИЧ-инфекции, предложенная в 1989 году В.И. Покровским и модифицированная в 2006 году. Согласно данной классификации, выделяют следующие стадии ВИЧ-инфекции [61, 70, 78]:

1. Инкубация, во время которой происходит интенсивное размножение ВИЧ без выработки антител (продолжается от момента инфицирования до клинических признаков так называемой «острой» ВИЧ-инфекции или образования специфичных антител; продолжительность стадии в большинстве случаев составляет до 3 месяцев).
2. Стадия первичных проявлений, которая продолжается в большинстве случаев несколько недель и может протекать в нескольких клинических вариантах: 2А – бессимптомная (клинические проявления отсутствуют, но

выявляются антитела к ВИЧ); 2Б – острая ВИЧ-инфекция без вторичных заболеваний (лимфаденопатия, лихорадка, фарингит, асептический менингит и другие); 2В – острая ВИЧ-инфекция с вторичными заболеваниями (чаще всего проявляется инфекционными заболеваниями на фоне снижения содержания CD4⁺-лимфоцитов).

3. Субклиническая стадия, которая характеризуется прогрессирующим иммунодефицитом с постепенным снижением количества CD4⁺-лимфоцитов; продолжительность данной стадии составляет в среднем 6-7 лет; на этой стадии иммунодефицит компенсируется образованием новых CD4⁺-лимфоцитов, единственным проявлением заболевания в большинстве случаев является лимфаденопатия.
4. Стадия вторичных заболеваний, которая в зависимости от тяжести подразделяется на подстадии: 4А – количество CD4⁺-лимфоцитов составляет около 350 клеток в мкл, клинически характерны разнообразные бактериальные, вирусные и грибковые инфекции кожных покровов, слизистых и верхних дыхательных путей, потеря массы тела менее 10%; 4Б – количество CD4⁺-лимфоцитов составляет 200-350 клеток в мкл, при этом наблюдаются инфекционные поражения внутренних органов, развиваются конституциональные симптомы, саркома Капоши, туберкулез одной анатомической локализации, потеря массы тела более 10%; Стадия 4В – количество CD4⁺-лимфоцитов составляет менее 200 клеток в мкл, развиваются тяжелые, в том числе, генерализованные оппортунистические инфекции, кахексия. В большинстве случаев при отсутствии лечения стадия 4А развивается через 6-7 лет после инфицирования, стадия 4Б – через 7-10 лет, стадия 4В – через 10-12 лет.
5. Терминальная стадия (в настоящее время определение данной стадии не рекомендуется в связи с возможностями проведения терапии даже у пациентов с нулевым содержанием лимфоцитов).

1.2 Современные направления антиретровирусной терапии

В настоящее время основным компонентом лечения пациентов с ВИЧ-инфекцией на всех стадиях заболевания является АРТ, которая позволяет в большинстве случаев добиться полного подавления репликации вируса [70, 78, 92, 116, 138, 189, 236, 249]. АРТ рекомендована всем пациентам с ВИЧ-инфекцией вне зависимости от состояния иммунного статуса и вирусной нагрузки, при этом её старт должен начинаться в максимально короткие сроки после постановки диагноза. Показано, что АРТ позволяет значительно продлить жизнь пациентов, улучшить качество их жизни, снизить контагиозность пациентов, прямые и косвенные расходы, связанные с ВИЧ-инфекцией. Высокая эффективность АРТ при ВИЧ-инфекции показана в огромном количестве крупных рандомизированных клинических исследований и метаанализах, включена в национальные и международные рекомендации по ведению пациентов с ВИЧ-инфекцией [70].

В то же время, несмотря на высокую эффективность современных препаратов, применяемых для АРТ, остаются нерешенными целый ряд вопросов, среди которых особенно следует отметить увеличение распространённости первичной лекарственной резистентности ВИЧ к применяемым препаратам, проблемы, связанные с безопасностью и переносимостью препаратов; необходимость применения антиретровирусных препаратов в комбинации, что сопровождается значительным ростом риска развития лекарственных взаимодействий [64, 68, 78, 79, 80, 120, 206, 214, 216, 253, 271, 280]. Безусловно, все это определяет высокую потребность в синтезе и внедрении в клиническую практику новых лекарственных препаратов для антиретровирусной терапии.

Первым лекарственным препаратом для лечения ВИЧ-инфекции, является нуклеозидный ингибитор обратной транскриптазы зимовудин, одобренный FDA в 1987 году. Через несколько лет были зарегистрированы еще 2 препарата этой же группы - диданозин и зальцитабин. В 1996 году появились ингибиторы протеазы, что сделало возможным проведение при ВИЧ комбинированной

антиретровирусной терапии. К настоящему времени зарегистрировано более 30 лекарственных препаратов для лечения ВИЧ-инфекции. Практически каждый молекулярный этап жизненного цикла ВИЧ является мишенью для как минимум одного лекарственного препарата, хотя не все из них широко используются в клинической практике [138, 189, 226, 236].

В настоящее время при проведении АРТ используются комбинированные схемы с включением препаратов разных групп, которые действуют на разные стадии жизненного цикла ВИЧ. Эффективность различных схем АРТ была неоднократно доказана в серии крупных клинических исследований. Согласно современным рекомендациям, для стартовой терапии ВИЧ-инфекции рекомендовано 2 схемы: 1) тенофовир в сочетании с ламивудином плюс долутегравир или 2) тенофовир в сочетании с эмтрицитабином плюс долутегравир. При невозможности использования предпочтительных схем рекомендовано назначение альтернативных схем, а на следующем этапе – так называемых схем для особых случаев [70].

ОТ в настоящее время остается ключевой мишенью для проведения АРТ. ОТ представляет собой асимметричный гетеродимер, состоящий из двух субъединиц – р661 и р51. Субъединица р66 обеспечивает ферментативную активность, р51 – поддерживает конформационную структуру фермента. Как и многие нуклеотидполимеразы, ОТ имеет форму «правой руки», включающую в свой состав следующие субдомены [87, 127, 197, 277]:

- «пальцы» (соответствуют аминокислотным остаткам 1-85, 118-155);
- «ладонь» (86–117, 156– 236);
- «большой палец» (237–318);
- соединительный субдомен (319–426);
- субдомен РНК-азы Н (остатки 427–560).

ОТ обладает двумя каталитическими центрами в составе субъединицы р66, которые обуславливают 2 вида каталитической активности – полимеризационную и активность РНК-азы Н. Основной является полимеризационная активность, - достраивание ДНК на матрице РНК. Второй вид активности необходим для

расщепления РНК в составе гибрида, включающего РНК и ДНК. Каталитический центр ОТ, обеспечивающий полимеризационную активность, располагается в районе «ладони»; каталитический центр активности РНК-азы Н – на расстоянии в 17-18 аминокислотных остатков от него [270].

НИОТ являются старейшим классом препаратов против ВИЧ, которые и до настоящего времени остаются «краеугольным» камнем антиретровирусной терапии, входя в большинство предложенных схем лечения. К НИОТ относятся абакавир, тенофовир дизопроксил, эмтрицитабин, ламивудин, зидовудин [87, 92, 138, 232]. Препараты данной группы выступают в качестве субстратов вирусной обратной транскриптазы (ОТ, ревертазы) – ключевого фермента ВИЧ, обеспечивающего транскрипцию вирусной РНК в двуспиральную ДНК. НИОТ подвергаются внутриклеточному фосфорилированию киназами клеток человека до ди- или трифосфатов и действуют как аналоги дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, включаясь в растущую цепь вирусной ДНК вместо аналогов. Это приводит к обрыву цепи и прекращению репликации вследствие отсутствия у НИОТ гидроксильной группы в 3'-положении рибозного кольца. Таким образом, НИОТ действуют в качестве терминаторов нарастания цепи вирусной ДНК [87].

Эпоха ННИОТ началась в конце 1980-х годов, когда в институте Rega (Бельгия) был открыт НЕРТ (1- [(2-гидроксиэтокси)метил]-6-(фенилтио)тимин). В дальнейшем были синтезированы различные производные НЕРТ, а также производные ТИВО (4,5,6,7-тетрагидро-5-метилимидазо(4,5,1-jk) (1,4)бензодиазепин-2(1H)-он), которые нашли широкое применение в клинической практике. В настоящее время в мире FDA одобрено 6 препаратов их группы ННИОТ - невирапин (NVP), делавирдин (DLV), эфавиренз (EFV), этравирин (ETR), рилпивирин (RPV) и доравирин (DOR). В России также зарегистрирован оригинальный препарат элсуфавирин [260, 270].

ННИОТ являются неконкурентными ингибиторами ОТ: они связываются с аллостерическими центрами фермента, влияя на работу полимеризационного центра вследствие изменения его мобильности и гибкости. Основной мишенью

ННИОТ является гидрофобный «карман», расположенный на расстоянии 10-15 Å от каталитического центра (рисунок 3) с полимеразной активностью и 60 Å от центра с активностью РНК-азы Н. В связывании ННИОТ участвуют преимущественно гидрофобные аминокислотные остатки субъединиц р66 и р51. Следует отметить, что ННИОТ активны только в отношении ВИЧ-1, но не ВИЧ-2 [114]. У ВИЧ-1 в 181 и 188 положении располагается остаток тирозина, в то время как у ВИЧ-2 в положении 181 находится остаток изолейцина, а в положении 188 – остаток лейцина, что обуславливает устойчивость ОТ ВИЧ-2 к действию ННИОТ на этапе связывания препаратов с ферментом [246, 270].

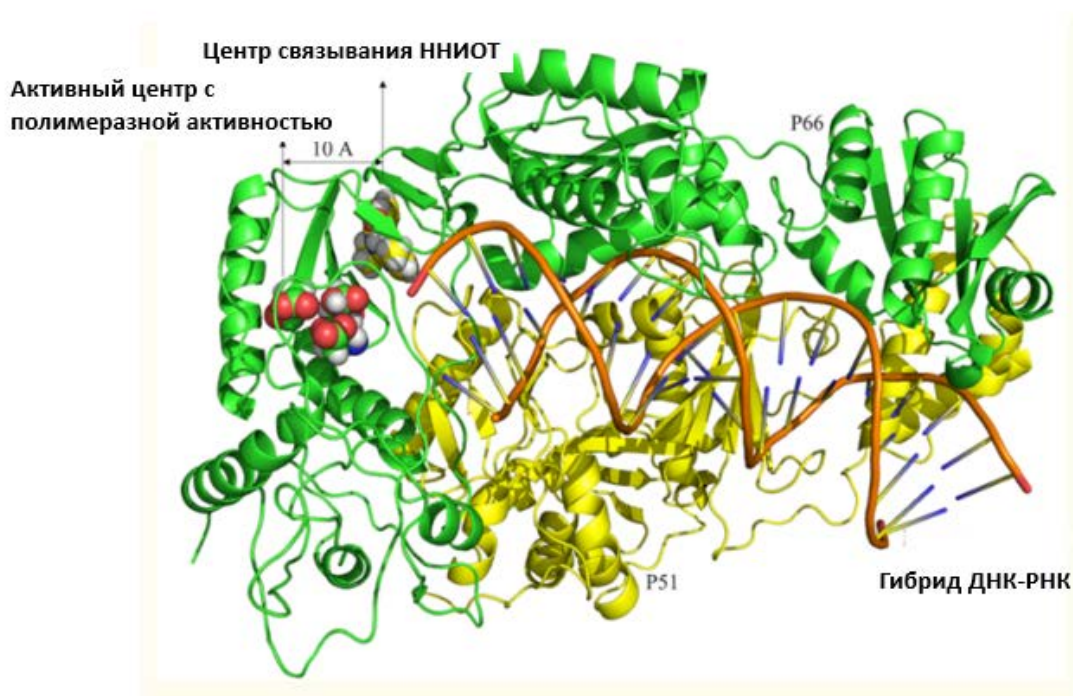


Рисунок 3 – Структура ОТ ВИЧ и место связывания ННИОТ (адаптировано из С. Zhuang и соавт., 2020)

Непосредственные механизмы молекулярного действия ННИОТ различаются у разных препаратов этого класса. Например, невирапин меняет положение остатков Y181 и Y188, что сопровождается изменением третичной структуры фермента и раздвиганием бета-листов, в состав которых входят каталитические аминокислотные остатки и места связывания праймера. Для

эфафиренза значимым может быть воздействие на динамические показатели взаимодействия нуклеиновой матрицы с ферментом [65].

С середины 1990-х годов в клинической практике для лечения ВИЧ-инфекции используются ингибиторы протеазы [182, 266]. Первый препарат из этой группы – саквинавир – был зарегистрирован в 1995 году. После этого были зарегистрированы еще 8 препаратов из этого класса. Протеаза ВИЧ представляет собой ретровирусную аспартатную протеазу, которая обеспечивает разрезание полипротеинов (Gag, Nef и Gag-Pol) на мелкие активные протеины, благодаря чему образуются зрелые вирионы. Во время сборки вирусных частиц с участие протеазы осуществляется 12 таких этапов [153, 263]. Учитывая небольшой размер протеазы ВИЧ (масса около 11 кДа) и его функциональную значимость, предполагалась, что резистентность к данному классу соединений будет развиваться крайне редко. Тем не менее при внедрении ингибиторов протеазы в клиническую практику достаточно быстро стали регистрироваться случаи резистентности [104, 242]. Более того, для ингибиторов протеазы характерна перекрестная резистентность, так как все соединения этого класса обладают сходной химической структурой [86]. Кроме того, при длительном применении ингибиторы протеазы приводят к нарушению липидного обмена и другим метаболическим нарушениям [111, 112, 125, 171, 207, 242].

Одной из последних по времени внедрения в клиническую практику группой антиретровирусных препаратов являются ингибиторы интегразы (или ингибиторы переноса цепи интегразой) [142, 207, 247, 256, 274]. Интеграза играет ключевую роль в процессе интеграции вирусной ДНК в геном клетки-хозяина. Данный процесс протекает в 4 этапа: 1) связывание интегразы с вирусной ДНК в цитоплазме с образование преинтеграционного комплекса; 2) «3'-процессинг» (вырезание интегразой динуклеотидов на концах вирусной ДНК и образование новых гидроксильных концов; 3) «перенос цепи» - проникновение преинтеграционного комплекса и связывание интегразы с ДНК клетки-хозяина для обеспечения стыковки гидроксильных групп на концах вирусной ДНК с фосфодиэстеразными мостиками ДНК клетки-хозяина; 4) репарация разрывов

[119, 141, 178, 187, 259]. Ингибиторы интегразы ингибируют третий этап данного процесса. Первый препарат из класса ингибиторов протеазы – ралтегравир - был зарегистрирован в 2007 году, позже были зарегистрированы другие препараты – элвитегравир (2012), долутегравир (2013), биктегравир (2018), каботегравир (2021). Высокая эффективность ингибиторов интегразы была показана в целом ряде крупных рандомизированных клинических исследований, что определяет их место в современных рекомендациях по лечению ВИЧ-инфекции [90, 164, 241, 281]. В частности, в нашей стране, согласно национальным рекомендациям, долутегравир входит в состав обеих схем, которые рекомендовано использовать для стартовой терапии ВИЧ-инфекции. Важным преимуществом ингибиторов интегразы является относительно благоприятный профиль переносимости и безопасности, а также минимальная токсичность [186]. Ингибиторы интегразы делятся на 2 поколения. Препараты первого поколения (ралтегравир и элвитегравир) характеризуются низким порогом возникновения перекрестной резистентности. Для препаратов второго поколения частота резистентности является достаточно низкой. Следует отметить, что ингибиторы интегразы эффективны у пациентов со множественной лекарственной устойчивостью к препаратам других групп [89]. В целом в настоящее время ингибиторы интегразы (прежде всего, препараты второго поколения) рассматриваются в качестве важнейшей составляющей комбинированной АРТ [207].

Среди других классов препаратов необходимо отметить ингибиторы фузии – препараты этой группы связываются с вирусным гликопротеином gp41 и препятствуют его структурной реаранжировке, которая необходима для процесса слияния вируса с клеткой организма хозяина [193, 269]. Зарегистрированный препарат этой группы – энфувиртид (2003) – используется в форме для подкожного введения в комбинации с другими антиретровирусными препаратами. Для энфувиртида характерны хорошая переносимость и благоприятный профиль безопасности. В настоящее время данный препарат в большинстве случаев используется в составе комбинированной терапии у пациентов со множественной

резистентностью, а также при развитии непереносимых нежелательных явлений на препараты других групп [170, 183].

Зарегистрированные в РФ препараты для ВААРТ с указанием механизма их действия представлены в таблице 1.

Среди немедикаментозных методов лечения ВИЧ-инфекции необходимо отметить трансплантацию костного мозга, а также генно-инженерные подходы (цинковые пальцы и CRISP/Cas). Применение этих методов основано на том, что люди с мутацией по типу делеции гена *CCR5* невосприимчивы к ВИЧ, так как в этом случае оказывается невозможным прикрепление ВИЧ к Т-лимфоциту [97, 150].

В литературе описано несколько случаев излечения (достижения длительной ремиссии) при трансплантации костного мозга от донора с мутацией *CCR5Δ32*. В этих случаях трансплантация костного мозга производилась в связи с развитием у пациентов онкологических гематологических заболеваний. Возможность применения данного метода лечения широко обсуждается в литературе [134, 172, 188, 190, 239, 264]. Определенные надежды также возлагаются на генно-инженерные методы редактирования генома с использованием технологии цинковых пальцев и методики CRISP/Cas [136, 150, 160, 190].

Несмотря на значительные достижения в области разработки АРТ, существенной проблемой остается быстрый рост резистентности ВИЧ к антиретровирусным препаратам [67, 103, 118, 176, 189, 209, 279]. Под резистентностью (лекарственной устойчивостью) понимают способность ВИЧ инфицировать клетки и размножаться в них в присутствии антиретровирусного препарата. Основным фактором развития резистентности ВИЧ является возникновение мутаций в ряде ключевых белков – мишеней для современной антиретровирусной терапии (ОТ, интегразы, протеазы, другие поверхностные и структурные белки). Следует отметить, что ведущей причиной развития резистентности является воздействие препаратов, которые недостаточно подавляют репликацию ВИЧ [110, 227, 273].

Таблица 1 - Препараты для ВААРТ и механизм их действия

Группа препаратов (механизм действия)	Международные непатентованные названия зарегистрированных в РФ препаратов
Нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы (НИОТ)	Абакавир Диданозин Зидовудин Ламивудин Ставудин Тенофовир Тенофовира алафенамид Фосфазид Эмтрицитабин
Ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы (ННИОТ). Комбинированные препараты	Зидовудин+Ламивудин Абакавир+Ламивудин+Зидовудин Абакавир+Ламивудин Эмтрицитабин+Тенофовир Ламивудин+Фосфазид
Ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы (ННИОТ)	Доравирин Рилпивирин Невирапин Элсульфавирин Этравирин Эфавиренз
НИОТ + ННИОТ. Комбинированные препараты	Тенофовир+Эмтрицитабин+Эфавиренз Рилпивирин+Тенофовир+Эмтрицитабин Доравирин+Ламивудин+Тенофовир
Ингибиторы протеазы (ИП)	Атазанавир Ритонавир Дарунавир Индинавир Саквинавир Типранавир Фосампренавир
ИП. Комбинированные препараты	Лопинавир+Ритонавир

Продолжение таблицы 1

Группа препаратов (механизм действия)	Международные непатентованные названия зарегистрированных в РФ препаратов
Ингибиторы интегразы (ИИ)	Долутегравир Ралтегравир
ИИ + НИОТ. Комбинированные препараты	Кобицистат+Тенофовира алафенамид+Элвитегравир+Эмтрицитабин
Ингибиторы слияния (фузии)	Энфувиртид
Антагонисты рецепторов CCR5	Маравирок

ВОЗ выделяет 4 группы факторов (причин) возникновения резистентности ВИЧ к применяемым лекарственным препаратам:

- факторы, связанные с препаратами и схемами используемой терапии (например, неверная дозировка, лекарственные взаимодействия и др.);
- факторы, связанные с вирусом (высокая репликативная активность, снижение у некоторых штаммов барьера к развитию резистентности и др.);
- факторы, связанные с пациентом (нарушение схемы приема препаратов, низкая приверженность к терапии);
- факторы, связанные с организацией системы лечения и наблюдения, что обуславливает снижение доступности препаратов.

Частота выявления резистентности к антиретровирусным препаратам меняется с течением времени. На первом этапе (до 2000 г.) было отмечено появление и распространение резистентности к НИОТ. Значительный рост резистентности отмечен в период с 2000 по 2005 гг. в связи с активным внедрением АРТ в целом ряде стран мира, причем в этот период прежде всего отмечался рост резистентности к ННИОТ. Следует отметить, что до настоящего времени именно ННИОТ являются классом антиретровирусных препаратов, к которым наиболее часто определяется резистентность. На данном этапе во многих развитых странах мира (прежде всего, странах Европы и США) уровень первичной резистентности превысил 10%, а для пациентов, длительно

получающих различные препараты, достигал 50%. В последующем за счет оптимизации схем АРТ удалось добиться стабилизации и снижения уровня резистентности на уровне около 10%. Однако в настоящее время крайне остро стоит проблема появления штаммов ВИЧ со множественной лекарственной устойчивостью.

В значительной части случаев резистентность отмечается уже у пациентов, только начинающих получать терапию. Особенно остро данная проблема стоит в развитых странах, в которых резистентность отмечается примерно в 20% случаев у пациентов, начинающих терапию и 40% случаев при возобновлении терапии [199]. Частота встречаемости резистентности ВИЧ к различным группам препаратов в разных странах представлена в таблице 2. В Российской Федерации при обследовании пациентов по клиническим показаниям в 2016 году резистентность была выявлена в 27% случаев (форма № 61 Министерства здравоохранения РФ).

Таблица 2 - Резистентность ВИЧ к различным лекарственным препаратам в разных странах (адаптировано из Y. Ma и соавт., 2021)

Страна/регион	Год	Резистентность, %			
		Общая	НИОТ	ННИОТ	Ингибиторы протеазы
США	2017	39,3	19,2	27,4	6,2
Европа	2017	14,5	5,1	8,6	2,0
Китай	2017	6,25	0,7	5,0	0,5
Латинская Америка	2001-2015	7,7	4,0	3,7	1,7
Страны Азии с высоким уровнем дохода	2000-2013	5,6	3,5	1,1	1,6

Как видно из таблицы 2, наиболее часто резистентность развивается к препаратам из группы ННИОТ. Большинство мутаций, вызывающих резистентность к препаратам из этой группы, локализованы в полимеразном

доме. Так как все известные ННИОТ имеют общие сайты связывания с ОТ, достаточно быстро развивается перекрестная резистентность. Например, такие мутации, как L100I, K101P, Y181C/I и G190A одновременно обуславливают толерантность ко всем применяемым в настоящее время ННИОТ. Первое поколение ННИОТ (невирапин, доравирин и эфавиренц) имеют достаточно низкий порог возникновения резистентности, при этом высокий уровень резистентности к данным препаратам может возникать при наличии одной мутации (например, K103N и Y181C) [192]. По данным обновленного в 2019 году отчета, чаще всего резистентность к ННИОТ обусловлена мутациями L100I, K101P, K103N/S, V106A/M, V108I, Y181C/I/V, Y188L, G190A/S и M230L [275]. Препараты второго поколения (рилпивирин и доравирин) характеризуются достаточно высоким порогом возникновения резистентности. Например, показано, что данные препараты сохраняют высокую противовирусную активность при наличии мутации K103N. Тем не менее к настоящему времени уже описаны случаи мутаций, обуславливающих резистентность ВИЧ к действию и этих препаратов, что чаще всего бывает при наличии трех и более мутаций [269].

1.3 Подходы к созданию новых нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы

В последние годы сохраняется крайне высокий интерес к синтезу новых препаратов из группы ННИОТ. Во многом это обусловлено уникальными особенностями препаратов данной группы, которые соединяют высокую антиретровирусную активность с низкой токсичностью и редкостью возникновения значимых лекарственных взаимодействий. Это обуславливает высокую эффективность ННИОТ, в том числе, в комбинации с другими антиретровирусными препаратами [136, 158, 215, 245, 283].

Основной проблемой применения существующих ННИОТ остается высокий уровень резистентности, который является фактически самым высоким среди всех

существующих групп препаратов. Изучение механизмов развития резистентности ВИЧ к ННИОТ крайне важны для создания новых лекарственных препаратов [257]. Например, исходя из особенностей взаимодействия ННИОТ с ОТ, ясно, что для успешного предотвращения резистентности структура молекулы должна быть гибкой, так как в этом случае единичные замены аминокислотных остатков в составе фермента не будут препятствовать взаимодействию препарата с сайтом его связывания. Считается, что именно жесткая структура ННИОТ первого поколения обуславливает развитие резистентности даже при единичных заменах аминокислотных остатков [269].

В целом известные в настоящее время механизмы развития резистентности к ННИОТ могут быть классифицированы следующим образом [65, 128]:

- препятствие размещению препарата в гидрофобном кармане (например, мутации L100I, G190A);
- нарушение проникновения ННИОТ внутрь гидрофобного «кармана» (K103N и K101E);
- нарушение взаимодействия препарата с аминокислотными остатками внутри «кармана» (мутации Y181C, Y188L);
- разрыв «мостика» между аминокислотными остатками K101–E138, которые стабилизируют конформацию фермента (K103N, K101E/H/P, E138A/G/K/Q/R);
- нарушение скорости связывания ННИОТ с ОТ за счет опосредованного эффекта мутации в соседнем домене (N348I, T369I/V, T376S).

Последнее десятилетия ознаменовалось значительным прогрессом в области синтеза новых ННИОТ. Так, только за последние 13 лет в клиническую практику были успешно внедрены 3 препарата из этой группы – этравирин, рилпивирин и доравирин. Новые препараты из группы ННИОТ в настоящее время разрабатываются на основе несколько ключевых соединений: НЕРТ, диарилзамещенных пиримидинов (DAPY) и дигидроалкоксибензилоксопиримидинов (DABO) [65, 117, 136, 278, 283].

НЕРТ, полученная впервые еще в 1989 году, является предшественником всех препаратов из группы ННИОТ [213]. Разработка новых препаратов – производных НЕРТ основано на модификации 6 основных структурных элементов в составе молекулы. В исследованиях с применением рентгеноструктурного анализа были уточнены основные механизмы ингибирующего эффекта производных НЕРТ. Высококонсервативными в составе НЕРТ оказались положения N-3 и C-4, необходимые соответственно для образования связей (с K101 для N-3, E138 и K101 для C-4). Высокая консервативность также характерна для кислорода в положении C-2, который необходим для образования водородной связи с Y318 [65].

Крайне важным для активности производных НЕРТ является ароматический цикл в положении C-6 пиримидинового цикла, вступающий в стеккинг с Y181 или Y188 [167]. Следует отметить, что данная особенность определяет и основное ограничение данных производных НЕРТ – быстрое развитие резистентности при мутациях Y181C. Было предложено несколько подходов для преодоления данного ограничения: введения вместо бензольного кольца циклогексильного фрагмента, замена бензольного кольца другой ароматической системой, введение радикалов в состав бензольного кольца, замена бензольного кольца на нафтильный цикл. Высокоактивное производное НЕРТ удалось получить путем введения заместителей в метаположение бензольного кольца, которые вступают во взаимодействие с боковой группой аминокислотного остатка в положении W229 [167]. Дальнейшее изучение этого ряда соединений было приостановлено из-за сложности выбора радикала в метаположении, так как соединение с метильной группой активно метаболизируется системой цитохрома P450, соединения с циано-группой обладают низкой биодоступностью, а ряд других соединений (с кето- и дифторметиленовой группой) оказались химически нестабильными [65].

Для повышения ингибирующей активности НЕРТ эффективными оказались несколько подходов. Один из них – введение алкильного заместителя в положение C-5 молекулы [94]. Именно таким образом было синтезировано одно из производных НЕРТ, дошедшее до клинических исследований (эмивирин).

Данное вещество характеризовалось высокой антивирусной активностью, но к нему быстро формировалась резистентность при развитии мутации Y181C [95]. Оказалось, что именно участок Y181 ОТ ВИЧ взаимодействует с изопропильным фрагментом молекулы эмвирина, вызывая при этом изменение положения боковой группы Y181 [167]. Другой, оказавшийся крайне успешным, подход – внесение изменений в структуру заместителя в N-1 положении пиримидина. Например, был создан ряд веществ с алкильным заместителем в данном положении, при этом наиболее хорошо изучена серия веществ с циклопентенильным фрагментом в данном положении [109].

В настоящее время наиболее перспективным можно считать разработку производных диарилзамещенных пиримидинов (DAPY) [117, 136, 278]. К данному классу относятся два зарегистрированных и широко применяемых ННИОТ - этравирин и рилпивирин. Наиболее значимым преимуществом данных препаратов является высокий барьер возникновения резистентности при мутациях в области гидрофобного «кармана», что напрямую связано с особенностями структуры производных DAPY и связанной с ней конформационной гибкостью. В последние годы многие исследовательскими группами проводятся исследования, направленные на модификацию структуры производных DAPY с целью получить препарат с высокой противовирусной активностью и низкой цитотоксичностью [65, 136, 243].

Родоначальником данного класса соединений является R15345, которое послужило основой для синтеза ловирида, дошедшего до клинических исследований, но не показавших преимущества перед ННИОТ первого поколения [198]. Ловирид стал основой для синтеза имидоил-тиомочевинных производных (R100943), на основе которых путем замены тиокето-группы на иминоциано-группу был синтезирован диарилтриазин (R106168). Для данного соединения была показана высокая противовирусная активность и высокий барьер для развития резистентности. Следующее значительное преобразование – замена центрального триазинового фрагмента на пиримидиновое кольцо, следствием чего стало получение соединения, для которого была показана очень высокая

активность в отношении как вируса ВИЧ дикого типа, так и мутантного штамма [65].

В серии экспериментов проводились модификации фрагментов А-С молекулы DAPY, что позволило получить дапивириин (R147681) [100, 133]. В дальнейшем были получены соединения с цианогруппой в параположении ароматического кольца, которые стали основой для синтеза рилпивирина. Полученные в результате замены аминокетильной группы между центральным и левым ароматическим циклами на гидроксиметиловую несколько соединений показали высокую активность в отношении вируса дикого типа, однако теряли её при наличии двойной мутации K103N+Y181C [136]. Потеря активности при наличии данной двойной мутации была характерна также для соединений, у которых была проведена замена бензольного цикла во фрагменте А на нафтильный цикл [146, 196]. Другой зарегистрированный в настоящее время ННИОТ второго поколения – этравириин – был синтезирован как галоген-замещенное по пиримидиновому циклу соединение, высокоактивное в отношении как вируса дикого типа, так и двойных мутантов (L100I+K103N и K103N+Y181C) [88, 198]. Наконец, еще один зарегистрированный в препарат (доравириин), был создан как аналог этравирина с заменой пиримидинового фрагмента пуриновым циклом [132, 151, 225, 235, 272].

В последние годы были открыты и изучены ННИОТ пиримидиновой природы, в состав которых входят двуядерные ароматические заместители - производные пирокатехина и бензофенона. Производные бензофенона впервые были получены в 2004 году [115]. Группой сотрудников кафедры фармацевтической и токсикологической химии, НИИ фармакологии ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России в сотрудничестве со специалистами Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН был открыт новый класс ННИОТ – N-алкилзамещенные производные пиримидиновых и пуриновых оснований, содержащие терминальные ненасыщенные и ароматические фрагменты [73, 219]. Было показано, что соединения этой группы высокоэффективно подавляют репродукцию ВИЧ-1 в условиях *in vitro*. Особенно перспективными являются соединения - производные бензофенона, содержащие

двухъядерный ароматический фрагмент на конце ациклической цепи в N1-замещенных урацилах, которые высокоэффективно подавляют репликацию ВИЧ, при этом обладают эффективностью в отношении многих мутантных форм ВИЧ (L100I, K103N, Y181C, Y188L, G190A, K103N/Y181C) [261]. Высокая эффективность данных соединений обусловлена высокой конформационной подвижностью, что позволяет им по-разному взаимодействовать с аллостерическим центром ОТ, а также позволяют взаимодействовать с консервативными участками Pro236, Asn103 и Tyr188. Таким образом, указанные особенности позволяют предполагать у данных соединений улучшенные профиль резистентности по сравнению с применяемыми ННИОТ как первого, так и второго поколения. Дальнейшие разработки позволили синтезировать вещество VMU-2012-05 с наибольшей величиной ингибиторной концентрации, которое представляет значительный интерес для дальнейших исследований.

1.4 Контроль качества инновационных препаратов

Согласно закону [1] фармацевтическая субстанция - лекарственное средство в виде одного или нескольких обладающих фармакологической активностью действующих веществ вне зависимости от природы происхождения, которое предназначено для производства, изготовления лекарственных препаратов и определяет их эффективность.

Качество активной фармацевтической субстанции (АФС) играет решающую роль в эффективности и безопасности лекарственных препаратов (ЛП) и является определяющим фактором качества препаратов. Современные подходы к стандартизации АФС любого происхождения зафиксированы в виде Государственных Фармакопейных стандартов Российской Федерации. Показатели качества АФС, методы их определения, и нормативные требования к качеству, включенные в фармакопейные статьи, должны быть воспроизводимы для любой субстанции, заявленной под соответствующим наименованием [47].

Более того, показатели контроля качества и пределы нормирования должны соответствовать назначению субстанции (например, изготовление стерильных и нестерильных ЛП). Испытания по показателям контроля качества фармацевтической субстанции проводят согласно соответствующим общим фармакопейным статьям (ОФС) [81].

Контроль качества АФС

Каждый этап и процесс производства АФС предполагает определенную стратегию контроля качества. Для достижения качества активной фармацевтической субстанции стратегия контроля должна обеспечивать нахождение каждого критического показателя качества активной фармацевтической субстанции в пределах соответствующей нормы [33].

Стратегия контроля может включать в себя различные этапы, представленные в таблице 3.

Таблица 3 - Стадии производства АФС и стратегии контроля качества

Стратегия контроля качества в зависимости от этапа производства				
Вид производства	Производство исходного сырья для АФС	Синтез АФС	Производство промежуточного продукта	Выделение и очистка АФС
Стратегия	Контроль параметров материалов	Контроль, встроенный в дизайн процесса производства	Внутрипроизводственный контроль, контроль параметров материалов	Контроль активной фармацевтической субстанции

Контроль параметров материалов может включать в себя контроль исходного сырья и материалов, промежуточных продуктов, реагентов и т.д. Контроль, встроенный в дизайн процесса производства, представляет собой контроль порядка добавления реагентов в процессе производства. Внутрипроизводственный контроль, как правило, включает внутрипроизводственные испытания и контроль параметров процесса. К контролю активной фармацевтической субстанции относят выпускающее испытание.

Характеризация АФС

В рамках разработки стратегии контроля производства, испытаний и выпуска фармацевтической субстанции проводятся подробные исследования химических и физических свойств продукта. Особое внимание уделяется характеристике и выпускающему контролю АФС, который включает следующие основные этапы (рисунок 4):

1. Подтверждение структуры молекулы;
2. Изучение физико-химических характеристик;
3. Изучение и идентификация посторонних примесей;
4. Разработка спецификации и методик контроля качества субстанции, их валидация;
5. Испытание стабильности вещества, установление срока и условий хранения.

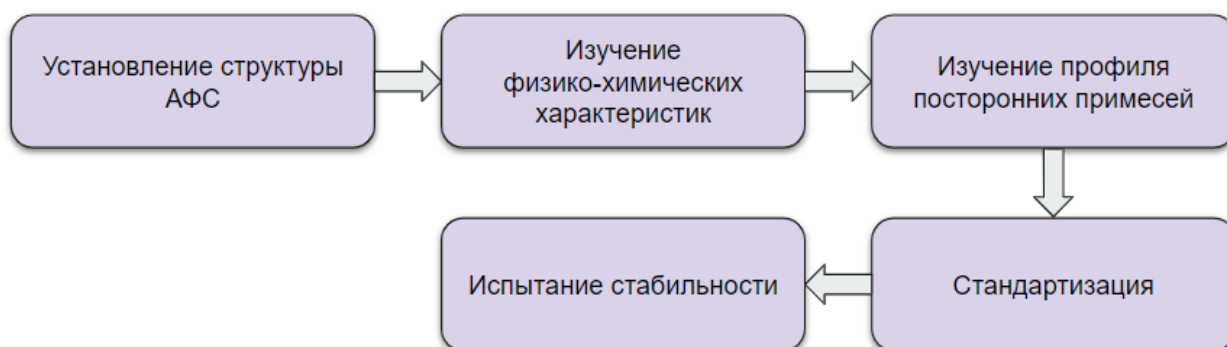


Рисунок 4 - Основные этапы контроля качества фармацевтической субстанции

Полученные результаты позволяют составить подробную характеристику АФС, а также установить целевые показатели для определения критических показателей качества субстанции.

Подготовка спецификации активной фармацевтической субстанции является частью общей стратегии контроля, при этом не обязательно включать в данный документ все критические показатели качества. Один из вариантов стратегии контроля качества - включение критических показателей качества в спецификацию и подтверждение их посредством испытания готовой активной

фармацевтической субстанции. Второй вариант - включение в спецификацию критических показателей качества и подтверждение их посредством контроля предшествующих стадий (например, при выпускающих испытаниях в реальном времени). Третий вариант стратегии контроля качества - критические показатели качества допускается не включать в спецификацию, но необходимо обеспечивать их оценку посредством контроля на предшествующих стадиях процесса производства [33].

Требования к спецификации на АФС

Спецификация определяется как список испытаний, аналитических методов и соответствующих критерий приемки, которые представляют собой пределы, диапазоны или другие критерии для описываемых испытаний. Он устанавливает набор критериев, которым должна соответствовать новая лекарственная субстанция, чтобы считаться приемлемыми для использования по назначению.

Разработку проекта спецификации на АФС с указанием методов контроля и норм показателей проводят на основании требований, представленных в соответствующих ОФС.

К критическим показателям качества относятся: подлинность, чистота и количественное определение с указанием содержания. Для контроля подлинности в большинстве случаев вводится проверка ИК-спектра субстанции, а также используются методы УФ-спектрофотометрии, ВЭЖХ, ТСХ и качественные реакции [219].

Дополнительно подлинность субстанции подтверждается следующими выделяемыми показателями качества «Температура плавления», «Плотность», «Удельное вращение», «Показатель преломления», «Удельный показатель поглощения», «Вязкость», и др. Каждый из этих параметров определяется соответствующим физическим или оптическим методом.

Для проверки степени чистоты АФС в ГФ предусмотрено большое количество показателей. Одним из наиболее часто включаемых показателей является определение родственных примесей - сходных по структуре с АФС промежуточные соединения, побочные продукты синтеза, а также продукты

распада субстанции. Для оценки содержания родственных примесей применяют методы физико-химического анализа: газовая хроматография, ВЭЖХ. Число родственных примесей в одной субстанции может достигать нескольких десятков. В ряде случаев родственные примеси являются очень токсичными соединениями, поэтому их строгое нормирование крайне важно для обеспечения безопасности фармацевтической субстанции.

Также к числу наиболее распространенных примесей в АФС относят воду, определение которой важно по нескольким причинам:

1. Невозможность рассчитать количественное содержание субстанции без учета влаги;
2. Влага способствует ускорению процесса разложения субстанции.

В соответствующих ОФС предлагается два основных метода определения воды в АФС: титрование по методу Карла Фишера и измерение потери массы при высушивании [26].

Одним из наиболее часто включаемых является показатель «Сульфатная зола», в котором определяется сумма минерализированных неорганических примесей. Среди этих показателей наиболее токсичными являются тяжелые металлы, поэтому их значение выносят в отдельный показатель.

Наличие неспецифических примесей кислотного и основного характера определяется такими показателями, как «рН» и «Кислотность или щелочность». Обычно определение рН проводят в том случае, если раствор субстанции в воде обладает буферной емкостью. В противном случае, вводится показатель качества «Кислотность или щелочность», при котором определяется количество щелочи или кислоты необходимое для изменения окраски индикатора.

Если примеси влияют на внешний вид раствора субстанции, то вводят показатели качества «Прозрачность» и «Цветность». Особенно важна оценка данных показателей, если АФС предназначена для производства препаратов для парентерального применения и глазных капель.

Стандартизации и последующему контролю качества по показателю «Остаточные органические растворители» подлежат все фармацевтические

субстанции независимо от способа применения, если при их получении или очистке используются органические растворители. Предусмотрены не только методы определения, но и нормируемое содержание в субстанциях остаточных органических растворителей [27]. Например, в таблице 4 представлены предельно допустимые содержание высокотоксичных растворителей (генотоксические канцерогены), применяемые в фармацевтическом производстве в исключительных случаях, когда нельзя отказаться от их использования.

Таблица 4 - Предельно допустимое содержание в лекарственных средствах остаточных органических растворителей 1 класса токсичности [27]

Растворитель	Предельно допустимое содержание, ppm
Бензол	2
1,1-Дихлорэтан	8
1,2-Дихлорэтан	5
1,1,1-трихлорэтан	1500
Четыреххлористый углерод	4

Для субстанций, которые используются для приготовления парентеральных лекарственных форм, предназначенных для внутрисосудистого введения, вводят такой параметр, как «Депрессорные вещества» и «Гистамин». «Испытания на Пирогенность» или «Бактериальные эндотоксины» проводят для субстанций, предназначенных для приготовления парентеральных лекарственных форм.

Важнейшим показателем качества АФС является содержание в ней основного вещества и фармакологически активной части молекулы, по которому и осуществляется ее стандартизация. Диапазон допустимого содержания устанавливается экспериментально. При этом учитывается:

- 1) способ получения, определяющий реально возможную степень чистоты субстанции;
- 2) точность, правильность и погрешность аналитического метода;
- 3) максимально допустимое количество примесей;
- 4) скорость разложения субстанции в течение срока годности;

5) данные количественного определения не менее трех серий различных производителей.

Разработка единых норм и требований, то есть стандартизация АФС, является неотъемлемой частью системы управления ее качеством и, следовательно, качество лекарственных препаратов, производимых из нее.

1.5 Заключение

ВИЧ-инфекция по-прежнему остается глобальной медико-социальной проблемой. За все время пандемии этим заболеванием заразилось до 100 млн. человек. Россия относится к странам с крайне напряженной эпидемиологической обстановкой по ВИЧ-инфекции. На протяжении последних десятилетий наблюдается непрерывный рост пораженности и смертности от ВИЧ-инфекции.

ВИЧ относится к лимфотропным вирусам и вызывает по мере прогрессирования заболевания развитие тяжелого иммунодефицита, на фоне которого у пациентов развиваются оппортунистические инфекционные осложнения и онкологические заболевания, которые и обуславливают большинство случаев развития летальных исходов. За последние десятилетия детально изучены основные молекулярные механизмы развития ВИЧ-инфекции, детально охарактеризованы этапы жизненного цикла ВИЧ. Значительным достижением является внедрение в клиническую практику нескольких классов антиретровирусных препаратов, что позволило значительно увеличить продолжительность жизни пациентов с ВИЧ-инфекцией. В настоящее время стало реальностью добиться полного подавления вирусной нагрузки у подавляющего большинства пациентов. Несмотря на значительные достижения, серьезной проблемой является частое развитие резистентности ВИЧ к применяемым препаратам, что определяет важность синтеза новых высокоэффективных и малотоксичных препаратов. В настоящее время продолжают интенсивные исследования, направленные на синтез новых соединений из группы нуклеотидных ингибиторов обратной транскриптазы, обладающих профилем

резистентности, отличным от имеющихся препаратов из этой группы первого и второго поколения. Во многом это связано уникальными особенностями препаратов данной группы – высокой антиретровирусной активностью, низкой токсичностью, отсутствием значимых лекарственных взаимодействий.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Исследуемый препарат

2.1.1 Субстанция

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 субстанции 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 5.

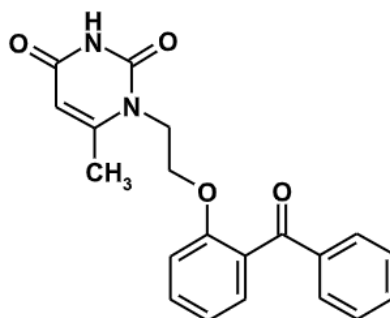


Рисунок 5 - Относительная пространственная структура соединения

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 малорастворим в метаноле, малорастворим в хлороформе.

2.1.2 Готовое лекарственное средство

Готовое лекарственное средство на основе субстанции 1- [2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил - таблетки для приема внутрь, 50 мг.

Состав на одну таблетку

Действующее вещество:

1- [2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил	50,0 мг
---	---------

Вспомогательные вещества:

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
------------------------	-----------------

Образцы таблеток были наработаны сотрудниками опытно-технологического отдела АО НПО «Дом Фармазии» и предоставлены для доклинического изучения.

2.2 Подтверждение структуры и характеристика субстанции VMU-2012-05 различными физико-химическими методами анализа

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР)

Спектроскопию ядерного магнитного резонанса проводили на ЯМР-спектрометре Bruker Avance-IIIHD 500 (Bruker, Германия), рабочая частота ^1H 500.13 Mhz, ^{13}C 125.76 Mhz с азотным криодатчиком Bruker Prodigy (Bruker, Германия). Для подтверждения строения углеродного скелета потенциального продукта регистрировали спектры ^{13}C в фазочувствительном варианте JMOD (CH_3 , CH – сигналы с отрицательными фазами, CH_2 , C – сигналы с положительными фазами), а также инверсные гетероядерные корреляции HC-NMQC (прямые взаимодействия C-H), HC-NMBC (дальние взаимодействия C-H). Отнесение в спектре ^{13}C -JMOD производили на основе анализа двумерных инверсных корреляций HC-NMQC и HC-NMBC . Навеску массой 20 мг образца субстанции растворяли в 600 мкл DMSO-D_6 (99.95% D). Полученный раствор без дальнейшей обработки помещали в ЯМР-спектрометр для регистрации ^1H , ^{13}C , HC-NMQC и HC-NMBC спектров [174].

Рентгеноструктурный анализ

Рентгенодифракционное исследование субстанции проводили на дифрактометре Bruker APEX II (Bruker, Германия), используя $\text{MoK}\alpha$ -излучение, графитовый монохроматор, ω -сканирование. Структуры расшифрованы прямым методом и уточнены МНК в анизотропном полноматричном приближении по F^2_{hkl} . Атомы водорода рассчитаны геометрически и уточнены с наложением ограничений на длины связей C-H и их изотропные параметры смещений. Все расчеты проведены с использованием программ SHELXL, SHELXT и OLEX-2 [174, 140].

ИК-спектроскопия

Регистрацию спектров в средней инфракрасной области проводили на ИК-Фурье спектрометре Vertex 70 (Bruker Optik GmbH, Германия). Диапазон регистрации спектров — $4000\text{--}400\text{ см}^{-1}$, разрешение — 2 см^{-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. Для регистрации спектра поглощения в средней ИК области применяли технику прессования в таблетку с бромидом калия. Все данные обрабатывали в управляющем программном обеспечении спектрометра OPUS (Bruker, Германия). Взвешивания проводили на аналитических весах Ohaus Adventurer (OHAUS, США) с точностью взятия навески 0.1 мг [174].

Подготовку таблетки для измерения ИК спектра проводили следующим образом. Отмеряли точные навески 1000 мг безводного бромида калия (Pike Technologies, США) и 20 мг, переносили в агатовую ступку (Pike Technologies, США) и тщательно перетирали. Далее смешивали 20 мг полученной смеси и 80 мг чистого бромида калия, тщательно перемешивали и полученную смесь количественно переносили в пресс-форму для формирования таблеток, диаметром 7 мм (Pike Technologies, США). Также формировали таблетку из 100 мг чистого бромида калия, которую измеряли в качестве фона. Регистрацию спектра поглощения таблетки с образцом проводили относительно фонового спектра. С помощью программного обеспечения автоматически компенсировали поглощение паров атмосферной влаги и поглощение диоксида углерода воздуха. После регистрации также проводили коррекцию базовой линии на светорассеяние.

Высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-селективным детектированием (ВЭЖХ-МС)

Для ВЭЖХ-МС анализа использовали систему, состоящую из жидкостного хроматографа Dionex Ultimate 3200 (Dionex, США) и тройного квадрупольного масс-спектрометра ABSciex Qtrap 3200 (ABSciex, Канада), оснащенного электрораспылительной ионизацией. Навеску образца VMU-2012-05 массой 14 мг растворяли в 10 мл метанола. Раствор перед вводом в хроматограф разбавляли в 10 раз смесью ацетонитрил-вода (40-60). 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.

Высокоэффективная жидкостная хроматография с ультрафиолетовым детектированием (ВЭЖХ-УФ)

Определение родственных примесей

Испытание проводили согласно ГФ РФ ОФС.1.2.1.2.0001.15 «Хроматография» и ОФС.1.2.1.2.0005.15 «Высокоэффективная жидкостная хроматография» или Фармакопеи ЕАЭС, ОФС 2.1.2.28 «Высокоэффективная жидкостная хроматография» и ОФС 2.1.2.36. «Хроматографические методы разделения».

Определение проводили методом ВЭЖХ на жидкостном хроматографе высокого давления LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония), оснащенным градиентной системой подачи элюента, диодно-матричным детектором поглощения УФ-видимого диапазона, термостатом для колонок и системой обработки данных.

Растворы были свежеприготовленными, их пропускали через фильтр с размером пор 0,45 мкм и дегазировали. Использовали воду Milli Q.

Хроматографировали испытуемый раствор, приготовленный для теста «Количественное определение», получая не менее 2 хроматограмм. На хроматограмме испытуемого раствора по совпадению времен удерживания с основным пиком на хроматограмме раствора стандартного образца (СО) VMU-2012-05 идентифицировали пик VMU-2012-05 (время удерживания около 4,8 мин). По относительным временам удерживания относительно пика VMU-2012-05 на хроматограмме испытуемого раствора идентифицировали возможные примеси.

На хроматограмме испытуемого раствора не принимали во внимание пики примесных компонентов, площади которых менее 0,1% от площади основного

пика, и пики с временами удерживания менее 3 мин (соответствуют отклику хроматографической системы на ввод плацебо).

Реактивы.

Трифторуксусная кислота (Fluka, кат. № 40967 или аналогичного качества);

Метанол для хроматографии;

Ацетонитрил для хроматографии.

Стандартные образцы.

VMU-2012-05, стандартный образец (СО) АО НПО «Дом Фармации» или аналогичный.

Подвижная фаза (ПФ) А. 0,3 мл трифторуксусной кислоты помещали в мерную колбу вместимостью 1000 мл, прибавляли 900 мл воды, доводили объем раствора водой до метки, перемешивали, фильтровали и дегазировали.

Подвижная фаза Б. Ацетонитрил для хроматографии.

Холостой раствор. 10 мл ацетонитрила помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводили объем раствора подвижной фазой А до метки, перемешивали.

Испытуемый раствор. Около 50,0 мг (точная навеска) субстанции помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, содержащую 10 мл метанола и обрабатывали ультразвуком при температуре 60°C в течение 20 мин, охлаждали до комнатной температуры, доводили объем раствора тем же растворителем до метки, перемешивали ($C = 2$ мг/мл). Раствор использовали свежеприготовленным.

Стандартный раствор. Около 5 мг (точная навеска) стандартного образца VMU-2012-05 помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, содержащую 20 мл метанола и обрабатывали ультразвуком при температуре 60 °С в течение 20 мин, охлаждали до комнатной температуры, доводил объем раствора до метки тем же растворителем, перемешивали.

2 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводили объем раствора метанолом до метки и перемешивали ($C = 0,02$ мг/мл). Раствор использовали свежеприготовленным.

Раствор для проверки пригодности хроматографической системы.

5 мг (точная навеска) стандартного образца VMU-2012-05 помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, содержащую 4 мл метанола, обрабатывали ультразвуком до полного растворения, охлаждали до комнатной температуры, доводили объем раствора до метки метанолом, перемешивали.

1 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводили объем раствора до метки метанолом, перемешивали.

Раствор для оценки чувствительности хроматографической системы.

1 мл стандартного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 20 мл, доводили объем раствора до метки метанолом, перемешивали ($C = 0,001$ мг/мл).

Ожидаемое время удерживания пика 1- [2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила: около 4,8 минут.

Хроматографические условия.

Колонка: Luna C18 (2), 4,6×150 мм с размером частиц 5 мкм или аналогичная, удовлетворяющая требованиям пригодности хроматографической системы.

Скорость потока 1,0 мл/мин

Температура колонки комнатная

Детектор 254 нм

Объем вводимой пробы 20 мкл

Время анализа 20 мин.

Градиент:

Время, мин	Подвижная фаза А, %	Подвижная фаза В, %
0	60	40
20	0	100

Проверка пригодности хроматографической системы:

Хроматографировали холостой раствор до тех пор, пока система не уравнивается; раствор для проверки пригодности хроматографической системы, раствор для оценки чувствительности хроматографической системы, стандартный раствор не менее 6 раз.

Хроматографическая система считалась пригодной, если выполнялись следующие условия:

– разрешение между пиком VMU-2012-05 и пиком примеси D на хроматограмме раствора для проверки пригодности хроматографической системы не менее XX;

– отношение «сигнал/шум», рассчитанное по пику VMU-2012-05 на хроматограмме раствора для оценки чувствительности хроматографической системы не менее 10;

– фактор асимметрии пика VMU-2012-05 на хроматограммах стандартного раствора не более 2,5;

– эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику VMU-2012-05 на хроматограммах стандартного раствора, не менее 1500 теоретических тарелок;

– относительное стандартное отклонение площади пика VMU-2012-05, рассчитанное по 6 последовательным хроматограммам стандартного раствора, не более 5,0 %.

Хроматографировали испытуемый раствор.

Содержание любой примеси, в процентах (X) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{S \cdot a_0 \cdot 2 \cdot 25 \cdot P}{S_0 \cdot a \cdot 50 \cdot 10} = \frac{S \cdot a_0 \cdot P}{S_0 \cdot a \cdot 10}, \quad (1)$$

где: S – площадь пика любой идентифицированной или неидентифицированной примеси на хроматограмме испытуемого раствора;

S_0 – площадь пика VMU-2012-05 на хроматограмме стандартного раствора;

a_0 – навеска стандартного образца VMU-2012-05, в миллиграммах;

a – навеска субстанции, в миллиграммах;

P – содержание VMU-2012-05 в стандартном образце, в процентах.

Сумму примесей (X) вычисляли в процентах по формуле:

X = сумма единичных идентифицированных примесей + сумма неидентифицированных примесей.

При расчете примесей не учитывали пики, присутствующие на хроматограмме холостого раствора и пики, площадь которых меньше площади пика VMU-2012-05 на хроматограмме раствора для оценки чувствительности хроматографической системы (менее 0,05 %).

Количественное определение

Анализ проводился методом ВЭЖХ в условиях, описанных в разделе «Родственные примеси».

Стандартный образец.

VMU-2012-05, стандартный образец (СО) АО НПО «Дом Фармации» или аналогичный;

Испытуемый раствор (0,1 мг/мл). Около 0,020 г субстанции (точная навеска) вносили в мерную колбу вместимостью 200 мл, растворяли во вспомогательном растворе, доводили объем раствора до метки тем же растворителем и перемешивали.

Стандартный раствор (0,1 мг/мл). Около 0,020 г СО VMU-2012-05 (точная навеска) вносили в мерную колбу вместимостью 200 мл, растворяли во вспомогательном растворе, доводили объем раствора до метки тем же растворителем и перемешивали.

В хроматографическую систему последовательно вводили стандартный и испытуемый растворы не менее 6 раз.

Содержание (X , %) VMU-2012-05 в пересчете на безводное, свободное от органических растворителей вещество вычисляли по формуле:

$$F = \frac{S \cdot a_0 \cdot 20 \cdot P \cdot 100}{S_0 \cdot a \cdot 20 \cdot 100 \cdot (100 - Z)} \cdot 100 = 100 \cdot \frac{a_0 \cdot S \cdot P}{a \cdot S_0 \cdot (100 - Z)}, \quad (2)$$

где S – площадь пика VMU-2012-05 на хроматограмме испытуемого раствора;

S_0 – площадь пика VMU-2012-05 на хроматограмме стандартного раствора;

a – навеска субстанции VMU-2012-05, г;

a_0 – навеска стандарта VMU-2012-05, г;

$Z = W + \Sigma Y_i$ – сумма потери в массе при высушивании (W , %) и содержания остаточных органических растворителей, %;

P – содержание VMU-2012-05 в стандартном образце, %.

Газовая хроматография

Остаточные органические растворители

Анализ проводился методом газовой хроматографии [13, 14]. Использовали свежеприготовленные растворы.

Реактивы.

Диметилформамид х.ч. или аналогичный.

Стандартные образцы.

2-этоксиэтанол для хроматографии или аналогичный.

Этилацетат для хроматографии или аналогичный.

Этанол для хроматографии или аналогичный.

Испытуемый раствор (50 мг/мл). Около 0,5 г (точная навеска) субстанции помещали в мерную колбу вместимостью 20 мл, растворяли в 16 мл диметилформамида, доводили объем раствора до метки диметилформамидом и перемешивали.

Стандартный раствор. Около 0,016 г (точная навеска) 2-этоксиэтанола, около 0,5 г (точная навеска) этилацетата, около 0,5 г (точная навеска) этанола помещали в мерную колбу вместимостью 20 мл, растворяли в 15 мл диметилформамида, доводили объем раствора до метки тем же растворителем и перемешивали.

1,0 мл полученного раствора вносили в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводили объем до метки диметилформамидом, перемешивали. Срок годности раствора 7 суток.

Хроматографические условия:

Колонка	капиллярная колонка ВРХ-Vol 30 м × 0,32 мм × 1,8 мкм (SGE) или аналогичная
Детектор	пламенно-ионизационный
Температура термостата колонки	начальная 40°C, подъем температуры со скоростью 20°C/мин до 200°C, выдержка 2 мин
Температура испарителя	140 °С
Температура детектора	250 °С
Скорость потока воздуха	450 мл/мин
Скорость потока водорода	45 мл/мин
Скорость газа-носителя (гелий)	20 см/с
Объем пробы	2 мкл
Деление потока	1 : 20
Время хроматографирования	10 мин

Последовательно хроматографировали испытуемый и стандартный растворы не менее 6 раз каждый. Порядок выхода пиков: этанол, 2-этоксиэтанол, этилацетат, диметилформамид.

Хроматографическая система считалась пригодной, если выполнялись следующие условия:

- разрешение R между пиками на хроматограммах испытуемого и стандартного растворов не менее 2,0;
- относительное отклонение площадей пиков для стандартного раствора при шести повторных вводах проб не более 15 %.

Содержание остаточных растворителей в процентах (Y_i) вычисляли по формуле:

$$Y_i = \frac{a_{0i} \cdot S_i \cdot 10 \cdot P}{S_0 \cdot a \cdot 20 \cdot 100 \cdot 100} \cdot 100 = \frac{a_{0i} \cdot S_i \cdot P}{S_0 \cdot a} \cdot 0,005, \quad (3)$$

где: S_i – площадь пика остаточного растворителя на хроматограмме испытуемого раствора;

S_0 – площадь пика остаточного растворителя на хроматограмме стандартного раствора;

a – навеска субстанции VMU-2012-05, в г;

a_{0i} – навеска остаточного растворителя, взятая для приготовления стандартного раствора, г;

P – содержание основного вещества в стандартном образце растворителя, %.

2.3 Получение и аттестация стандартного образца субстанции VMU-2012-05

Для осуществления рутинного контроля качества субстанции и таблеток VMU-2012-05 по показателям «Подлинность», «Родственные примеси», «Количественное определение» проводили аттестацию стандартного образца. В последующем стандартный образец был передан в АО НПО «Дом Фармации» для проведения контроля качества таблеток на основе субстанции VMU-2012-05.

Аттестацию проводили по показателям: «Описание», «Растворимость», «Молекулярная масса», «Подлинность (подтверждение структуры)», «Родственные примеси», «Потеря в массе при высушивании», «Количественное определение», «Упаковка», «Маркировка», «Хранение», «Срок годности». Указанные выше показатели легли в основу проекта спецификации на стандартный образец. Показатели нормировали в соответствии с требованиями общих фармакопейных статей Государственной фармакопеи Российской Федерации (ГФ РФ) [25].

2.4 Валидация методики ВЭЖХ-УФ

Процесс валидации является обязательным в практике качественного производства медицинской продукции и является важной частью системы

обеспечения и контроля качества. Проводили предварительную (частичную) валидацию методики ВЭЖХ-УФ, которая использована для контроля качества препарата по показателям «Подлинность», «Родственные примеси» и «Количественное определение». Валидация методик выполнена в соответствии с рекомендациями Руководства по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств [34] и требованиями ОФС.1.1.0012.15 Валидация аналитических методик ГФ РФ [7].

Валидация методики по показателю «Подлинность»

В качестве параметра предварительной (частичной) валидации методики выбран параметр специфичность (Specificity). Поскольку методика будет использована для испытания в тесте «Подлинность» определения других валидационных параметров не требуется.

Специфичность

Специфичность - способность однозначно оценивать анализируемое вещество в присутствии других компонентов, которые могут присутствовать в образце. При валидации хроматографических методик для подтверждения специфичности должны быть использованы характерные хроматограммы с указанием индивидуальных веществ.

Проводили сравнение хроматограмм раствора плацебо (растворителя), стандартного раствора, содержащего стандартный образец (СО) определяемого вещества, и испытуемого раствора.

Валидация методики по показателю «Родственные примеси»

В качестве параметров валидации методики были выбраны: специфичность (Specificity), предел обнаружения (ПО, Limit of detection – LOD) и предел количественного определения (ПКО, Limit of quantification – LOQ). Поскольку методика будет использована для лимитирующего теста, для её валидации не требуется определения каких-либо иных параметров.

Специфичность

Проводили сравнение хроматограмм раствора плацебо (растворителя), стандартного раствора, содержащего стандартный образец (СО) определяемого вещества, и испытуемого раствора.

Предел обнаружения (ПО) и предел количественного определения (ПКО)

Предел обнаружения - наименьшая концентрация аналита в образце, обнаруживаемая данным методом. Устанавливают экспериментально по соотношению сигнал/шум – не менее 3/1. Предел количественного определения - наименьшая концентрация аналита в образце, которая поддается надежному количественному определению. Устанавливают экспериментально по соотношению сигнал/шум – не менее 10/1, а также по значению наименьшей концентрации стандартного раствора при оценке линейности.

Проводили регистрацию хроматограмм раствора СО в выбранном диапазоне концентраций. Оценка соотношения сигнал/шум.

Предварительная (частичная) валидация методики по показателю «Количественное определение»

В качестве параметров предварительной (частичной) валидации методики были выбраны: специфичность (Specificity), линейность (Linearity), сходимоссть (Repeatability), точность (или правильность, Accuracy). Поскольку методика использована для испытания по показателю «Количественное определение» определения предела обнаружения (Limit of detection – LOD) и предела количественного определения (Limit of quantitation – LOQ) не требуется.

Специфичность

Проводили сравнение хроматограмм раствора плацебо (растворителя), стандартного раствора, содержащего стандартный образец (СО) определяемого вещества, и испытуемого раствора.

Линейность и диапазон применения методики

Линейность (linearity) – способность показать, что аналитические сигналы пропорциональны концентрации анализируемого вещества в образце в пределах диапазона применения методики. Линейность проверяют непосредственно на активной субстанции или на модельных смесях. На основании полученных

данных методом наименьших квадратов производят расчет уравнения регрессии и дополнительных статистических показателей.

Оценка линейности выполнена с использованием раствора СО. Выбор области концентраций зависит от предполагаемого использования методики. Данная методика использована для теста «Количественное определение» - требуемый диапазон 80-120% от номинальной концентрации (соответствует концентрации субстанции от 40 до 50 мкг/мл). Поскольку методика использована для одновременного испытания по показателям «Подлинность», «Посторонние примеси» и «Количественное определение», диапазон концентраций расширен от минимально детектируемой (ПКО, 0,05 мкг/мл) до 130% от номинальной.

Проводили регистрацию значений хроматограмм растворов СО 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила в выбранном диапазоне концентраций.

В соответствии с рекомендациями Руководства по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств [34] первичные данные были переведены в нормализованные координаты (концентрации и значения площадей пиков 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила, соответствующие 100% номинальной концентрации, приняты за 100%), получены уравнения регрессии и статистические параметры для нормализованных данных и проведено их сравнение с рекомендациями Руководства [34].

Прецизионность

Прецизионность (precision) – характеризует степень близости независимых результатов индивидуальных испытаний, полученных в конкретных установленных условиях. Эта характеристика зависит только от случайных факторов и не связана с истинным значением определяемой величины. Мерой прецизионности является величина относительного стандартного отклонения (RSD, %), полученная при усреднении результатов измерений.

Сходимость или повторяемость (repeatability) – степень согласованности результатов измерений, полученных одним методом, на одном объекте, одним оператором в одних и тех же условиях (с использованием тех же приборов), в

пределах короткого промежутка времени. Выделяют внутрисуточную (intra-day precision) и междусуточную (inter-day precision) прецизионность (сходимость).

Для оценки прецизионности эксперимент повторяли в течение трех различных дней в трехкратной повторности при 3-х концентрациях раствора СО (около 80, 100 и 120% от номинальной). По результатам измерений в один день оценивали внутрисуточную прецизионность, по результатам всех измерений - междусуточную прецизионность.

Правильность

Правильность характеризует близость результатов испытаний, полученных с помощью данной методики, к истинному значению. Показателем правильности метода является систематическая погрешность (δ), выражаемая как разность между ожидаемым (истинным) значением и результатом измерений.

Правильность оценивали по результатам анализа модельных растворов с концентрациями СО около 80, 100 и 120% от номинальной.

2.5 Разработка проекта спецификации и методов контроля качества субстанции VMU-2012-05

Разрабатывали проект спецификации субстанции VMU-2012-05 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. Для осуществления контроля качества субстанции по показателям «Подлинность», «Родственные примеси» и «Количественное определение» разрабатывали метод ВЭЖХ-УФ.

Требования, предъявляемые к качеству стандартного образца субстанции, VMU-2012-0 и субстанции-порошок VMU-2012-05 сформированы с учетом назначения каждого из вышеуказанных продуктов, требований ГФ РФ,

Фармакопеи ЕАЭС и Министерства здравоохранения РФ и позволяют достоверно оценить качество.

2.6 Изучение стабильности субстанции VMU-2012-05

Изучение стабильности и установление срока годности «VMU-2012-05, субстанция-порошок» было проведено согласно рекомендациям Государственной фармакопеи Российской Федерации (ГФ РФ), ОФС.1.1.0009.18 «Стабильность и сроки годности лекарственных средств» и Решению Коллегии ЕЭК № 69 от 10.05.2018 г. «Об утверждении Требований к исследованию стабильности лекарственных препаратов и фармацевтических субстанций».

Испытания АФС VMU-2012-05 было проведено по всем показателям качества, согласно спецификации на VMU-2012-05, которые подвержены изменениям в процессе хранения, включая контроль микробиологической чистоты. С целью выбора оптимальных условий хранения АФС VMU-2012-05 была составлена Программа исследования стабильности, позволяющая сделать обоснованное заключение в пользу тех или иных параметров среды (температуры и относительной влажности) при долгосрочных и ускоренных испытаниях (таблицы 5, 6, 7).

Контейнеры с субстанцией были помещены в сушильные шкафы, в которых поддерживались необходимые температура и влажность.

Исследования стабильности (при долгосрочных и ускоренных испытаниях) были проведены для трех опытно-промышленных серий АФС VMU-2012-05 в течение предполагаемого срока годности (2 года) и ускоренные испытания - в течение 6 месяцев.

Продолжение таблицы 7

Показатели	Интервал от даты производства, мес.							
	0*	3	6	9	12	18	24	27
Сульфатная зола	+	-	-	-	-	-	-	-
Тяжелые металлы	+	-	-	-	-	-	-	-
Потеря в массе при высушивании	+	+	+	+	+	+	+	+
Остаточные органические растворители	+	-	-	-	-	-	-	-
Микробиологическая чистота	+	-	-	-	-	-	-	+
Количественное определение	+	+	+	+	+	+	+	+

2.7 Изучение механизма действия субстанции VMU-2012-05

2.7.1 Исследование ингибирующей активности субстанции VMU-2012-05 в отношении обратной транскриптазы ВИЧ дикого типа

ОТ ВИЧ-1, как и другие обратные транскриптазы, обладают двумя видами полимеразной активности: РНК- и ДНК-зависимой. То есть, они способны утилизировать со сходной эффективностью праймер-матричные комплексы, в которых матрицей является рибо- или 2'-дезоксирибоолигонуклеотид, в то же время в качестве праймера выступают исключительно дезоксиолигонуклеотиды. Одной из наиболее распространенных систем для определения активности ОТ ВИЧ-1 и других ДНК-полимераз является система, основанная на т.н. «активированной» ДНК, которая получается в результате расщепления ДНК неспецифическими нуклеазами (напр., ДНКазой I). Активированная ДНК представляет собой спектр различных праймер-матричных комплексов 30-300 п.н. длиной. ДНК полимеразы способны включать в такой субстрат все четыре природные нуклеотиды (dAMP, dGMP, dCMP и dTMP). В данной системе активность ОТ определялась на основе включения в полинуклеотиды радиоактивно-меченного $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dAMP}$. Отделение меченых продуктов реакции от

невключенного [α - ^{32}P]dATP 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 [α - ^{32}P]-меченного нуклеотида) проводили измерением сорбированной радиоактивности в сцинтилляторе Ultima Gold (PerkinElmer, США) в счетчике Tri-Carb Liquid Scintillation Analyzer (PerkinElmer, США).

Получение обратной транскриптазы ВИЧ-1 дикого типа

Рекомбинантная обратная транскриптаза ВИЧ-1 дикого типа получена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук в соответствии с описанной ниже методикой. Для экспрессии гетеродимера дикого типа обратной транскриптазы ВИЧ-1 использовались клетки *E.coli* штамма M15 [pRep4] компании Qiagen, которые трансформировали плазмидой рbHRT-PROT. В 10 мл среды LB, содержащей канамицин (50 мкг/мл), ампициллин (150 мкг/мл) и глюкозу (10 мг/мл), вносили 1 колонию клеток трансформированных целевой плазмидой, и выращивали при встряхивании в течение 18 ч при 37°C. Клеточную суспензию (1-2 мл) осаждали центрифугированием (5 мин, 3500 об/мин), осадок клеток ресуспендировали в 2 мл среды LB, снова осаждали аналогичным образом и снова ресуспендировали в 1 мл свежей LB. Полученную суспензию вносили в 250 мл среды LB с канамицином (50 мкг/мл) и ампицилином (150 мкг/мл). Суспензию клеток инкубировали при 37°C при встряхивании до достижения оптической плотности OD₆₀₀ 0,6, после чего добавляли индуктор - изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) до концентрации 1,67 мМ, инкубировали 5 ч при 25°C и осаждали клетки центрифугированием (20 мин, 3500 об/мин). Осадок ресуспендировали в 10 буфера GTE (25 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 50 мМ глюкоза, 10мМ ЭДТА), и клетки заново осаждали центрифугированием (20 мин, 3500 об/мин).

Для выделения целевого белка, осадок клеток размораживали во льду (20 мин) и ресуспендировали в 10 мл буфера для лизиса (25 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 500

мМ NaCl, 10% глицерин, 5 мМ 2-меркаптоэтанол, 0,5% Тритон X-100, 1 мМ фенилметилсульфонилфторид и коктейль ингибиторов протеиназ). Клетки разрушались во льду с помощью ультразвукового дезинтегратора Sinipuls HD 2070 («Bandelin», Германия) в следующем режиме: 15х (45 сек, 80% цикла, мощность – 95%) с 2 мин перерывами. После осаждения осадка центрифугированием (4°C, 30 мин, 8000 об/мин), лизат наносили на колонку с Ni-NTA-агарозой (8x25 мм). Затем колонку последовательно промывали буфером А (25 мМ Tris-HCl, pH=8.0, 500 мМ NaCl, 10% глицерин, 5 мМ 2-меркаптоэтанол, 1 мМ фенилметилсульфонилфторид, и коктейль ингибиторов протеиназ) с повышающимися концентрациями имидазола. Концентрация имидазола в буфере увеличивали пошагово: 1-ая промывка – 20 мл (10 мМ имидазола), 2-ая промывка – 30 мл (30 мМ имидазола), третья промывка – 20 мл (40 мМ имидазола). Целевой белок элюировали буфером А, содержащим также 250 мМ имидазол, собирая фракции по 0,7 мл. Наличие белка во фракциях определяли спектрофотометрически с помощью реагента Coomassie G250 при длине волны 550 нм. Фракции, содержащие максимальное количество белка, объединяли и последовательно диализовали при 4°C против буфера Б (25 мМ Tris-HCl, pH=8.0, 300 мМ NaCl, 10% глицерин, 5 мМ дитиотреитол, 10 мМ MgCl₂, 1 мМ фенилметилсульфонилфторид), и затем против буфера В (25 мМ Tris-HCl, pH=8.0, 300 мМ NaCl, 50% глицерин, 5 мМ дитиотреитол, 10 мМ MgCl₂, 1 мМ фенилметилсульфонилфторид) в течение не менее 10 ч. в каждом случае. Полученный после диализа препарат разделяли на аликвоты по 0,5 мл и хранили при -20°C. Концентрация и чистота полученного препарата оценивалась методом гель-электрофореза в полиакриламидном геле согласно стандартной методике [65].

Методика определения ингибирующей активности VMU-2012-05 в отношении обратной транскриптазы ВИЧ дикого типа

Для определения активности использовали следующую реакционную смесь: активированная ДНК (150 мкг/мл), dATP (1,5 мкМ), остальные дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (dCTP, dTTP, dGTP) (30 мкМ), [α -³²P]dATP (1

МБК/мл), буфер для измерения активности ОТ ВИЧ-1 (50 мМ Tris-HCl, pH=8.0, 10 М MgCl₂, 20 мМ KCl). Объем реакционной смеси для 1 реакции составлял 20 мкл. При исследовании влияния ингибиторов на активность ОТ ВИЧ-1 в состав реакционной смеси вводили 10% раствора ингибитора в ДМСО (в контрольные реакции вносили 10% чистого ДМСО). Инициирование реакции производили внесением в реакционную смесь фермента ОТ ВИЧ-1 дикого типа (2,5 мкг/мл), после чего реакционную смесь инкубировали 17 мин при 37°C. После инкубации, реакционную смесь наносили на фильтры (1x1 см, Whatmann DE81), пропитанные 0.5 М раствором ЭДТА. Фильтры последовательно отмывали от невключенного в растущую цепь ДНК [α -³²P]dATP 10% раствором трихлоруксусной кислоты (40 мл, 1 промывка), 5% раствором трихлоруксусной кислоты (40 мл, 3 промывки), этиловым спиртом (20 мл, 1 промывка), после чего сушили на воздухе. Радиоактивность [α -³²P]dATP, включенного в растущую цепь ДНК, определяли с помощью сцинтиллятора Ultima Gold в счетчике Intertechnique Liquid Scintillation Counter SL-4000. Расчет констант ингибирования проводили по методу Диксона [65].

2.7.2 Исследование ингибирующей активности субстанции VMU-2012-05 в отношении мутантных форм обратной транскриптазы ВИЧ-1, соответствующих лекарственно-устойчивым штаммам вируса

В ходе исследования ингибирующей активности VMU-2012-05 в отношении мутантных форм обратной транскриптазы ВИЧ-1 была использована панель мутантных форм ОТ ВИЧ-1 с аминокислотными заменами L100I, K103N, V106A, Y181C, G190A, так как они широко представлены у пациентов с устойчивостью ННИОТ, приводят к резистентности посредством разных механизмов и являются принятыми при определении профиля резистентности новых анти-ВИЧ препаратов. Дополнительно была исследована ингибирующая активность VMU-2012-05 в отношении двойного мутанта с двумя наиболее часто встречающимися заменами K103N и Y181C [174].

Получение мутантных форм обратной транскриптазы ВИЧ-1

Для экспрессии гетеродимера дикого типа обратной транскриптазы ВИЧ-1 использовались клетки *E.coli* штамма Rosetta(DE3) компании Qiagen, которые трансформировали соответствующей плазмидой (pBRP-HRL100I, pBRP-HRK103N, pBRP-HRV106A, pBRP-HRY181C, pBRP-HRG190A, pBRP-HRDM). Культивирование трансформированных плазмидами клеток, выделение целевого белка, очистку, определение концентрации и чистоты фермента проводили по той же методике, что описана для фермента дикого типа [174].

Методика определения ингибирующей активности VMU-2012-05 в отношении мутантных форм обратной транскриптазы ВИЧ-1, соответствующих лекарственно-устойчивым штаммам вируса

Определение ингибирующей активности субстанции в отношении мутантных форм ОТ ВИЧ проводили по той же методике, что описана для фермента дикого типа.

Константы ингибирования субстанции VMU-2012-05 в отношении мутантных форм ОТ ВИЧ-1 определяли по методу Диксона, то есть на основании зависимости обратной скорости ферментативной реакции в присутствии ингибитора от его концентрации. В качестве положительного контроля использовали субстанцию препарата эфавиренз (Merck, Германия) - широко применяемый в клинической практике ННИОТ первого поколения. Анализ полученных констант в случае мутантных форм ОТ ВИЧ-1 с константой ингибирования вещества в отношении фермента дикого типа был выполнен с использованием программного обеспечения StatPlus (Ванкувер, Канада) [174].

2.8 Изучение специфической фармакологической активности VMU-2012-05 в отношении клеток, инфицированных ВИЧ-1

Для исследования противовирусного действия субстанции в отношении ВИЧ-1 использовали культуры клеток, инфицированные штаммом ВИЧ-1 субтипа А и первичных клеток периферической крови человека, инфицированных

штаммами ВИЧ-1, резистентными к нуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы вируса.

При использовании первой модели в качестве чувствительных к ВИЧ-1 клеток использовали лимфоидную культуру клеток человека МТ-4. Клетки МТ-4 получены из коллекции клеточных культур ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Клетки МТ-4 культивировали на среде RPMI-1640, содержащей 0,2% бикарбоната натрия с добавлением 10% инактивированной фетальной сыворотки, 2 mM L-глутамина и 20 мкг/мл гентамицина. Культивирование суспензионной клеточной культуры МТ-4 проводили в закрытой культуральной посуде при 37°C. Каждые 3-4 дня урожай клеток определяли в камере Горяева, после чего клетки пересевали с концентрацией 400-500 тысяч клеток в 1 мл среды.

В работе использовали штамм ВИЧ-1 субтипа А (депонирован в коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, при репродукции на МТ-4 вызывает 100% гибель клеток) из лабораторной коллекции ФБУН ГНЦ ВБ Вектор. Препараты ВИЧ-1 предварительно нарабатывали на культуре клеток МТ-4 с концентрацией 400 000 клеток в 1 мл среды. Урожай инфекционного вируса получали на 5 сутки культивирования. Культуральную среду отбирали, клеточный дебрис удаляли центрифугированием, а супернатант разливали в криопробирки по 0,5 - 1,0 мл, замораживали при - 70°C и хранили в жидком азоте до использования.

2.8.1 Определение инфекционности наработанного вируса

Определение инфекционности наработанного вируса (TCID₅₀) проводили на 96-луночном планшете. Для тестирования использовали клетки МТ-4 в фазе логарифмического роста. Клетки в полной среде RPMI-1640 с концентрацией 300 000 в 1 мл разливали по лункам планшета в объёме 100 мкл. Вирус размораживали на водяной бане при 37°C и готовили его последовательные разведения в отдельной посуде на среде RPMI-1640. Затем приготовленные

разведения вируса (в 3-х повторах) в объеме 100 мкл добавляли в соответствующие лунки планшета с культурой клеток.

Далее инфицированные клетки на планшете культивировали в CO₂ инкубаторе при температуре 37°C и 5% CO₂. Определение концентрации вирусного белка p24 в культуральной жидкости проводили на 5 сутки культивирования. TCID₅₀ вируса определяли методом Рида – Менча.

2.8.2 Определение цитотоксичности субстанции VMU-2012-05

Для определения цитотоксичности VMU-2012-05 использовали calorиметрический МТТ-тест. Жизнеспособность и биохимическую активность клеток оценивали по интенсивности превращения ими растворимого МТТ (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) в кристаллы формазана. После растворения кристаллов в изопропанолe интенсивность синего окрашивания измеряли с помощью спектрофотометра.

Живые клетки преобразуют МТТ-реагент желтого цвета в химическое соединение (формазан) синего цвета. Формазан локализуется внутри выживших клеток, поэтому его количество пропорционально количеству живых клеток. После лизирования клеток и растворения формазана в лизирующем буфере интенсивность синего окрашивания может быть измерена с помощью спектрофотометра. Оптическая плотность раствора коррелирует с количеством живых клеток, что используется для количественной оценки степени их жизнеспособности.

Определение цитотоксичности субстанции МТТ-методом проводили в 96-луночном планшете. В лунки планшета вносили по 40 000 клеток МТ-4 в 100 мкл полной среды RPMI-1640. Затем в отдельной посуде готовили разведения исследуемого препарата с 5-ти кратным шагом разведения. Далее по 3 повтора каждого разведения препарата в объеме 50 мкл добавляли в соответствующие лунки планшета с культурой клеток. Объем жидкости в каждой лунке доводили до 200 мкл путем добавления 50 мкл полной среды RPMI-1640.

Инкубирование клеток МТ-4 с исследуемыми разведениями VMU-2012-05 (от 0,06 до 400 мкг/мл, последовательные трехкратные разведения) проводили 5 суток в CO₂ инкубаторе при температуре 37°C и 5% CO₂. После этого в каждую лунку с образцами препарата и в контроль клеток добавляли раствор МТТ-реагента в объеме 20 мкл. Через 1,5 часа дополнительного инкубирования в термостате из лунок планшета удаляли культуральную среду, а образовавшийся осадок формазана растворяли в изопропанолe при встряхивании в течение 10-15 минут. Интенсивность полученного синего окрашивания раствора измеряли с помощью мультискана GO (Thermo Fisher Scientific, Финляндия) на двух длинах волн (540 и 690 нм).

По результату тестирования токсичности препарата для культуры клеток МТ-4 определяли максимально возможную нетоксичную и СС₅₀ концентрацию препарата (концентрация, при которой жизнеспособными остаются 50% клеток).

Цитотоксичность препарата сравнения эфавиренз (Merck, Германия) оценивали по аналогичной методике в разведениях от 0,003 до 100 мкг/мл (последовательные трехкратные разведения).

2.8.3 Оценка способности субстанции VMU-2012-05 подавлять репродукцию ВИЧ в культуре клеток

Оценку подавления репродукции ВИЧ/защиты клеток человека исследуемой субстанцией в отношении ВИЧ проводили путем определения изменения концентрации живых клеток в экспериментальных лунках с клетками МТ-4, инфицированных ВИЧ-1, с добавлением разных концентраций исследуемых веществ и без добавления химических соединений.

Определение концентрации живых клеток, не разрушенных ВИЧ-1, в присутствии ВИЧ и исследуемых соединений проводили в 96-луночном планшете МТТ-методом. В лунки планшета вносили по 40 000 клеток МТ-4 в 100 мкл полной среды RPMI-1640.

В тесте «Противовирусная активность» в качестве вирусосодержащего материала использовалась культуральная среда с предварительно разведенным в ней вирусом (50 мкл/лунку). Противовирусная активность препаратов определялась по отношению к ВИЧ-1 субтипа А при инфицировании культуры клеток постоянной дозой вируса, соответствующей 300 TCID₅₀. Затем в отдельной посуде готовили разведения исследуемого препарата с 3-х кратным шагом разведения, используя нетоксические для клеток концентрации веществ. Для VMU-2012-05, с учетом определенного ранее диапазона 50% ингибирующей ВИЧ-1 активности, были исследованы концентрации в диапазоне 0,01-30 мкг/мл. Далее по 3 повтора каждого разведения препарата в объеме 50 мкл добавляли в соответствующие лунки планшета с культурой клеток. Объем жидкости в каждой лунке составил 200 мкл. Инкубирование клеток МТ-4 с исследуемыми разведениями субстанции проводили 5 суток в СО₂ инкубаторе при температуре 37°С и 5% СО₂. После этого в каждую лунку с образцами препарата и в контроль клеток добавляли раствор МТТ-реагента в объеме 20 мкл. Через 1,5 часа дополнительного инкубирования в термостате из лунок планшета удаляли культуральную среду, а образовавшийся осадок формазана растворяли в изопропанолу при встряхивании в течение 10-15 минут. Интенсивность полученного синего окрашивания раствора измеряли с помощью мультискана GO (Thermo Fisher Scientific Oy, Финляндия) на двух длинах волн (540 и 690 нм).

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 (концентрация препарата, при которой ингибируется размножение ВИЧ-1 и защищены от ВИЧ остаются 50% клеток).

В дальнейшем для лекарственной формы проводили дополнительно определение способности препарата блокировать размножение ВИЧ по степени снижения репродукции вирусного белка р24 в культуральной жидкости. Для количественного определения белка р24 ВИЧ-1 использовали иммуноферментные

наборы ВектоВИЧ-1 p24-антиген-подтверждающий тест производства ЗАО ВекторБест, Россия.

Учёт и обработку полученных результатов проводили с помощью специальной программы SoftMax Pro 4,0. Данные оптической плотности для каждого разведения препарата (540-690 нм) в тесте «Токсичность» или «Противовирусная активность» вводили в программу, которая строит графики зависимости оптической плотности раствора от концентрации препарата с использованием 4-параметрового алгоритма. Одновременно программа автоматически рассчитывает значение CC_{50} или IC_{50} при условии, если кривая зависимости получается S-образной формы.

В качестве отрицательного контроля использовали клетки МТ-4, инфицированные ВИЧ, без добавления препаратов. В качестве Положительный контроль – клетки МТ-4, инфицированные ВИЧ, с добавлением коммерческого препарата.

2.8.4 Исследование противовирусной активности лекарственного средства на основе субстанции VMU-2012-05 в отношении ВИЧ-1, резистентного к нуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы вируса

Для исследования противовирусного действия препарата субстанции VMU-2012-05 в отношении резистентного к ингибиторам обратной транскриптазы ВИЧ-1 использовали первичные клетки периферической крови человека (МПК здоровых доноров), инфицированные резистентным 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. Данные мутации наиболее часто возникают при приеме антиретровирусных препаратов.

Мутации L74V, M184V влияют на чувствительность к НИОТ ВИЧ-1. L74V вызывает высокий уровень резистентности к ddI и средний уровень

резистентности к абакавиру; M184V – высокий уровень резистентности к ЗТС и ФТС, увеличивая чувствительность к AZT, TDF и d4T.

Мутации K103N, H221Y снижают чувствительность к ННИОТ ВИЧ-1. Мутация K103N отвечает за развитие высокого уровня к препарату эфавиренз и невирапин; H221Y – акцессорная мутация, возникает у пациентов, получающих невирапин и рилпивирин.

При исследовании противовирусной активности препарата лекарственной формы в отношении резистентного штамма ВИЧ-1 в качестве контроля использовали препарат эфавиренз (Merck, Германия), активно используемый в клинической практике ННИОТ.

Культивировали вирус в присутствии различных концентраций препаратов в течение 11 суток на 96-луночных планшетах. Определение токсичности проводили при культивировании неинфицированных МПК в присутствии разных концентраций препаратов, в качестве контроля роста ВИЧ-1 культивировали вирус на МПК без препаратов.

Культивировали ВИЧ-1_{RES} в присутствии препаратов в течение 11 суток на культуре МПК, полученных от двух доноров, с посадочной концентрацией 2 млн/мл, на 12 луночном планшете, в 3 мл среды с 20% FBS и IL-2. Лунки с разведениями препаратов дублировались в трех повторах.

Цитотоксичность и противовирусную активность исследуемых препаратов определяли, как описано ранее, методом МТТ и количественной оценкой уровня накопления в культуральном супернатанте вирусного белка p24 (методом ИФА). Были исследованы концентрации препарата эфавиренз (Merck, Германия) в отношении ингибирования резистентного к ННИОТ ВИЧ-1_{RES} в диапазоне от 0,00006 до 10 мкг/мл.

2.9 Оценка токсичности субстанции VMU-2012-05 и ЛС на ее основе при однократном и многократном введениях экспериментальным животным

Эксперименты по изучению токсических свойств фармацевтической субстанции VMU-2012-05 и ЛС на ее основе при однократном введении проводили на половозрелых самцах и самках беспородных мышей в возрасте 9-11 недель (питомник АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ») и на половозрелых самцах и самках беспородных крыс возраста 10-12 недель (питомник АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ»). Изучение токсических свойств при многократном введении проводили на половозрелых самцах и самках беспородных крыс возраста 10-12 недель (питомник АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ») и на половозрелых самцах и самках кроликов породы «Белый Великан» возраста 2,5-3,5 месяцев (крестьянское фермерское хозяйство «Нера»). Проведение экспериментов было одобрено на заседаниях биоэтической комиссии (БЭК) АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ»: 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 [261].

Для исключения влияния предпочтений исследователя на формирование экспериментальных групп, отбор животных был проведен при помощи метода модифицированной блочной рандомизации. Животных содержали в стандартных условиях в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях и в соответствии с санитарно-эпидемиологическими правилами СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» [29]. Животных содержали в контролируемых условиях окружающей среды. Световой режим составил 12 часов света и 12 часов темноты [261].

Животные получали корм для содержания лабораторных животных, изготовленный по ГОСТ Р50258-92 «Комбикорма полнораціонные для лабораторных животных. Технические условия». Корм и воду давали *ad libitum*. Планирование и проведение всей работы осуществлялось в строгом соответствии с требованиями МЗ РФ и международными стандартами в области доклинического изучения безопасности новых фармакологических средств - системы GLP (Good Laboratory Practice) [4, 59, 261].

2.9.1 Изучение токсичности при однократном введении субстанции VMU-2012-05

В первой серии экспериментов были использованы 3 самки крысы для каждого этапа. По данным, предоставленным разработчиками изучаемой субстанции, LD_{50} при однократном внутрижелудочном введении крысам составляет более 800 мг/кг, поэтому введение было начато с дозы 300 мг/кг, лимитирующая доза – 2000 мг/кг, [3, 53]. Суспензию ФС вводили внутрижелудочно с помощью зонда. Отсутствие или наличие связанной с веществом смертности животных, получивших определенную дозу вещества, определяло следующий этап (рисунок 6), т.е.:

- нет необходимости в дальнейшем исследовании,
- введение той же дозы трем дополнительным животным,
- введение трем дополнительным животным следующих возрастающих или нисходящих доз.

Дозы были распределены по времени введения так, чтобы было возможно оценить вещество по степени опасности и систематизировать результаты. Следующая доза вводилась через 48 ч после предыдущей. Данная методика позволяет сделать вывод относительно классификации исследуемого вещества с отнесением его к одному из классов токсичности по GHS [36] с использованием минимально возможного количества животных.

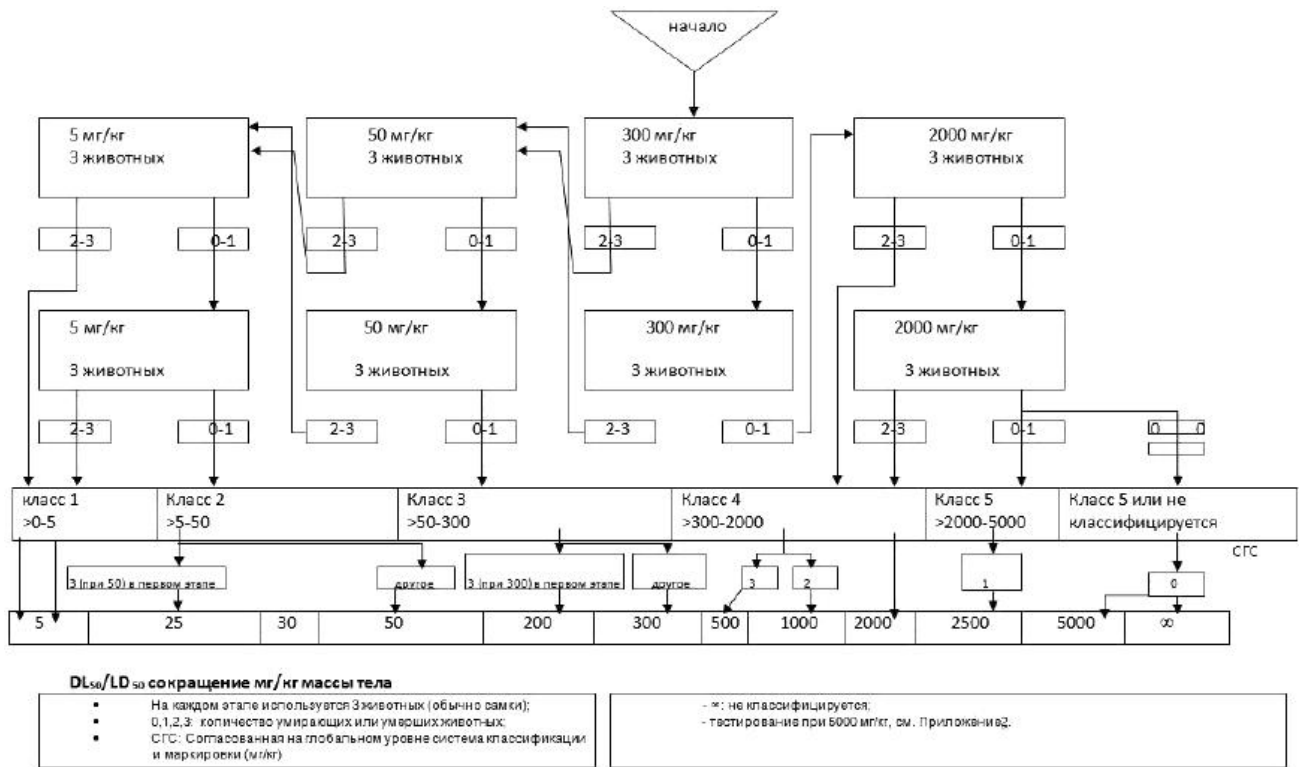


Рисунок 6 - Схема проведения эксперимента

Во второй серии экспериментов, на основании результатов исследования на крысах, были выбраны дозы, максимально подходящие для определения ЛД₅₀. Были использованы мыши, по 5 самок в каждой группе. Субстанцию вводили животным однократно внутрижелудочно. Эксперимент был проведен поэтапно и начат с введения 1 дозы. В зависимости от полученных результатов (летальность, картина интоксикации) было принято решение о введении других доз тестируемого препарата. Так как было зафиксировано отсутствие гибели крыс на первом этапе при введении ФС в дозе 2000 мг/кг, мышам была однократно введена аналогичная доза, при отсутствии гибели эксперимент был завершен. Так как в эксперименте на крысах ЛД₅₀ была < 2000 мг/кг, то ФС вводили мышам в дозе менее 2000 мг/кг. При отсутствии гибели мышей при введении ФС в дозах менее 2000 мг/кг, максимальной тестируемой (лимитирующей) дозой стала доза 2000 мг/кг.

Общий период наблюдения за животными составил 14 дней. В ходе эксперимента с целью регистрации признаков интоксикации проводили клиническое наблюдение (в течение 4-х ч после введения препаратов), далее

ежедневно и еженедельно осуществляли подробный клинический осмотр, взвешивание мышей проводили непосредственно до введения, через сутки после введения, на 7-й и 15-й дни эксперимента. Для регистрации возможного отсроченного влияния препарата на локомоторную и ориентировочно-исследовательскую активность животных на 14-й день эксперимента проводили тест «Открытое поле». Эвтаназию осуществляли на 15-й день с помощью CO₂ – камеры. Последующее патоморфологическое исследование включало в себя necropsию, макроскопическое исследование и взвешивание внутренних органов. Было проведено исследование состояния грудной и брюшной полости и макроскопическое исследование внутренних органов. Проведено взвешивание сердца, тимуса, печени, селезенки, почек, головного мозга, семенников.

2.9.2 Изучение токсичности при однократном введении ЛС на основе субстанции VMU-2012-05

Эксперименты по изучению токсических свойств ЛС VMU-2012-05 при однократном введении проводили на половозрелых самцах и самках беспородных мышей в возрасте 9-11 недель (питомник АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ»). Результаты ранее проведенных исследований по изучению острой токсичности фармацевтической субстанции VMU-2012-05 показали, что ЛД₅₀ субстанции при внутрижелудочном введении крысам и мышам - более 2000 мг/кг. При введении в дозе 2000 мг/кг гибели крыс и мышей не было зафиксировано, выраженных признаков интоксикации не отмечено. С учетом имеющихся данных о низкой токсичности субстанции, в соответствии с рекомендациями [2, 50], а также в соответствии с принципами «3Rs», острая токсичность ЛФ тестируемого объекта (таблетки для приема внутрь, 50 мг) была изучена при введении в лимитирующей дозе 2000 мг/кг на мышах. Мыши (5 самцов и 5 самок) получали внутрижелудочно с помощью атравматичного зонда суспензию (в 1% растворе крахмала) ЛФ препарата в дозе 2000 мг/кг (по активному веществу), 5 самцов и 5 самок - получали суспензию плацебо ЛС тестируемого объекта (контрольная

группа). Общий объем введения составил 1,6 мл на животное массой 20 г. Поскольку общий объем превышал допустимый для однократного в/ж введения мышам [72], суспензии вводили дробно (по 0,4 мл на животное массой 20 г), с интервалами между введениями не менее 30 мин. Контрольные животные получали плацебо (только вспомогательные вещества).

Общий период наблюдения за животными составил 14 дней. В ходе эксперимента с целью регистрации признаков интоксикации проводили клиническое наблюдение (в течение 4-х ч после введения препаратов), далее ежедневно и еженедельно осуществляли подробный клинический осмотр, взвешивание мышей проводили непосредственно до введения, через сутки после введения, на 7-й и 15-й дни эксперимента. Для регистрации возможного отсроченного влияния препарата на локомоторную и ориентировочно-исследовательскую активность животных на 14-й день эксперимента проводили тест «Открытое поле». Эвтаназию осуществляли на 15-й день с помощью CO₂ – камеры. Последующее патоморфологическое исследование включало в себя necropsy, макроскопическое исследование и взвешивание внутренних органов. Было проведено исследование состояния грудной и брюшной полости и макроскопическое исследование внутренних органов. Проведено взвешивание сердца, тимуса, печени, селезенки, почек, головного мозга, семенников [261].

2.9.3 Изучение токсичности при многократном введении ЛС на основе субстанции VMU-2012-05

Согласно проекту инструкции по медицинскому применению препарата VMU-2012-05, разработанной на основании изучения фармакологической активности, механизма действия и с учетом опыта клинического применения препаратов аналогичной фармакологической группы и сходного механизма действия, клиническая высшая терапевтическая доза (ВТД) препарата предположительно составляет 100 мг в день. Для человека со средней массой тела 60 кг – 1,7 мг/кг. С учетом коэффициентов межвидового пересчета доз [72], ВТД

для крысы составит 9 мг/кг, для кролика – 4 мг/кг. В данном исследовании тестируемый объект вводили крысам внутривентрикулярно в трех дозах: 9 мг/кг (1 ВТД); 45 мг/кг (5 ВТД); 90 мг/кг (10 ВТД). Непосредственно перед введениями готовили суспензию препарата в 1% растворе крахмала с концентрацией активного вещества 0,94 мг/мл, 4,69 мг/мл, 9,38 мг/мл соответственно. Объем разового введения составил 2,4 мл на крысу массой 250 г. Кроликам препарат вводили перорально в дозах 4 мг/кг (1 ВТД), 20 мг/кг (5 ВТД), 40 мг/кг (10 ВТД). Непосредственно перед введениями готовили суспензию ЛФ в 1% растворе крахмала с концентрацией активного вещества 2,79 мг/мл, 13,95 мг/мл, 27,91 мг/мл соответственно. Суспензию вводили в объеме 1,45 мл на 1 кг массы тела. Контрольные животные получали плацебо в объеме, соответствующем объему введения суспензий тестируемого объекта. В каждой из 4-х групп было по 16 самцов и 16 самок крыс и по 8 самцов и 8 самок кроликов. Период введения крысам составил 90 дней, кроликам – 28 дней. На 91-й день эксперимента (крысы) или на 29-й день (кролики) эвтаназию подвергали 50% животных каждой группы (основные группы), эвтаназию оставшихся животных проводили через 30 дней отсроченного наблюдения (группы отсроченного наблюдения) [261].

Характеристики групп лабораторных животных представлены в таблицах 8 и 9.

Таблица 8 - Характеристика групп при многократном внутривентрикулярном введении крысам [261]

Группа №	Количество животных		Исследуемый объект	Доза активного вещества, мг/кг	День эвтаназии
	самцы	самки			
1	16	16	Плацебо	0	50% животных из каждой группы – на 91-й день эксперимента, оставшихся – на 121-й.
2	16	16	ЛС VMU-2012-05	9	
3	16	16		45	
4	16	16		90	

Таблица 9 - Характеристика групп при многократном пероральном введении кроликам [261]

Группа №	Количество животных		Исследуемый объект	Доза активного вещества, мг/кг	День эвтаназии
	самцы	самки			
1	8	8	Плацебо	0	50% животных из каждой группы – на 29-й день эксперимента, оставшихся – на 57-й.
2	8	8	ЛС VMU-2012-05	4	
3	8	8		20	
4	8	8		40	

В ходе эксперимента ежедневно в течение 1 ч после введения препарата и в восстановительный период осуществляли клиническое наблюдение; еженедельно проводили подробный клинический осмотр, регистрировали массу тела животных. У крыс для оценки возможного влияния препарата на локомоторную и ориентировочно-исследовательскую активность на 30-й и 90-й дни эксперимента (для животных основных групп) и на 120-й день (для животных групп отсроченного наблюдения) проводили тест «Открытое поле». На 30-й и 90-й дни (для животных основных групп) и на 120-й день (для животных групп отсроченного наблюдения) проводили клинический анализ крови, а также оценивали показатели системы гемостаза: протромбиновое время (ПВ) и активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ). У кроликов кровь забирали дважды: на 28-й день (у всех животных) и на 56-й день (у животных групп отсроченного наблюдения). Кровь забирали из хвостовой вены (крысы) или краевой вены уха (кролики). Кровь для клинического анализа отбирали в пробирки с ЭДТА. С использованием гематологического анализатора «ABACUS JuniorVet» (Австрия) в цельной крови определяли количество эритроцитов, уровень гемоглобина, гематокрит, количество лейкоцитов, количество тромбоцитов, лейкоцитарную формулу. Кровь для определения показателей гемостаза отбирали в пробирки с цитратом натрия, далее центрифугировали 15 мин для получения плазмы. Плазму переносили во вторичные пробирки. Показатели гемостаза определяли с помощью коагулометра АПГ4-02-П.

Протромбиновое время (ПВ) определяли с использованием набора реагентов «Техпластин-тест», Технология-стандарт, Россия. АЧТВ определяли с помощью набора реагентов «АПТВ-Эл-тест», Технология-стандарт, Россия. Биохимические показатели крови у крыс определяли на 30-й и 90-й дни (для животных основных групп) и на 120-й день (для животных групп отсроченного наблюдения). У кроликов кровь забирали дважды: на 28-й день (у всех животных) и на 56-й день (у животных групп отсроченного наблюдения). Для исследования использовали кровь, которую отбирали в пробирки без антикоагулянта. Для получения плазмы кровь центрифугировали 15 мин при 3000 об/мин. Полученную плазму переносили во вторичные пробирки. Образцы исследовали с помощью анализатора «А-25» (Испания) с использованием реагентов фирмы BioSystems (Испания) и в соответствии с инструкциями производителя. Оцениваемые параметры: аминотрансферазы (АЛТ и АСТ), креатинин, мочевины, альбумин, щелочная фосфатаза (ЩФ), общий белок, триглицериды, холестерин, отношение альбумины/глобулины (расчетные значения), общий билирубин, глобулин (расчетные значения), глюкоза [261].

Регистрацию ЭКГ у крыс проводили на 29-й и 89-й дни у животных основных групп, и на 119-й у животных групп отсроченного наблюдения; у кроликов на 26-й день (50% животных) и на 54-й день (у животных групп отсроченного наблюдения). Для регистрации ЭКГ животное предварительно наркотизировали смесью Золетила®+Ксилы® в дозах 25 мг/кг+5 мг/кг, внутримышечно (крысы) и 5 мг/кг + 2 мг/кг, внутривенно (кролики), фиксировали на операционном столике. Регистрацию ЭКГ проводили с помощью компьютерного электрокардиографа для ветеринарии «Поли-спектр-8В». ЭКГ записывали в отведении II. Оценивались следующие показатели: частота сердечных сокращений (ЧСС), интервал RR (мс), P (мс), PQ (мс), QRS (мс), QT (мс) [261].

Исследование физико-химического состава мочи проводили с помощью диагностических тест-полосок «LabStripurinalysis REF ANA-9910» и анализатора «DocURader 2» у крыс на 28-й и 88-й дни (основные группы) и на 118-й день

(группы отсроченного наблюдения), у кроликов на 27-й день (50% животных, основные группы) и на 55-й день (у животных групп отсроченного наблюдения). Мочу собирали с помощью метаболических клеток, куда помещали животное на 4 ч. Перед помещением в метаболическую клетку крысы получали питьевую воду в/ж в объеме 10 мл/кг, кролики помещались в метаболические клетки без предварительной водной нагрузки. Определяемые параметры: глюкоза, рН, билирубин; уробилиноген, белок, удельный вес, лейкоциты, эритроциты, кетоны, нитриты [261].

Эвтаназию крыс осуществляли на 91-й день (животные основных групп) и на 121-й день (животные групп отсроченного наблюдения) с помощью CO₂-камеры. Кроликов подвергали эвтаназии на 29-й день (50 % животных) и на 57-й день. Эвтаназию кроликов осуществляли посредством передозировки анестетиком (Золетил®; 25 мг/кг; внутривенно). После эвтаназии животные были тщательно обследованы на предмет внешних патологических признаков. Органы, извлеченные при некропии, были взвешены (сердце, тимус, печень, селезенка, легкие с трахеей, почки, надпочечники, головной мозг, семенники/яичники). Рассчитывали массовые коэффициенты органов (отношение массы органа к массе тела, выраженное в процентах) [261].

Проведено гистологическое исследование следующих органов: аорта, сердце, трахея, лёгкие с бронхами, тимус, желудок, тонкая кишка, толстая кишка, поджелудочная железа, печень, селезёнка, почки, мочевой пузырь, семенники (самцы), яичники (самки), подчелюстные лимфатические узлы, щитовидная железа, головной мозг [261].

Для оценки местнораздражающего действия препаратов при проведении процедуры некропии были визуально оценены отклонения во внешнем виде органов желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), а также проведена их гистологическая оценка [261].

Анализ данных

Для всех данных была применена описательная статистика: данные проверены на соответствие закону нормального распределения. Проверка на соответствие закону нормального распределения осуществлялась с помощью критерия Шапиро-Уилка. Межгрупповые различия анализировались параметрическими или непараметрическими методами, в зависимости от типа распределения. Для оценки данных с признаками нормального распределения был использован однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA), с последующим межгрупповым сравнением (post-hoc) с использованием теста Тьюки (post-hoc Tukey's). В случае ненормально распределенных данных использовали критерий Краскела-Уоллиса (Kruskal-Wallis) с дальнейшим применением непараметрического метода средних рангов для множественных сравнений в случае обнаружения достоверного влияния исследуемого фактора. Различия были определены при 0,05 уровне значимости. Статистический анализ выполнялся с помощью программного обеспечения Statistica 10.0. (StatSoft, США) [261].

2.10 Изучение генотоксичности и прогноз канцерогенности субстанции VMU-2012-05

Генотоксические свойства ЛС на основе VMU-2012-05 изучали в тестах учёта микроядер в эритроцитах крови и ДНК-комет. Эксперименты были проведены на лабораторных животных вивария АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ» с соблюдением положений Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза от 22 сентября 2010 г. [17] по охране животных, используемых в научных целях, а также с соблюдением институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23.07.2010). Все исследования рассмотрены локальной биоэтической комиссией организации и одобрены для проведения. Протоколы исследований также одобрены данной комиссией: протоколы БЭК № 4.3/18 от 17.01.2018 (тест учёта микроядер), №

3.3/18 от 17.01.2018 (ДНК-комет-тест). Все тесты проведены в соответствии со стандартными методиками. Исследуемый препарат вводили внутривентриально с помощью атравматичного зонда. Подобный способ введения был выбран как аналог перорального, планируемого в клинической практике. Тестируемый объект и плацебо предварительно измельчали и суспендировали в 1% растворе крахмала. Объемы для внутривентриального введения не превышали максимально допустимые для данного вида животных. Продолжительность и схема введения различались в зависимости от типа исследования и были регламентированы нормативными документами [54, 55, 66].

Для исключения влияния предпочтений исследователя на формирование экспериментальных групп, отбор животных осуществлялся при помощи метода модифицированной блочной рандомизации. Для этого всех животных, переданных на исследование, случайным образом помещали в ячейки блока рандомизации (число ячеек блока рандомизации кратно числу групп в эксперименте). Далее, пользуясь генератором случайных чисел (программное обеспечение Statistica 10.0), получали перечень данных, содержащий номера ячеек с животными и соответствующие им номера групп, куда в дальнейшем были размещены животные [66].

В соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского ссоюза по охране животных, используемых в научных целях, от 22 сентября 2010 г. всех животных эвтаназировали помещением в CO₂-камеру в условиях постепенного заполнения её диоксидом углерода. Данный вид эвтаназии сопровождается минимальной степенью болевых ощущений, страдания и выраженности дистресса [66].

Результаты обрабатывали статистически в программном обеспечении Statistica 10.0 (StatSoft, США). Для оценки показателей применяли параметрические и непараметрические методы анализа в зависимости от типа распределения данных. Определяли среднее значение (M), статистическую ошибку среднего значения (m), медиану (Me), межквартильный интервал ($Q1$; $Q3$). С целью обработки результатов с признаками нормального распределения

использовали однофакторный дисперсионный анализ (analysis of variance, ANOVA), а также дисперсионный анализ с повторными измерениями и последующим межгрупповым сравнением при помощи теста Тьюки. Для показателей, не подчиняющихся закону нормального распределения, применяли критерий Краскела–Уоллиса с дальнейшим межгрупповым сравнением средних рангов. Различия определяли как достоверные при уровне значимости (p), равном 0,05 [66].

Для всех данных была применена описательная статистика: данные проверены на соответствие закону нормального распределения. Проверка на соответствие закону нормального распределения осуществлялась с помощью критерия Шапиро-Уилка. Затем были подсчитаны среднее значение и стандартная ошибка среднего, которые вместе со значением n представлены в итоговых таблицах. Межгрупповые различия анализировались параметрическими методами. Для оценки данных с признаками нормального распределения был использован однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA), с последующим межгрупповым сравнением (*post hoc*) с использованием теста Тьюки (*post hoc Tukey*). Различия были определены при 0,05 уровне значимости. Статистический анализ выполнялся с помощью программного обеспечения Statistica 10.0 (StatSoft, Россия) [66].

2.10.1 Изучение мутагенных свойств ЛС на основе VMU-2012-05 в тесте по учету микроядер в эритроцитах крови мышей

Микроядерный тест является общепринятым цитогенетическим методом оценки мутагенных свойств и канцерогенных свойств агентов различной природы. Оценка содержания микроядер производится визуально с использованием красителя акридинового оранжевого, который связывается с ДНК клеток. В приготовленных препаратах оценивается соотношение незрелых эритроцитов (полихроматофилов, ПХЭ) к общему количеству зрелых эритроцитов (нормохроматофилов, НХЭ) в процентах (%) на каждое

экспериментальное животное, количество НХЭ с микроядром и ПХЭ с микроядром.

В исследовании использовали аутбредных мышей в возрасте 6-8 недель (40 самцов, 40 самок) - в каждой контрольной и экспериментальной группе по 10 самцов и 10 самок. В соответствии с Руководством по проведению доклинических исследований для оценки мутагенных свойств соединений при многократном введении тестируемый объект рекомендуется вводить на протяжении 5 дней. Таким образом, в данном исследовании ЛС VMU-20012-05 и плацебо вводили мышам внутривентрикулярно (аналог перорального применения) 1 раз в сутки в течение 5 дней. В соответствии с Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств оптимальным является исследование двух уровней доз: высшая терапевтическая доза ВТД и 10 ВТД. Высшая терапевтическая доза препарата (ВТД) – 100 мг в сутки, или $100 \text{ мг}/60 \text{ кг} = 1,7 \text{ мг}/\text{кг}$. Для мышей эквивалентная доза в соответствии с коэффициентом перерасчёта доз составляет: $\text{ТД мыши} = 1,7 \text{ мг}/\text{кг} * 37$ (коэффициент перерасчета человека массой тела 60 кг) / 3,0 (коэффициент перерасчета для мыши массой тела 20 г) = 21 мг/кг. В данном исследовании были использованы терапевтическая доза ТД и 10ТД, что с учетом метаболического коэффициента для данного вида животных составило соответственно 21 мг/кг и 210 мг/кг. В качестве позитивного контроля, согласно рекомендациям Руководства по доклиническим исследованиям лекарственных средств, использовали циклофосфамида моногидрат (Sigma-Aldrich, США) в дозе 50 мг/кг при однократном внутривентрикулярном введении - вещество, индуцирующее образование эритроцитов с микроядрами. Для этого субстанцию растворяли в стерильном физиологическом растворе до концентрации 6,25 мг/мл. Субстанцию циклофосфамид вводили внутривентрикулярно на 5-й день исследования с помощью шприца с иглой. Разовый объем введения не превысил допустимый и составил 8 мл/кг. Негативным контролем являлось плацебо тестируемого объекта – таблетка, лишенная активных компонентов. Тестируемый объект и плацебо суспендировали в 1% растворе крахмала. Дозы тестируемого объекта приведены в таблице 10.

Таблица 10 - Дозы тестируемых объектов

Тестируемый объект	Доза суспензии, мл/животное*	Доза активных компонентов в пересчете на массу тела, мг/кг
ГЛС на основе субстанции VMU-2012-05	0,3	21
	0,3	210
* Примерное значение с учетом массы мыши 30 г.		

Забор крови из сердца и фиксацию клеточного материала на предметные стекла проводили через 48 часов после последнего введения. Для оценки микроядер мазки окрашивали ДНК-специфическим красителем акридиновым оранжевым.

Схема исследования представлена в таблице 11.

Таблица 11 - Учет содержания микроядер в периферической крови мышей

Номер группы	Количество животных		Исследуемый объект	Доза	Способ и схема введения
	самцы	самки			
1	10	10	Циклофосфамид (позитивный контроль)	50 мг/кг	Однократно, внутрибрюшинно (на 5-й день эксперимента)
2	10	10	Плацебо	0	Внутрижелудочно, один раз в сутки в течение 5 дней
3	10	10	ЛФ на основе субстанции VMU-2012-05	21 мг/кг	
4	10	10		210 мг/кг	

Для проведения цитогенетического анализа из образцов крови готовили мазки, окрашенные флуоресцентным красителем акридиновым оранжевым по методу Hayashi et al [162, 163]. Предварительно кровь разводили физиологическим раствором в 5 раз. 10 мкл 0,01% водного раствора акридинового оранжевого наносили на обезжиренное, нагретое до 56°C предметное стекло и равномерно распределяли по поверхности. Далее поверх красителя наносили по 5 мкл суспензии клеток крови на остывшее стекло и распределяли по поверхности. Оценку содержания микроядер проведена визуально с использованием флуоресцентного микроскопа (Axio Scope A1, Carl Zeiss, Германия) и синего возбуждающего светофильтра. В приготовленных препаратах оценивали соотношение незрелых эритроцитов (полихроматофилов, ПХЭ) к общему

количеству зрелых эритроцитов (нормохроматофилов, НХЭ) в процентах (%) на каждое животное. Оценивали количество НХЭ с микроядром и ПХЭ с микроядром. Подсчет проводили в 20 полях зрения на каждое животное, подсчитывали не менее 2000 НХЭ. Результаты представлены в промилле. Критерий позитивного результата: критерием позитивного результата является статистически значимое увеличение НХЭ или ПХЭ с микроядрами, по крайней мере, в одной из опытных групп по сравнению с контрольной группой. В норме спонтанная частота клеток с микроядрами составляет 0,1-0,2% (1-2 ‰), при проявлении цитогенетических нарушений данный показатель увеличивается. В соответствии с этим, если на фоне применения вещества количество микроядер увеличивается статистически значимо, то вещество принято считать мутагеном. Соотношение ПХЭ к НХЭ может свидетельствовать о влиянии на гемопоэз. Например, показано, что цитостатик циклофосфамид изменяет соотношение ПХЭ к НХЭ.

2.10.2 Изучение генотоксичности ЛС на основе VMU-2012-05 в тесте «ДНК-комет» *in vivo*

В основе ДНК-комет-теста лежит регистрация подвижности в постоянном электрическом поле молекул и/или фрагментов ДНК клеток, заключённых в агарозный гель. При этом молекулы нуклеиновой кислоты мигрируют к аноду, формируя электрофоретический след, напоминающий хвост кометы. Длина и содержание в нём ДНК зависят от количества одно- и двунитевых разрывов её молекул, а также щёлочнолабильных сайтов. Методика позволяет оценивать повреждения генетического материала на уровне отдельных клеточных элементов; она обладает высокой чувствительностью, требует минимального количества экспериментального материала и применима ко всем типам клеток, содержащих ДНК. В качестве показателя поврежденности ДНК использовали её процентное содержание в хвосте кометы. В рамках данного исследования изучали

клетки костного мозга, печени, почек, селезёнки и головного мозга самцов и самок крыс [66].

В исследовании использовали аутбредных крыс в возрасте 7-9 недель (30 самцов, 30 самок) - в каждой контрольной и экспериментальной группе по 5 самцов и 5 самок. В соответствии с Руководством по проведению доклинических исследований для оценки генотоксического действия соединений при многократном введении рекомендуется вводить тестируемый объект на протяжении 7-14 дней. В связи с этим было использовано курсовое введение 1 раз в сутки на протяжении 14 дней. Предполагаемая высшая терапевтическая доза препарата (ВТД) – 100 мг в сутки по действующему веществу для человека, или $100 \text{ мг}/60 \text{ кг} = 1,7 \text{ мг}/\text{кг}$. При перерасчете на крысу массой 250 г ВТД составила: $1,7 \text{ мг}/\text{кг} * 37$ (коэф. переноса для человека массой 60 кг) / 7 (коэф. переноса для крысы массой 250 г) $\sim 9 \text{ мг}/\text{кг}$ по действующему веществу. В исследовании тестируемый объект вводили самцам и самкам внутрижелудочно на протяжении 14 дней в трех дозах ТД = 9 мг/кг, ТД×5 = 45 мг/кг и десятикратной терапевтической 10ТД = 90 мг/кг [66].

В качестве позитивного контроля использовали этилметансульфонат (ЭМС, ООО «КемКонсалт», Россия) в дозе 200 мг/кг при внутрижелудочном однократном введении - супермутаген, вещество, индуцирующее повреждение нуклеиновой кислоты. Объем введения раствора этилметансульфоната не превысил допустимый и составил 0,5 мл на животное массой 300 г. Негативным контролем являлось плацебо тестируемого объекта – таблетка, лишенная активных компонентов [66].

Дозы тестируемого объекта приведены в таблице 12.

Таблица 12 - Дозы тестируемых объектов

Тестируемый объект	Объем введения, мкл*	Доза активных компонентов, в пересчете на массу тела, мг/кг
ЛС на основе VMU-2012-05	60	≈ 9
	270	45
	540	90
* Значение с учетом массы крысы 300 г.		

Согласно рекомендациям нормативных документов, положительный контроль этилметансульфонат (ООО «Кемконсалт», Россия) вводили внутрижелудочно однократно в дозе 200 мг/кг с помощью зонда для внутрижелудочного введения.

Тестируемый объект вводили крысам внутрижелудочно в течение 14 дней один раз в сутки в трех дозах (группы № 4, 5, 6). Группе №3 по той же схеме в объеме, эквивалентном объему максимальной дозы, вводили плацебо. Группе №2 позитивного контроля вводили этилметансульфонат в дозе 200 мг/кг однократно внутрижелудочно на 14-й день эксперимента.

Описание экспериментальных групп представлено в таблице 13.

Таблица 13 - Описание экспериментальных групп

Группа №	Количество животных		Исследуемый объект	Доза, мг/кг	Способ и схема введения
	Самцы	Самки			
1	5	5	- (интактные животные)	-	-
2	5	5	Этилметансульфонат (позитивный контроль)	200	Внутрижелудочно однократно на 14 день эксперимента
3	5	5	Плацебо	0	Внутрижелудочно, один раз в день, в течение 14 дней
4	5	5	ЛС на основе VMU-2012-05	9	
5	5	5		45	
6	5	5		90	

Через 3 часа после последнего введения животные были подвергнуты эвтаназии. В ходе некропсии извлекали образцы костного мозга, печени, почек, селезенки и головного мозга. Для выделения костного мозга бедренные кости очищали от мышц, срезали эпифизы и вымывали клетки костного мозга 3 мл (по 1,5 мл на кость) охлажденного до 4°C фосфатно-солевого буфера, содержащего 20 мМ EDTA-Na₂ и 10% ДМСО. 1,5 мл суспензии клеток переносили в микроцентрифужную пробирку и центрифугировали при 1000 g в течение 10 мин. Супернатант удаляли, осадок клеток разводили в 2 мл охлажденного фосфатно-солевого буфера. Пробирки с клеточной суспензией замораживали при -80°C. Образцы тканей печени, почек, селезенки и головного мозга с массой 150-200 мг

замораживали в эппендорфах при -80°C . По мере постановки электрофореза образцы тканей размораживали при комнатной температуре. Образцы тканей измельчали на льду и переносили в стеклянные пробирки с 3 мл охлажденного до 4°C фосфатно-солевого буфера, содержащего 20 мМ EDTA- Na_2 и 10% ДМСО, дважды отмывали от клеток крови и интенсивно раздавливали в новой порции буфера. Пробирки выдерживали 5 мин при комнатной температуре для осаждения крупных фрагментов ткани, после чего 1,5 мл верхнего слоя переносили в микроцентрифужные пробирки и центрифугировали при 1000 g в течение 10 мин. Супернатант удаляли, осадок клеток разводили в 1 мл охлажденного буфера. Клеточные суспензии доводили до конечной концентрации клеток $(1-5) \times 10^5$ кл/мл. Полученную взвесь клеток наносили на подготовленный слайд (1%-ная нормоплавкая агароза на воде), затем клетки лизировали в течение 1 ч при $+4^{\circ}\text{C}$ (2.5 мМ NaCl, 100 мМ Na_2EDTA , 10 мМ трис, с добавлением непосредственно в день эксперимента 10% ДМСО и 1% тритон X-100 (в % от конечного объема), pH 10). Слайды, содержащие лизат клеток, помещали в щелочной буфер (1 мМ Na_2EDTA , 300 мМ NaOH, pH=13) на 20 мин для раскручивания спирали ДНК и реализации щелочеллабильных сайтов в однонитевые разрывы [66, 72].

Микропрепараты раскладывали на поверхности камеры для горизонтального электрофореза. Электрофорез осуществляли в свежей порции охлажденного (4°C) щелочного раствора для электрофореза (pH=13) при температуре окружающей среды $20-25^{\circ}\text{C}$. Электрофорез проводили в течение 25 минут при силе тока 300 mA. Микропрепараты помещали в кювету и заливали дистиллированной водой. Проводили нейтрализацию в течение 5 минут при комнатной температуре. Процедуру нейтрализации повторяли дважды со свежей порцией H_2O . Далее микропрепараты окрашивали свежеприготовленным раствором флуоресцентного красителя SYBR GREEN I (рисунки 7 и 8). Для этого 15 мкл раствора капали на поверхность геля, накрывали покровным стеклом. Микропрепараты анализировали под флуоресцентным микроскопом AxioScore Carl Zeiss (Германия). С каждого микропрепарата рандомизированно делали не менее 20 фотографий, характеризующих не менее 100 клеток (комет).

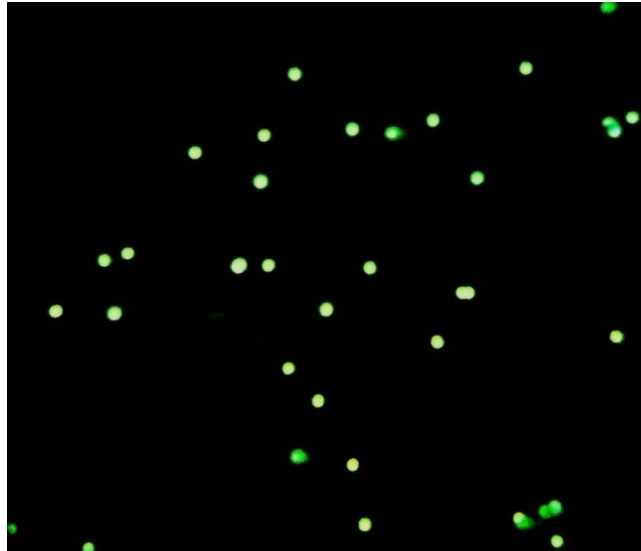


Рисунок 7 - Окраска SYBR Green I. ДНК клеток животных, получавших плацебо

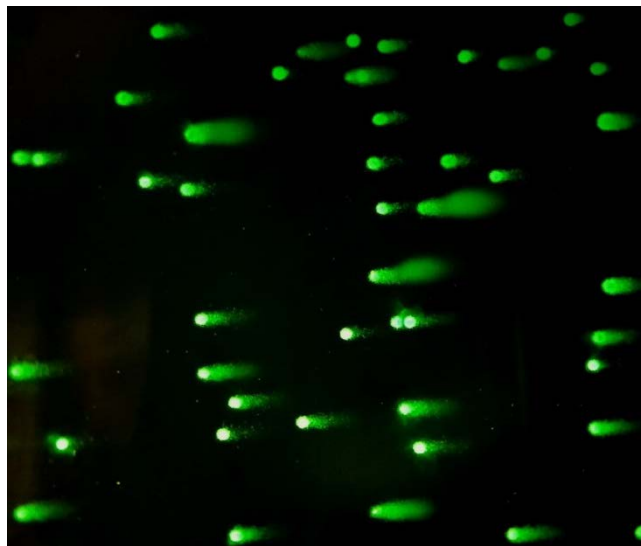


Рисунок 8 - Окраска SYBR Green I. ДНК клеток животных, получавших этилметансульфонат

Полученные изображения и обработку данных осуществляли с помощью специализированного программного обеспечения Comet-Д (ЗАО “ДиаМорф”, Россия, версия 2.0) – рисунок 9. Программное обеспечение осуществляет поиск и выделение комет в автоматическом режиме.

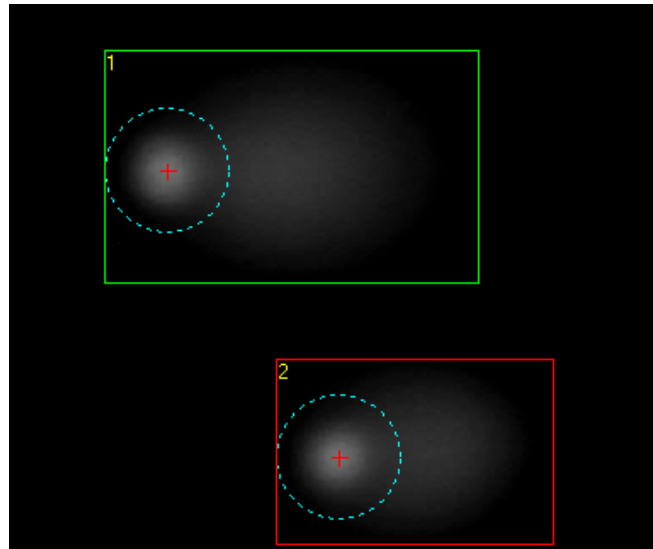


Рисунок 9 - Обработка ДНК-комет в программном обеспечении ЗАО “ДиаМорф”. На фрагментах “1” и “2” выделены ДНК-кометы для анализа

С помощью программного обеспечения производился мониторинг повреждений ДНК, структуры ДНК – длина кометы, длина хвоста кометы, диаметр головы кометы, процентное содержание ДНК в голове или хвосте.

В качестве показателя поврежденности ДНК использовали процентное содержание ДНК в хвосте (% ДНК в хвосте) кометы. Согласно критериям международной программы по стандартизации краткосрочных тестов на канцерогенность достаточным свидетельством генотоксичности вещества в данном тесте является наличие дозовой зависимости, в которой достоверность превышения опытных величин над контрольными должна быть $<0,1$ и, по крайней мере, в одной точке $<0,5$ [262, 72].

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 Подтверждение структуры и характеристика субстанции VMU-2012-05 различными физико-химическими методами анализа

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР)

Регистрировали спектр ЯМР ^1H образца субстанции VMU-2012-05 в DMSO-D₆ (рисунок 10). Произведено отнесение сигналов в спектре ^1H (рисунок 10). Из спектра видно, что в образце присутствуют сигналы, относящиеся как к алифатическим фрагментам – метильному заместителю 26 ($\delta=1.82\text{ppm}$), мостиковым CH_2 -группам 16,17 ($\delta=3.85, 4.18\text{ppm}$), винильной CH -группе 22 ($\delta=5.12$), так и к положениям 1-4, 10-14 в замещенных ароматических кольцах ($\delta=7.00- 8.00\text{ppm}$). Также виден сигнал группы NH 20 ($\delta=11.10$). В целом спектр основного продукта не противоречит предложенной структуре. Также видны сигналы минорных примесей ($\delta=1.10, 3.50, 4.58\text{ppm}$), содержащих CH_3 и CH_2 группы – предположительно это могут быть, например, производные простейших алифатических спиртов. Содержание примесей оценивается на уровне не более 1% мольного (рисунок 11) [174].

Также в спектре ^1H в ароматической области присутствуют малоинтенсивные сигналы примесей в следовых количествах, которые из-за их низкого содержания невозможно идентифицировать [174].

Для подтверждения строения углеродного скелета были зарегистрированы спектры ЯМР ^{13}C в фазочувствительном варианте JMOD (сигналы C, CH_2 направлены вверх, сигналы CH , CH_3 вниз), HC-NMQC, HCNMBC. Эти спектры представлены на рисунках 12, 13, 14, 15 [174].

Произведено отнесение сигналов в спектре ^{13}C (рисунок 12). Из спектра видно, что в образце присутствуют сигналы, относящиеся как к алифатическим фрагментам – метильному заместителю 26 ($\delta=19.88\text{ppm}$), мостиковым CH_2 -группам 16, 17 ($\delta=43.47, 66.25\text{ppm}$), винильной CH -группе 22 ($\delta=101.56$), так и к положениям в ароматических кольцах ($\delta=110.00-156.00\text{ppm}$) и карбонильных.

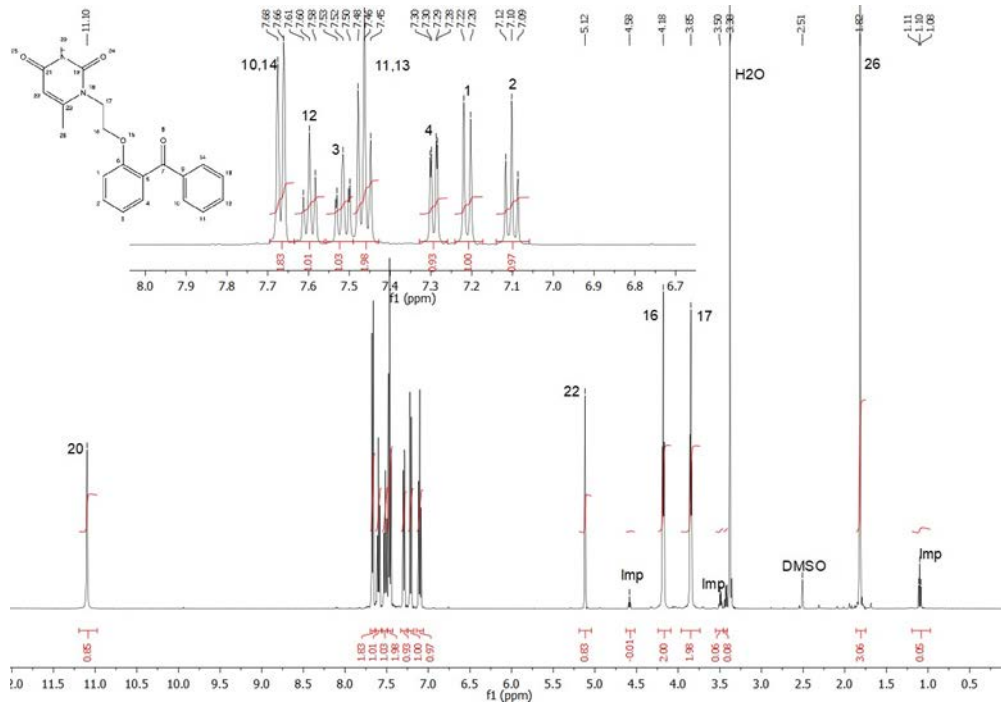


Рисунок 10 - ¹H ЯМР Спектр субстанции VMU-2012-05. Bruker Avance-IIIHD-500, рабочая частота 500.13Mhz

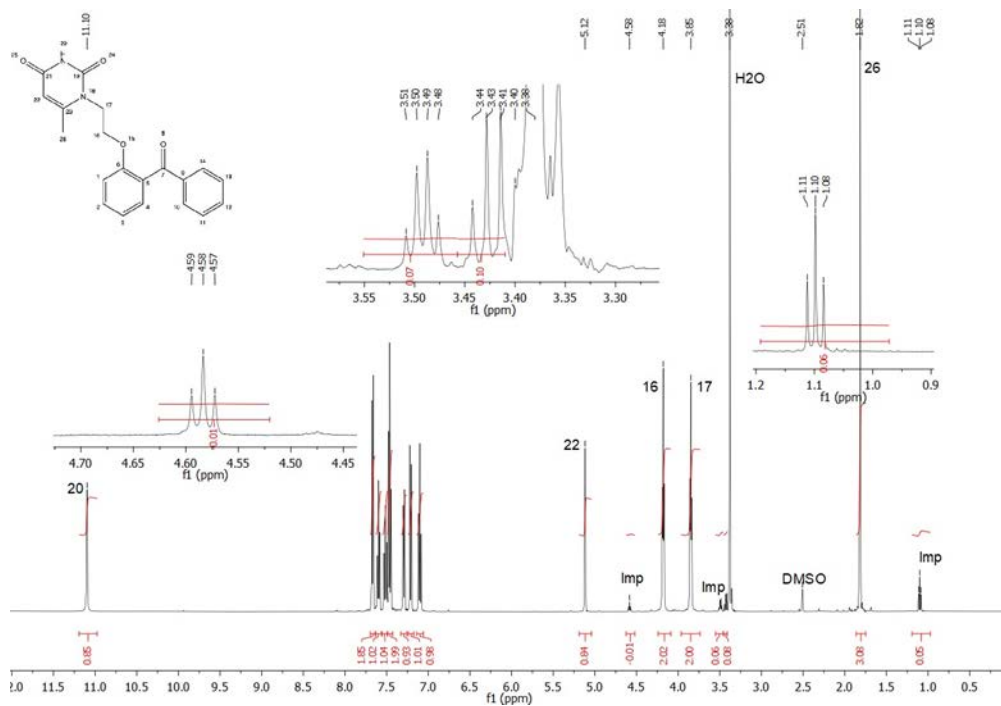


Рисунок 11 - ¹H ЯМР Спектр субстанции VMU-2012-05. Bruker Avance-IIIHD-500, рабочая частота 500.13Mhz. Фрагменты спектра с сигналами примесей увеличены

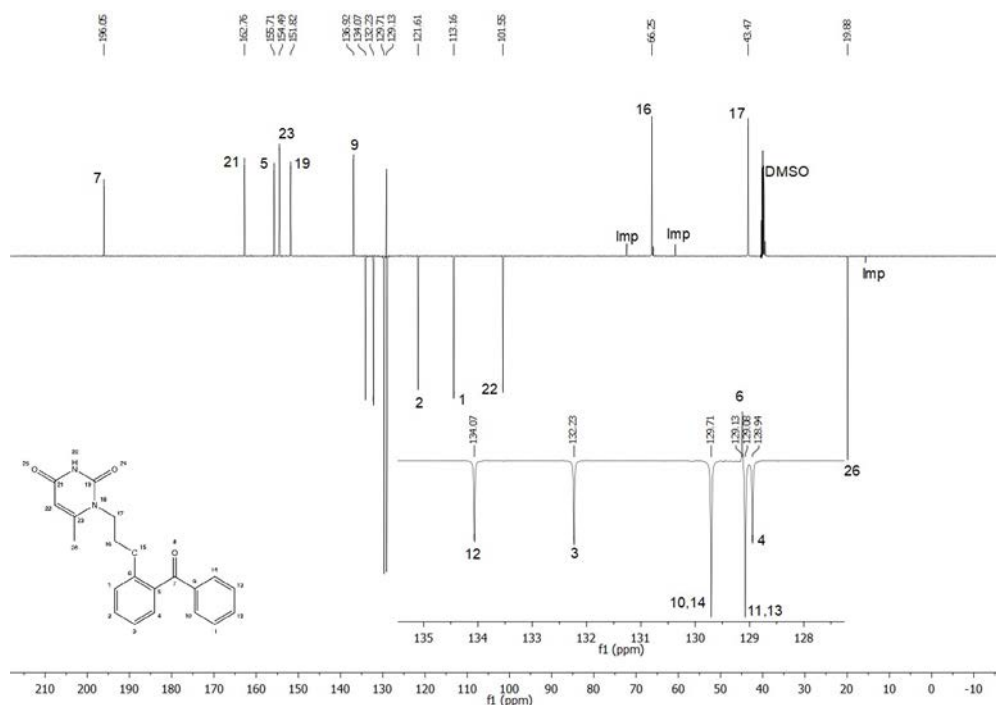


Рисунок 12 - 13С JMOD ЯМР Спектр субстанции VMU-2012-05. Bruker Avance-IIIHD-500, рабочая частота 125.76Mhz

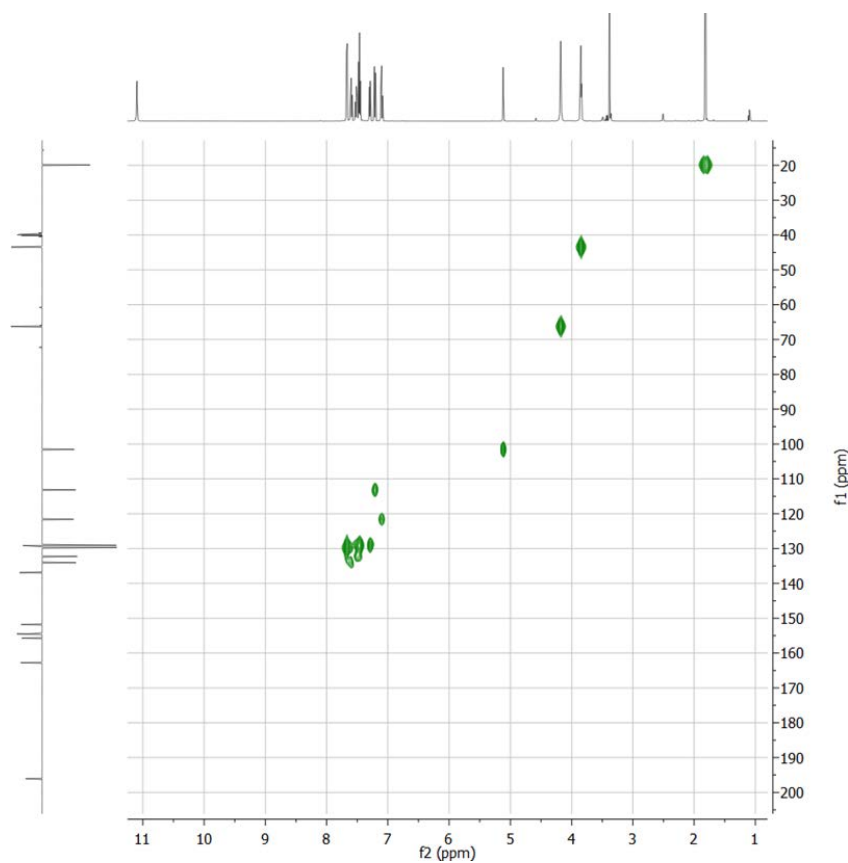


Рисунок 13 - HSQC ЯМР Спектр субстанции VMU-2012-05. Bruker Avance-IIIHD-500, рабочая частота 500.13, 125.76Mhz

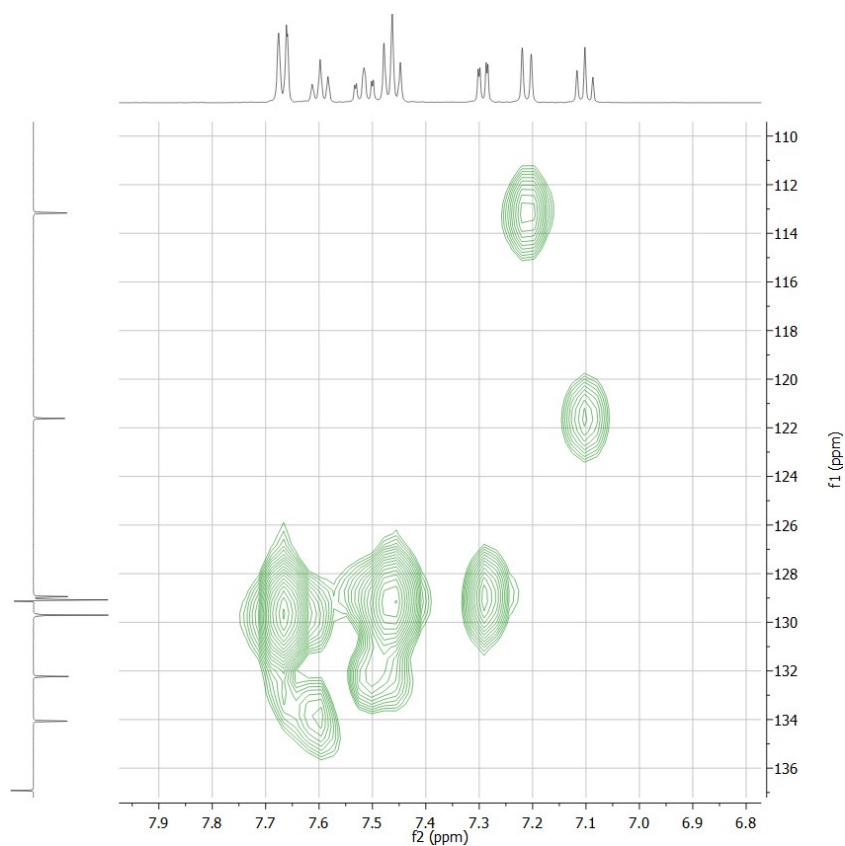


Рисунок 14 - HS-HMQC ЯМР Спектр вещества VMU-2012-05. Bruker Avance-IIIHD-500, рабочая частота 500.13, 125.76Mhz. Увеличенный фрагмент ароматической области

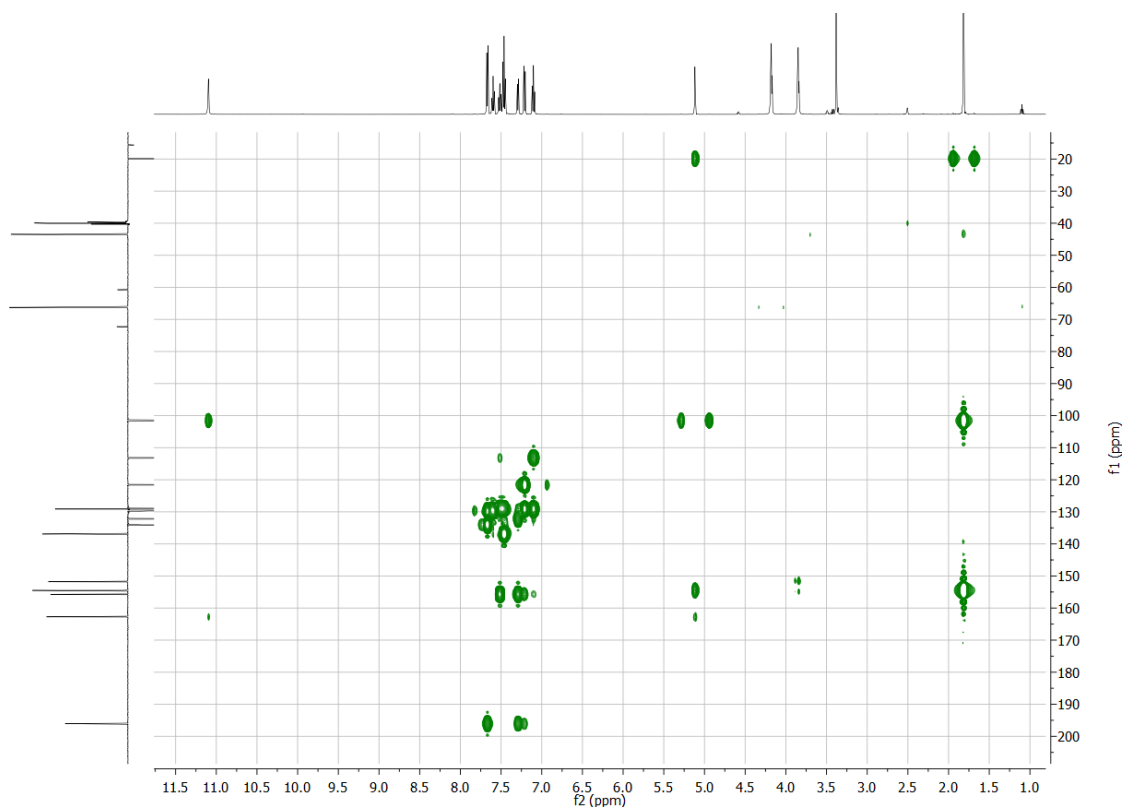


Рисунок 15 - HS-HMBC ЯМР Спектр вещества VMU-2012-05. Bruker Avance-IIIHD-500, рабочая частота 500.13, 125.76Mhz групп 7, 19, 21 ($\delta=150-197$ ppm)

В целом, спектр основного вещества не противоречит предложенной структуре. Также видны сигналы минорных примесей ($\delta=15.55$ -CH₃, 60.71, 65.93, 72.19ppm-CH₂), содержащие CH₃ и CH₂ группы. Сигналы следовых примесей, присутствующие в ароматической области в спектре ¹H, в спектре ¹³C-JMOD отсутствуют полностью. Это означает, что их содержание в образце находится ниже предела обнаружения спектроскопии ЯМР ¹³C [174].

По результатам интерпретации инверсных двумерных корреляционных спектров HC-NMQC и HC-NMBC (рисунки 13, 14, 15) было сделано полное отнесение сигналов в спектрах ¹H и ¹³C, подтверждено строение углеродного скелета соединения. Из рисунков 13, 14, 15 также видно, что распределение двумерных корреляционных сигналов не противоречит предложенной структуре VMU-2012-05. Все данные отнесения спектров приведены в таблице 14 [174].

Таким образом, на основе выполненных экспериментальных исследований и интерпретации полученных данных можно сделать вывод, что образце субстанции VMU-2012-05 присутствует основной продукт и минорные примеси. Полученные спектры не противоречат представленной структуре. В общем, количество и взаимное расположение функциональных групп, интегральная интенсивность из сигналов в спектре ¹H соответствует предполагаемой структуре. Проведено полное отнесение сигналов ядер ¹H и ¹³C в полученных спектрах, которое не противоречит представленной структуре. В образце присутствуют минорные примеси, содержащие алифатические фрагменты CH₃, CH₂ в количествах до 1% мольного. Предположительно это могут быть сигналы производных простых алифатических спиртов. Также в спектре ¹H в ароматической области присутствуют в следовых количествах малоинтенсивные сигналы примесей. Это подтверждается отсутствием сигналов этих примесей в спектре ¹³C, что может объясняться их содержанием ниже предела обнаружения спектроскопии ЯМР ¹³C [174].

Таблица 14 - Отнесение сигналов продукта в спектрах ^1H , ^{13}C [174]

Положение	Группа	$\delta^1\text{H}$, ppm	I/M, J, Hz	$\delta^{13}\text{C}$, ppm	I/M
1	Ar, α -CH	7.21	1/D, J=8.58Hz	113.16	1/S
2	Ar, β -CH	7.10	1/T, J=7.34Hz	121.61	1/S
3	Ar, β -CH	7.50	1/T, J=7.68Hz	132.23	1/S
4	Ar, α -CH	7.29	1/D, J=7.56Hz	128.94	1/S
5	Ar, ipso-C	-	-	155.71	1/S
6	Ar, ipso-C	-	-	129.13	1/S
7	C=O	-	-	196.05	1/S
9	Ar, ipso-C	-	-	136.92	1/S
10,14	Ar, α -CH	7.67	2/D, J=7.48Hz	129.71	2/S
11,13	Ar, β -CH	7.46	2/T, J=7.72Hz	129.08	2/S
12	Ar, γ -CH	7.60	1/T, J=7.44Hz	134.07	1/S
16	O-CH ₂	4.18	2/T, J=5.12Hz	66.25	1/S
17	N-CH ₂	3.85	2/T, J=5.09Hz	43.47	1/S
19	C=O	-	-	151.82	1/S
20	NH	11.10	1/BS	-	-
21	C=O	-	-	162.76	1/S
22	=CH	5.12	1/S	101.55	1/S
23	=C	-	-	154.49	1/S
26	CH ₃	1.82	3/BS	19.88	1/S

δ – Химический сдвиг, ppm. I- интегральная интенсивность сигнала, M- Мультиплетность сигнала: S-синглет, BS-уширенный синглет, D-дублет, T-триплет; J-Константа Спин Спинового Взаимодействия (KCCB), Hz

Рентгеноструктурный анализ

Основные кристаллографические данные и параметры уточнения представлены в таблице 15.

Структуры расшифрованы прямым методом и уточнены МНК в анизотропном полноматричном приближении по F^2_{hkl} . Атомы водорода рассчитаны геометрически и уточнены с наложением ограничений на длины связей C-H и их изотропные параметры смещений. Общий вид молекулы и кристаллической упаковки показан на рисунках 16 и 17 [174].

Таблица 15 - Основные кристаллографические данные и параметры уточнения структуры VMU-2012-05 [174]

Параметр	vmu201205
Брутто формула	C ₂₀ H ₁₈ N ₂ O ₄
Молекулярная масса	350.36
T, К	120
Пространственная группа	P2 ₁ /n
Z	4
a, Å	8.1352(7)
b, Å	13.7868(11)
c, Å	15.0957(12)
α , °	90
β , °	98.443(2)
γ , °	90
V, Å ³	1674.8(2)
$d_{\text{выч}}$, Г·см ⁻³	1.390
μ , см ⁻¹	0.98
F(000)	736
2 θ_{max} , °	61.36

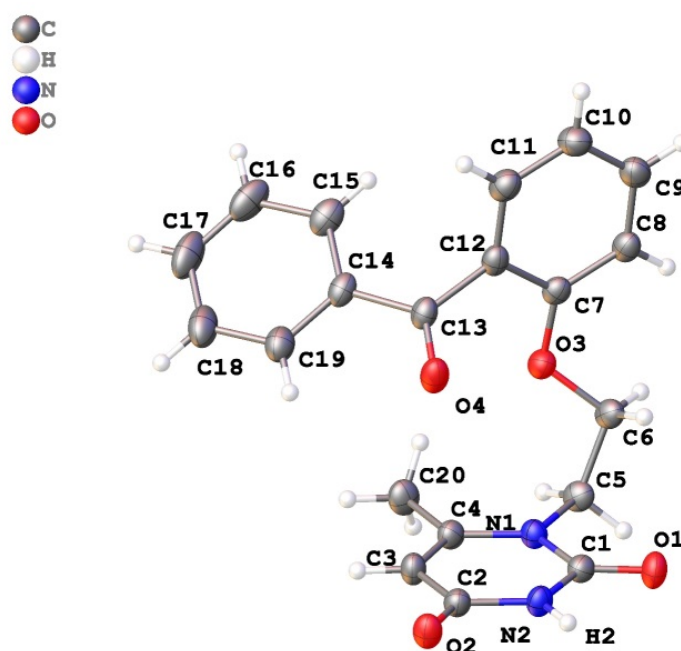


Рисунок 16 - Общий вид молекулы субстанции VMU-2012-05 в представлении атомов эллипсоидами анизотропных смещений

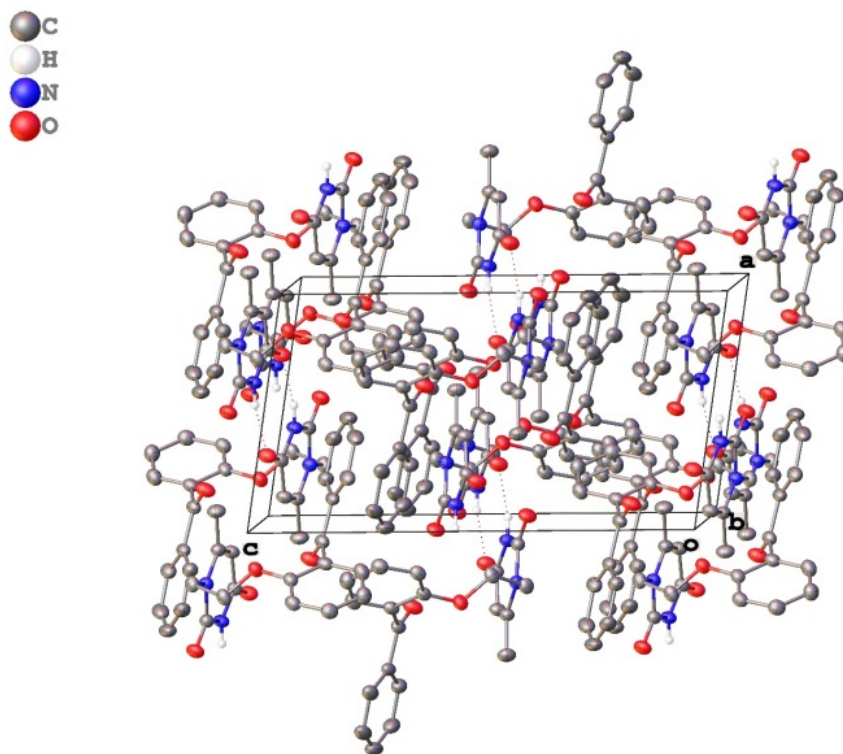


Рисунок 17 - Кристаллическая упаковка субстанции VMU-2012-05

ИК-спектроскопия

Получен типичный ИК спектр субстанции, зарегистрированный в таблетке КВг в области от 4000 до 400 см^{-1} (рисунок 18). Полосы около 1600-1500 см^{-1} связаны с двойными связями в ароматических кольцах молекулы. Карбонильные группы обуславливают появление полос в области 1700-1500 см^{-1} , полосы в области 1300-1200 см^{-1} следует в большей степени отнести к C-N колебаниям, а метильный заместитель проявляется в виде поло в области 1400-1300 см^{-1} , характерных для деформационных колебаний CH_3 -групп. Полосы в области 3200-2700 см^{-1} связаны со всеми имеющимися в молекуле валентными колебаниями C-H-фрагментов.

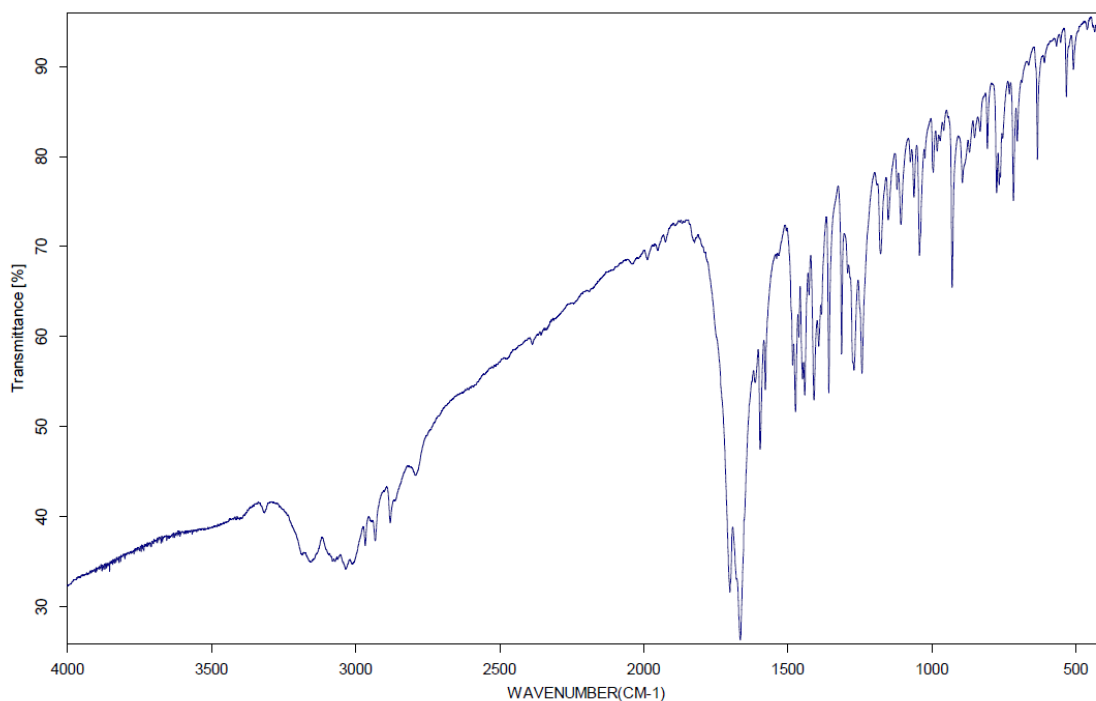


Рисунок 18 – Типичный ИК-спектр субстанции VMU-2012-05

Высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС)

Экспериментально определенное соотношение масса к заряду соответствует расчетному - 351, что подтверждено соответствующим масс-спектром. Молекулярный ион $[M+H]^+$ m/Z 351 в режиме регистрации полного ионного тока.

Данные масс-спектрометрии представлены в таблице 16, рисунках 19 и 20.

В условиях масс-спектрометрического детектирования даже схожие по структуре соединения могут сильно по-разному ионизироваться, что может привести к большой погрешности при оценке их относительного содержания без привлечения стандартных образцов.

Таблица 16 - Результаты масс-спектрометрического анализа

	Площадь пика	Процентное содержание
Основное в-во	4790,00	99,07
Примесь А	25,30	0,42
Примесь В	10,40	0,21
Примесь С	14,90	0,31

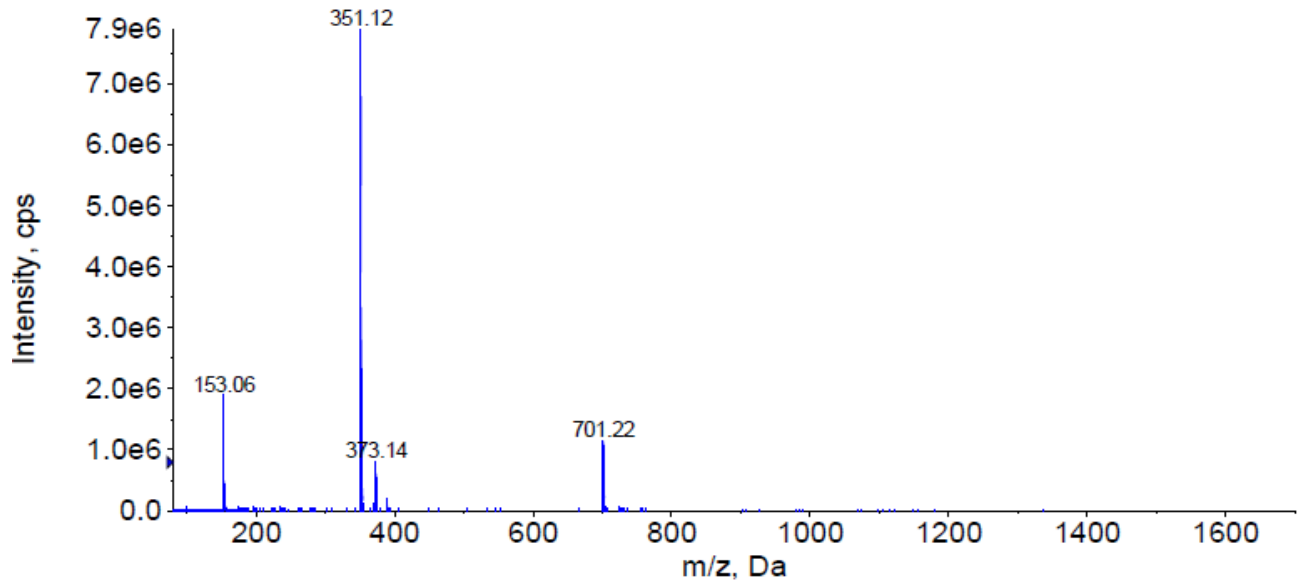


Рисунок 19 - Масс-спектр основного вещества субстанции VMU-2012-05

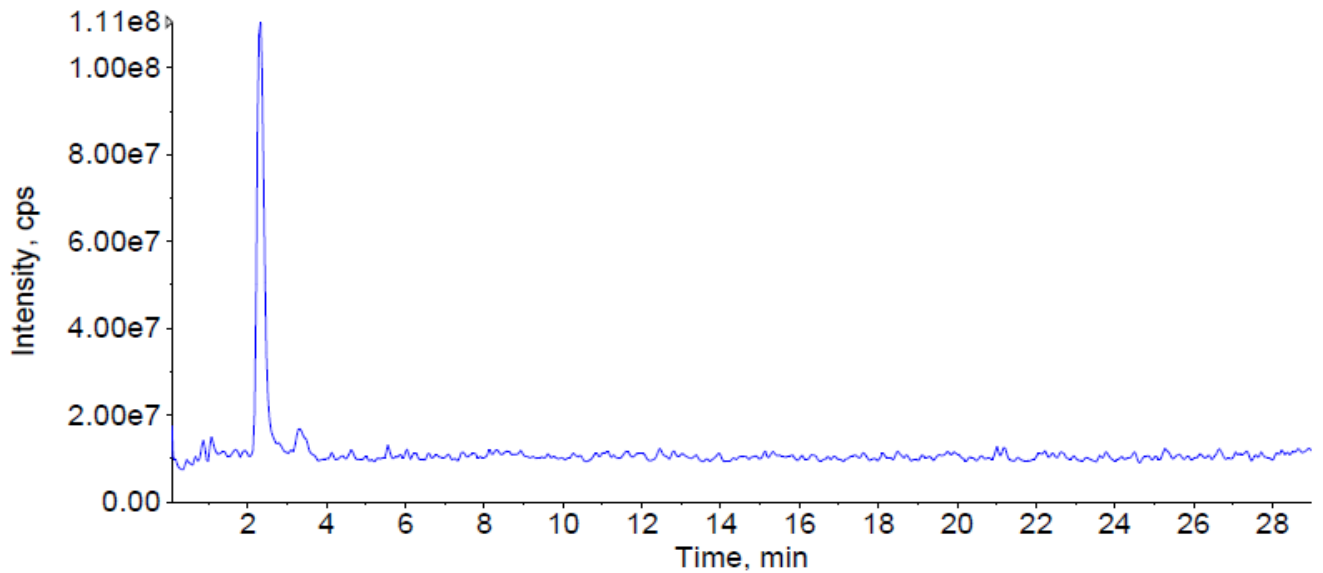


Рисунок 20 - Масс-хроматограмма раствора VMU-2012-05 по полному ионному току

Высокоэффективная жидкостная хроматография с ультрафиолетовым детектированием (ВЭЖХ-УФ)

Получена типичная ВЭЖХ-хроматограмма субстанции VMU-2012-05 (рисунок 21).

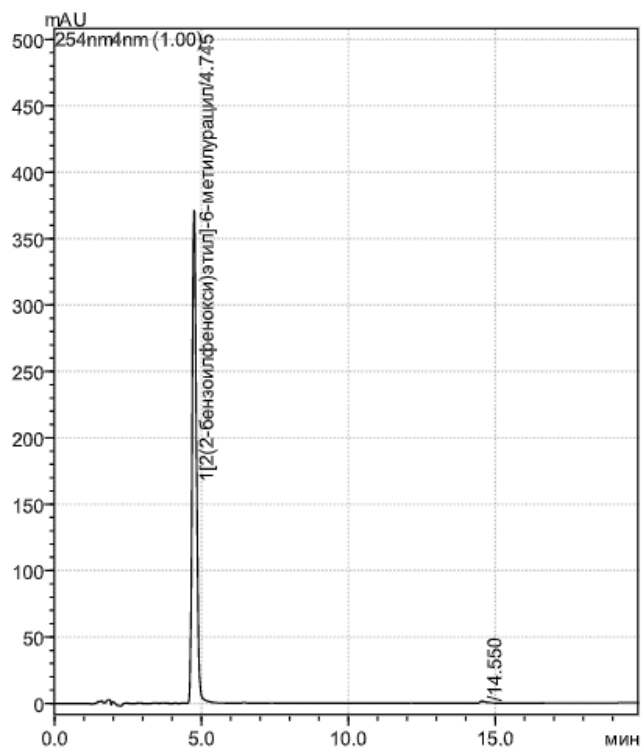


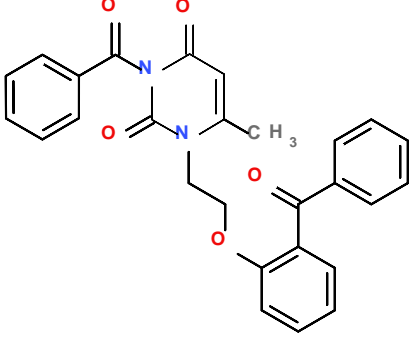
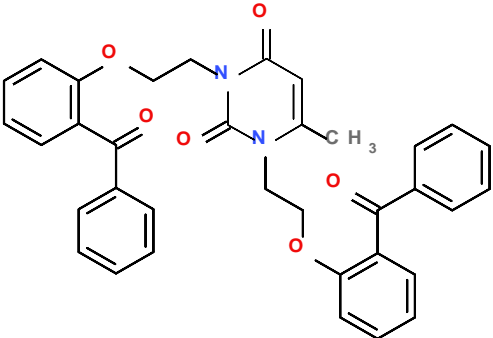
Рисунок 21 – Типичная ВЭЖХ-хроматограмма субстанции VMU-2012-05

Установлены и идентифицированы 3 основные примеси, установлены их относительные времена удерживания по VMU-2012-05 (RRT, таблица 17). Чистота субстанции, определенная методом ВЭЖХ-УФ, составила 99,3%.

Таблица 17 – Примеси и их относительные времена удерживания по VMU-2012-05 (RRT - relative retention time)

Структурная формула	Химическое название	RRT
	Примесь А. 3-бензоил-6-метилурацил	0,71±0,05

Продолжение таблицы 17

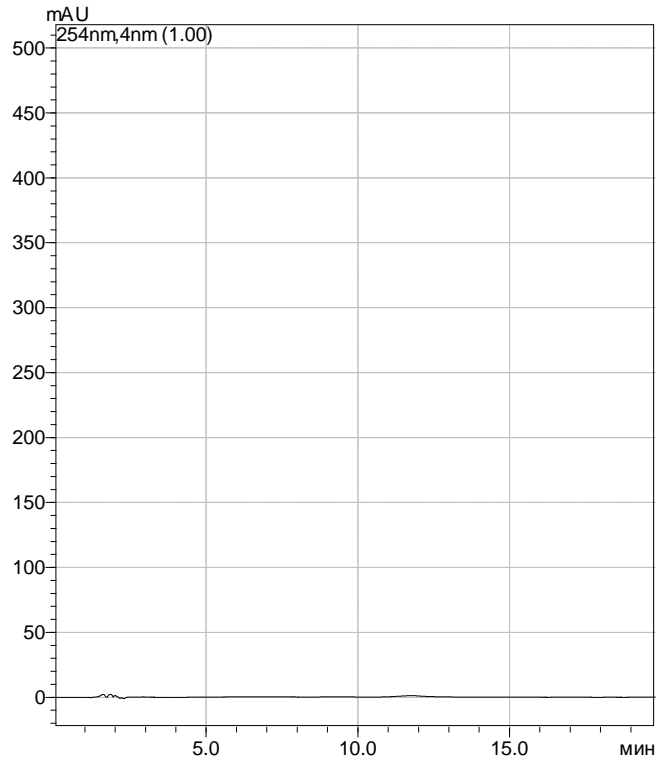
	<p>Примесь В. 1- [2-(2-бензоилфенокс)этил]-3-бензоил-6-метилурацил</p>	2,48±0,05
	<p>Примесь С. 1,3-ди [2-(2-бензоилфенокс)этил]-6-метилурацил</p>	3,03±0,05

Валидация методики ВЭЖХ-УФ по показателю «Подлинность»

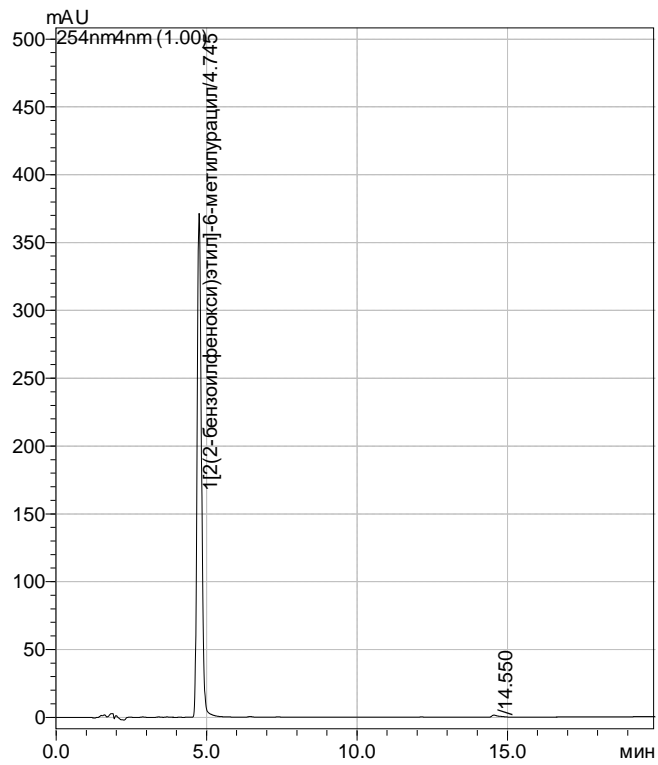
В качестве показателя специфичности на рисунке 22 представлены хроматограммы раствора плацебо (растворителя), стандартного раствора, содержащего СО определяемого вещества, и испытуемого раствора.

Наличие пика 1-[2-(2-бензоилфенокс)этил]-6-метилурацила на хроматограммах раствора СО VMU-2012-05 и испытуемого раствора, а также отсутствие соответствующего сигнала на хроматограмме раствора плацебо свидетельствует о специфичности предлагаемой методики.

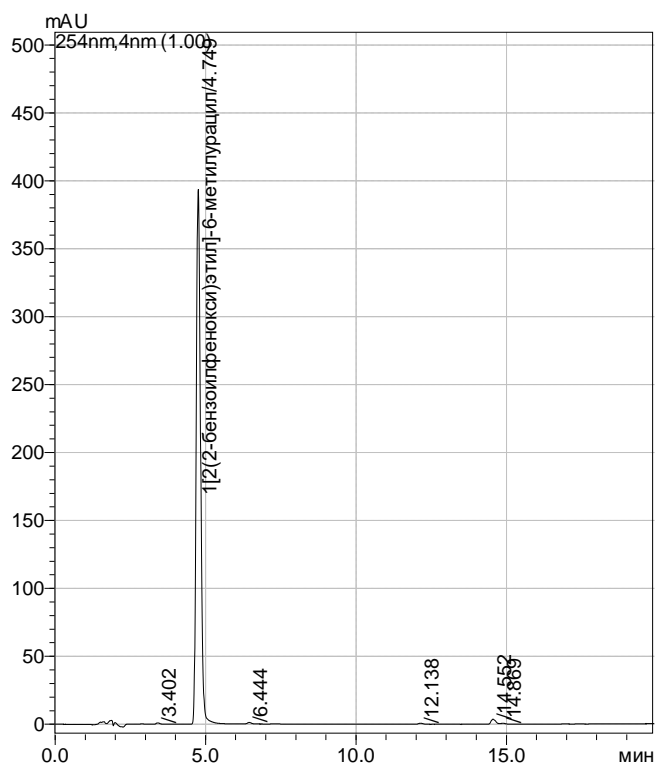
Таким образом, специфичность методики подтверждена различием хроматограмм раствора плацебо (растворителя), стандартного раствора, содержащего СО определяемого вещества, и испытуемого раствора.



А



Б



В

Рисунок 22 – Типичные ВЭЖХ-хроматограммы. А – плацебо, Б – раствор СО VMU-2012-05, В – испытуемый раствор

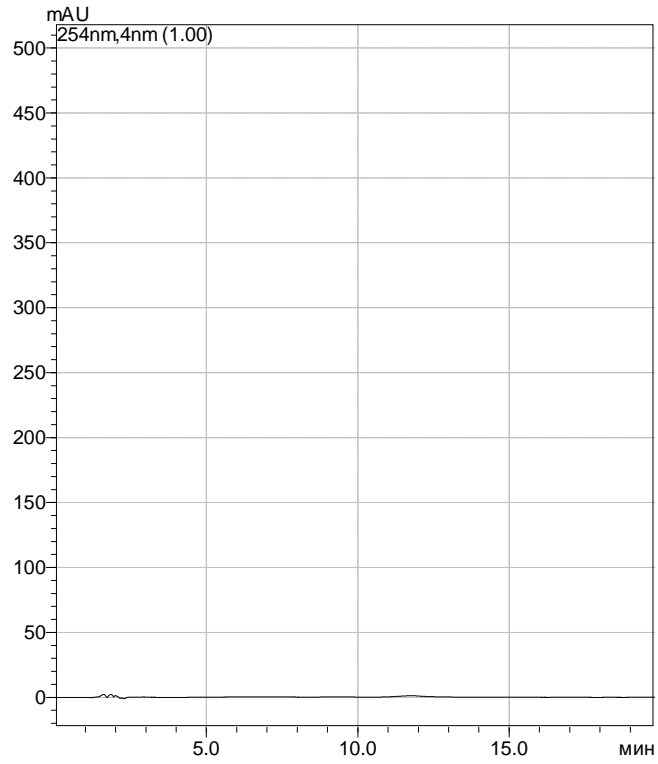
Валидация методики ВЭЖХ-УФ по показателю «Родственные примеси»

Специфичность

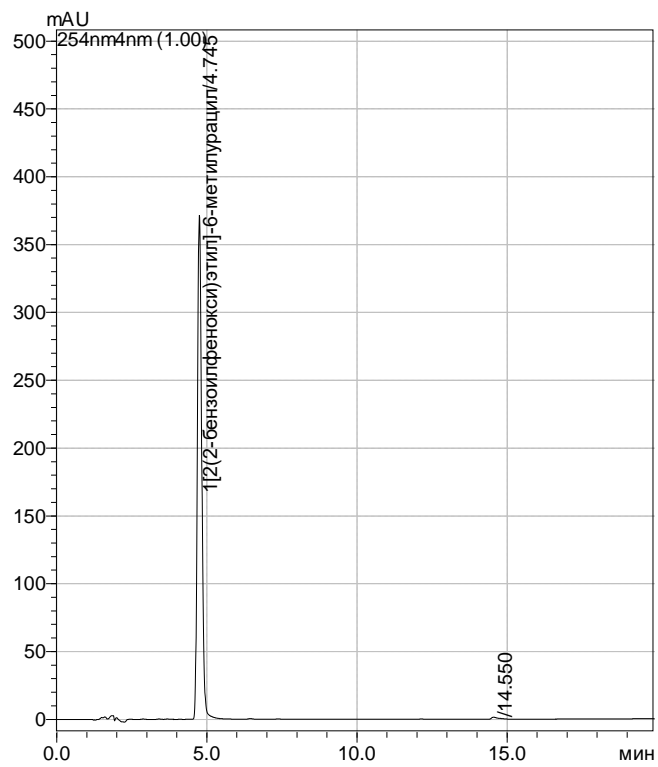
В качестве показателя специфичности на рисунке 23 представлены хроматограммы раствора плацебо (растворителя), стандартного раствора, содержащего СО определяемого вещества, и испытуемого раствора.

Наличие пика 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила на хроматограммах раствора СО VMU-2012-05 и испытуемого раствора, а также отсутствие соответствующего сигнала на хроматограмме раствора плацебо свидетельствует о специфичности предлагаемой методики.

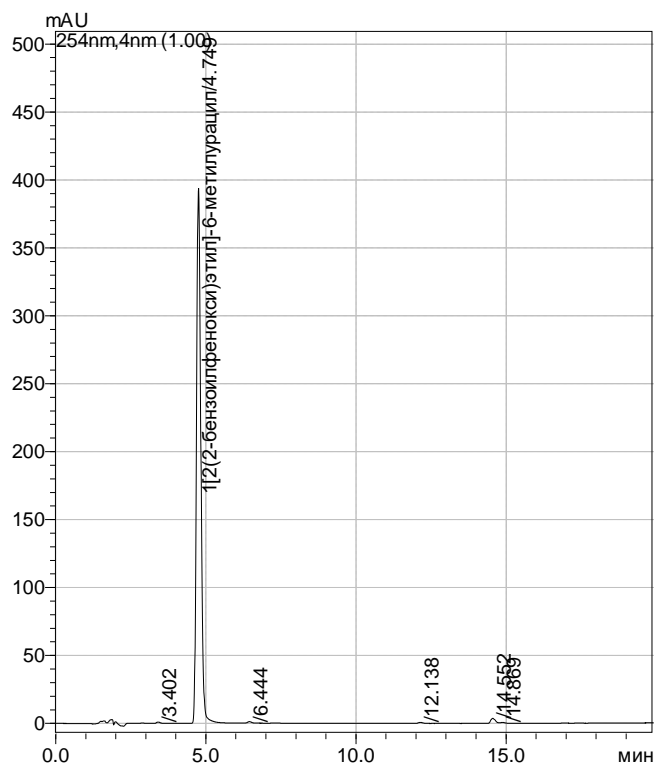
Таким образом, специфичность методики подтверждена различием хроматограмм раствора плацебо (растворителя), стандартного раствора, содержащего СО определяемого вещества, и испытуемого раствора.



А



Б



В

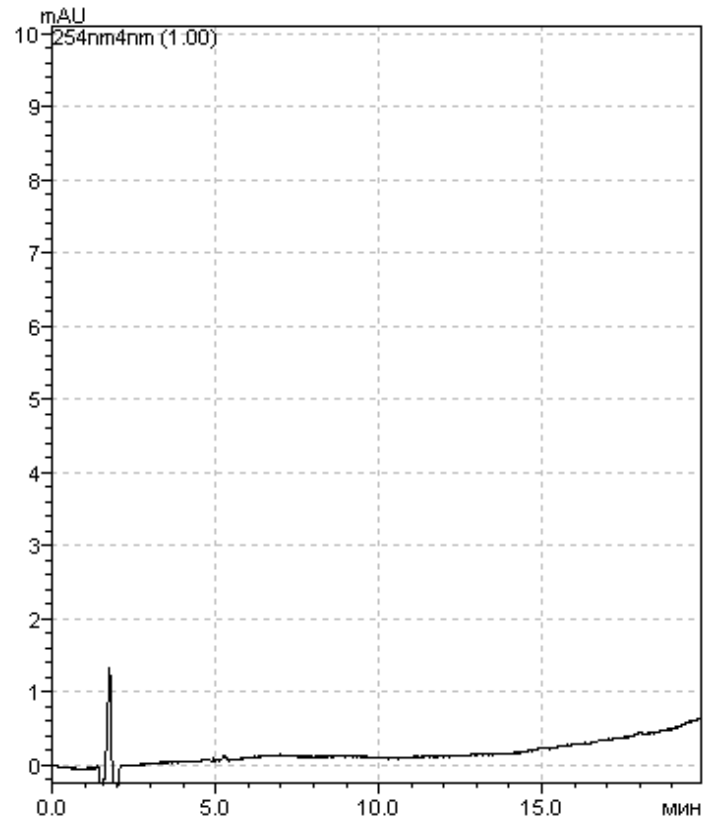
Рисунок 23 – Типичные ВЭЖХ-хроматограммы. А – плацебо, Б – раствор СО VMU-2012-05, В – испытуемый раствор

Предел обнаружения (ПО) и предел количественного определения (ПКО)

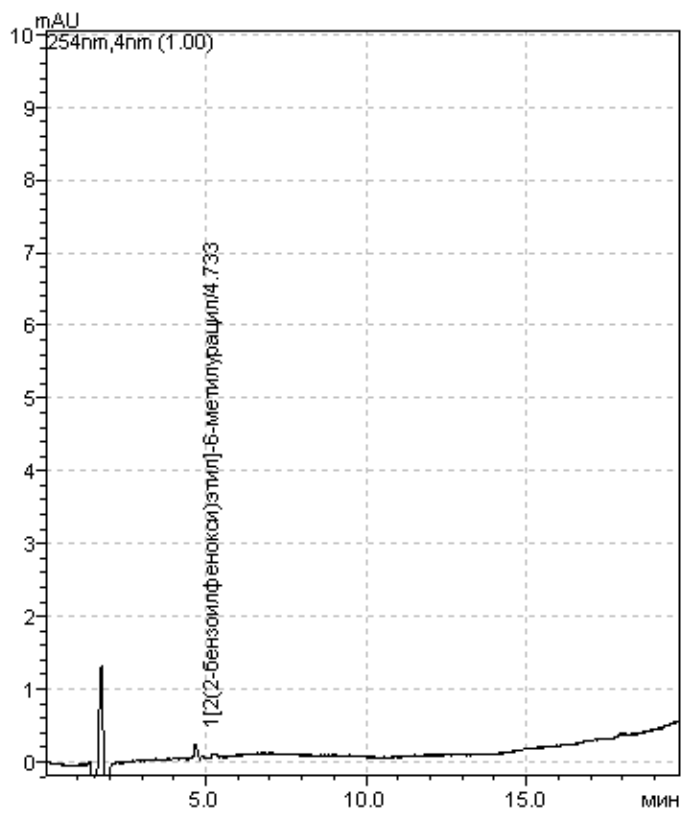
На рисунке 24 представлены типичные хроматограммы раствора плацебо и раствора СО VMU-2012-05, соответствующие ПО и ПКО.

Уровень шума составил около 0,05 mAU (рисунок 24А), соотношение сигнал/шум для раствора с концентрацией 0,02 мкг/мл составил около 4:1 (рисунок 24Б), соотношение сигнал/шум для раствора с концентрацией 0,05 мкг/мл составил около 10:1 (рисунок 24В). ПО VMU-2012-05 составил 0,02 мкг/мл (соответствует уровню содержания примесей 0,04%), ПКО – 0,05 мкг/мл (соответствует уровню содержания примесей 0,1%).

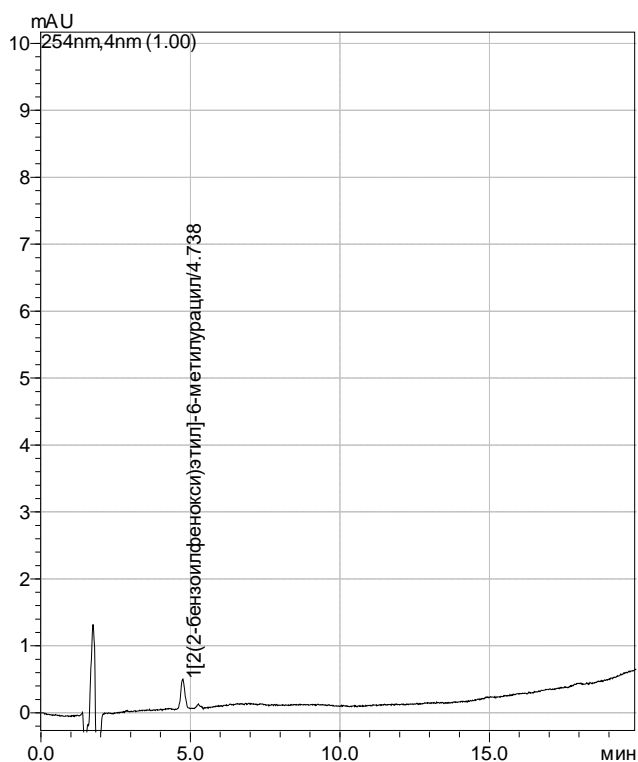
Таким образом, установлены значения предела обнаружения (ПО) и предела количественного определения (ПКО) VMU-2012-05.



А



Б



В

Рисунок 24 – Типичные ВЭЖХ-хроматограммы. А – плацебо, Б – раствор СО 1 VMU-2012-05, соответствующий уровню ПО, В – раствор СО VMU-2012-05, соответствующий уровню ПКО

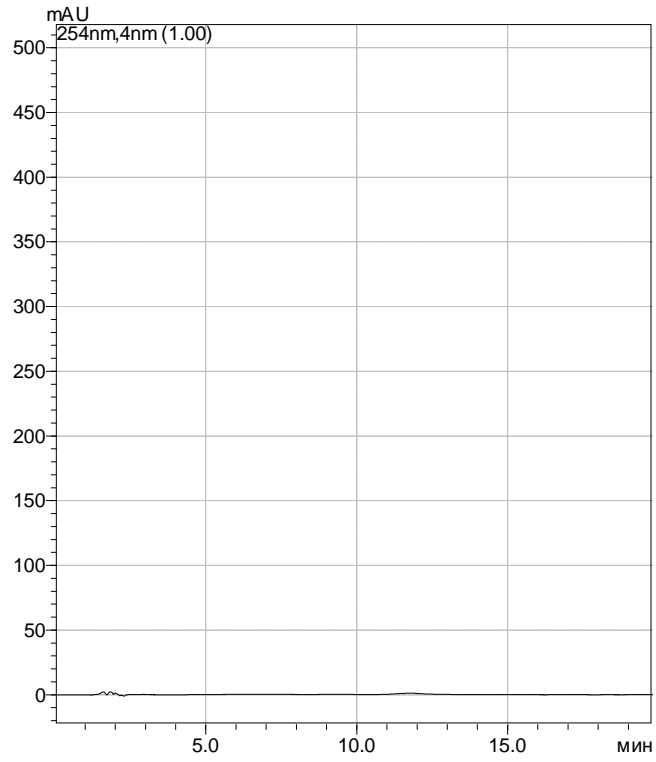
Валидация методики ВЭЖХ-УФ по показателю «Количественное определение»

Специфичность

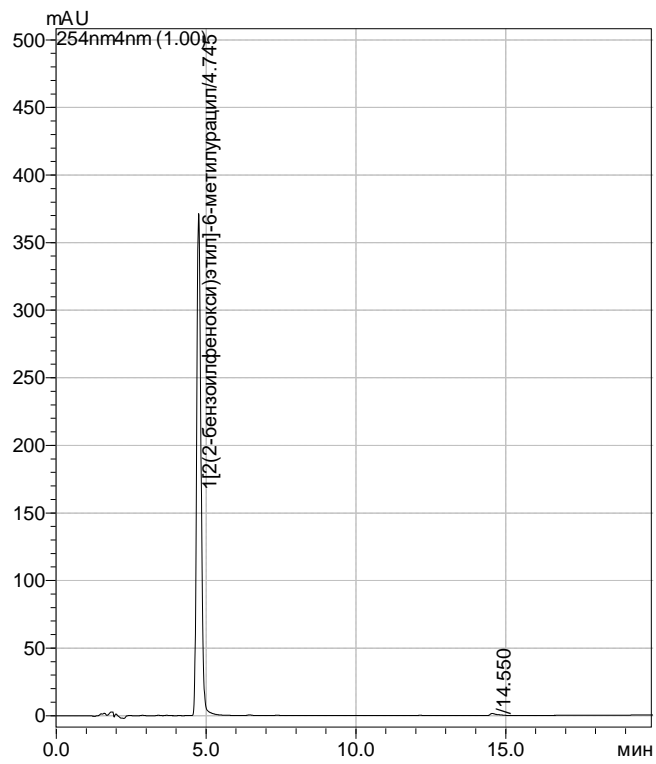
В качестве показателя специфичности на рисунке 25 представлены хроматограммы раствора плацебо (растворителя), стандартного раствора, содержащего СО определяемого вещества, и испытуемого раствора.

Наличие пика 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила на хроматограммах раствора СО VMU-2012-05 и испытуемого раствора, а также отсутствие соответствующего сигнала на хроматограмме раствора плацебо свидетельствует о специфичности предлагаемой методики.

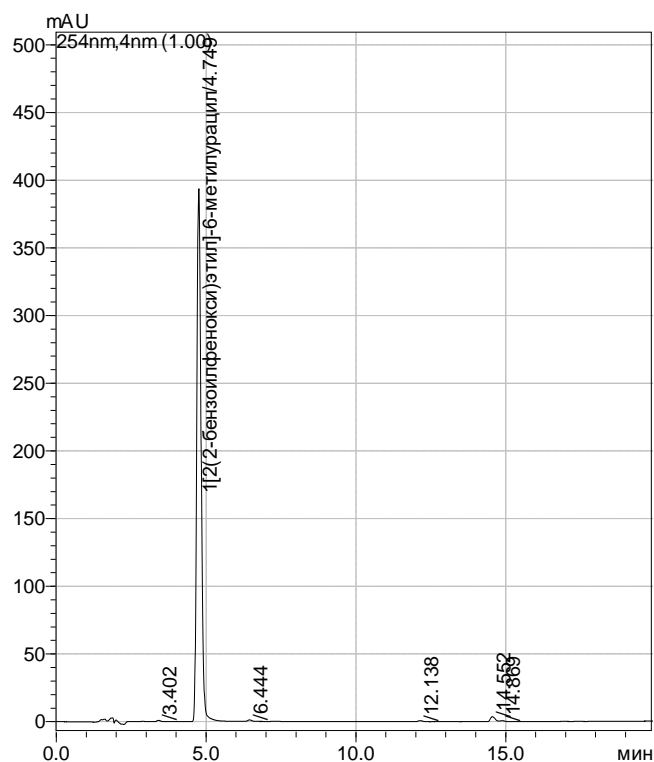
Таким образом, специфичность методики подтверждена различием хроматограмм раствора плацебо (растворителя), стандартного раствора, содержащего СО определяемого вещества, и испытуемого раствора.



А



Б



В

Рисунок 25 – Типичные ВЭЖХ-хроматограммы. А – плацебо, Б – раствор СО VMU-2012-05, В – испытуемый раствор

Линейность и диапазон применения методики

Значения площадей хроматографических пиков при различных концентрациях растворов СО VMU-2012-05 представлены в таблице 18.

Статистические параметры для нормализованных данных по результатам анализа растворов СО VMU-2012-05 приведены в таблице 19.

На рисунке 26 представлен график линейной зависимости площадей хроматографических пиков от концентрации раствора СО VMU-2012-05.

Таким образом, полученные значения статистических критериев удовлетворяют требованиям Руководства по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств [34]. Следовательно, валидируемая методика может быть использована в тесте «Количественное определение».

Таблица 18 – Значения площадей хроматографических пиков, полученные при анализе растворов СО VMU-2012-05 различных концентраций

Концентрация раствора СО VMU-2012-05, мкг/мл	Площадь хроматографического пика VMU-2012-05, усл. ед.	Концентрация раствора СО VMU-2012-05, мкг/мл	Площадь хроматографического пика VMU-2012-05, усл. ед.
65,00	5176086	65,00	5190179
60,00	4789650	60,00	4798253
55,00	4426729	55,00	4421344
50,00	4029493	50,00	4036903
45,00	3639824	45,00	3647012
40,00	3248539	40,00	3253571
35,00	2844825	35,00	2852905
30,00	2447495	30,00	2432299
25,00	2048159	25,00	2045090
12,50	1026047	12,50	1023392
5,00	405339	5,00	403925
2,50	201480	2,50	200004
0,50	40325	0,50	39946
0,25	19762	0,25	20230
0,05	4105	0,05	4261

Таблица 19 – Статистические параметры для нормализованных данных по результатам анализа растворов СО VMU-2012-05

Параметр	Получено для растворов СО VMU-2012-05	Требования Руководства по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств [34]
Уравнение регрессии	$Y=0,9965X+0,3471$	
Диапазон концентраций, %	0,1-130	80-120
Значение остаточного стандартного отклонения (S_0), %	0,57	1,58
Значение коэффициента корреляции (r)	0,9999	0,9933
Значение свободного члена в уравнении регрессии (a), %	0,3471	4,8

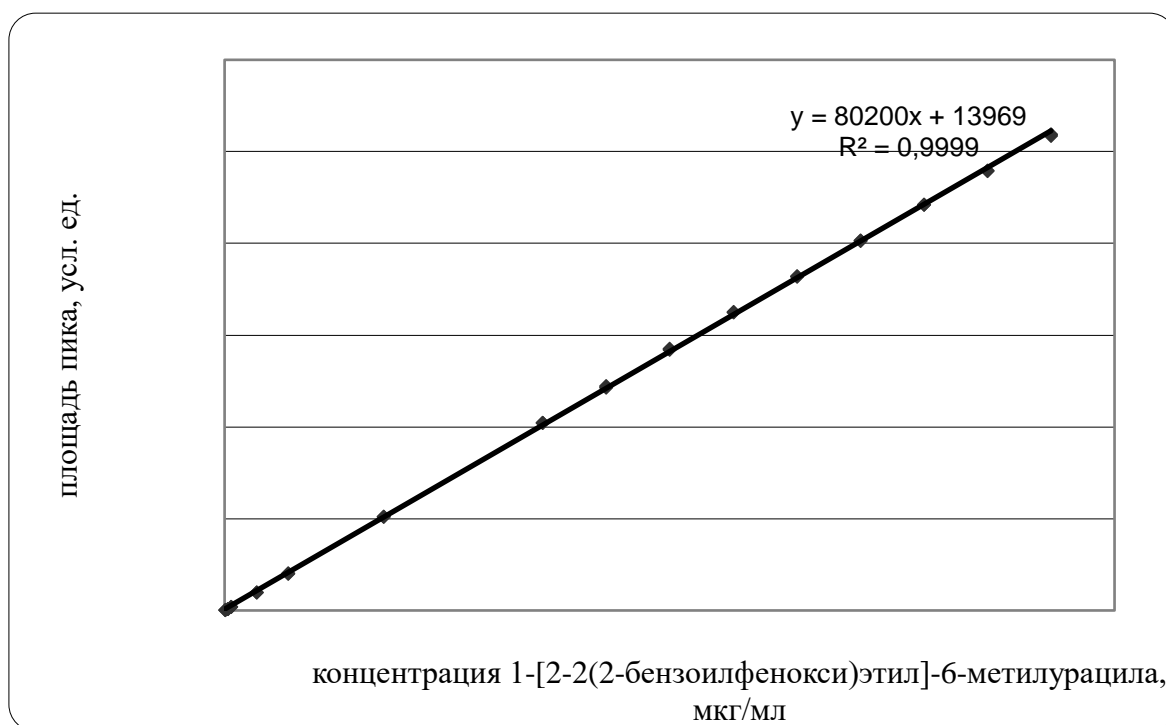


Рисунок 26 – График линейной зависимости площадей хроматографических пиков от концентрации раствора СО VMU-2012-05

Прецизионность

Фактические данные, полученные при оценке прецизионности, представлены в таблице 20.

Таблица 20 – Экспериментальные данные, полученные при оценке прецизионности методики испытания препарата «VMU-2012-05, субстанция» по показателю «Количественное определение»

Концентрация от номинальной	Площадь хроматографического пика VMU-2012-05, усл. ед. (среднее±SD)	Внутридневная прецизионность (intra-day precision), RSD, %	Междневная прецизионность (inter-day precision), RSD, %
80	1-ый день: 3251055±3558 2-ой день: 3344165±2172 3-ий день: 3372360±4011	0,12	1,47
100	1-ый день: 4033198±5240 2-ой день: 4153564±3505 3-ий день: 4185253±6379	0,15	1,49
120	1-ый день: 4793952±6083 2-ой день: 4973301±11936 3-ий день: 4999652±2621	0,24	0,34

Таким образом, прецизионность методики не превышает максимально допустимую неопределенность результата ($\max\Delta_{AS}$), которая в соответствии с Руководством по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств [34], составляет 3,0 %: внутридневная прецизионность (intra-day precision) не превышает 0,25 %, а междневная прецизионность (inter-day precision) 1,50 %.

Правильность

В таблице 21 представлены данные, полученные при оценке правильности.

Таблица 21 – Данные по проверке правильности методики испытания препарата «VMU-2012-05, субстанция» по показателю «Количественное определение»

Внесено VMU-2012-05, мкг/мл	Концентрация, % от номинальной	Найдено VMU-2012-05, мг/мл	Погрешность абс., мг/мл	Погрешность отн., %
40	80,0	40,5	+0,5	1,23
		39,8	-0,2	-0,50
		39,9	-0,1	-0,25
50	100,0	50,1	+0,1	0,20
		50,4	+0,4	0,80
		49,7	-0,3	-0,60
60	120,0	59,9	-0,1	-0,17
		60,0	0,0	0,00
		60,5	+0,5	+0,83
Среднее:				0,51

В соответствии с требованиями Руководства по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств [34] в тесте «Количественное определение» для субстанций при допустимом уровне отклонений в содержании действующих веществ $\pm 3\%$ значение систематической погрешности ($|\delta|$, %) не должно превышать 0,96. Полученное среднее значение (0,51%) удовлетворяет этим рекомендациям.

Установлена правильность методики испытания препарата «VMU-2012-05, субстанция» по показателю «Количественное определение».

Таким образом, проведена предварительная (частичная) валидация методик анализа (контроля качества) «VMU-2012-05, субстанция».

В тесте «Подлинность» методика анализа валидирована по показателю специфичность (Specificity); в тесте «Посторонние примеси» методика анализа валидирована по показателям специфичность (Specificity), предел обнаружения (ПО, Limit of detection – LOD) и предел количественного определения (ПКО, Limit of quantification – LOQ); в тесте «Количественное определение» методика анализа валидирована по показателям специфичность (Specificity), линейность (Linearity), сходимость (Repeatability), точность (или правильность, Accuracy) в соответствии с современными требованиями. Получены удовлетворительные результаты по всем валидационным показателям согласно протоколу предварительной валидации (приложение Б).

3.2 Аттестация и разработка спецификации на стандартный образец VMU-2012-05

Разработан проект спецификации и проведена аттестация стандартного образца субстанции для осуществления контроля качества фармацевтической субстанции VMU-2012-05 по показателям «Подлинность», «Количественное определение», разработан проект спецификации (таблица 22).

Стандартный образец VMU-2012-05 представляет собой высокоочищенную субстанцию. Молекулярная масса по данным масс-спектрометрии составляет 350,37.

Стандартный образец аттестован по показателям «Описание», «Растворимость», «Молекулярная масса», «Подлинность (подтверждение структуры)», «Родственные примеси», «Потеря в массе при высушивании», «Количественное определение», «Упаковка», «Маркировка», «Хранение», «Срок годности».

Таблица 22 - Спецификация на СО «VMU-2012-05, стандартный образец»

Показатель	Метод	Нормы
Описание	Визуальный	Кристаллический порошок от кремового до светло-коричневого цвета
Подлинность	Спектроскопия ЯМР	В спектре ЯМР ^1H и ^{13}C должны наблюдаться сигналы соответствующих структурных фрагментов молекулы
	Масс-спектрометрия	Молекулярный ион $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 351 в режиме регистрации положительных ионов
	Температура плавления	227-229°C
Родственные примеси	ВЭЖХ	Единичной неидентифицированной примеси не более 0,1 % Сумма примесей не более 1 %
Потеря в массе при высушивании	Гравиметрический ГФ РФ	Не более 0,5 %
Количественное определение	Расчётный	Не менее 99,0 %
Упаковка	По 0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 1,0 и 2,0 г в стеклянные банки темного стекла с завинчивающейся крышкой	
Маркировка	На этикетке упаковки должны быть указаны: наименование материала, квалификация, номер серии, количество, срок годности (дата изготовления), производитель	
Хранение	В защищённом от влаги и света месте при температуре не выше 25 °С.	
Срок годности	2 года	

3.3 Разработка проекта спецификации и методов контроля качества субстанции VMU-2012-05

Разработан проект спецификации и методы контроля качества субстанции VMU-2012-05 и 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 (таблица 23).

Таблица 23 – 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 ОФС.1.2.1.005.15;	Практически нерастворим в воде, этаноле, гексане, очень малорастворим в метаноле, малорастворим в хлороформе
Подлинность	ИК-спектрометрия	ИК спектр субстанции, зарегистрированный в таблетке KBr 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 [одновременно с количественным определением]	Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора, должно соответствовать времени удерживания пика VMU-2012-05 на хроматограмме стандартного раствора
Температура плавления	ГФ РФ; ОФС.1.2.1.0011.18 (капиллярный метод)	От 227 до 229 °С
Родственные примеси	ВЭЖХ; [одновременно с количественным определением]	Примесь А, не более 0,5 % Примесь В не более 0,3 % Примесь С не более 0,2 % Сумма примесей – не более 1,0 %
Сульфатная зола	ГФ РФ; ОФС.1.2.2.2.0014.15	Не более 0,1 %

Продолжение таблицы 23

ПОКАЗАТЕЛЬ	МЕТОД	НОРМЫ
Тяжелые металлы	ГФ РФ; ОФС.1.2.2.2.0012.15	Не более 0,002 %
Потеря в массе при высушивании	ГФ РФ; ОФС.1.2.1.0010.15	Не более 0,5 %
Остаточные органические растворители	ГХ	Этанол – не более 0,5% Этилацетат – не более 0,5% 2-Этоксизтанол – не более 0,016%
Микробиологическая чистота	ГФ РФ; ОФС.1.2.4.0002.18	Категория 2.2
Количественное определение	ВЭЖХ	От 98,0 % до 102,0 % $C_{20}H_{18}N_2O_4$ в пересчете на безводное и свободное от органических растворителей вещество
Упаковка	Двухслойный прозрачный полиэтиленовый пакет, который помещают в черный полиэтиленовый пакет. Пакет помещают в полиэтиленовый барабан. На барабан наклеивают этикетку.	
Хранение	При температуре не выше 25° С в защищенном от света месте в плотно укупоренной упаковке.	
Маркировка	В соответствии с НД	
Срок годности	2 года	

Обоснование спецификации

Спецификация на фармацевтическую субстанцию VMU-2012-05 предназначена для испытаний качества и безопасности. В спецификацию на фармацевтическую субстанцию VMU-2012-05 включены методы и критерии приемлемости (нормы).

Разработку проекта спецификации на фармацевтическую субстанцию «VMU-2012-05, субстанция-порошок» с указанием методов контроля и норм проводили на основании требований, представленных в соответствующих общих фармакопейных статьях (ОФС) Государственной фармакопеи Российской Федерации (ГФ РФ) XIV издания, а также «Руководстве по экспертизе

лекарственных средств» в 4-х томах 2013-2014 г. Издание ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава РФ». Том 2, гл. 5 «Правила составления, изложения и оформления НД на фармацевтические субстанции».

Включенные в проект спецификации показатели контроля качества и пределы нормирования соответствуют назначению субстанции – «для производства нестерильных лекарственных форм». В рамках разработки комплексной системы контроля производства, испытаний и выпуска фармацевтической субстанции VMU-2012-05 были проведены подробные исследования свойств продукта и технологического процесса для подтверждения строения (структуры) молекулы, идентификации примесей и их источников. Результаты указанных исследований, предшествующая деятельность по разработке и целевые показатели фармацевтической субстанции были исходными параметрами для определения критических показателей качества.

Аналитические методики, способные определять соответствующие показатели качества фармацевтической субстанции VMU-2012-05, включены в спецификацию и/или в испытания внутрипроизводственного контроля для обеспечения соответствующего качества, эффективности и безопасности продукта, а также для обеспечения однородности процесса производства фармацевтической субстанции.

Критерии приемлемости (нормы) предложены на основании нормативной документации, токсикологической оценки, ожидаемого качества продукта, производственных и аналитических возможностей.

Аналитические методики контроля качества субстанции «VMU-2012-05, субстанция-порошок» должны быть разработаны и гармонизированы со стандартными методиками, приведенными в ОФС ГФ РФ и монографиях ЕФ, с учетом имеющейся материальной базы. Приведенные методики позволят достоверно оценить качество фармацевтической субстанции, что в последствии было подтверждено результатами фактического контроля 3 (трех) опытно-промышленных серий фармацевтической субстанции. При разработке методик контроля качества руководствовались фактическими данными,

характеризующими качество испытуемых образцов субстанции, как в момент выпуска, так и при хранении.

Описание.

В разделе указывают характеристики физического состояния и цвета субстанции; если необходимо, приводят информацию о запахе, гигроскопичности и полиморфизме. В проекте спецификации предлагается следующая редакция нормы:

Норма: кристаллический порошок от кремового до светло-коричневого цвета, без запаха.

Испытание проводят визуально. Все серии фармацевтической субстанции, проконтролированные на данный момент, удовлетворяют предложенной норме. При испытаниях в условиях долгосрочного хранения и ускоренного старения не наблюдалось изменения цвета или физического состояния субстанции.

Растворимость.

Данный показатель качества отражает стабильность технологического процесса, а также может характеризовать чистоту субстанции. Для проведения испытания рекомендуется использовать не менее трех растворителей различной полярности: вода, метанол, гексан, этанол и хлороформ. Испытание проводят визуально в соответствии с ГФ РФ, ОФС.1.2.1.005.15 «Растворимость».

Норма: практически нерастворим в воде, этаноле, гексане, очень малорастворим в метаноле, малорастворим в хлороформе [31, 32].

Подлинность.

Для идентификации VMU-2012-05 предлагается использование двух независимых методов: ВЭЖХ и ИК-спектрометрии.

ИК-спектрометрия

Норма: Инфракрасный спектр испытуемого образца субстанции в области от 4000 до 400 см⁻¹ по положению и относительной интенсивности полос поглощения должен соответствовать ИК-спектру стандартного образца должен соответствовать ИК спектру стандартного образца, зарегистрированному в идентичных условиях VMU-2012-05.

ВЭЖХ.

Норма: время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания пика VMU-2012-05 на хроматограмме стандартного раствора.

Испытание проводят одновременно с количественным определением VMU-2012-05. Для проведения испытания готовят испытуемый и стандартный растворы СО VMU-2012-05. Регистрируют хроматограммы испытуемого раствора и раствора СО VMU-2012-05.

Температура плавления.

В соответствии с данными, предоставленными химиками-синтетиками (проф. А.А. Озеров), образец синтезированной субстанции плавится при температуре в диапазоне 227-229°C. На основании этих данных в проект предварительной спецификации включен показатель «Температура плавления».

Норма: от 227 до 229 °С.

Испытание проводят капиллярным методом в соответствии с ГФ РФ, ОФС.1.2.1.0011.18 «Температура плавления» [41, 42].

Родственные примеси.

Данное испытание контролирует продукты деструкции и технологические примеси, обусловленные технологией производства фармацевтической субстанции VMU-2012-05. Определение родственных примесей проводили методом ВЭЖХ с УФ-детектированием при 252 нм в условиях, приведенных в разделе «Количественное определение».

Норма: примесь А не более 0,5 %;

примесь В не более 0,3 %;

примесь С не более 0,2 %;

сумма примесей – не более 1,0 %.

Определение проводят методом ВЭЖХ одновременно с количественным определением в условиях, указанных в разделе «Количественное определение».

Сульфатная зола.

Норма: не более 0,1 % [39, 40].

Показатель характеризует содержание катионов металлов в субстанции в виде оксидов и сульфатов. Испытание проводят в соответствии с ГФ РФ ОФС.1.2.2.2.0014.15 «Сульфатная зола». Приведенная редакция нормы является компромиссной и указана на основании анализа численных значений норм по данному показателю, представленных в спецификациях фармацевтических субстанций, полученных синтетически.

Тяжелые металлы.

Источниками тяжелых металлов в субстанции VMU-2012-05 могут выступить сильные кислоты и основания, катализаторы, исходное сырье, реактивы, остатки фильтрующих материалов, конструкционные элементы аппаратуры, содержащие металлы. Для контроля содержания примесей тяжелых металлов, в проект предварительной спецификации включен соответствующий показатель.

Норма: не более 0,002 % [44, 45].

Численное значение нормы, указанное в проекте спецификации, рассчитано исходя из максимальной суточной дозой лекарственного препарата на основе субстанции VMU-2012-05 (не более 0,5 г/день) и длительностью его планируемого применения в клинической практике (более 30 дней).

Испытание проводят в соответствии с ГФ РФ, ОФС.1.2.2.2.0012.15 «Тяжелые металлы» с тиацетамидным реактивом (метод 2).

Потеря в массе при высушивании.

Норма: не более 0,5 %.

Испытание проводят согласно ГФ РФ, ОФС.1.2.1.0010.15 «Потеря в массе при высушивании». Навеску субстанции массой не менее 1,0 г сушат при температуре 50 °С и при остаточном давлении не более 10 мм рт.ст.

Остаточные органические растворители.

Согласно ОФС.1.1.0008.15 «Остаточные органические растворители» ГФ РФ: летучие растворители, которые используются или образуются на любой стадии производства фармацевтической субстанции и полностью не удаляются после завершения технологического процесса. Для контроля содержания

остаточных органических растворителей в проект предварительной спецификации на субстанцию «VMU-2012-05, субстанция-порошок» включен соответствующий показатель.

Норма: этанол – не более 0,5%;

этилацетат – не более 0,5%;

2-этоксиэтанол – не более 0,016%.

Нормируемые органические растворители указаны на основании данных, предоставленных химиками-синтетиками (проф. А.А. Озеров). Численные значения нормы (пределы) указаны на основании ОФС.1.1.0008.15 «Остаточные органические растворители» ГФ РФ.

Испытание проводят методом газовой хроматографии в соответствии с ГФ РФ, ОФС.1.1.0008.15 «Остаточные органические растворители». Содержание остаточных растворителей минимизируют с помощью контроля технологического процесса, обеспечивающего содержание остаточных растворителей систематически ниже уровня, влияющего на качество фармацевтической субстанции.

Микробиологическая чистота.

Уровень микробиологической чистоты субстанции обеспечивает уровень чистоты лекарственного препарата при его производстве/изготовлении из данной фармацевтической субстанции.

Норма: категория 2.2. [24, 43].

Определение проводят методом прямого посева в соответствии с ГФ РФ, ОФС.1.2.4.0002.18 «Микробиологическая чистота» для субстанций, предназначенных для производства нестерильных лекарственных препаратов – таблетки:

- общее число аэробных микроорганизмов – не более 10^3 КОЕ в 1 г;
- общее число дрожжевых и плесневых грибов – не более 10^2 КОЕ в 1 г;
- отсутствие *Escherichia coli* в 1 г.

Количественное определение.

Определение проводят методом ВЭЖХ одновременно с определением родственных примесей в субстанции. Содержание действующего вещества VMU-2012-05 дается в пересчете на сухое вещество.

Норма: от 98,0 % до 102,0 % C₂₀H₁₈N₂O₄ в пересчете на сухое вещество.

Упаковка.

Двухслойный прозрачный полиэтиленовый пакет, который помещают в черный полиэтиленовый пакет. Пакет помещают в полиэтиленовый барабан. На барабан наклеивают этикетку. Предлагаемый вид первичной упаковки обеспечивает стабильность фармацевтической субстанции «VMU-2012-05, субстанция-порошок» по всем показателям спецификации в течение заявленного срока годности при соблюдении заявленных условий хранения, что подтверждено результатами испытаний стабильности трех опытно-промышленных серий субстанции методом долгосрочных испытаний в соответствии с ГФ РФ, ОФС.1.1.0009.18 «Стабильность и сроки годности лекарственных средств».

Маркировка.

На этикетке на русском языке указывают торговое наименование субстанции, международное непатентованное наименование, массу брутто, массу нетто, номер реестровой записи, номер серии, дату производства, дату окончания срока годности, условия хранения, назначение, логотип, название и адрес производителя.

Хранение.

При температуре не выше 25° С в защищенном от света месте в плотно укупоренной упаковке (ГФ РФ, ОФС.1.1.0010.18 «Хранение лекарственных средств»).

Срок годности. 2 года.

Назначение. Для приготовления нестерильных лекарственных средств.

3.4 Результаты испытаний стабильности субстанции VMU-2012-05

Три опытно-промышленные серии фармацевтической субстанции выдержали испытания ускоренной и долгосрочной стабильности согласно программе стабильности. Результаты исследования ускоренной стабильности VMU-2012-05 (серия 010821) приведены в таблице 24.

Таблица 24 - Результаты исследования ускоренной стабильности АФС VMU-2012-05, температура (40 ± 2) °С, отн. влажность (75 ± 5) %

Продолжительность хранения, мес/дата испытаний	Описание	Растворимость	Подлинность		Температура плавления	Родственные примеси	Сульфатная зола/ Тяжелые металлы	Потеря в массе при высушивании	Остаточные органические растворители	Микробиологическая чистота	Количественное определение	Заключение о соответствии проекту НД
			ИК-спектр	ВЭЖХ								
	Кристаллический порошок от кремового до светло-коричневого цвета	Практически нерастворим в воде, этаноле, гексане, очень малорастворим в метаноле, малорастворим в хлороформе	ИК спектр субстанции, зарегистрированный 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	Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора, должно соответствовать времени удерживания пика VMU-2012-05 на хроматограмме стандартного раствора	От 227 до 229 °С	Примесь А, не более 0,5 % Примесь В не более 0,3 % Примесь С не более 0,2 % Сумма примесей – не более 1,0 %	Не более 0,1 %/ Не более 0,002 %	Не более 0,5 %	Этанол – не более 0,5% Этилацетат – не более 0,5% 2-Этоксипропанол – не более 0,016%	категория 2.2	От 98,0 % до 102,0 % C ₂₀ H ₁₈ N ₂ O ₄	Заключение о соответствии проекту НД
<i>Серия 010821</i>												
0/ 29.10. 21	Кристаллический порошок от кремового до светло-коричневого цвета	Соответствует	Соответствует	Соответствует	227,1 °С	Примесь А – не обнаружена Примесь В – не обнаружена Примесь С 0,03 % Единичная неидентифицированная примесь – 0,03 % Сумма примесей – 0,033 %	0,1 % Менее 0,002%	0,4%	Этанол – не обнаружен Этилацетат – не обнаружен 2-этоксипропанол – не обнаружен	категория 2.2	100,2 %	Соответствует

Продолжение таблицы 24

Продолжительность хранения, мес/дата испытаний	Описание	Растворимость	Подлинность		Температура плавления	Родственные примеси	Сульфатная зола/ Тяжелые металлы	Потеря в массе при высушивании	Остаточные органические растворители	Микробиологическая чистота	Количественное определение	
			ИК-спектр	ВЭЖХ								
3/ 31.01. 22	Кристаллический порошок от кремового до светло-коричневого цвета	н/п	н/п	Соответствует	н/п	Примесь А – не обнаружена Примесь В – не обнаружена Примесь С 0,08 % Единичная неидентифицированная примесь – 0,03 % Сумма примесей – 0,11 %	н/п	0,2%	н/п	н/п	100,3 %	Соответствует
	Кристаллический порошок от кремового до светло-коричневого цвета	Практически нерастворим в воде, этаноле, гексане, очень малорастворим в метаноле, малорастворим в хлороформе	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	Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора, должно соответствовать времени удерживания пика УМУ-2012-05 на хроматограмме стандартного раствора	От 227 до 229 °С	Примесь А, не более 0,5 % Примесь В не более 0,3 % Примесь С не более 0,2 % Сумма примесей – не более 1,0 %	Не более 0,1 %/ Не более 0,002 %	Не более 0,5 %	Этанол – не более 0,5% Этилацетат – не более 0,5% 2-Этоксипанол – не более 0,016%	категория 2.2	От 98,0 % до 102,0 % C ₂₀ H ₁₈ N ₂ O ₄	Заключение о соответствии проекту НД

Продолжение таблицы 24

Продолжительность хранения, мес./дата испытаний	Описание	Растворимость	Подлинность		Температура плавления	Родственные примеси	Сульфатная зола/ Тяжелые металлы	Потеря в массе при высушивании	Остаточные органические растворители	Микробиологическая чистота	Количественное определение		
			ИК-спектр	ВЭЖХ									
6/ 29.04. 22	Кристаллический порошок от кремового до светло-коричневого цвета	н/п	н/п	Соответствует	н/п	Примесь А – не обнаружена Примесь В – не обнаружена Примесь С – 0,08 % Единичная неидентифицированная примесь – 0,03 % Сумма примесей – 0,11 %	н/п	0,2%	н/п	н/п	100,3 %	Соответствует	
	Кристаллический порошок от кремового до светло-коричневого цвета	Практически нерастворим в воде, этаноле, гексане, очень малорастворим в метаноле, малорастворим в хлороформе	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	Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора, должно соответствовать времени удерживания пика УМУ-2012-05 на хроматограмме стандартного раствора	От 227 до 229 °С	Примесь А, не более 0,5 % Примесь В не более 0,3 % Примесь С не более 0,2 % Сумма примесей – не более 1,0 %	Не более 0,1 %/ Не более 0,002 %	Не более 0,5 %	Этанол – не более 0,5% Этилацетат – не более 0,5% 2-Этоксипропанол – не более 0,016%	категория 2.2	От 98,0 % до 102,0 % C ₂₀ H ₁₈ N ₂ O ₄	Заключение о соответствии проекту НД	

3.5 Механизм действия субстанции в отношении обратной транскриптазы ВИЧ-1

3.5.1 Результаты изучения ингибирующей активности VMU-2012-05 в отношении ОТ ВИЧ дикого типа и мутантных форм

В ходе первого этапа эксперимента была наработана обратная транскриптаза ВИЧ-1 дикого типа в количестве 1,4 мг (рисунок 27).

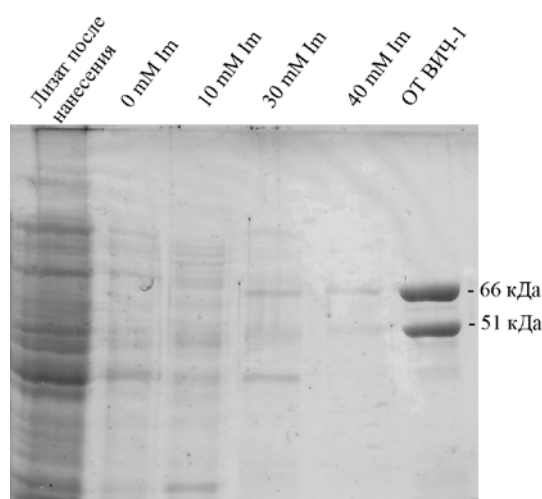


Рисунок 27 - Выделение гетеродимера ОТ ВИЧ дикого типа на Ni-NTA-агарозе

Установлена константа ингибирования ОТ ВИЧ дикого типа: $K_i = 0,23 \pm 0,04$ μM (таблица 25). Было показано, что субстанция VMU-2012-05 эффективно ингибирует ОТ ВИЧ дикого типа – ключевой фермент репликации вируса (рисунок 28).

Таблица 25 - Константы ингибирования ОТ ВИЧ дикого типа

Обратная транскриптаза	K _i , μM	
	VMU-2012-05	эфавиренз
Дикий тип	$0,23 \pm 0.04$	$0,011 \pm 0.002$

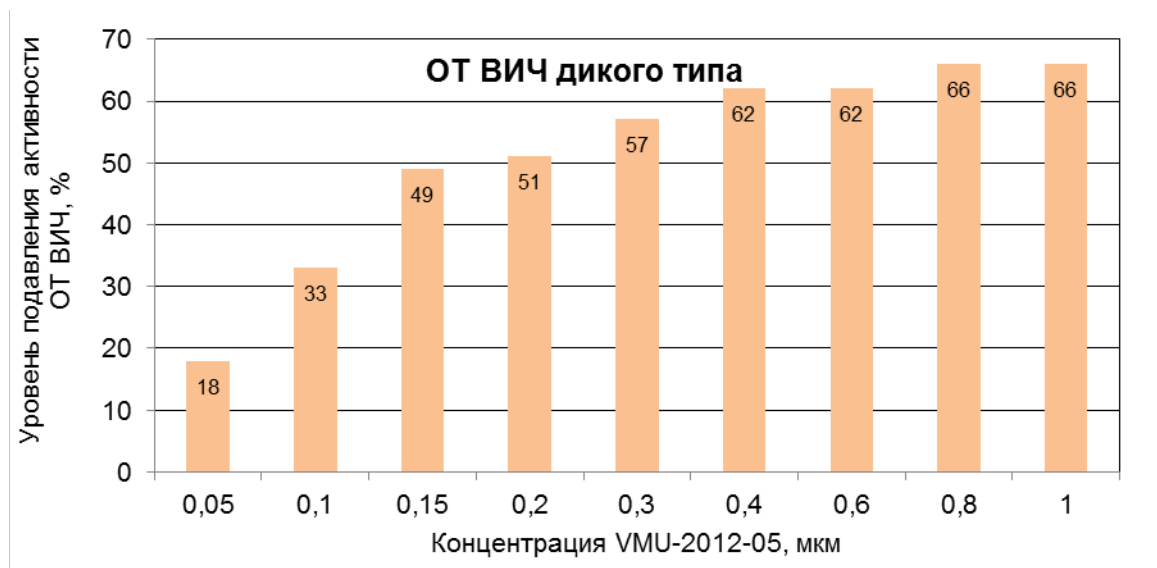


Рисунок 28 - Зависимость активности ОТ ВИЧ-1 дикого типа от концентрации VMU-2012-05

В качестве положительного контроля ингибитора ОТ ВИЧ-1 была использована субстанция препарата эфавиренз (рисунок 29).

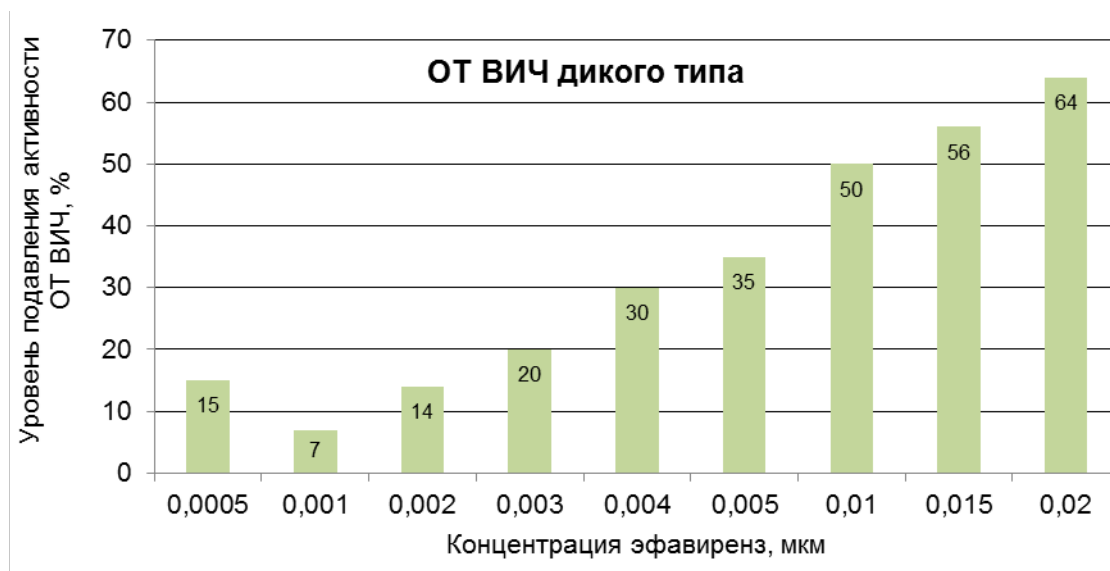


Рисунок 29 - Зависимость активности ОТ ВИЧ дикого типа от концентрации эфавиренза

Используемая выше система, основанная на активированной ДНК, позволяла измерять ДНК-зависимую ДНК-полимеразную активность ОТ ВИЧ-1. В то же время в инфицированной клетке данный фермент создает ДНК-копию своего генома, используя в качестве матрицы РНК. Наиболее распространенная система измерения РНК-зависимой ДНК-полимеразной активности ОТ основана

на поли(rA)-олиго(dT) праймер-матричном комплексе. Ее недостатком является тот факт, что в данный комплекс может включаться только dTMP, что не позволяет использовать данную систему для изучения других нуклеотидов. В случае ненуклеозидных ингибиторов данный недостаток не имеет значения.

Суммируя полученные результаты, получим, что пиримидиновое производное бензофенона (1- [2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил) эффективно ингибирует ОТ ВИЧ дикого типа – ключевой фермент репликации вируса.

3.5.2 Результаты изучения ингибирующей активности субстанции в отношении мутантных форм обратной транскриптазы ВИЧ-1

Полученная в ходе первого этапа эксперимента панель мутантных форм ОТ ВИЧ-1 (рисунок 30, таблица 26), была применена для определения ингибирующей активности 1- [2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила в отношении мутантных форм ОТ ВИЧ-1 [174].

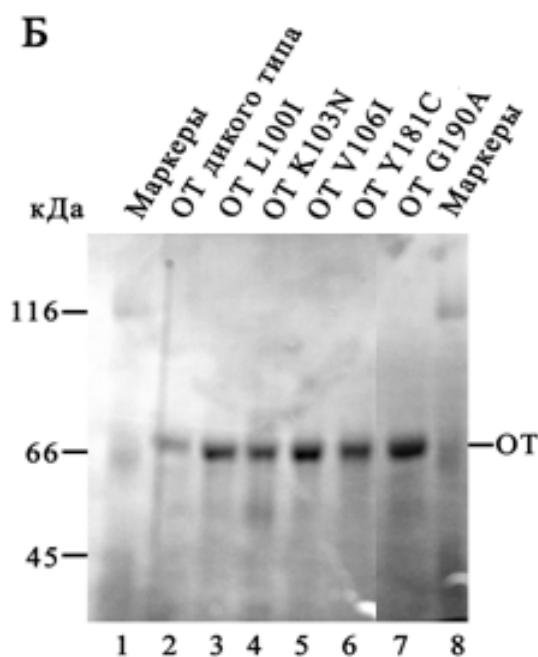


Рисунок 30 - Анализ чистоты препаратов гомодимеров мутантных форм ОТ ВИЧ гелевым электрофорезом с последующей окраской геля Кумасси

Таблица 26 - Характеризация ОТ ВИЧ дикого типа в виде гетеродимера и мутантных форм в виде гомодимеров [174]

Мутантные формы ОТ ВИЧ-1 /мутация/	Выход белка, мг/л культуры	Препарат, мг/мл	К _М (dATP), μМ	V _{max} , μМ/с*мг
Дикий тип (гетеродимер)	2,5	1,4	0,76	1,5
L100I	26	11,7	1,2	1,05
K103N	7	3	0,78	0,92
V106A	23	9,2	0,77	1,6
Y181C	12	8,7	0,84	1,3
G190A	7	5,2	0,83	1,36
K103N/Y181C	23	10,5	0,85	0,89

Показано, что исследуемое вещество ингибирует мутантные формы ОТ ВИЧ-1 L100I, K103N, V106A и двойной мутант 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). Установлена статистическая достоверность увеличения констант ингибирования в случае мутантных форм ОТ ВИЧ-1 по сравнению с константой ингибирования для ОТ дикого типа (таблица 27) [174].

Таблица 27 - Константы ингибирования ОТ ВИЧ дикого и мутантного штаммов

Обратная транскриптаза	K _i , μМ (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)*

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

Ингибирующая активность VMU-2012-05 в отношении мутантных форм Y181C и G190A ОТ ВИЧ-1 проиллюстрирована рисунками 31, 32, 33, 34.

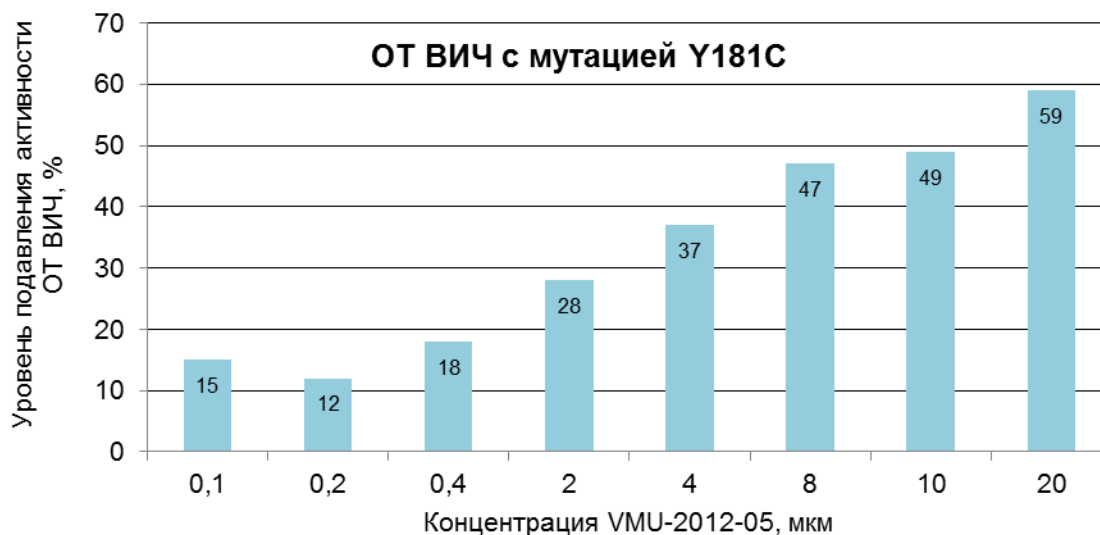


Рисунок 31 - Зависимость активности ОТ ВИЧ с мутацией Y181C от концентрации VMU-2012-05

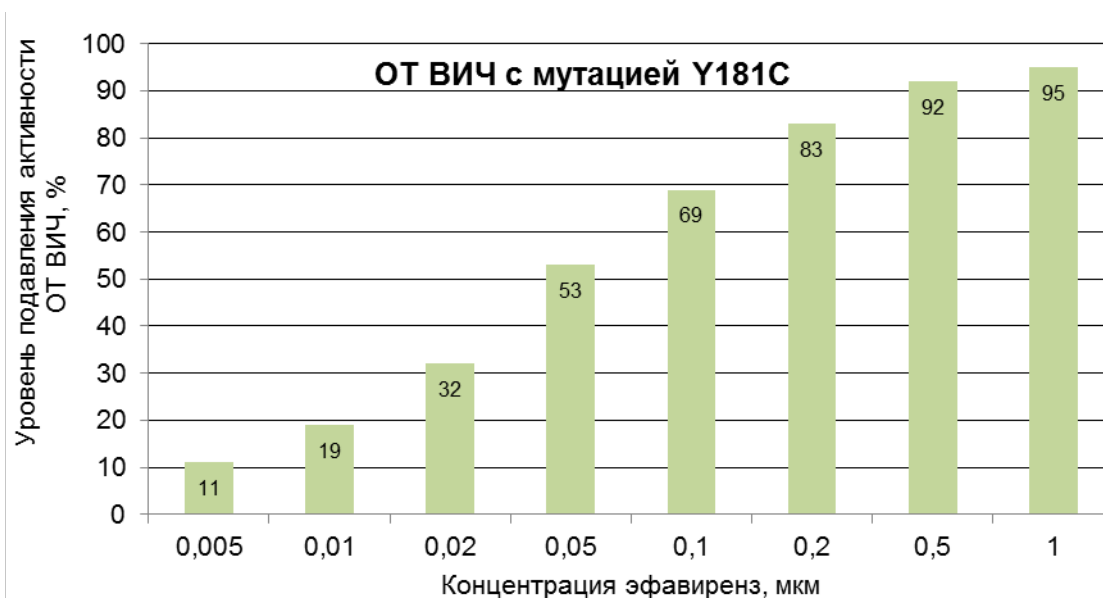


Рисунок 32 - Зависимость активности ОТ ВИЧ с мутацией Y181C от концентрации эфавиренза

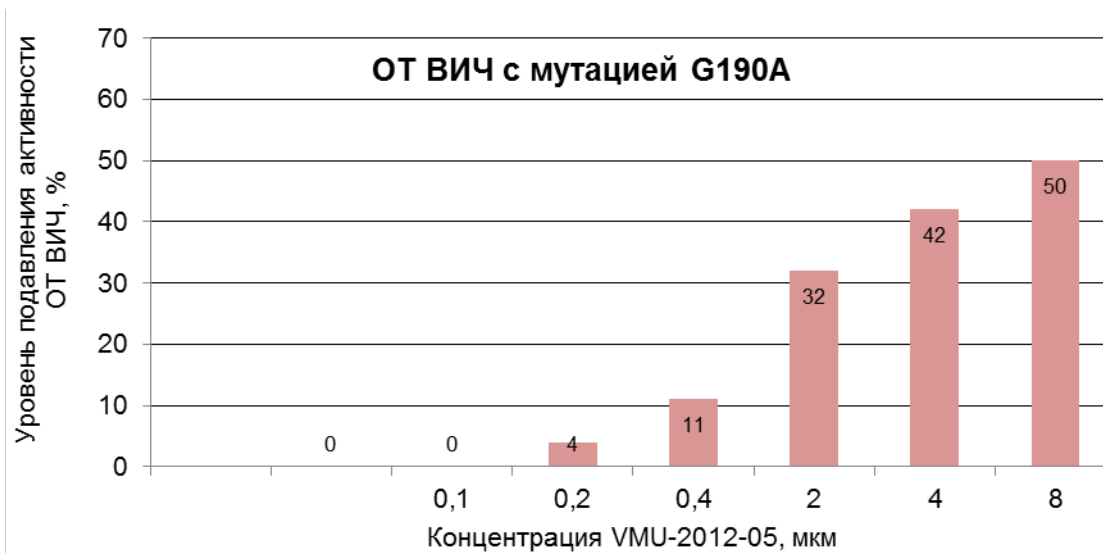


Рисунок 33 - Зависимость активности ОТ ВИЧ с мутацией G190A от концентрации VMU-2012-05

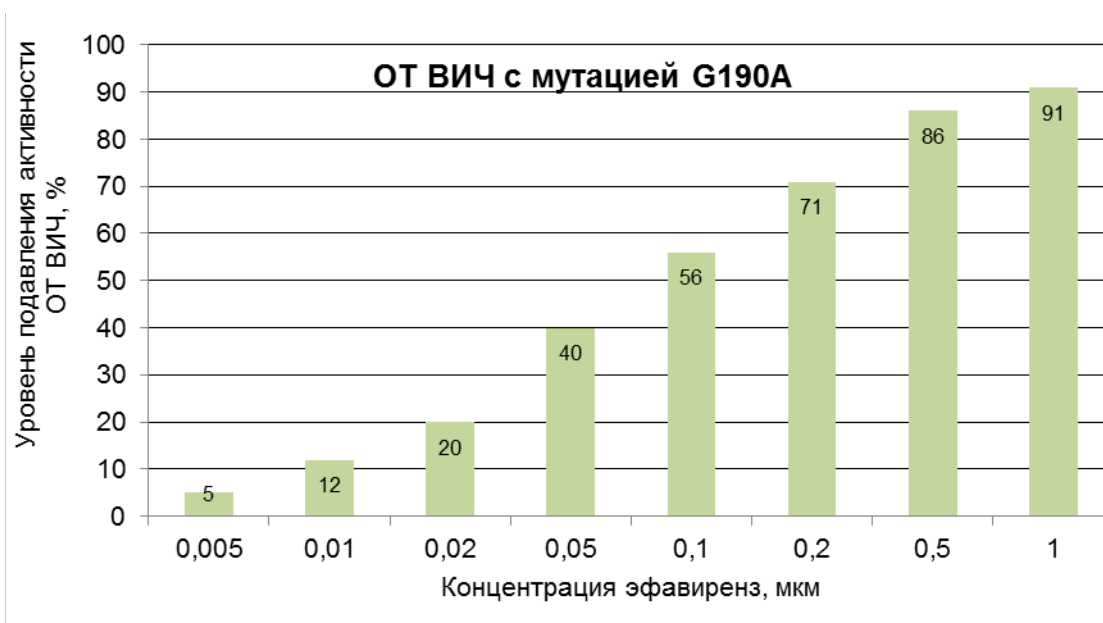


Рисунок 34 - Зависимость активности ОТ ВИЧ с мутацией G190A от концентрации эфавиренза

Таким образом, показано, 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. На ОТ ВИЧ-1 дикого типа константа ингибирования составила 0,23 μM . На ферменте с мутацией G190A константа ингибирования VMU-2012-05 составила 8,3 μM , на ферменте с

мутацией Y181C – 11,7 μ M, а на ферментах с мутациями L100I, K103N, V106A и двойном мутанте K103N/Y181C более 20 μ M.

Согласно полученным результатам, исследуемая субстанция является ингибитором ОТ ВИЧ, при этом по ингибирующей активности как в отношении фермента как дикого типа, так и в отношении его исследованных мутантных форм уступает эфавирензу [174].

3.6 Результаты изучения специфической фармакологической активности субстанции в отношении ВИЧ-1

3.6.1 Результаты исследования цитотоксичности субстанции

VMU-2012-05 методом МТТ-тест

Установлено, что цитотоксичность субстанции VMU-2012-05 в отношении первичных лимфоцитов крови составила менее 50% при концентрации около 400 мкг/мл как после 4, так и после 7 суток инкубирования (таблица 28). В результате исследований цитотоксичности субстанции методом МТТ-тест установлена 50% цитотоксическая концентрация (CC_{50}), которая для клеток МТ-4 превышает 100 мкг/мл.

Таблица 28 - Данные по исследованию цитотоксичности субстанции VMU-2012-05 в отношении мононуклеаров периферической крови, $M \pm SEM$

концентрация VMU-2012-05, мкг/мл	0,02	0,06	0,18	0,54	1,6	4,9	14,8	44,4	133	400
% живых клеток с препаратом, 4 сутки культивирования	100	100	100	100	100	100	100	100	100	51 \pm 10
% живых клеток с препаратом, 7 сутки культивирования	100	100	100	100	100	100	100	100	100	56 \pm 12

Цитотоксичность субстанции сравнения эфавиренз для мононуклеаров периферической крови начинала проявляться при концентрации 10 мкг/мл, значение CC_{50} (50% цитотоксическая концентрация) составило 10,7 мкг/мл (таблица 29).

Таблица 29 - Данные по исследованию токсичности субстанции эфавиренз в отношении мононуклеаров периферической крови, $M \pm SEM$

концентрация эфавиренса, мкг/мл	0,003	0,01	0,04	0,12	0,37	1,11	3,33	10	33,3	100
% живых клеток с препаратом, 4 сутки культивирования	100	100	100	100	100	100	100	100	90±6	45±11
% живых клеток с препаратом, 7 сутки культивирования	100	100	100	100	100	100	100	92±4	84±8	32±14

3.6.2 Результаты изучения антиретровирусной активности субстанции VMU-2012-05

Результаты изучения антиретровирусной активности субстанции калориметрическим тестом показали, что 50% ингибирующая концентрация (IC_{50}) в отношении дикого штамма ВИЧ-1 составляет 0,2 мкг/мл, подавление степени репродукции вирусного белка p24, оцененное методом ИФА, происходит при концентрации 1,1 мкг/мл, индекс селективности (IS) препарата (CC_{50} / IC_{50}) превышает 500. С учетом данных ИФА полное ингибирование репликации дикого штамма ВИЧ-1 субстанцией сравнения эфавиренз происходит при концентрации не менее 0,001 мкг/мл. Результат совпадает с данными, полученными при исследовании методом МТТ, где 100% подавление ВИЧ-1 происходит при концентрации 0,001 мкг/мл (таблица 30) [174].

Таблица 30 - Результаты изучения антиретровирусной активности субстанции VMU-2012-05 в отношении дикого штамма ВИЧ-1

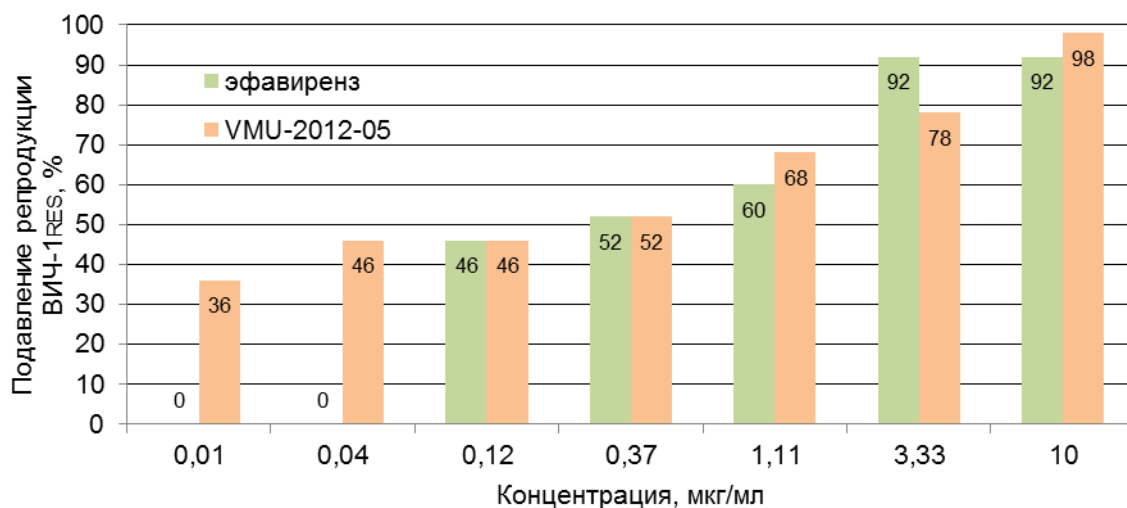
	CC_{50} , мкг/мл	IC_{50} , мкг/мл (метод МТТ)	IC_{50} , мкг/мл (метод ИФА)	Индекс селективности (CC_{50}/IC_{50})
VMU-2012-05	>100	0,2	1,1	>500
эфавиренз	10,7	0,001	0,001	10700
Примечание - CC_{50} - 50% цитотоксическая концентрация; IC_{50} - 50% ингибирующая концентрация.				

3.6.3 Результаты изучения противовирусной активности субстанции VMU-2012-05 в отношении штамма ВИЧ-1, резистентного к нуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы вируса

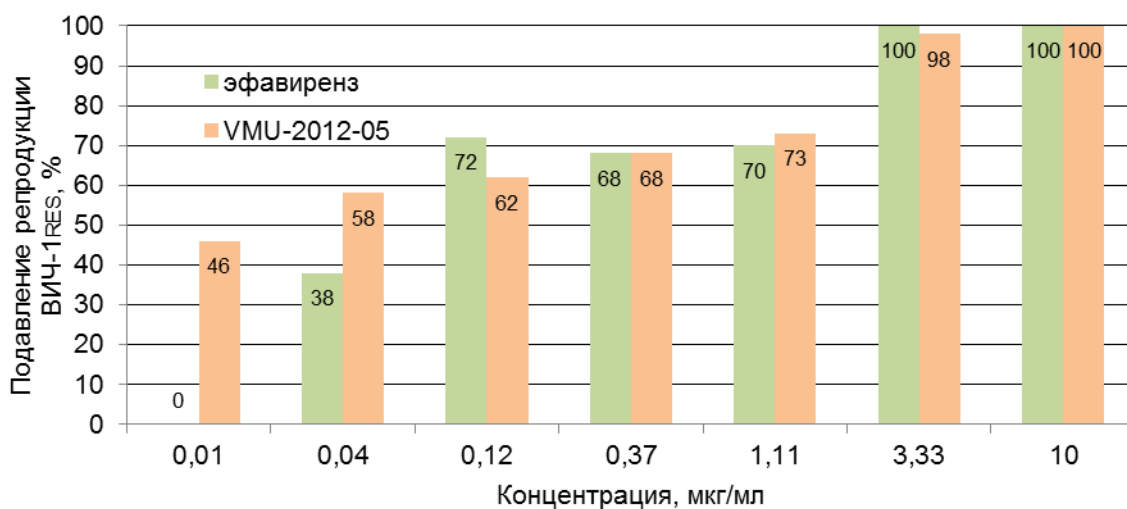
Исследование противовирусной активности субстанции VMU-2012-05 в отношении штамма ВИЧ-1, резистентного к ННИОТ вируса, выявило 50% ингибирование вируса при концентрации, превышающей 0,04 мкг/мл, для эфавиренза – выше 0,12 мкг/мл. При концентрации эфавиренза, превышающей 0,04 мкг/мл, на 7-е сутки начинало проявляться незначительное ингибирование репродукции ВИЧ-1, действие которого на 11 сутки культивирования уже не наблюдалось. Более существенное подавление репродукции ВИЧ-1_{RES}, достигающее 50%, регистрировалось при концентрации выше 0,12 мкг/мл на 4-е сутки. На 7-е сутки при всех исследованных концентрациях анти-ВИЧ действие 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} (рисунок 35).

При концентрации VMU-2012-05, превышающей 0,01 мкг/мл, происходит ингибирование репродукции ВИЧ-1, действие которого наблюдается и на 11-е сутки культивирования. Для субстанции VMU-2012-05 выявлено 50% ингибирование вируса при концентрации, превышающей 0,04 мкг/мл. При 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. Данные по исследованию антиретровирусной активности VMU-2012-05 и препарата эфавиренз в отношении резистентного штамма ВИЧ-1_{RES} представлены на рисунке 35. Субстанция VMU-2012-05 проявляет антиретровирусную активность, зависящую от концентраций, в отношении резистентного штамма ВИЧ-1_{RES}. сохраняется на протяжении всего периода культивирования (11 суток), в то время

Сутки культивирования 4



Сутки культивирования 7



Сутки культивирования 11

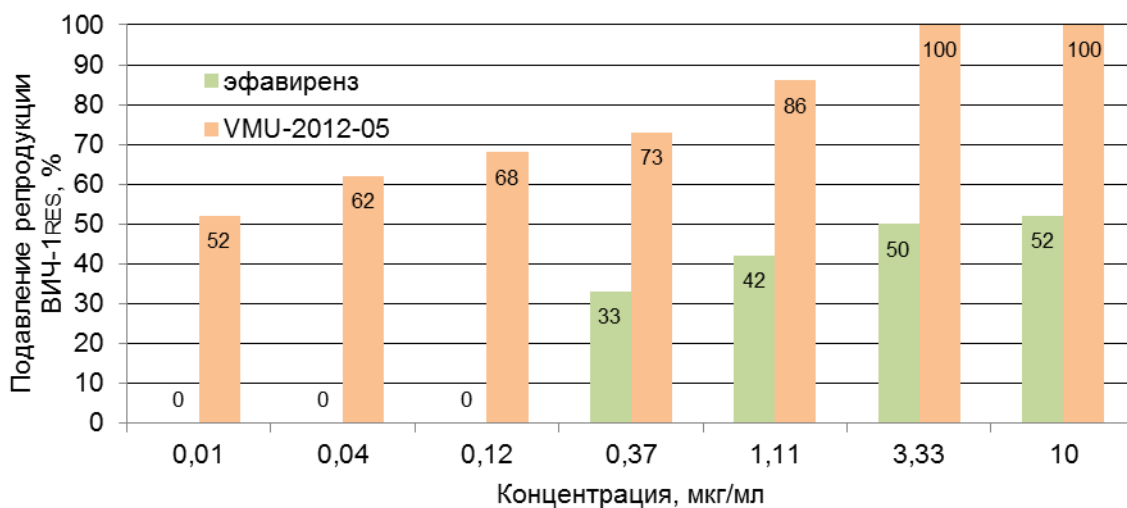


Рисунок 35 - Данные по исследованию антиретровирусной активности VMU-2012-05 и препарата эфавиренз в отношении резистентного штамма ВИЧ-1_{RES}

как препарат сравнения эфавиренз утрачивает свою активность к 11 суткам наблюдения.

Таким образом, исследуемая субстанция VMU-2012-05, в отличие от субстанции сравнения эфавиренз, способна полностью подавлять репродукцию ВИЧ-1_{RES}, резистентного к препаратам класса ННИОТ, и представляет интерес в качестве перспективного для разработки препарата прямого действия против ВИЧ-1, в том числе, против штаммов, резистентных к препарату эфавиренз. Принимая во внимание тот факт, что субстанция VMU-2012-05 обладает низкой цитотоксичностью и высокой противовирусной активностью в отношении «дикого» и резистентного штаммов ВИЧ-1, можно полагать, что разрабатываемый лекарственный кандидат будет обладать определенными преимуществами перед применяемыми в клинической практике препаратами класса ННИОТ.

3.7 Параметры токсичности субстанции и ЛС на ее основе при однократном и многократном введениях экспериментальным животным

3.7.1 Результаты изучения токсичности при однократном введении субстанции VMU-2012-05

В первой серии экспериментов гибель животных после поэтапного введения фармацевтической субстанции крысам в дозах 300 мг/кг и 2000 мг/кг не зарегистрирована. Данная методика, с использованием минимально возможного количества животных, позволила отнести исследуемое вещество к 5 классу токсичности по GHS. При исследовании препарата на мышах в дозе 2000 мг/кг гибель также не была зарегистрирована. Доза 2000 мг/кг может рассматриваться как максимально переносимая, так как при введении данной дозы гибели животных не наблюдали и не фиксировали выраженных признаков интоксикации как у крыс, так и у мышей. Таким образом, на основании полученных данных, тестируемая ФС была отнесена к 4 классу малотоксичных веществ по

классификации Hodge и Sterner (ЛД₅₀ 500-5000 мг/кг при однократном в/ж введении), к 3 классу умеренно токсичных веществ по ГОСТ 12.1.007–76 (ЛД₅₀ 151-5000 мг/кг при в/ж введении) и к 5 классу опасности по классификации GHS OECD (ЛД₅₀ в/ж > 2000 мг/кг) [261].

Клиническая картина интоксикации отсутствовала на протяжении 14 дней эксперимента. Все крысы, получившие ФС в дозах 300 мг/кг и 2000 мг/кг, и мыши, получившие ФС в дозе 2000 мг/кг, находились в удовлетворительном состоянии, каких-либо отклонений в общем состоянии и поведении зарегистрировано не было.

При клиническом осмотре внешний вид и поведение животных экспериментальных групп не отличались от показателей нормы. Ни у одного из животных, получивших ФС, не было отмечено изменений поведения в сторону угнетения или возбуждения. Отношение к другим животным было стандартным, без признаков агрессии. При взятии в руки у всех животных реакция оставалась стандартной. Все животные нормального телосложения, удовлетворительной упитанности. Тонус мускулатуры был умеренным. Шерсть у экспериментальных животных была опрятной, блестящей, без очагов облысения. Пальпируемые образования выявлены не были. Видимые слизистые оболочки бледной окраски, блестящие. Изменения цвета и нарушения целостности кожных покровов и слизистых оболочек не было отмечено ни у одного животного. Тургор кожи сохранен.

Нарушения целостности и патологических выделений из глаз не выявлено. Нос розовый, умеренно влажный, патологические выделения отсутствовали. Ротовая полость нормального цвета без патологических выделений. Нарушений слюноотделения не наблюдали. Уши бледно-розовые, обычной температуры, нагноений, воспаления, загрязнений ни у кого отмечено не было. Зубы у всех сохранены.

При осмотре на открытой площадке у всех животных двигательная активность была нормальной. Нарушений походки и координации движений не наблюдалось. Положение в пространстве у всех физиологическое.

Дыхание было нормальным у всех животных. Патологических выделений при дефекации и мочеиспускании отмечено не было.

Таким образом, результаты клинических осмотров на протяжении 14 дней эксперимента показали отсутствие каких-либо патологических изменений у животных, получивших однократно ФС.

Данные о влиянии ФС на динамику массы тела самок крыс и самок мышей представлены в таблицах 31 и 32.

Данные соответствовали закону нормального распределения. Масса всех животных до начала эксперимента не различалась между группами. Дисперсионный анализ (ANOVA) выявил влияние фактора «повторность измерений» ($p < 0,05$) на массу тела крыс. Проведение последующего межгруппового сравнения с использованием критерия Тьюки выявило статистически значимое снижение массы тела крыс, получивших субстанцию в дозе 2000 мг/кг, на 15-й день, по сравнению с исходной массой (таблица 31).

Таблица 31 - Влияние ФС на массу тела самок крыс, $M \pm SEM$, г, $n=6$

Группы	Доза, мг/кг	День эксперимента			
		1-й день	2-й день	7-й день	15-й день
1-2	300	271,8 \pm 1,82	272,8 \pm 3,17	277,2 \pm 2,96	270,0 \pm 2,92
3-4	2000	275,2 \pm 2,15	275,8 \pm 4,08	269,5 \pm 5,65	263,7 \pm 7,62*

* Статистически значимое отличие от исходной массы в соответствующей группе, тест Тьюки, $p < 0,05$.

Данные соответствовали закону нормального распределения. Дисперсионный анализ (ANOVA) не выявил влияния факторов «группа» и «повторность измерений» на массу тела самок мышей ($p > 0,05$), (таблица 32).

Таблица 32 - Влияние ФС на массу тела самок мышей, $M \pm SEM$, г, $n=5$

Группы	Доза, мг/кг	День эксперимента			
		1-й день	2-й день	7-й день	15-й день
Контроль	0	30,4±0,75	30,2±0,49	29,6±0,51	31,0±0,5
ФС	2000	29,6±0,24	29,2±0,37	28,6±0,24	29,4±0,40*

Таким образом, однократное внутрижелудочное введение ФС оказало влияние на динамику массы тела самок аутбредных крыс. В течение периода наблюдения отмечена тенденция к снижению массы тела по сравнению с исходной, которая достигла статистической значимости на 15-й день. У мышей статистически значимого влияния ФС на массу тела выявлено не было.

При тестировании на 14-й день в установке «Открытое поле» животные после однократного введения ФС демонстрировали преимущественно уравновешенный тип поведения, с умеренной локомоторной и поисковой активностью без проявления признаков тревожности. Отличий в поведении самок крыс и мышей в тесте «Открытое поле» не выявлено. Таким образом, однократное внутрижелудочное введение тестируемого объекта крысам и мышам не оказало отсроченного влияния на индивидуальное поведение экспериментальных животных.

Результаты патоморфологического исследования крыс при плановой некропии показали, что тестируемый препарат в исследованных дозах оказывает местно-раздражающее действие в месте введения. Так же у двух самок крыс паренхима печени была желто-коричневого цвета, дряблой консистенции, что характерно для дистрофических изменений (рисунок 36, таблица 33). В остальных исследованных органах крыс макроскопически видимых изменений не обнаружено.



Рисунок 36 – Эвисцерированная печень самки крысы, получавшей субстанцию VMU-2012-05 в дозе 2000 мг/кг. Паренхима органа дряблая, желтокоричневого цвета, дистрофические изменения

Таблица 33 - Патоморфологические изменения, обнаруженные при плановой некропии крыс

Органы	Обнаруженные изменения	Доза ФС	
		300 мг/кг	2000 мг/кг
	n	6	6
Печень	Дистрофические изменения	-	2
Примечание - «n» – общее количество животных в группе, подвергнутых патоморфологическому исследованию; «-» – отсутствие изменений.			

При плановой некропии мышей на 15-й день исследования макроскопически патологических изменений не было обнаружено во всех исследованных органах.

Влияния тестируемого препарата при однократном внутрижелудочном введении на массовые коэффициенты органов мышей и крыс не установлено.

Местно-раздражающее действие, оцененное путем регистрации и анализа патоморфологических изменений тканей и органов, определяемых в месте контакта исследуемых препаратов с тканями *in vivo*, было установлено для тестируемой субстанции в исследованных дозах у одного вида животных - крыс.

У самки крысы №1.1, получавшей ФС в дозе 300 мг/кг, слизистая оболочка тонкой кишки была гиперемированной, отёчной, содержимое было представлено слизью, что характерно для катарального энтерита (рисунок 37).



Рисунок 37 - Вскрытая брюшная полость: стрелкой указаны петли тонкой кишки, заполненные слизью. Катаральный энтерит. Самка крысы №1.1

У самки крысы №2.2, получавшей ФС в дозе 300 мг/кг, в месте введения (желудок) обнаружены изменения: слущивание эпителия, отёк слизистой оболочки желудка, а также эрозивно-язвенные поражения, что характерно для катарального гастрита (рисунок 38). У самок крыс №2.1 и 2.2, получавших ФС в дозе 300 мг/кг, слизистая оболочка тонкой кишки была гиперемированной, отёчной, содержимое было представлено слизью, что характерно для катарального энтерита (рисунок 39).

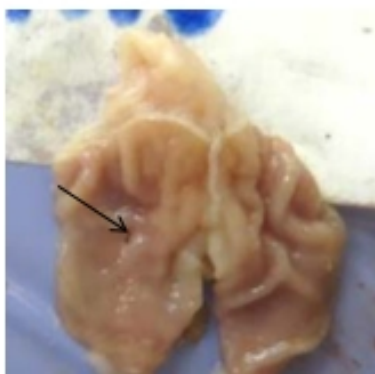


Рисунок 38 - Вскрытый желудок (место введения): стрелкой указано эрозивно-язвенное поражение. Катаральный гастрит. Самка крысы №2.2

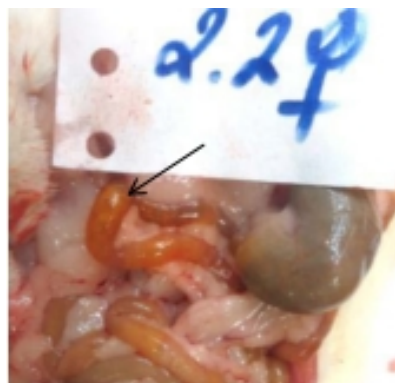


Рисунок 39 - Вскрытая брюшная полость: стрелкой указаны петли тонкой кишки, заполненные слизью. Катаральный энтерит. Самка крысы №2.2

У самок крыс №3.1, 3.2, 3.3, получавших ФС в дозе 2000 мг/кг, в месте введения (желудок) обнаружены изменения: слущивание эпителия и отёк слизистой оболочки желудка, а также эрозивно-язвенные поражения, что характерно для катарального гастрита (рисунок 40). У самки крысы №3.2 слизистая оболочка тонкой кишки была гиперемированной, отёчной, содержимое было представлено слизью, что характерно для катарального энтерита (рисунок 41).

У самок крыс №4.1, 4.2, 4.3, получавшей ФС в дозе 300 мг/кг, в месте введения (желудок) обнаружены изменения: слущивание эпителия и отёк слизистой оболочки желудка, что характерно для катарального гастрита (рисунок 42). У самок крыс №4.2, 4.3 слизистая оболочка тонкой кишки была гиперемированной, отёчной, содержимое было представлено слизью, что характерно для катарального энтерита (рисунок 43).

Таким образом, в месте введения у крыс, получивших исследуемую субстанцию в дозе 300 мг/кг, у одного животного был обнаружен катаральный гастрит, в дозе 2000 мг/кг – данный патологический признак наблюдался у всех животных. Также, вне зависимости от дозы, у половины крыс был обнаружен катаральный энтерит (таблица 34).

Тестируемый объект оказал местно-раздражающее действие на органы ЖКТ у крыс при внутрижелудочном пути введения.

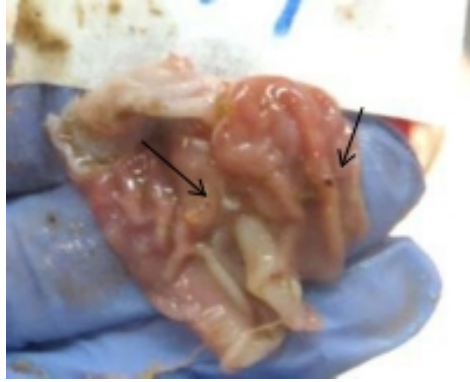


Рисунок 40 - Вскрытый желудок (место введения): слущивание эпителия, отек слизистой оболочки. Стрелкой указаны эрозивно-язвенные поражения. Катаральный гастрит. Самка крысы №3.1

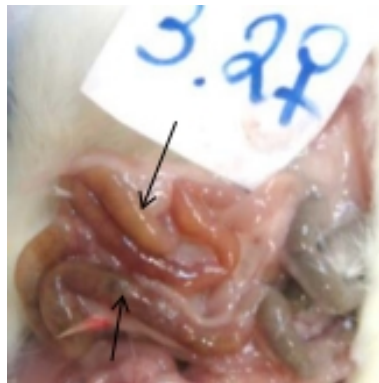


Рисунок 41 - Вскрытая брюшная полость: стрелками указаны петли тонкой кишки, заполненные слизью. Катаральный энтерит. Самка крысы №3.2



Рисунок 42 - Вскрытый желудок (место введения): слущивание эпителия, отек слизистой оболочки. Катаральный гастрит. Самка крысы №4.1

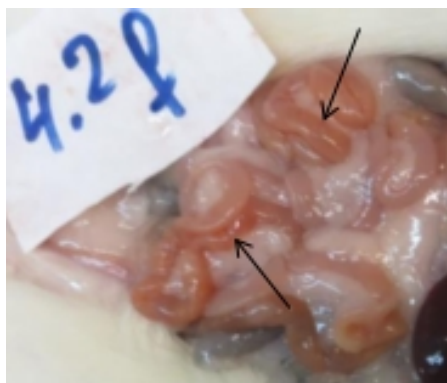


Рисунок 43 - Вскрытая брюшная полость: стрелками указаны петли тонкой кишки, заполненные слизью. Катаральный энтерит. Самка крысы №4.2

Таблица 34 - Патоморфологические изменения в месте введения, обнаруженные при плановой некропсии крыс

Органы	Обнаруженные изменения	Доза ФС	
		Группа 1-2 300 мг/кг	Группа 3-4 2000 мг/кг
		п	п
Желудок	Катаральный гастрит	1	6
Тонкая кишка	Катаральный энтерит	3	3
Примечание - «п» – общее количество животных в группе, подвергнутых патоморфологическому исследованию.			

Основными органами-мишенями токсического действия препарата, выявленными при изучении острой токсичности на крысах, является печень и органы ЖКТ.

3.7.2 Результаты изучения токсичности при однократном введении ЛС на основе субстанции VMU-2012-05

При введении препарата в дозе 2000 мг/кг гибели животных не зарегистрировано. На начало эксперимента масса тела самок мышей составляла 19-21 г, самцов - 21-23 г, в течение 14-ти дней после введения отмечалась положительная динамика массы тела как в группе контроля, так и в группах самцов и самок, получивших VMU-2012-05. У всех животных после введения

последней порции, как тестируемого объекта, так и плацебо наблюдали диарею. Спустя 5 часов состояние животных нормализовалось и далее на протяжении 14 дней наблюдения каких-либо отклонений от нормы не фиксировали. Местно-раздражающего действия также не зафиксировали, таким образом, подобранный состав готового лекарственного средства позволил нивелировать негативное воздействие фармацевтической субстанции VMU-2012-05 на слизистую оболочку желудка и кишечника (рисунки 44 и 45) [261].



Рисунок 44 – Вскрытый желудок (место введения) самки мыши, получавшей плацебо: макроскопически видимые изменения отсутствуют



Рисунок 45 – Вскрытый желудок (место введения) самки мыши, получавшей ЛС на основе VMU-2012-05 в дозе 2000 мг/кг: макроскопически видимые изменения отсутствуют

Доза 2000 мг/кг может рассматриваться как максимально переносимая, так как при введении данной дозы гибели животных и /или выраженных признаков интоксикации не наблюдали [261].

3.7.3 Результаты изучения токсичности при многократном введении ЛС VMU-2012-05 на основе субстанции

Влияние на общее состояние, результаты функциональных тестов

На протяжении всего эксперимента зарегистрировано три случая гибели самцов крыс. Один случай в группе, получавшей тестируемый препарат в дозе 45 мг/кг (51-й день эксперимента), и два - в дозе 90 мг/кг (на 36-й и 48-й дни). За 3-4 дня до гибели у этих животных отмечали угнетение поведения, взъерошенность шерсти, за день до гибели к наблюдаемым изменениям добавилась одышка и снижение тонуса мускулатуры. У погибших животных выявлены отек и геморрагическое пропитывание ткани легких, отек и умеренное полнокровие сосудов головного мозга, на основании чего признано, что непосредственной причиной смерти животных стала острая сердечная недостаточность. Общее состояние и поведенческие реакции остальных животных, получавших препарат, как в период введения, так и в период отсроченного наблюдения не отличались от показателей контрольной группы. Отсутствие влияния препарата на общее состояние животных подтвердилось и при проведении теста «Открытое поле»: изменений в индивидуальном поведении животных, получавших препарат, по сравнению с группой контроля, отмечено не было. У кроликов также никаких отклонений от нормы по результатам клинических осмотров и наблюдений за весь эксперимент не отмечено [261].

Масса тела крыс на начало эксперимента составляла 190-200 г (самцы) и 178-185 г (самки), масса тела кроликов 2800-3200 г (самцы) и 2300-2600 г (самки). Некоторое замедление положительной динамики массы тела к окончанию периода введения наблюдалось только у самцов крыс, получавших препарат в максимальной исследованной дозе. К 91-му дню масса тела животных этой группы была статистически значимо снижена по сравнению с группой контроля, при этом снижение составляло не более 10% от показателей контроля (таблица

35). У самок крыс, также, как и у кроликов, за весь период эксперимента влияния препарата на динамику массы тела не выявлено (таблицы 36 и 37) [261].

Таблица 35 - Влияние VMU-2012-05 на массу тела самцов крыс в период 90-дневного введения препарата, $M \pm SEM$, г [261].

День исследования	Контроль	VMU-2012-05		
		9 мг/кг	45 мг/кг	90 мг/кг
1-й	193,3±3,05 n=16	193,3±3,35 n=16	193,3±3,23 n=16	193,2±3,91 n=16
7-й	222,3±3,38* n=16	223,6±3,77* n=16	220,3±4,56* n=16	211,8±4,95 n=16
14-й	256,1±4,15* n=16	251,6±3,59* n=16	248,3±4,08* n=16	243,1±4,49* n=16
21-й	286,0±4,91* n=16	275,9±3,62* n=16	271,9±3,77* n=16	267,8±4,33* n=16
28-й	320,6±5,65* n=16	303,0±4,44* n=16	306,7±5,05* n=16	305,7±4,71* n=16
35-й	302,1±4,59* n=16	286,7±5,73* n=16	284,2±5,45* n=16	281,6±4,27* n=16
42-й	337,1±6,99* n=16	316,1±6,58* n=16	309,3±5,63* n=16	310,9±5,48* n=15
49-й	373,2±9,09* n=16	348,2±7,04* n=16	343,3±6,95* n=16	344,1±6,10* n=14
56-й	372,7±8,61* n=16	345,7±7,07* n=16	339,2±6,81* n=15	344,6±6,25* n=14
63-й	380,3±9,03* n=16	351,2±6,90* n=16	346,3±7,63* n=15	355,4±6,88* n=14
70-й	392,6±9,78* n=16	361,1±7,13* n=16	355,9±8,52* n=15	359,0±6,97* n=14
77-й	401,9±9,85* n=16	369,6±7,06* n=16	366,5±8,50* n=15	374,3±7,15* n=14
84-й	407,8±10,22* n=16	374,6±6,77* n=16	369,9±8,26* n=15	379,3±6,61* n=14
91-й	425,6±11,44* n=16	389,6±7,28* n=16	383,7±9,77*# n=15	385,5±6,89*# n=14

* $p < 0,05$, различия статистически значимы по сравнению с исходным уровнем в соответствующей группе, критерий Тьюки; #- $p < 0,05$, различия статистически значимы по сравнению с контрольной группой, критерий Тьюки.

Таблица 36 - Влияние VMU-2012-05 на массу тела самок крыс в период 90-дневного введения препарата, $M \pm SEM$, $n=16$, г [261].

День исследования	Контроль	VMU-2012-05		
		9 мг/кг	45 мг/кг	90 мг/кг
1-й	180,4±1,93	180,7±1,78	180,2±2,16	180,8±2,25
7-й	188,8±3,09	191,1±1,91	192,3±2,83	194,6±2,45
14-й	199,7±3,64*	202,3±2,64*	200,4±2,99*	203,0±2,96*
21-й	207,1±3,76*	213,7±3,51*	212,1±3,24*	221,0±5,06*
28-й	231,4±4,30*	236,3±2,84*	234,6±3,65*	225,3±6,76*
35-й	219,6±4,12*	224,2±2,98*	225,2±3,73*	222,5±4,22*
42-й	225,9±4,64*	232,9±3,46*	230,3±3,49*	233,6±4,94*
49-й	241,3±5,53*	245,4±4,07*	248,1±4,68*	245,9±4,78*
56-й	235,9±5,00*	245,8±5,00*	247,4±4,27*	239,6±5,25*
63-й	233,1±5,04*	242,6±5,21*	243,3±4,29*	236,6±4,88*
70-й	238,7±5,17*	243,9±4,75*	248,5±4,14*	242,3±4,82*
77-й	242,6±5,56*	250,1±5,02*	255,9±4,92*	246,7±4,85*
84-й	241,3±5,89*	253,1±5,86*	254,5±4,90*	244,6±4,94*
91-й	257,1±6,26*	265,8±5,92*	269,6±5,39*	257,2±4,50*

* $p < 0,05$, различия статистически значимы по сравнению с исходным уровнем в соответствующей группе, критерий Тьюки.

Таблица 37 - Влияние VMU-2012-05 на массу тела самцов и самок кроликов в период 28-ми дневного введения препаратов, $M \pm SEM$, $n=8$, г [261].

День исследования	Пол	Контроль	VMU-2012-05		
			4 мг/кг	20 мг/кг	40 мг/кг
1-й	самцы	3120,6±50,54	2886,3±128,79	2843,8±93,84	2895,0±112,83
	самки	2443,1±50,87	2591,3±89,16	2516,9±56,50	2540,6±47,70
7-й	самцы	3248,8±59,83*	2982,5±136,27	2990,6±85,48*	2966,9±112,12
	самки	2495,6±51,05	2678,1±94,76	2568,8±51,27	2620,0±49,78
14-й	самцы	3268,8±52,46*	3073,1±129,90*	3088,1±105,08*	3078,8±110,82*
	самки	2524,4±48,93	2737,5±90,28*	2591,3±61,17	2677,5±49,31*
21-й	самцы	3324,4±51,98*	3122,5±132,78*	3144,4±104,69*	3148,8±107,20*
	самки	2657,5±35,98*	2767,5±90,48*	2626,3±57,65*	2708,1±48,91*
29-й	самцы	3383,1±61,68*	3311,3±141,92*	3281,3±121,92*	3277,5±102,93*
	самки	2891,9±43,31*	2917,5±91,68*	2830,0±54,18*	2817,5±54,62*

* $p < 0,05$, различия статистически значимы по сравнению с исходным уровнем в соответствующей группе, критерий Тьюки.

При оценке индивидуального поведения крыс в тесте «Открытое поле» влияния тестируемого препарата на оцениваемые показатели не обнаружено ни на 30-й, 90-й (таблицы 38 и 39), ни на 120-й дни эксперимента.

В ходе эксперимента было проведена оценка функционального состояния сердечно-сосудистой системы по данным ЭКГ. Ни у крыс, ни у кроликов, получавших препарат, изменений параметров ЭКГ по сравнению с контрольной группой не выявлено (таблицы 40, 41, 42) [261].

Таблица 38 - Локомоторная активность крыс в тесте «Открытое поле» на 30-й и 90-й дни многократного внутрижелудочного введения VMU-2012-05, $M \pm SEM$, $n=16$ [261]

Группы	Доза, мг/кг	Количество посещенных квадратов		Количество пристеночных стоек	
		30-й день	90-й день	30-й день	90-й день
Контроль	0	27,5±1,54	27,6±2,87	12,8±0,78	9,9±1,16
VMU-2012-05	9	28,1±1,53	29,8±3,19	14,0±0,97	10,4±1,23
	45	26,8±1,16	28,6±2,24	13,1±1,05	10,9±1,50
	90	24,1±1,49	27,5±2,48 ^{\$}	11,8±0,91	11,0±1,14 ^{\$}
Примечание - \$- количество животных в группе $n=15$					

Таблица 39 - Активность крыс в тесте «Открытое поле» на 30-й и 90-й дни многократного внутрижелудочного введения VMU-2012-05, Me (Q1;Q3) [261]

день	Группы	Доза, мг/кг	n	Кол-во центровых посещений	Кол-во свободных стоек	Кол-во груминга	Кол-во уринаций	Кол-во дефекаций
30-й	Контроль	0	16	0,5 (0,0;2,0)	0,0 (0,0;1,0)	0,5 (0,0;1,5)	0,0 (0,0;1,0)	0,5 (0,0;1,0)
	VMU-2012-05	9	16	0,5 (0,0;2,0)	0,0 (0,0;1,0)	0,0 (0,0;1,5)	0,0 (0,0;1,0)	1,0 (0,0;1,0)
		45	16	1,0 (0,0;1,5)	0,0 (0,0;1,0)	0,0 (0,0;1,5)	0,0 (0,0;1,0)	0,0 (0,0;2,0)
		90	16	0,5 (0,0;1,5)	0,0 (0,0;0,0)	1,0 (0,0;2,5)	0,0 (0,0;0,5)	1,0 (0,0;2,0)

Продолжение таблицы 39

день	Группы	Доза, мг/кг	n	Кол-во центровых посещений	Кол-во свободных стоек	Кол-во груминга	Кол-во уринаций	Кол-во дефекаций
90-й	Контроль	0	16	0,5 (0,0;1,0)	1,0 (1,0;4,5)	1,5 (0,5;3,5)	0,5 (0,0;3,0)	0,0 (0,0;1,0)
	VMU-2012-05	9	16	1,0 (0,0;2,5)	1,0 (0,0;3,5)	1,0 (0,0;2,5)	2,0 (0,0;3,5)	0,0 (0,0;0,0)
		45	16	0,5 (0,0;1,0)	1,0 (0,5;3,0)	0,0 (0,0;2,5)	1,0 (0,0;6,5)	0,0 (0,0;0,0)
		90	15	0,0 (0,0;1,0)	1,0 (0,0;3,0)	1,0 (0,0;1,0)	2,0 (0,0;2,0)	0,0 (0,0;0,0)

Таблица 40 - Влияние VMU-2012-05 на показатели работы сердца крыс на 29-й день эксперимента, $M \pm SEM$, $n=8$ [261]

Группы	Доза мг/кг	Пол	Показатели					
			ЧСС уд/мин	RR, мсек	P, мсек	PQ, мсек	QRS, мсек	QT, мсек
Контроль	0	Самцы	254,9±9,2	237,1±8,7	45,8±2,7	57,0±2,4	63,0±2,5	136,8±6,6
		Самки	234,4±14,1	263,8±18,6	42,3±0,9	57,3±3,5	65,1±2,9	131,0±8,2
VMU-2012-05	9	Самцы	280,3±6,2	214,9±4,8	41,9±0,4	53,9±2,2	69,5±2,4	142,9±9,9
		Самки	264,8±13,4	219,6±10,7	37,6±1,9	49,0±1,4	75,1±2,9	149,0±8,5
	45	Самцы	280,3±15,9	215,1±11,3	39,9±0,8	50,4±2,6	63,4±2,2	146,0±11,0
		Самки	235,5±5,1	255,5±5,5	42,3±0,7	53,4±1,9	67,1±4,1	125,8±3,1
	90	Самцы	242,4±11,1	242,3±15,2	45,0±4,4	57,8±4,5	63,8±1,5	128,1±4,9
		Самки	248,5±8,4	243,6±8,3	42,4±1,5	50,6±1,5	64,0±1,4	152,6±8,9

Таблица 41 - Влияние VMU-2012-05 на показатели работы сердца крыс на 89-й день эксперимента, $M \pm SEM$ [261]

Группы	Доза, мг/кг	Пол	n	Показатели					
				ЧСС уд/мин	RR, мсек	P, мсек	PQ, мсек	QRS, мсек	QT, мсек
Контроль	0	Самцы	8	278,3±5,1	215,3±3,4	41,8±0,8	53,1±2,1	62,1±6,5	139,9±9,9
		Самки	8	304,8±7,9	198,1±4,9	47,3±2,6	56,0±2,4	65,4±2,9	154,4±9,3
VMU-2012-05	9	Самцы	8	294,8±5,8	204,3±3,8	42,0±1,0	52,1±2,5	64,5±3,0	139,4±6,7
		Самки	8	306,5±5,7	196,3±3,6	43,9±1,9	51,5±2,6	73,5±4,6	146,0±7,6
	45	Самцы	8	297,8±5,9	202,1±4,3	39,0±2,0	52,3±1,2	58,4±3,3	134,4±10,2
		Самки	8	298,8±10,6	202,5±6,3	40,8±0,9	50,1±0,7	67,4±4,1	150,5±9,9
	90	Самцы	7	284,6±14,2	215,0±13,3	48,6±4,2	57,3±2,9	63,0±4,1	136,4±7,4
		Самки	8	296,1±6,7	203,4±4,5	49,0±5,2	59,9±5,1	71,8±4,4	133,8±7,7

Таблица 42 - Влияние VMU-2012-05 на показатели работы сердца кроликов обоих полов на 26-й день эксперимента, $M \pm SEM$, n=4 [261]

Группы	Доза мг/кг	Пол	Показатели					
			ЧСС уд/мин	RR, мсек	P, мсек	PQ, мсек	QRS, мсек	QT, мсек
Контроль	0	Самцы	274,8±21,3	222,3±16,2	45,5±4,8	71,3±6,2	142,5±4,1	170,8±11,1
		Самки	187,5±10,5	322,5±18,7	59,0±6,4	77,0±2,5	158,8±2,0	156,8±8,1
VMU-2012-05	4	Самцы	300,0±9,3	200,8±5,9	55,8±7,7	70,3±7,5	139,0±7,7	163,3±11,0
		Самки	208,8±6,1	288,5±8,7	51,5±2,5	82,0±4,7	146,0±12,2	192,3±14,4
	20	Самцы	251,3±24,9	246,3±25,2	46,5±10,1	70,8±6,2	168,8±20,4	229,5±27,6
		Самки	200,3±9,7	302,3±14,9	49,5±1,0	73,0±2,6	159,0±5,2	190,5±10,5
	40	Самцы	267,3±7,0	225,0±6,2	52,0±3,7	66,3±4,3	166,8±3,3	190,0±8,8
		Самки	182,3±6,9	330,0±12,1	49,3±2,3	79,0±2,9	156,5±3,7	206,3±23,5

Результаты клинико-лабораторных исследований

Результаты анализа физико-химических свойств мочи показали, что в группе самок кроликов, получавшей тестируемый препарат в максимальной исследованной дозе, наблюдалось снижение уровня pH мочи (до 5,5) по сравнению с внутрилабораторными нормами (pH от 7 до 9) [59]. После периода отсроченного наблюдения снижение уровня pH мочи (до 6,3) по сравнению с

физиологической нормой отмечалось в группах самок кроликов, получавших тестируемый препарат в средней и максимальной дозах. В остальных группах кроликов и крыс никаких отклонений от нормы не обнаружено, как после курса введения, так и после периода отсроченного наблюдения [261].

По результатам клинического анализа крови на 30-й и 90-й дни (таблица 43) эксперимента в группах самок крыс, получавших препарат в дозах 45 мг/кг и 90 мг/кг, наблюдалось значимое увеличение количества тромбоцитов, на 90-й день в этих группах отмечено увеличение количества лейкоцитов по сравнению с группой контроля (таблица 43) [261].

Таблица 43 - Влияние тестируемого препарата на показатели клинического анализа крови самок крыс на 90-й день эксперимента, $M \pm SEM$, $n=8$ [261]

Исследуемые показатели	Контроль	VMU-2012-05		
		9 мг/кг	45 мг/кг	90 мг/кг
WBC Лейкоциты, $10^9/л$	8,6±0,48	9,6±0,40	13,1±1,30*	12,3±1,18*
LYM Лимфоциты, %	70,9±2,54	74,2±1,41	73,1±1,84	79,3±2,28*
MON Моноциты, %	5,0±0,49	4,8±0,28	6,9±0,44	6,3±0,83
GRA Гранулоциты, %	24,1±2,18	20,9±1,18	20,1±1,98	14,4±1,68*
RBC Эритроциты, $10^{12}/л$	7,6±0,21	7,4±0,08	7,6±0,12	7,0±0,41
HGB Гемоглобин, г/л	153,5±1,95	148,1±1,36	149,1±2,81	137,9±8,18
HCT Гематокрит, %	42,0±0,60	40,4±0,35	41,3±0,55	38,5±1,79
PLT Тромбоциты, $10^9/л$	748,0±30,84	865,3±47,25	969,9±40,58*	989,5±57,61*
* $p < 0,05$, статистически достоверные отличия от контрольной группы, (однофакторный дисперсионный анализ, критерий Тьюки).				

В группе максимальной дозы наблюдался сдвиг лейкоцитарной формулы в сторону снижения процентного содержания гранулоцитов и увеличения лимфоцитов (по сравнению с контролем). При этом все выявленные изменения по лейкоцитам и лейкоцитарной формуле не выходили за границы установленных внутрилабораторных норм для самок беспородных крыс (лейкоциты $5,5 - 18,0 \times 10^9/л$, процентное содержание лимфоцитов 59-87%, процентное содержание гранулоцитов -13,5-37,6%, количество тромбоцитов $348-950 \times 10^9/л$). У самок кроликов групп средней и максимальной доз по окончании введения препарата

также обнаружено увеличение процентного содержания лимфоцитов по отношению к группе контроля, отмечена тенденция к снижению процентного количества гранулоцитов (таблица 44), изменения не выходили за рамки внутрилабораторных норм для кроликов (процентное содержание лимфоцитов 30-70%, гранулоцитов – 20-58%). Других отличий от группы контроля или отклонений от физиологической нормы ни у крыс, ни у кроликов за весь период введения препарата не выявлено. Отсроченных эффектов также не установлено [261].

Таблица 44 - Влияние тестируемого препарата на показатели клинического анализа крови самок кроликов, 28-й день эксперимента, $M \pm SEM$, $n=8$ [261]

Исследуемые показатели	Контроль	VMU-2012-05		
		4 мг/кг	20 мг/кг	40 мг/кг
WBC Лейкоциты, 10 ⁹ /л	7,2±0,29	7,6±0,60	6,5±0,51	7,9±0,46
LYM Лимфоциты, %	61,1±1,54	61,1±2,19	67,6±1,72	67,9±2,54*
MON Моноциты, %	3,1±0,25	3,2±0,17	2,6±0,18	3,1±0,15
GRA Гранулоциты, %	35,9±1,61	35,7±2,19	29,5±1,48	29,2±2,50
RBC Эритроциты, 10 ¹² /л	6,1±0,15	6,2±0,25	5,9±0,21	6,0±0,11
HGB Гемоглобин, г/л	130,9±2,33	133,4±5,98	126,9±3,42	127,6±2,38
HCT Гематокрит, %	43,5±0,64	43,2±1,41	43,0±1,04	43,3±0,82
PLT Тромбоциты, 10 ⁹ /л	302,5±17,76	320,3±30,74	289,0±22,75	304,4±32,31
* $p < 0,05$, статистически достоверные отличия от контрольной группы, (однофакторный дисперсионный анализ, критерий Тьюки).				

По результатам анализа параметров системы гемостаза клинически значимых эффектов препарата на ПВ и АЧТВ у кроликов и крыс не установлено (таблицы 44, 45, 46, 47, 48).

Таблица 45 – Результаты определения протромбинового времени (ПВ) у крыс, с, $M \pm SEM$ [261]

Группы	Доза, мг/кг	30-й день эксперимента		90-й день эксперимента		120-й день эксперимента	
		Самцы	Самки	Самцы	Самки	Самцы	Самки
Контроль	0	21,6±0,37 n=8	22,7±0,16 n=8	18,4±0,25 n=8	20,0±0,35 n=8	17,3±0,27 n=8	17,6±0,27 n=8
VMU-2012-05	9	21,8±0,19 n=8	22,6±0,31 n=8	17,7±0,41 n=8	18,8±0,45 n=8	18,0±0,50 n=8	16,9±0,68 n=8
	45	21,4±0,50 n=8	22,3±0,51 n=8	17,4±0,73 n=8	19,0±0,28 n=8	18,3±0,86 n=7	16,0±0,40 n=8
	90	22,5±0,19 n=8	20,0±0,96* n=8	17,3±0,54 n=7	19,8±0,41 n=8	20,1±0,72* n=7	16,1±0,43 n=8

* Статистически значимые отличия от группы контрольных животных, критерий Тьюки, $p < 0,05$.

Таблица 46 – Результаты определения протромбинового времени (ПВ) у кроликов, с, $M \pm SEM$ [261]

Группы	Доза, мг/кг	28-й день эксперимента		56-й день эксперимента	
		Самцы	Самки	Самцы	Самки
		n=8	n=8	n=4	n=4
Контроль	0	8,3±0,17	8,7±0,37	8,6±0,25	8,5±0,08
VMU-2012-05	4	8,1±0,20	7,9±0,26	8,0±0,18	8,0±0,16
	20	7,4±0,17*	7,5±0,14	8,3±0,20	8,1±0,19
	40	7,5±0,13*	7,2±0,42*	7,9±0,05	7,7±0,12*

* Статистически значимые отличия от группы контрольных животных, критерий Тьюки, $p < 0,05$.

Таблица 47 – Результаты определения активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ) у крыс, с, $M \pm SEM$ [261]

Группы	Доза, мг/кг	30-й день эксперимента		90-й день эксперимента		120-й день эксперимента	
		Самцы	Самки	Самцы	Самки	Самцы	Самки
Контроль	0	16,2±0,67 n=8	17,6±0,89 n=8	12,8±0,42 n=8	13,3±0,94 n=8	12,2±0,33 n=8	14,2±1,06 n=8
VMU-2012-05	9	13,8±0,66 n=8	15,5±1,65 n=8	12,7±0,47 n=8	16,2±0,51* n=8	13,7±1,05 n=8	12,3±0,50 n=8
	45	13,8±0,43 n=8	18,8±0,85 n=8	12,8±0,65 n=8	14,5±0,72 n=8	13,5±0,76 n=8	12,2±0,30 n=8
	90	16,9±0,75 n=8	17,7±0,62 n=8	15,4±0,92* n=8	16,2±0,33* n=8	13,0±0,62 n=8	12,1±0,57 n=8

* Статистически значимые отличия от группы контрольных животных, критерий Тьюки, $p < 0,05$.

Таблица 48 – Результаты определения у кроликов активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ), с, $M \pm SEM$ [261]

Группы	Доза, мг/кг	28-й день эксперимента		56-й день эксперимента	
		Самцы	Самки	Самцы	Самки
		n=8	n=8	n=4	n=4
Контроль	0	15,2±0,35	15,6±0,44	18,5±0,69	18,4±0,47
VMU-2012-05	4	15,1±0,72	16,8±0,61	16,9±1,16	17,4±0,51
	20	16,1±0,72	17,2±1,04	17,7±1,36	15,7±0,63*
	40	17,1±0,87	17,0±0,78	16,8±1,08	15,7±0,59*

* Статистически значимые отличия от группы контрольных животных, критерий Тьюки, $p < 0,05$.

Результаты биохимического анализа крови показали, что на фоне введения тестируемого препарата у самок крыс, получавших препарат в максимальной дозе, на 30-й день эксперимента увеличился уровень активности АСТ (на 40 % по сравнению с группой контроля; тенденция, не достигшая статистической значимости) - таблица 49 [261].

Таблица 49 – Влияние VMU-2012-05 на биохимические показатели крови крыс, $M \pm SEM$, n=8 [261]

Пол	Доза, мг/кг	АЛТ, Ед/л			АСТ, Ед/л			ЩФ, Ед/л		
		День эксперимента								
		30	91	121	30	91	121	30	91	121
самцы	0	42±3,4	66±3,3	57±2,5	94±7,9	103±8,0	128±8,7	124±14,8	152±11,3	113±9,4
самки	0	36±5,1	57±5,0	53±2,9	86±2,2	115±4,0	139±5,6	96±7,1	134±12,0	100±4,6
самцы	9	42±4,2	67±2,7	61±4,1	83,9±8,07	107±6,8	135±6,5	111±14,8	153±12,6	120±9,1
самки	9	32±2,0	56±3,8	55±7,5	95±3,6	112±5,5	135±7,3	92±12,3	125±19,3	92±9,9
самцы	45	43±6,5	62±5,3	60±5,7	98±10,4	108±6,7	134±7,5	106±7,2	159±12,9	139±11,0
самки	45	31±2,5	62±5,0	50±4,6	91±4,8	98±4,8	131±10,8	117±13,1	144±12,4	91±7,7
самцы	90	40±4,3	52±2,7	57±2,9	76±3,3	107±7,5	134±9,9	116±8,7	103±12,7*	122±7,0
самки	90	39±5,4	65±4,0	52±3,3	118±14,0*	112±4,6	148±4,9	103±13,5	155±14,6	87±4,5

* $p < 0,05$, статистически достоверные отличия от контрольной группы, (однофакторный дисперсионный анализ, критерий Тьюки); # - n=7 (самцы, группа 90 мг/кг, 91-й и 121-й день и группа 45 мг/кг – 121-й день).

Аналогичная тенденция (не значимая статистически) отмечена и у самцов кроликов на 28-й день эксперимента: уровень активности АСТ превышал показатели группы контроля на 60% (таблица 50). У самок кроликов, получавших препарат в средней и максимальной дозах, на 28-й день эксперимента отмечен повышенный, по сравнению с внутрилабораторными нормами (15-140 Ед/л) и/или группой контроля, уровень активности щелочной фосфатазы. В период отсроченного наблюдения тестируемый препарат не оказал влияния на биохимические показатели крови лабораторных животных [261].

Таблица 50 – Влияние VMU-2012-05 на биохимические показатели крови кроликов, $M \pm SEM$ [261]

Пол	Доза, мг/кг	АЛТ, Ед/л		АСТ, Ед/л		ЩФ, Ед/л	
		День эксперимента					
		28	56	28	56	28	56
		n=8	n=4	n=8	n=4	n=8	n=4
самцы	0	61±4,7	50±6,3	34±3,6	24±1,4	120±7,0	106±14,8
самки	0	50±6,1	54±8,9	34±4,4	34±14,0	126±5,0	130±4,0
самцы	4	56±6,7	59±6,2	33±8,3	40±11,7	123±7,3	102±10,0
самки	4	47±4,5	54±10,2	38±9,5	46±10,1	131±5,7	109±6,9
самцы	20	60±5,0	57±12,0	45±7,0	29±7,5	131±3,6	115±8,4
самки	20	49±4,9	56±3,7	34±4,5	35±7,9	142±4,7	116±8,5
самцы	40	64±5,0	53±4,8	53±7,0	24±2,9	139±7,4	108±13,4
самки	40	49±4,6	52±2,9	32±7,1	67±26,7	152±5,1*	130±9,9

* $p < 0,05$, статистически достоверные отличия от контрольной группы, (однофакторный дисперсионный анализ, критерий Тьюки).

Результаты патоморфологического исследования

При некропии погибших до плановой эвтаназии 3-х самцов крыс зарегистрированы отек и геморрагическое пропитывание ткани легких, отек и умеренное полнокровие сосудов головного мозга, а также полнокровие внутренних органов. Непосредственной причиной смерти животных данной группы стала острая сердечная недостаточность.

При гистологическом исследовании, непосредственно после окончания периода введения, у двух крыс на максимальной исследованной дозе 90 мг/кг выявлен альвеолярный гистиоцитоз и инкапсулированные очаги с инородными телами в ткани легких, аналогичное патологическое изменение обнаружено в одном случае после периода отсроченного наблюдения в группе средней дозы. Обнаруженные изменения, вероятно, обусловлены попаданием микрочастиц препарата в ткань легкого, и соответственно, не связаны напрямую с его токсическим действием [261].

На 91-й день эксперимента у двух самцов крыс из групп, получавших VMU-2012-05 в дозах 45 мг/кг и 90 мг/кг, обнаружена гипоплазия сперматогенного эпителия. Аналогичные изменения в этих же группах обнаружены и после периода отсроченного наблюдения у двух самцов (рисунок 46) [261].

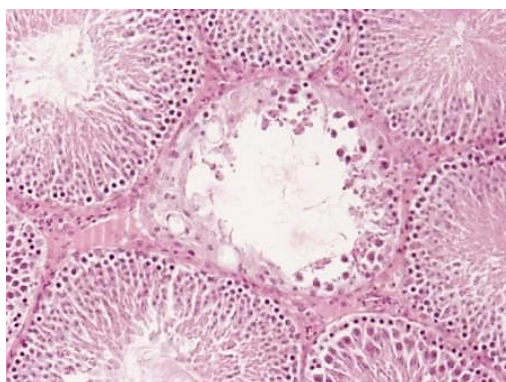


Рисунок 46 – Срез семенника самца крысы группы, получавшей препарат в дозе 45 мг/кг, 91-й день эксперимента

Примечание - Гипоплазия сперматогенного эпителия. Окраска - гематоксилин-эозин, ув $\times 100$.

В группе крыс максимальной дозы, непосредственно по окончании периода введения, обнаружен один случай мелкокапельной жировой дистрофии печени (рисунок 47). По окончании периода отсроченного наблюдения у одной самки группы, получавшей VMU-2012-05 в дозе 90 мг/кг, выявлены предположительно апоптотические изменения гепатоцитов (рисунок 48). У трёх животных этой группы обнаружена мелкокапельная жировая дистрофия гепатоцитов [261].

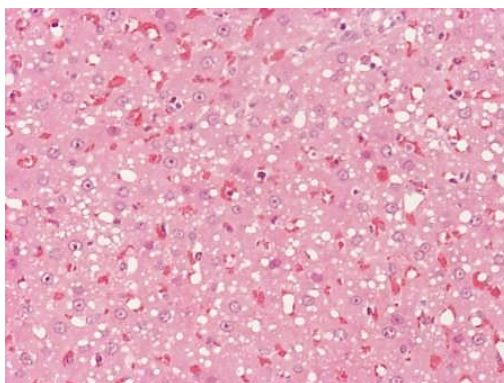


Рисунок 47 – Срез печени самца крысы группы, получавшей препарат в дозе 90 мг/кг, 91-й день эксперимента

Примечание - Мелкокапельная жировая дистрофия гепатоцитов. Окраска - гематоксилин-эозин, ув. $\times 200$.

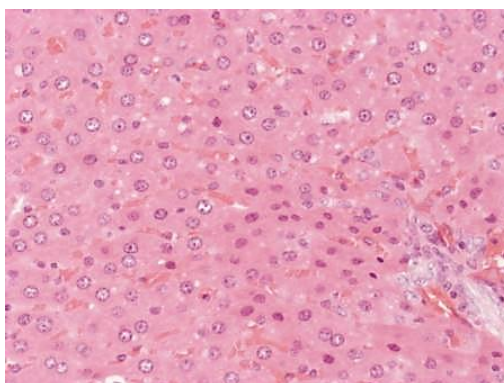


Рисунок 48 – Срез печени самки крысы группы, получавшей препарат в дозе 90 мг/кг, отсроченное наблюдение, 121-й день эксперимента

Примечание - Предположительно апоптотические изменения гепатоцитов (стрелки). Окраска - гематоксилин-эозин, ув. $\times 200$.

При патоморфологическом исследовании кроликов на 29-й и 57-й дни эксперимента патологических изменений органов не выявлено.

У самцов крыс непосредственно после окончания периода введения на 91-й день выявлено статистически значимое снижение массовых коэффициентов печени, почек и семенников в группе, получавших тестируемый препарат в дозе 90 мг/кг, по сравнению с группой контроля (таблица 51). После периода отсроченного наблюдения отличий от группы контроля не наблюдалось.

У самок крыс и у кроликов обоего пола влияния тестируемого препарата на массовые коэффициенты органов не отмечено [261].

Таблица 51 – Влияние VMU-2012-05 на массовые коэффициенты органов самцов крыс, 91-й день исследования, % от массы тела, $M \pm SEM$ [261]

Исследуемые показатели	Контроль	Тестируемый препарат		
		9 мг/кг	45 мг/кг	90 мг/кг
	n=8	n=8	n=8	n=7
Печень	3,65±0,154	3,61±0,082	3,38±0,168	3,14±0,071*
Почки	0,76±0,029	0,82±0,020	0,73±0,031	0,65±0,010*
Семенники	1,01±0,064	1,1±0,034	0,97±0,044	0,73±0,072*
* $p < 0,05$, статистически достоверные отличия от контрольной группы, (однофакторный дисперсионный анализ, критерий Тьюки).				

При оценке местно-раздражающего действия по результатам гистологического исследования на 91-й день эксперимента выявлен один случай катарального гастрита в группе самцов крыс, получавших тестируемый препарат в дозе 90 мг/кг. У кроликов патологических изменений органов ЖКТ не выявлено. По окончании периода восстановления признаков местно-раздражающего действия ни у крыс, ни у кроликов не установлено [261].

Таким образом, 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). Основные органы-мишени токсического действия препарата - печень, органы мужской репродуктивной системы (семенники). Изменения в этих органах были обнаружены только у одного вида животных (крысы) при введении препаратов в дозах, превышающих терапевтическую: 45 мг/кг (5 ВТД) и 90 мг/кг (10 ВТД). Патологические изменения в 12,5-20% случаях из группы встречались как непосредственно после периода введения, так и после периода отсроченного наблюдения. По результатам оценки местно-раздражающего действия выявлен один случай катарального гастрита у крыс на фоне введения препарат в максимальной дозе. Частота выявления патологических изменений органов ЖКТ позволяет предположить, что препарат относительно безопасен для органов желудочно-кишечного тракта [261].

Результаты оценки общих токсических свойств лекарственной формы лекарственного средства на основе VMU-2012-05 для лечения ВИЧ-1 инфекции

продемонстрировали его относительную безопасность при приеме в терапевтических дозах, что свидетельствует о целесообразности дальнейшего изучения специфической токсичности препарата с целью получения дополнительных доказательств безопасности и получения разрешения на проведение клинических испытаний [261].

3.8 Результаты изучения генотоксичности ЛС на основе VMU-2012-05 в тесте по учету микроядер в эритроцитах периферической крови мышей

По результатам оценки генотоксического действия изучаемое вещество в дозах 1 и 10 ТД не обладало мутагенной активностью в микроядерном тесте в эритроцитах мышей. В группе негативного контроля показатели количества НХЭ и ПХЭ с микроядрами находились в пределах нормальных значений (1–2‰ с учётом погрешности измерений) [222]. Межгрупповой анализ данных показал значимое увеличение содержания клеток с микроядрами, а также процентного соотношения ПХЭ/НХЭ у животных, получивших однократно внутрибрюшинно циклофосфамид, по сравнению с группой плацебо (таблица 52) [66].

Таблица 52 - Результаты учета микроядер в эритроцитах периферической крови мышей после введения тестируемых объектов, $M \pm m$, $n=10$ [66]

№ гр.	Препарат	Доза	Пол	% ПХЭ/НХЭ	‰ НХЭ с микроядром	‰ ПХЭ с микроядром
1	Циклофосфамид (позитивный контроль)	50 мг/кг	Самцы	7,6±0,53*	7,3±0,91*	7,0±0,72*
			Самки	8,2±0,38*	8,3±0,90*	7,9±0,98*
2	Плацебо (негативный контроль)	0	Самцы	1,0±0,06	1,9±0,17	2,3±0,30
			Самки	1,0±0,06	1,8±0,17	1,7±0,16
3	ЛС на основе субстанции VMU-2012-05	21 мг/кг	Самцы	1,2±0,07	1,3±0,21	1,3±0,16
			Самки	1,2±0,09	1,3±0,23	1,2±0,17
4	ЛС на основе субстанции VMU-2012-05	210 мг/кг	Самцы	1,2±0,05	1,3±0,14	1,0±0,12
			Самки	1,2±0,07	1,5±0,14	1,4±0,20

* Различия статистически значимы по сравнению с группами животных негативного контроля (получавших плацебо) (ANOVA, критерий Тьюки); $p < 0,05$. ПХЭ – полихроматофильные эритроциты; НХЭ – нормохроматофильные эритроциты.

Этот факт свидетельствует о корректной постановке эксперимента. Статистически значимых межгрупповых различий между животными, получавшими ЛС в обеих дозах, и входившими в группу плацебо не выявлено. Лекарственное средство на основе VMU-2012-05, предназначенное для лечения ВИЧ-1 инфекции, при 5-дневном внутрижелудочном введении в исследуемых дозах не увеличивало количество ПХЭ и НХЭ с микроядрами и не влияла на соотношение %ПХЭ/НХЭ ($p < 0,05$) [66].

Таким образом, пятидневное внутрижелудочное введение тестируемого объекта в дозах 21 мг/кг (ВТД) и 210 мг/кг (10ВТД) не повлияло на соотношение незрелых эритроцитов (полихроматофилов) к общему числу эритроцитов в процентах (%) на каждое экспериментальное животное. Тестируемый объект не оказал влияния на количество нормохроматофилов (зрелые формы) с микроядром и полихроматофилов с микроядром [66].

3.9 Результаты исследования прогноза канцерогенности ЛС на основе VMU-2012-05 в тесте «ДНК-комет»

Результаты ДНК-комет-теста показали, что процентное содержание ДНК в хвосте комет клеток интактных животных и особей, получавших плацебо, не превышало $8,7 \pm 0,24\%$ и соответствовало внутрилабораторной норме для здоровых животных (в среднем 5–15%). Позитивный контроль ЭМС в дозе 200 мг/кг достоверно ($p < 0,05$) увеличивал этот показатель для клеток всех анализируемых органов. Полученные результаты для позитивного контроля также указывают на корректность проведения эксперимента (таблица 53). Межгрупповое сравнение данных с помощью критерия Тьюки показало отсутствие влияния тестируемого препарата в обеих дозах на величину содержания ДНК в хвосте комет ($p < 0,05$) [66].

Таблица 53 - Результаты теста «ДНК-комет». % ДНК в хвосте кометы, $M \pm m$, $n = 5$ [66]

Группа	Пол	% ДНК в хвосте кометы				
		Костный мозг	Печень	Почки	Селезенка	Головной мозг
Интактные животные	Самцы	7,7 ± 0,22	8,0 ± 0,22	8,0 ± 0,23	6,8 ± 0,18	7,6 ± 0,23
	Самки	7,2 ± 0,17	8,5 ± 0,25	7,9 ± 0,25	7,4 ± 0,20	7,9 ± 0,25
Этилметан-сульфонат	Самцы	39,7 ± 1,11*	35,6 ± 1,04*	36,2 ± 1,05*	51,8 ± 1,05*	42,6 ± 1,15*
	Самки	36,6 ± 1,13*	46,0 ± 1,09*	35,2 ± 1,10*	40,3 ± 1,16*	37,2 ± 1,12*
Плацебо	Самцы	7,4 ± 0,23	7,9 ± 0,22	7,8 ± 0,20	7,6 ± 0,19	7,6 ± 0,21
	Самки	7,8 ± 0,21	8,7 ± 0,24	8,0 ± 0,23	7,5 ± 0,21	7,4 ± 0,21
ЛС на основе субстанции VMU-2012-05, 9 мг/кг	Самцы	7,6 ± 0,22	7,7 ± 0,22	7,9 ± 0,23	7,4 ± 0,21	7,9 ± 0,21
	Самки	7,2 ± 0,18	9,1 ± 0,25	7,7 ± 0,19	7,1 ± 0,19	7,8 ± 0,23
ЛС на основе субстанции VMU-2012-05, 45 мг/кг	Самцы	6,2 ± 0,18	8,2 ± 0,21	6,5 ± 0,19	7,7 ± 0,21	7,9 ± 0,24
	Самки	7,2 ± 0,19	9,0 ± 0,25	7,5 ± 0,21	7,4 ± 0,19	7,9 ± 0,23
ЛС на основе субстанции VMU-2012-05, 90 мг/кг	Самцы	7,2 ± 0,21	8,2 ± 0,23	8,1 ± 0,22	7,8 ± 0,21	7,4 ± 0,18
	Самки	7,8 ± 0,22	7,4 ± 0,21	8,4 ± 0,22	7,8 ± 0,21	7,5 ± 0,24

* Отличия статистически значимы в сравнении с % ДНК в хвосте клеток животных, получавших плацебо, по критерию Тьюки при $p < 0,05$.

Таким образом, ежедневное 14-дневное внутрижелудочное введение ЛС на основе VMU-2012-05, предназначенного для лечения ВИЧ-1 инфекции, самцам и самкам аутбредных крыс в дозах 9 (ТД), 45 (5ТД) и 90 (10 ТД) мг/кг не оказало повреждающего действия на ДНК клеток костного мозга, печени, почек, селезенки и головного мозга, что свидетельствует об отсутствии генотоксических свойств. На основании проведенных ранее исследований по изучению генотоксических свойств (тест по учету микроядер в эритроцитах крови мышей), а также полученных результатов в тесте «ДНК-комет» можно сделать прогноз об отсутствии канцерогенных свойств у ЛС на основе VMU-2012-05, предназначенного для лечения ВИЧ-1 инфекции [66].

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

ВИЧ-инфекция начала распространяться в 1970-х годах и привлекла внимание общественности в начале 1980-х как пандемия, ставшая одной из самых серьезных угроз общественному здравоохранению в истории [98]. Ключевой этап в жизненном цикле вируса - стадия обратной транскрипции/полимеризации ДНК - был рассмотрен в качестве основной мишени для создания препаратов, а нуклеозидный ингибитор ОТ зидовудин [147, 212] был одобрен FDA в качестве первого препарата против ВИЧ в 1987 году. Клиническое применение зидовудина показало, что лечение ВИЧ-инфекции одним препаратом неэффективно для снижения вирусной нагрузки в течение длительного периода времени. Кроме того, стало понятно, что появляются лекарственно-устойчивые штаммы с потерей чувствительности к препарату, так как ВИЧ-1 демонстрирует высокую генетическую изменчивость. Открытие первого поколения ненуклеозидных ингибиторов ОТ в начале 1990-х годов не решило проблему - препарат первого поколения ННИОТ Невирапин продолжает вызывать мутации резистентности даже после однократной дозы, которую обычно вводят беременным женщинам для предотвращения передачи ВИЧ-1 от матери ребенку. В настоящее время основу эффективных методов лечения ВИЧ-1 инфекции составляет высокоактивная антиретровирусная терапия, использующая комбинацию противовирусных препаратов с различным механизмом действия, а ингибиторы ОТ, в частности ННИОТ, являются ключевыми компонентами комбинированных схем согласно клиническим рекомендациям по лечению ВИЧ-инфекции Министерства здравоохранения Российской Федерации [9], руководству Международного противовирусного общества США (IAS-USA, International Antiviral Society-USA) [238], рекомендациям Европейского клинического общества по СПИДу (EACS, European AIDS Clinical Society) [237], рекомендациям национального института здравоохранения США по ВИЧ / СПИДу [52] и руководящим принципам ВОЗ по ВИЧ/СПИДу [58].

С 1987 по 2010 год было официально одобрено восемь препаратов НИОТ и четыре ННИОТ для борьбы с ВИЧ-инфекцией. В лекарственном классе НИОТ Управление по контролю за продуктами и лекарствами США (FDA) одобрило зидовудин в марте 1987 года, затем диданозин в октябре 1991 года, залцитабин в июне 1992 года, ставудин в июне 1994 года, ламивудин в ноябре 1995 года, абакавир в декабре 1998 года, тенофовира дизопроксил фумарат в октябре 2001, и эмтрицитабин в июле 2003. В классе препаратов ННИОТ невирапин, делавирдин, эфавиренз и этравирин были одобрены FDA [158, 242, 267, 272].

Прием препаратов первого поколения ингибиторов ОТ часто связан с проблемой возникновения лекарственной устойчивости и нежелательных явлений. Например, применение залцитабина, ставудина и делавирдин было ограничено из-за серьезных побочных эффектов, неудобного приема (три раза в день) и низкого генетического барьера для формирования устойчивости [131]. Зидовудин, диданозин, ставудин и невирапин больше не рекомендуются из-за их токсичности, низкой эффективности и тяжелой лекарственной устойчивости [237, 238].

Терапия на основе абакавира может увеличить риск сердечно-сосудистых заболеваний по сравнению со схемами лечения без него [205].

Прием эфавиренза связан с высокой частотой развития нейropsychиатрических осложнений [126].

Тенофовира дизопроксил фумарат может вызвать нарушение функции почек и снизить минеральную плотность костной ткани [113].

С 2010 по октябрь 2021 года FDA одобрило три ингибитора ОТ: рилпивирин (Edurant®), дата утверждения: 2011-05-20), тенофовира алафенамид (Vemlidy®), дата утверждения: 2016-11-10) и доравирин (Pifeltro™, дата утверждения: 2018-08-30). Эти ингибиторы ОТ дополнительно включены в 10 комбинированных схем приема фиксированных доз, которые были (предварительно) одобрены FDA. В дополнение к этим препаратам, одобренным FDA, эльсульфавирин (Elpida®) был одобрен Министерством здравоохранения Российской Федерации в июне 2017 года. Вагинальное кольцо, содержащее 25 мг

дапивирина, было одобрено Европейским агентством по лекарственным средствам в июле 2020 года. 21 июля 2021 года азвудин был условно одобрен Национальным управлением по лекарственным средствам в Китае.

Являясь неконкурентными ингибиторами фермента, ННИОТ взаимодействуют с аллостерическим центром обратной транскриптазы вблизи полимеразного центра, влияют на мобильность и гибкость центра полимеризации, что, в конечном итоге, приводит к снижению эффективности фермента [166, 233]. Ингибирующее действие препаратов проявляется несколькими вариантами, например, связывание невирапина вызывает трансляцию положения гидрофобных остатков, и, как результат, третичная структура протеина обратной транскриптазы раздвигается [265]. Также оно проявляется за счет влияния на динамические процессы ОТ с нуклеиновой матрицей [173, 185, 204]. Существует два поколения препаратов ННИОТ. Однако, несмотря на медленное развитие резистентности к ННИОТ второго поколения, в клинической практике уже встречаются мутантные штаммы ВИЧ, позволяющие вирусу противостоять действию этих препаратов [210]. В настоящее время подходы к разработке новых ННИОТ включают: повышение позиционной адаптивности и конформационной гибкости в кармане связывания лекарственного средства [91]; нацеливание на консервативные остатки в связывающем кармане [129, 135]; улучшение физико-химических свойств с помощью пролекарств или введение солубилизирующих групп [175, 174].

В литературе сообщается о большом количестве разрабатываемых новых НИОТ и ННИОТ [137, 177, 179, 282, 283], но только несколько кандидатов в настоящее время проходят клинические испытания. Разработка большинства лекарственных кандидатов была прекращена из-за их ограниченной эффективности, неблагоприятных побочных эффектов и / или высокой токсичности. Например, разработка лерсивирина (УК-453061) была прекращена в 2013 году, поскольку лерсивирин не показал преимуществ перед существующими НИОТ; разработка фосдевирина была прекращена в 2014 году из-за неожиданных побочных эффектов, таких как судороги; разработка ценсавудина была

прекращена в 2015 году из-за успеха тенофовира алафенамида с лучшими профилями клинической эффективности и безопасности [108]; и разработка абрикитабина была прекращена в 2016 из-за отсутствия финансирования и интересов со стороны спонсора.

Более чем двадцатилетняя история применения антиретровирусных препаратов различной химической структуры и механизма действия имеет ограничения, главными из которых являются образование в процессе терапии устойчивых форм вируса, что делает необходимой постоянную смену препаратов, и побочные действия, в ряде случаев приводящие к преждевременной отмене терапии. Таким образом, поиск новых соединений, обладающих благоприятным профилем безопасности и анти-ВИЧ активностью как в отношении дикого штамма ВИЧ-1, так и в отношении резистентных изолятов вируса, с целью создания лекарственных антиретровирусных препаратов представляет крайне важную и перспективную проблему современной вирусологии и медицинской химии [66].

Важным этапом в решении данной проблемы стало открытие нового класса высокоактивных ННИОТ, представляющих собой N-алкилзамещенные производные пиримидиновых и пуриновых оснований, содержащие терминальные ненасыщенные и ароматические фрагменты [219, 220]. Было показано, что среди соединений данного класса наиболее перспективными лекарственными кандидатами, эффективно подавляющими активность обратной транскриптазы как дикого штамма ВИЧ-1, так и большинства исследованных мутантных форм (L100I, K103N, Y181C, Y188L, G190A, K103N/Y181C), являются производные бензофенона, содержащие двухъядерный ароматический фрагмент на конце ациклической цепи в N1-замещенных урацилах. Пиримидиновые производные бензофенона обладают повышенной конформационной подвижностью, прежде всего, за счет своей не жесткой структуры (в отличие от ННИОТ ВИЧ-1 первого поколения, в частности, невирапина) и наличия гибкого и подвижного линкера, соединяющего, собственно, бензофеноновый фрагмент с гетероциклом. Это свойство позволяет соединениям, как показали результаты их

докинга в область связывания обратной транскриптазы ВИЧ-1, по-разному взаимодействовать с аминокислотами ее аллостерического центра, прежде всего с консервативными участками Pro236, Asn103 и Tyr188, обеспечивая улучшенный профиль резистентности по сравнению с применяющимися в клинике аналогами – ненуклеозидными ингибиторами ОТ ВИЧ-1 первого и второго поколения. Дальнейший рациональный дизайн соединений данного класса позволил существенно упростить их химическое строение при значительном увеличении антиретровирусной активности *in vitro*. Соединение-лидер в этом ряду - 1- [2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил (соединение VMU-2012-05) - показало высокую способность подавлять репродукцию ВИЧ-1 дикого типа. Соединение VMU-2012-05 также подавляло репродукцию мутантного штамма ВИЧ-1 и имело профиль резистентности, близкий к таковому у эфавиренза [73, 74, 76, 174].

Технология получения VMU-2012-05 представляет 5-стадийный синтез, основанный на алкилировании 1,3-дибензоил-6-метилурацила толуолсульфонатом 2-(2-бензоилфенокси)этанола в среде безводного ДМФА при комнатной температуре с последующим деблокированием промежуточного 1- [2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила водно-спиртовым раствором аммиака, структуры побочных, промежуточных и конечного продуктов синтеза были подтверждены ЯМР-спектроскопией, родственные примеси идентифицированы и нормированы. Из химической схемы производства (приложение В) видно, что предлагаемое соединение отличается относительной простотой химического строения, его синтез базируется на использовании дешевого и доступного российского сырья, включает небольшое количество химических и технологических стадий, выделение и очистка субстанции не требует использования сложного и дорогостоящего оборудования. По предварительной оценке, основанной на стоимости исходных химических реактивов, растворителей и вспомогательных веществ, постадийного выхода промежуточных и конечного продуктов, затраты на получение 1 кг субстанции предлагаемого соединения составят в 15-20 раз меньше, чем при синтезе эфавиренза при сопоставимой эффективности *in vitro*, что позволяет прогнозировать низкую стоимость

разрабатываемого препарата, а как следствие его широкую доступность для пациентов.

Полученные результаты исследований позволили рассматривать предлагаемое соединение в качестве перспективного лекарственного кандидата, предназначенного для лечения ВИЧ-1 инфекции, и обусловили дальнейшую фармацевтическую разработку АФС и ЛФ на ее основе, а также их фармакодинамическое и токсикологическое изучение.

Для характеристики субстанции использовали современные физико-химические методы анализа, применяемые в фармацевтическом анализе и позволяющие достигать максимальной специфичности и достоверности результатов. Подтверждение структуры и оценку чистоты соединения проводили несколькими независимыми разрушающими и неразрушающими методами: ВЭЖХ-МС анализом, ЯМР-спектроскопией, рентгеноструктурным анализом, ВЭЖХ-УФ и ИК-спектроскопией [174].

Отдельно нарабатывали высокоочищенную субстанцию для получения первичного стандартного образца с целью последующего контроля качества АФС по критическим показателям “подлинность”, “чистота”, “количественное определение”. Критические показатели качества – это физические, химические, физико-химические, биологические свойства или характеристики АФС, которые должны находиться в рамках соответствующих пределов, диапазона или в границах допустимости для обеспечения целевого качества субстанции. Для определения количественного содержания основного вещества в СО использовали метод, основанный на материальном балансе: сумма всех определенных в СО веществ (основное вещество, вода и летучие растворители, минеральные и нелетучие органические примеси) должна составлять 100,0 %.

Разработку спецификации на фармацевтическую субстанцию «VMU-2012-05, субстанция-порошок» с указанием методов контроля и норм проводили на основании требований, представленных в соответствующих общих разделах (главах) и общих фармакопейных статьях (ОФС) Фармакопеи Евразийского экономического союза (Ф.ЕАЭС), а также Рекомендации Коллегии Евразийской

экономической комиссии от 22 декабря 2020 г. № 26 «О Руководстве по разработке и производству активных фармацевтических субстанций». В соответствии с принципами, изложенными в нормативных актах Евразийского экономического союза (ОФС 2.3.5.0. Контроль примесей в субстанциях для фармацевтического применения Ф.ЕАЭС), а также в соответствующих монографиях Фармакопеи США (Ф.США), Европейской Фармакопеи (ЕФ) действующих изданий, а также Гармонизированным Трехсторонним Руководством (ICH), в том числе:

- ICH Q3A(R2): “Примеси в новых фармацевтических субстанциях”
- ICH Q3C(R5): “Примеси: Руководство для остаточных растворителей”

В рамках разработки комплексной системы контроля производства, испытаний и выпуска АФС VMU-2012-05 были проведены комплексные исследования физико-химических свойств и технологического процесса для подтверждения строения (структуры) молекулы, идентификации примесей и их источников.

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».

Аналитические методики, способные определять соответствующие показатели качества АФС VMU-2012-05, были включены в спецификацию для обеспечения соответствующего качества, эффективности и безопасности лекарственного препарата, а также для обеспечения воспроизводимости процесса производства АФС VMU-2012-05. Критерии приемлемости (нормы) предложены на основании нормативной документации, токсикологической оценки, ожидаемого качества продукта, производственных и аналитических возможностей, а также с учетом ограниченного количества произведенных серий. Аналитические методики контроля качества АФС «VMU-2012-05, субстанция-

порошок» были разработаны и гармонизированы со стандартными методиками, приведенными в ОФС Ф.ЕАЭС, с учетом имеющейся материальной базы. Приведенные методики позволят достоверно оценить качество фармацевтической субстанции, что было подтверждено результатами фактического контроля трех опытно-промышленных серий фармацевтической субстанции. При разработке методик контроля качества руководствовались фактическими данными, характеризующими качество испытуемых образцов субстанции VMU-2012-05, как в момент выпуска, так и при хранении.

Для осуществления контроля качества субстанции по показателям «Подлинность», «Родственные примеси» и «Количественное определение» разрабатывали и валидировали метод ВЭЖХ-УФ. Разработанная аналитическая ВЭЖХ методика продемонстрировала пригодность для качественного и количественного определения VMU-2012-05 и его родственных примесей. Для осуществления контроля качества субстанции по показателю «Остаточные органические растворители» разрабатывали метод ГХ-ПИД (пламенно-ионизационный детектор). Разработанная аналитическая ГХ-ПИД методика продемонстрировала пригодность для качественного и количественного определения остаточных органических растворителей.

Изучение стабильности и установление срока годности «VMU-2012-05, субстанция-порошок» было проведено согласно рекомендациям Государственной фармакопеи Российской Федерации (ГФ РФ), ОФС.1.1.0009.18 «Стабильность и сроки годности лекарственных средств» и Решению Коллегии ЕЭК № 69 от 10.05.2018 г. «Об утверждении Требований к исследованию стабильности лекарственных препаратов и фармацевтических субстанций». С целью выбора оптимальных условий хранения АФС VMU-2012-05 была составлена Программа исследования стабильности, позволяющая сделать обоснованное заключение в пользу тех или иных параметров среды (температуры и относительной влажности) при долгосрочных и ускоренных испытаниях. Исследования стабильности (при долгосрочных и ускоренных испытаниях) были проведены для

трех промышленных серий АФС VMU-2012-05 в течение предполагаемого срока годности (2 года) и ускоренные испытания - в течение 6 месяцев.

Следующим этапом в разработке лекарственного кандидата для лечения ВИЧ-инфекции стало его доклиническое фармакологическое изучение, а именно определение механизма действия - подтверждение способности VMU-2012-05 ингибировать обратную транскриптазу ВИЧ-1 дикого типа и ее мутантные формы.

Высокая изменчивость ВИЧ приводит к многочисленным заменам аминокислот в ОТ. Часть из них приводит к резистентности вируса к ННИОТ. Согласно литературным данным [130], большинство выявленных мутаций резистентности к ННИОТ локализовано непосредственно в гидрофобном кармане, центре связывания ННИОТ ВИЧ, сформированном вблизи каталитического центра фермента. Среди пациентов с резистентностью к ННИОТ наиболее частыми являются мутации K103N (56,98%) и Y181C (24,95%). Мутации G190A, L100I, V106A встречаются реже (8,16%, 6,92% и 2,37% соответственно), но также сильно влияют на анти-ВИЧ терапию, поскольку приводят к потере ингибирующей активности невирапина более чем на 2 порядка [124]. Мутации L100I, K103N и Y181C являются характерными также для пациентов с резистентностью к эфавирензу и делавердину [200]. Мутации Y181C и V106A вызывали падение активности каправирин – потенциального ННИОТ второго поколения, снятого с клинических испытаний [240]. Для лерсивирин, ННИОТ созданного на основе каправирин и прошедшего клиническую фазу IIb, удалось добиться устойчивости к этим мутациям, однако наблюдалось падение активности в случае мутации L100I [124]. Умеренная потеря активности в отношении мутации V106A была характерна для соединения GW69564 [115], модификация структуры которого позволила создать GW695634, дошедшего до III фазы клинических испытаний [174].

Предложено несколько механизмов устойчивости ОТ к действию ННИОТ:

1) Мутации L100I и G190A стерически препятствуют размещению ННИОТ в гидрофобном кармане [168].

2) Мутация Y181C приводит к утрате взаимодействий с аминокислотными остатками внутри кармана [181].

3) Мутация K103N затрудняет проникновения ННИОТ в гидрофобный карман [169, 234, 174].

Лекарственная устойчивость к доравирину в основном связана с тремя первичными мутациями ОТ (V106 A /M, Y188L) и 11 вторичными мутациями ОТ (V106T / I, Y188 C / H, G190E, P225H, F227 C / L / R, M230L, L234I) [275]. Исследования *in vitro* подтвердили противовирусную активность доравирин в отношении широкого спектра различных штаммов ВИЧ-1 с мутациями K101E, K103N, E138K, Y181C, M184V/I и / или G190A [144, 145, 191, 248]. Мутации резистентности, связанные с доравирином, были очень редкими (1,4%; 137/9764), согласно крупномасштабной когорте из 9764 пациентов, не получавших лечения, из Греции, Италии и Франции [131]. Значительное увеличение мутаций резистентности, связанных с доравирином (V106 A/M, V108I, Y188 L / C / H, G190E, F227L, M230L, K103N + P225H), наблюдалось в большой группе из 6893 пациентов, получавших другие НИОТ (делавирдин, эфавиренц, невирапин, этравирин, рилпивирин) [252].

Показано, что рилпивирин проявляет противовирусную активность широкого спектра действия в отношении вирусных штаммов генотипов ВИЧ-1 (A1, C, D, F1, G, H) и CRFS (AE, AG, BG) со значениями EC₅₀ в диапазоне от 0,13 до 0,44 нмоль/л [93]. Согласно результатам экспериментов *in vitro*, рилпивирин активно ингибирует изоляты ВИЧ-1 группы O (EC₅₀: 2,88–8,45 нмоль/л) [93]. Согласно руководству IAS-США, мутации устойчивости к рилпивирину включают L100I, K101 E /P, E138 A / G / K / Q / R, V179L, Y181C / I / V, Y188L, H221Y, F227C и M230I /L25. Важно отметить, что распространенные мутации устойчивости, связанные с ННИОТ (например, V106 и G190) не снижают чувствительность к рилпивирину [93].

В ходе исследования ингибирующей активности VMU-2012-05 в отношении мутантных форм обратной транскриптазы ВИЧ-1 была использована панель мутантных форм ОТ ВИЧ-1 с аминокислотными заменами L100I, K103N, V106A,

Y181C, G190A, так как они широко представлены у пациентов с устойчивостью ННИОТ, приводят к резистентности посредством разных механизмов и являются принятыми при определении профиля резистентности новых анти-ВИЧ препаратов. Дополнительно была исследована ингибирующая активность VMU-2012-05 в отношении двойного мутанта с двумя наиболее часто встречающимися заменами K103N и Y181C. Установлено, что субстанция VMU-2012-05 является ингибитором обратной транскриптазы ВИЧ-1 дикого типа и шести изученных мутантных форм, соответствующих лекарственно-устойчивым штаммам вируса. Значение константы ингибирования (K_i) фермента дикого типа оставляет $0,23 \mu\text{M}$, фермента с мутацией G190A - $8,3 \mu\text{M}$, фермента с мутацией Y181C - $11,7 \mu\text{M}$, фермента с мутациями L100I, K103N, V106A и двойного мутанта K103N/Y181C - более $20 \mu\text{M}$. Таким образом, VMU-2012-05 является ингибитором обратной транскриптазы ВИЧ-1 дикого типа и ряда ее мутантных форм. Активность объекта испытаний зависит от мутаций в сайте связывания ненуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы, действующих по неконкурентному механизму, что подтверждает, что объект относится к группе ненуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы (ННИОТ) ВИЧ-1 [174].

Основная причина, из-за которой у пациентов наблюдается значительная вариабельность ВИЧ-1 и зачастую низкий ответ на АРТ — это высокая частота мутаций вируса, способствующая накоплению в среднем одной нуклеотидной мутации за цикл репликации [84, 203].

Поскольку пациенты обычно инфицированы одним или несколькими штаммами дикого типа [180], у людей, не получающих лечение, вероятно, каждый день образуется экспоненциальное количество вирионов, что приводит к появлению бесчисленных вариантов вируса. На самом деле, можно обнаружить широкий спектр вариантов вируса, инфицирующих одного и того же пациента. К сожалению, в большинстве случаев эти варианты приобретают новые механизмы, позволяющие избежать ответа иммунной системы хозяина [161]. Пациентов с резистентными ВИЧ-штаммами можно разделить на две категории: люди, получающие АРТ, которые приобретают лекарственную устойчивость, и люди,

инфицированные устойчивыми к АРТ штаммами. Среди людей, получающих АРТ, часто может развиться резистентность, вызванная неоптимальным медикаментозным лечением, что может привести к отбору устойчивых к терапии штаммов вирусов [203, 204]. Когда репликация вируса происходит в присутствии субоптимальных концентраций препарата, отбираются лекарственно-устойчивые штаммы, и их репликация в присутствии препарата может еще больше увеличить частоту мутаций вируса [203, 204]. За исключением приобретенной лекарственной устойчивости и передающейся устойчивости, вирусы с естественной лекарственной устойчивостью встречаются крайне редко, когда вирусы не подвергаются избирательному лекарственному давлению, особенно у нелеченных пациентов. Генетическая изменчивость ВИЧ-1 обусловлена ошибками в работе обратной транскриптазы ВИЧ-1 при рекомбинации, когда более одного вирусного варианта заражает одну и ту же клетку, и при накоплении провирусных вариантов в ходе инфекции [121, 194, 203, 204, 211].

Хотя большинство случаев ВИЧ-1 инфекции вызвано одним вирусным вариантом [229], бесчисленные варианты, связанные с первоначально переданным вирусом, появляются в течение нескольких недель после заражения [224, 229].

Часто существуют высокие уровни перекрестной устойчивости внутри каждого класса лекарств. Большинство мутаций лекарственной устойчивости в определенном классе антиретровирусных препаратов снижают восприимчивость к одному или нескольким антиретровирусным препаратам того же класса [218]. Напротив, вирусы с высоким уровнем лекарственной устойчивости к одному конкретному антиретровирусному классу, как правило, чувствительны к лекарствам, которые принадлежат к другому классу. Тем не менее, существует несколько случаев перекрестной устойчивости между классами лекарств. Недавно Sun и соавт. продемонстрировали распространенность перекрестной устойчивости к доравирину у ВИЧ-инфицированных пациентов, которые не прошли курс АРТ первой линии [255]. Устойчивость к доравирину была в значительной степени связана с устойчивостью к эфавирензу и невирапину и в умеренной степени с устойчивостью к этравирину и рилпивирину.

Несколько исследований недавно показали увеличение показателей первичной резистентности в различных географических районах [218, 276], и теперь перед началом АРТ у пациентов с ВИЧ-инфекцией рекомендуется проводить генотипическое тестирование на резистентность.

В эксперименте на культуре клеток, инфицированных диким и мутантным штаммами ВИЧ-1 показана антиретровирусная активность VMU-2012-05 - 50% ингибирующая концентрация (IC_{50}) в отношении дикого штамма ВИЧ-1 составляет 0,2 мкг/мл, подавление степени репродукции вирусного белка p24, оцененное методом ИФА, происходит при 1,1 мкг/мл, индекс селективности (IS) препарата (CC_{50} / IC_{50}) превышает 500. Установлено, что субстанция VMU-2012-05 в отличие от препарата сравнения эфавиренз, способна полностью подавлять репродукцию ВИЧ-1_{RES}, резистентного к препаратам класса ННИОТ. При концентрации VMU-2012-05, превышающей 0,01 мкг/мл, происходит ингибирование репродукции ВИЧ-1, действие которого наблюдается и на 11-е сутки культивирования. Для субстанции VMU-2012-05 выявлено 50% ингибирование вируса при концентрации, превышающей 0,04 мкг/мл. При 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. Таким образом, субстанция VMU-2012-05 проявляет антиретровирусную активность, зависимую от концентраций, 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.

Для дальнейшего доклинического токсикологического изучения были предоставлены образцы ЛФ VMU-2012-05 - таблетки в форме “облонг”, кремовые, двояковыпуклые с риской для деления, массой 400 мг, полученные АО НПО «Дом Фармации».

Доклинические токсикологические исследования являются ключевым этапом разработки оригинального лекарственного препарата с целью установления характера и выраженности повреждающего действия препарата на организм экспериментальных животных и оценки его безопасности.

Токсикологические исследования подразделяются на исследования общетоксического действия - токсичность при однократном и многократном введениях и исследования специфической токсичности - оценка аллергенности, иммунотоксичности, репродуктивной токсичности, мутагенности, канцерогенности. Токсикологическую оценку необходимо проводить для субстанции оригинального фармакологического вещества, а также для его ЛФ, оценивая вклад вспомогательных веществ в профиль безопасности препарата. Исследования проводят на нескольких видах животных, причем наряду с грызунами обязательно использовать не грызунов [71, 72].

Задачами исследований общетоксического действия являются:

- выявление переносимых и токсических доз фармакологического вещества;
- установление органов и систем организма, наиболее чувствительны к изучаемому фармакологическому веществу, определяется характер и степень патологических изменений;
- определение зависимости токсических эффектов от дозы и длительности применения фармакологического вещества и обратимости патологических изменений [71, 72].

В ходе исследований оцениваются интегральные, гематологические, биохимические, физиологические и патоморфологические показатели.

Токсичность при однократном введении (острая токсичность) представляет токсикометрическую характеристику фармакологического вещества или лекарственного препарата, выражающую его способность вызывать гибель животных при однократном введении или при введении через короткие (не более 6 часов) интервалы времени в течение суток [71, 72].

Целью изучения острой токсичности является определение переносимых, токсических и летальных доз фармакологического вещества и причин наступления гибели животных с анализом картины интоксикации, изучается на нескольких видах животных, обычно на двух, в том числе обязательно на том виде, который будет использоваться при исследовании токсичности при многократном введении. Полученные результаты должны адекватно обеспечить

возможность вычисления LD_{50} , что предполагает наличие среди изучаемых групп одной группы со 100% летальностью и одной, в которой гибель животных отсутствует. Если из-за низкой токсичности фармакологического вещества нельзя определить LD_{50} , следует указать максимальную дозу, которая была введена животным, но не менее 2000 мг/кг. Общая продолжительность наблюдения за животными должна составлять не менее 14 дней, причем в первый день после введения животные должны находиться под непрерывным наблюдением. Проведение данного вида исследований регламентируется протоколами OECD по тестированию химических веществ, например протоколом № 420 Острая токсичность при внутрижелудочном введении (метод фиксированных доз), руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств [71, 72], руководством токсичности фармакологических веществ с целью выявления пороговых доз (DRF-протокол) [49].

В экспериментах по изучению токсичности при однократном введении субстанции VMU-2012-05 и ЛС на ее основе на мышах и на крысах значение LD_{50} не было определено в связи с отсутствием гибели животных в максимальной исследованной дозе 2000 мг/кг. На основании полученных данных субстанция и ЛС отнесены 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).

Для сравнения значение LD_{50} субстанции эфавиренза при внутрижелудочном введении крысам составляет 419 мг/кг [56], а для невирапина у аналогичного вида животных при том же пути введения данное значение составляет 400 мг/кг [57].

Токсичность при многократном введении характеризует совокупность функциональных и/или морфологических нарушений органов и систем подопытного животного после повторного введения. Целью изучения хронических токсикологических исследований является характеристика повреждающего действия фармакологического вещества при его длительном

введении, выявление наиболее чувствительных органов и систем организма, а также исследование возможности обратимости вызываемых повреждений, поэтому в исследование необходимо включать дозу, при которой развиваются признаки интоксикации. Продолжительность введения препарата в доклинических исследованиях, целью которых является получение разрешения на проведение первой фазы клинических исследований, зависит от длительности планируемых клинических исследований. Оптимально использовать 2 дозы: ВТД ($ЭД_{50}$) и в 10 раз больше рекомендованной для клинических исследований. Группы отсроченного наблюдения необходимы для оценки обратимости наблюдаемых патологических изменений. Путь введения - аналогичный планируемому для клиники. Проведение данного вида исследований регламентируется протоколами по тестированию химических веществ OECD (Например, протокол 407 Хроническая 28 дневная токсичность при внутрижелудочном введении грызунам, протокол 452 Исследование хронической токсичности), руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств [48, 72] и т.д.

В ходе исследования хронической токсичности ЛС на основе VMU-2012-05 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 являются печень и органы мужской репродуктивной системы (семенники), однако изменения в этих органах были обнаружены только у одного вида животных (крысы) при введении препаратов в дозах, превышающих терапевтическую [261].

Таким образом, результаты оценки общих токсических свойств лекарственной формы лекарственного средства на основе VMU-2012-05 для лечения ВИЧ-1 инфекции продемонстрировали благоприятный профиль безопасности при приеме в терапевтических дозах.

Оценка генотоксических свойств является обязательным этапом доклинического исследования оригинальных лекарственных препаратов. Тестирование на генотоксическую активность преследует две цели: оценку

собственно генотоксичности и оценку потенциальной канцерогенности. По характеру изменения генотипа различают генные мутации (изменение гена), хромосомные (изменения хромосомы), генные (изменения числа хромосом), поэтому полное тестирование генотоксичности должно охватывать три конечные точки: мутации генов (мутагенность), структурные aberrации хромосом (кластогенность) и числовые хромосомные мутации (анеуплоидия), что предусматривает комплексное использование разных тестов. Для оценки способности вещества индуцировать генные мутации чаще всего используют *in vitro* тест Эймса, для оценки хромосомных изменений - *in vivo* тесты по учету хромосомных aberrаций в клетках костного мозга или учета микроядер в клетках костного мозга или периферической крови грызунов (протокол OECD 474 микроядерный тест в эритроцитах млекопитающих *in vivo*), для изучения влияния препарата на геномные повреждения - ДНК-комет тест *in vivo* (протокол OECD 489 Тест ДНК-комет в клетках млекопитающих *in vivo*). В соответствии с требованиями, изложенными в Руководстве по доклиническим исследованиям под редакцией Миронова А.Н. до начала фазы I клинических исследований в рамках изучения специфических видов токсичности ЛС проводится исследование их мутагенной активности и потенциальной канцерогенности в краткосрочных тестах. При получении отрицательных результатов во всех тестах или положительных результатов, по меньшей мере, в двух тестах выносится соответствующее заключение об отсутствии или наличии у ЛС генотоксичности и, соответственно, канцерогенного потенциала.

Результаты теста по учету микроядер в эритроцитах мышей при пятидневном внутрижелудочном введении ЛС на основе субстанции VMU-2012-05 в дозах 21 мг/кг (ВТД) и 210 мг/кг (10ВТД) показали, что препарат не обладает генотоксичностью. Отсутствие канцерогенного потенциала ЛС подтверждено результатами теста «ДНК-комет»: ежедневное внутрижелудочное введение тестируемого объекта самцам и самкам аутбредных крыс на протяжении 14 дней в дозах (1ВТД), 45 мг/кг (5 ВТД) и 90 мг/кг (10 ВТД) по действующему веществу не

оказало повреждающего действия на ДНК клеток костного мозга, печени, почек, селезенки и головного мозга [66].

Полученные в результате настоящей работы данные вошли в состав регистрационного досье на оригинальный отечественный препарат для лечения ВИЧ-инфекции. Исследованный препарат представляет интерес в качестве перспективного для разработки препарата прямого действия против ВИЧ-1, в том числе, против резистентных к эфавиренз штаммов ВИЧ-1, так как этот препарат обладает низкой токсичностью и высокой противовирусной активностью в отношении «дикого» и резистентного штаммов ВИЧ-1, что является неоспоримым преимуществом перед существующими препаратами класса ННИОТ. Благоприятный профиль безопасности лекарственного кандидата и убедительные данные по фармакодинамике свидетельствуют о целесообразности дальнейшей разработки и получения разрешения на проведение клинических исследований препарата.

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 (ЛД₅₀ 500-5000 мг/кг при однократном в/ж введении), к 3 классу умеренно токсичных веществ по ГОСТ 12.1.007–76 (ЛД₅₀ 151-5000 мг/кг при в/ж введении) и к 5 классу опасности по классификации GHS OECD (ЛД₅₀ 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). Выявлены основные мишени токсического действия препарата - органы мужской репродуктивной системы и печень. Вместе с тем, 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 субстанции, разработаны методики контроля качества и спецификации на субстанцию и ЛС. 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 мутантным 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 и изучения стабильности.

Полученные в ходе проделанной работы результаты и разработанные на их основе документы легли в основу регистрационного досье на оригинальный отечественный препарат для лечения ВИЧ-инфекции.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АЛТ	– аланинаминотрансфераза
АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ»	Акционерное общество «Научно-производственное объединение «Дом Фармации»
АРТ	- антиретровирусная терапия
АСТ	– аспаратаминотрансфераза
АФС	- активная фармацевтическая субстанция
АЧТВ	- активированное частичное тромбопластиновое время
БЭК	- биоэтическая комиссия
ВААРТ	- высокоактивная антиретровирусная терапии
ВИЧ	- вирус иммунодефицита человека
ВОЗ (WHO)	- Всемирная организация здравоохранения
ВТД	- высшая терапевтическая доза
ВЭЖХ	- высокоэффективная жидкостная хроматография
ВЭЖХ-МС	- высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-селективным детектированием
ВЭЖХ-УФ	- высокоэффективная жидкостная хроматография с ультрафиолетовым детектированием
ГОСТ	- государственный стандарт
ГФ	- Государственная фармакопея
ГХ	- газовая хроматография
ДМСО	- диметилсульфоксид
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
ЕАЭС	- Евразийский экономический союз
ЕЭК	- Евразийская экономическая комиссия
ЖКТ	– желудочно-кишечный тракт
ИИ	– ингибиторы интегразы
ИП	– ингибиторы протеазы

ИПТГ	- изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид
ИФА	- иммуноферментный анализ
КЭФ	- капиллярный электрофорез
ЛД ₅₀	– средняя летальная доза, вызывающая гибель 50% экспериментальных животных
ЛС	– лекарственное средство
ЛФ	– лекарственная форма
МНК	- метод наименьших квадратов
МПК	– моноклеары периферической крови
МС	- масс-спектрометр (масс-спектрометрия)
МТГ	- тетразолиевый краситель (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид)
МТТ-тест (метод)	- колориметрический тест для оценки метаболической активности клеток
НИОТ	- нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы
ННИОТ	- ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы
НХЭ	- нормохроматофилы
ОТ	- обратная транскриптаза
ОФС	– общая фармакопейная статья
ПВ	- протромбиновое время
ПКО	- предел количественного определения
ПО	- предел обнаружения
ПХЭ	- полихроматофилы
РНК	- рибонуклеиновая кислота
СО	- стандартный образец
СПИД	- синдром приобретенного иммунодефицита
ТД	– терапевтическая доза
ТСID ₅₀	(англ. median tissue culture infective dose) тканевая цитопатогенная доза, вызывающая гибель 50% клеток монослоя

УФ	- ультрафиолет
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»	- Федеральное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора
Роспотребнадзора	
ФГБОУ ВО ВолгГМУ	- Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации
Минздрава России	
ФГБУН ИМБ им. В.А. Энгельгардта РАН	- Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук
ФС	- фармацевтическая субстанция
ЧСС	- частота сердечных сокращений
ЩФ	- щелочная фосфатаза
ЭД ₅₀	- средняя эффективная доза, которая обеспечивает требуемый результат у 50% экспериментальных животных
ЭДТА	- этилендиаминтетрауксусная кислота
ЭКГ	- электрокардиография
ЭМС	- этилметансульфонат
ЯМР	- ядерный магнитный резонанс
3Rs	–(англ. Replacement, Reduction и Refinement) замена, уменьшение, уточнение – руководящие принципы этического обращения с животными
ANOVA	- (англ. analysis of variance) однофакторный дисперсионный анализ
CC ₅₀	– (англ. median cytotoxic concentration) концентрация, при которой наблюдается гибель 50% клеток
GHS	- (англ. globally Harmonized System) согласованная на

глобальном уровне система классификации и маркировки химических веществ

- GLP – (англ. good laboratory practice) надлежащая лабораторная практика
- GMP - (англ. good manufacturing practice) надлежащая производственная практика)
- IC₅₀ – (англ. median inhibitory concentration) концентрация, при которой вещество оказывает половину своего максимального ингибирующего действия
- ICH (англ. The International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) Международная конференция по гармонизации требований к регистрации лекарственным средствам для медицинского применения
- IS - (англ. selectivity index) индекс селективности
- IUPAC - (англ. International Union of Pure and Applied Chemistry) Международный союз теоретической и прикладной химии
- mAU – (англ. milli absorbance unit) одна тысячная единицы поглощающей способности
- NOAEL - (англ. No-Observed-Adverse-Effect Level) уровень не наблюдаемых побочных эффектов
- OECD - (англ. Organisation for Economic Co-operation and Development) Организация экономического сотрудничества и развития
- RRT – (англ. relative retention time) относительное время удерживания
- UNAIDS - (англ. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS) Объединённая программа Организации Объединённых Наций по ВИЧ/СПИД

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Российская Федерация. Законы. Об обращении лекарственных средств : Федеральный закон № 61-ФЗ : [принят Государственной думой 24 марта 2010 года : одобрен Советом Федерации 31 октября 2010 года] // Российская газета : офиц. сайт. URL: <https://rg.ru/documents/2010/04/14/lekarstva-dok.html/> (дата обращения: 16.02.2023).
2. ГОСТ 32296-2013. Методы испытаний по воздействию химической продукции на организм человека. Основные требования к проведению испытаний по оценке острой токсичности при внутрижелудочном поступлении методом фиксированной дозы : межгосударственный стандарт : утвержден и введен в действие приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 22 ноября 2013 г. № 795-ст : введен впервые : дата введения 2014-08-01 // Кодекс : электрон. фонд правовой и норматив.-техн. информ. URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200111000> (дата обращения 16.02.2023).
3. ГОСТ 32644-2014. Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Острая пероральная токсичность – метод определения класса острой токсичности : межгосударственный стандарт : утвержден и введен в действие приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 24 сентября 2014 г. № 1214-ст : введен впервые : дата введения 2015-06-01 // Кодекс : электрон. фонд правовой и норматив.-техн. информ. URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200115815> (дата обращения 16.02.2023).
4. ГОСТ 33044-2014. Принципы надлежащей лабораторной практики : межгосударственный стандарт : утвержден и введен в действие приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 20 ноября 2014 г. № 1700-ст : введен впервые : дата введения 2015-08-01 // Кодекс : электрон. фонд правовой и норматив.-техн. информ. URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200115791> (дата обращения 16.02.2023).

5. ГОСТ Р 52249-2009. Правила производства и контроля качества лекарственных средств : национальный стандарт Российской Федерации : утвержден и введен в действие приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 20 мая 2009 г. № 159-ст : взамен ГОСТ Р 52249-2004 : дата введения 2010-01-01 // Кодекс : электрон. фонд правовой и норматив.-техн. информ. URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200071754> (дата обращения 16.02.2023).
6. Патент № 2489427 Российская Федерация, МПК А61К 31/513 А61Р 31/18 С07D 239/54 С07D 239/553 Пиримидиновые производные бензофенона, обладающие анти-ВИЧ-1 активностью : заявл. 18.07.2012 : опубл. 10.08.2013 / Петров В. И., Озеров А. А., Луганченко А. И. // Яндекс.Патенты : 1 з.п. ф-лы : 3 табл., 3 пр. URL: https://patents.s3.yandex.net/RU2489427C1_20130810.pdf (дата обращения 16.02.2023).
7. Валидация аналитических методик (ОФС.1.1.0012.15) : Общая фармакопейная статья : утверждена приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 29 октября 2015 г. № 771 : введена впервые : дата введения 2016-01-01 // Кодекс : электрон. фонд правовой и норматив.-техн. информ. URL: <https://docs.cntd.ru/document/554031180> (дата обращения 16.02.2023). Режим доступа: для зарегистрир. пользователей.
8. Специализированный научно-исследовательский отдел по профилактике и борьбе со СПИДом ФБУН Центрального НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора. ВИЧ-инфекция в Российской Федерации на 31 декабря 2021 г. // Федеральный научно-методический Центр по профилактике и борьбе со СПИДом : офиц. сайт. – URL: <http://www.hivrussia.info/wp-content/uploads/2022/03/Spravka-VICH-v-Rossii-na-31.12.2021-g..pdf> (дата обращения 16.02.2023).
9. Российская Федерация. Министерство здравоохранения. Клинические рекомендации : ВИЧ-инфекция у взрослых - 2020 : утверждены Минздравом РФ 16 декабря 2021 г. // Министерство здравоохранения Российской Федерации

- Федерации : офиц. сайт. – URL: https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/79_1 (дата обращения 16.02.2023).
10. Всемирная организация здравоохранения. ВИЧ // Всемирная организация здравоохранения : офиц. сайт. – URL: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids> (дата обращения 16.02.2023).
11. Высокоэффективная жидкостная хроматография (201010028-2019) : Общая фармакопейная статья : утверждена Решением Коллегии Евразийской экономической комиссии от 11 августа 2020 г. № 100 // ЗДРАВМЕД-ИНФОРМ.РУ: Справочник по здравоохранению и медицине : официальный сайт. – URL: <https://zdravmedinform.ru/farmakopeia-evrazes/2.1.2.28.html> (дата обращения 16.02.2023).
12. Высокоэффективная жидкостная хроматография (ОФС.1.2.1.2.0005.15) : Общая фармакопейная статья : утверждена приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 31 октября 2018 года № 749 : взамен ст. ГФ XI : дата введения 2018-01-12 // Кодекс : электрон. фонд правовой и норматив.-техн. информ. URL: <https://docs.cntd.ru/document/554031235> (дата обращения 16.02.2023). – Режим доступа : для зарегистрир. пользователей.
13. Газовая хроматография (201020027-2019) : Общая фармакопейная статья : утверждена Решением Коллегии Евразийской экономической комиссии от 11 августа 2020 г. № 100 // СудАкт: судебные и нормативные акты РФ. URL: https://sudact.ru/law/reshenie-kollegii-evraziiskoi-ekonomicheskoi-komissii-ot-11082020_5/farmakopeia/2/2.1/2.1.2/2.1.2.27/ (дата обращения 16.02.2023).
14. Газовая хроматография (ОФС.1.2.1.2.0004.20) : Общая фармакопейная статья : утверждена приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 15 декабря 2020 года № 1332 : взамен ст. ГФ XI : дата введения : 2020-20-12 // Кодекс : электрон. фонд правовой и норматив.-техн. информ. URL: <https://docs.cntd.ru/document/573324784> (дата обращения 16.02.2023). Режим доступа: для зарегистрир. пользователей.

15. ЮНЕЙДС. Информационный бюллетень - глобальная статистика по ВИЧ // UNAIDS : офиц. сайт. URL: <https://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet> (дата обращения 16.02.2023).
16. ЮНЕЙДС. Глобальная стратегия по СПИДу на 2021-2026 годы. Ликвидировать неравенство. Покончить со СПИДом // UNAIDS : офиц. сайт. URL: https://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/global-AIDS-strategy-2021-2026_ru.pdf (дата обращения 16.02.2023).
17. Директива Европейского парламента и Совета Европейского Союза 2010/63/ЕС от 22 сентября 2010 г. о защите животных, используемых для научных целей // ГАРАНТ.РУ: информационно-правовой портал. URL: <https://base.garant.ru/70350564/> (дата обращения 16.02.2023).
18. Российская Федерация. Министерство здравоохранения. Заявление Минздрава России относительно серии публикаций о ситуации с ВИЧ (08.12.2022 г.) // Министерство здравоохранения Российской Федерации : официальный сайт. URL: <https://minzdrav.gov.ru/news/2022/12/08/19630-zayavlenie-minzdrava-rossii-otnositelno-serii-publikatsiy-o-situatsii-s-vich> (дата обращения 16.02.2023).
19. ЮНЕЙДС. Информационный бюллетень - глобальная статистика по ВИЧ // UNAIDS : офиц. сайт. URL: https://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/UNAIDS_FactSheet_ru.pdf (дата обращения 16.02.2023).
20. ЮНЕЙДС. Координационный совет программы ЮНЭЙДС принял новую Глобальную стратегию по СПИДу, которая прокладывает путь к искоренению СПИДа к 2030 году // UNAIDS : – офиц. сайт. URL: https://www.unaids.org/ru/resources/presscentre/pressreleaseandstatementarchive/2021/march/20210325_new-global-aids-strategy (дата обращения 16.02.2023).
21. Масс-спектрометрия (201020051-2022) : Общая фармакопейная статья : утверждена Решением Коллегии Евразийской экономической комиссии от 11 августа 2020 г. № 100 // СудАкт : судебные и нормативные акты РФ. URL:

- https://sudact.ru/law/reshenie-kollegii-evraziiskoi-ekonomicheskoi-komissii-ot-11082020_5/farmakoreia/2/2.1/2.1.2/2.1.2.51/ (дата обращения 16.02.2023).
22. Масс-спектрометрия (ОФС.1.2.1.1.0008.15) : Общая фармакопейная статья : утверждена приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 29 октября 2015 г. № 771 : введена впервые : дата введения 2016-01-01 // Кодекс : электрон. фонд правовой и норматив.-техн. информ. URL: <https://docs.cntd.ru/document/554031217> (дата обращения 16.02.2023). Режим доступа: для зарегистрир. пользователей.
23. Российская Федерация. Министерство здравоохранения и социального развития. Методические рекомендации. Анализ эпидемиологической ситуации по ВИЧ-инфекции и сопутствующим заболеваниям (туберкулез, ИППП, гепатиты) : утверждены приказом Минздравсоцразвития РФ 20.09.2007 N 6964-РХ // Е-Досье : база нормативных и законодательных актов. URL: https://e-ecolog.ru/docs/SQod4CjIP131xiJtldeh_ (дата обращения 16.02.2023).
24. Микробиологическая чистота (ОФС.1.2.4.0002.18) : Общая фармакопейная статья : утверждена приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 31 октября 2018 г. № 749 : взамен ОФС 1.2.4.0002.15 : дата введения 2018-01-12 // Кодекс : электрон. фонд правовой и норматив.-техн. информ. URL: <https://docs.cntd.ru/document/554031282> (дата обращения 16.02.2023). Режим доступа: для зарегистрир. пользователей.
25. Стандартные образцы (ОФС.1.1.0007.18) : Общая фармакопейная статья : утверждена приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 31 октября 2018 г. № 749 : взамен ст. ГФ XI, вып.2 : дата введения 2018-01-12 // Е-ДОСЬЕ : база нормативных и законодательных актов. URL: https://e-ecolog.ru/docs/i1SAF4PopsePGDpTLcOJ_ (дата обращения 16.02.2023).
26. Определение воды (ОФС.1.2.3.0002.15) : Общая фармакопейная статья : утверждена приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 31 октября 2018 г. № 768 : взамен ст. ГФ X, ст. ГФ XI, вып. 1 : дата введения : 2016-01-01 // Кодекс : электрон. фонд правовой и норматив.-техн. информ.

- URL: <https://docs.cntd.ru/document/554031255?ysclid=lmorxbuntg523172949>
(дата обращения 16.09.2023). Режим доступа: для зарегистрир. пользователей.
27. Остаточные органические растворители (ОФС.1.1.0008.15) : Общая фармакопейная статья : утверждена приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 31 октября 2018 г. № 749 : взамен ГФ XII, ч. 1, ОФС 42-0057-07 : дата введения : 2018-01-12 // Кодекс : электрон. фонд правовой и норматив.-техн. информ. URL: <https://docs.cntd.ru/document/420324468?ysclid=lmos0lug5g186722153> (дата обращения 16.09.2023). Режим доступа: для зарегистрир. пользователей.
28. Оценка социально-экономических потерь общества от эпидемии ВИЧ/СПИД в России. Доклад аналитического центра при правительстве Российской Федерации / Н. А. Николаева, Н. Н. Ладная, Д. В. Помазкин, А. А. Блохин // ИТРС ЕЕСА : Международная коалиция по готовности к лечению : офиц. сайт. URL: https://itpcru.org/wp-content/uploads/2021/03/doklad_oczenka_socz_ek_poter_ot_vich_v_rossii_final-290121_91013.pdf (дата обращения 16.02.2023).
29. Российская Федерация. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор) : постановление Главного государственного санитарного врача РФ от 29 августа 2014 г. № 51 // Роспотребнадзор : официальный сайт. URL: https://www.rospotrebnadzor.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=3521 (дата обращения 16.02.2023).
30. Российская Федерация. Федеральное государственное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения Росздравнадзора» : Правила составления, изложения и оформления стандартов качества на фармацевтические субстанции: Метод. рекомендации // www.fptl.ru : факультет Промышленной Технологии Лекарств СПХФА : сайт. – URL: <http://www.fptl.ru/biblioteka/razrabotka-i-ekspertiza-LS/pravila-sostavleniya-ND-na-farmaceuticheskie-substancii-2009.pdf> (дата обращения 16.02.2023).

31. Раздел Свойства в частных фармакопейных статьях (203060000-2019) :
Общая фармакопейная статья : утверждена Решением Коллегии Евразийской
экономической комиссии от 11 августа 2020 г. № 100 // СудАкт : судебные и
нормативные акты РФ. URL: https://sudact.ru/law/reshenie-kollegii-evraziiskoi-ekonomicheskoi-komissii-ot-11082020_5/farmakopeia/2/2.3_1/2.3.1_1/2.3.6.0/
(дата обращения 16.02.2023).
32. Растворимость (ОФС.1.2.1.0005.15): общая фармакопейная статья :
утверждена приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации
от 31 октября 2018 г. № 749 : взамен ГФ X, ГФ XII, ч. 1, ОФС 42-0049-07 : дата
введения 2018-01-12 // Кодекс : электрон. фонд правовой и норматив.-техн.
информ. URL: <https://docs.cntd.ru/document/554031196> (дата обращения
16.02.2023).
33. Коллегия Евразийской экономической комиссии. Рекомендация от 22
декабря 2020 г. № 26 : О руководстве по разработке и производству активных
фармацевтических субстанций // СудАкт : судебные и нормативные акты РФ.
URL: https://sudact.ru/law/rekomendatsiia-kollegii-evraziiskoi-ekonomicheskoi-komissii-ot-22122020_7/rekomendatsiia/ (дата обращения 16.02.2023).
34. Коллегия Евразийской экономической комиссии. Решение от 17.07.2018 г. №
113 : Об утверждении Руководства по валидации аналитических методик
проведения испытаний лекарственных средств // СудАкт : судебные и
нормативные акты РФ. URL: https://sudact.ru/law/reshenie-kollegii-evraziiskoi-ekonomicheskoi-komissii-ot-17072018_3/ (дата обращения 16.02.2023).
35. Совет Евразийской экономической комиссии. Решение от 07.09.2018 г. №
151 (ред. от 04.10.2022) : Об утверждении Руководства по составлению
нормативного документа по качеству лекарственного препарата // СудАкт :
судебные и нормативные акты РФ. URL: https://sudact.ru/law/reshenie-kollegii-evraziiskoi-ekonomicheskoi-komissii-ot-07092018_6/ (дата обращения
16.02.2023).
36. Совет Евразийской экономической комиссии. Решение от 3 ноября 2016 г. №
81 : Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики

- Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств // Таможенный портал для участников ВЭД : Альта софт. URL: <https://www.alt.ru/tamdoc /16sr0081/> (дата обращения 16.02.2023).
37. Российская Федерация. Федеральная служба государственной статистики : Российский статистический ежегодник 2022 // Росстат : официальный сайт. URL: https://rosstat.gov.ru/storage/mediabank/Ejegovodnik_2022.pdf (дата обращения 16.02.2023).
38. Спектрометрия в инфракрасной области (ОФС.1.2.1.1.0002.15) : Общая фармакопейная статья : утверждена приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 31 октября 2018 г. № 771 : взамен ГФ X, ст. ГФ XI, вып. 1, ГФ XII, ч.1, ОФС 42-0043-07 : дата введения 2016-01-01 // Кодекс : электрон. фонд правовой и норматив.-техн. информ. URL: <https://docs.cntd.ru/document/554031214> (дата обращения 16.02.2023). Режим доступа: для зарегистрир. пользователей.
39. Сульфатная зола (201040014-2019) : Общая фармакопейная статья : утверждена Решением Коллегии Евразийской экономической комиссии от 11 августа 2020 г. № 100 // СудАкт: судебные и нормативные акты РФ. URL: https://sudact.ru/law/reshenie-kollegii-evraziiskoi-ekonomicheskoi-komissii-ot-11082020_5/farmakoreia/2/2.1/2.1.4/2.1.4.14/ (дата обращения 16.02.2023).
40. Сульфатная зола (ОФС.1.2.2.2.0014.15) : Общая фармакопейная статья : утверждена приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 31 октября 2018 г. № 377 : взамен ОФС.1.2.2.2.0014.15 : дата введения 2023-01-09 // Кодекс : электрон. фонд правовой и норматив.-техн. информ. URL: <https://docs.cntd.ru/document/554031253> (дата обращения 16.02.2023). Режим доступа: для зарегистрир. пользователей.
41. Температура плавления – капиллярный метод (201020014-2019). Фармакопея Евразийского экономического союза, утверждена Решением Коллегии Евразийской экономической комиссии от 11 августа 2020 г. № 100 // Судебные и нормативные акты РФ : официальный сайт. – URL: <https://sudact.ru/law/reshenie-kollegii-evraziiskoi-ekonomicheskoi-komissii-ot->

- 11082020_5/farmakoreia/2/2.1/2.1.2/2.1.2.14/ (дата обращения 16.02.2023). – Режим доступа : свободный.
42. Температура плавления (ОФС.1.2.1.0011.15) : Общая фармакопейная статья : утверждена приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 29 октября 2015 г. № 771 : взамен ГФ X, ст. ГФ XI вып. 1, ГФ XII, ч. 1, ОФС 42-0034-07 : дата введения 2016-01-01 // Кодекс : электрон. фонд правовой и норматив.-техн. информ. URL: <https://docs.cntd.ru/document/554031197> (дата обращения 16.02.2023). Режим доступа: для зарегистрир. пользователей.
43. Требования к микробиологической чистоте лекарственных препаратов, фармацевтических субстанций и вспомогательных веществ для их производства (203010002-2022) : Общая фармакопейная статья : утверждена Решением Коллегии Евразийской экономической комиссии от 11 августа 2020 г. № 100 // СудАкт : судебные и нормативные акты РФ. URL: https://sudact.ru/law/reshenie-kollegii-evraziiskoi-ekonomicheskoi-komissii-ot-11082020_5/farmakoreia/2/2.3_1/2.3.1_1/2.3.1.2_1/ (дата обращения 16.02.2023).
44. Тяжелые металлы, метод 1 (201040008-2019): Общая фармакопейная статья : утверждена Решением Коллегии Евразийской экономической комиссии от 11 августа 2020 г. № 100 // СудАкт : Судебные и нормативные акты РФ. URL: https://sudact.ru/law/reshenie-kollegii-evraziiskoi-ekonomicheskoi-komissii-ot-11082020_5/farmakoreia/2/2.1/2.1.4/2.1.4.8/ (дата обращения 16.02.2023).
45. Тяжелые металлы, метод 1 (ОФС.1.2.2.2.0012.15) : Общая фармакопейная статья : утверждена приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 31 октября 2018 г. № 771 : взамен ГФ X, ГФ XI, вып. 1, ГФ XII, ч. 1, ОФС 42-0059-07 : дата введения 2016-01-01 // Кодекс : электрон. фонд правовой и норматив.-техн. информ. URL: <https://docs.cntd.ru/document/554031254> (дата обращения 16.02.2023). Режим доступа: для зарегистрир. пользователей.
46. Международный совет по гармонизации технических требований к лекарствам для медицинского применения. Гармонизированное руководство ICH : Управление рисками для качества Q9(R1) : принято 18 января 2023 г. //

- PharmAdvisor : библиотека нормативно-правовых актов. URL: <https://pharmadvisor.ru/document/tr3660/?fbclid=IwAR1K7k1rJOa-F74rXhqlOpaXMmth5WbdjoaEby6WF1aFuIbDTvsEuyo-xd8> (дата обращения 16.02.2023).
47. Фармацевтические субстанции (ОФС.1.1.0006.15) : Общая фармакопейная статья : утверждена приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 31 октября 2018 г. № 771 : взамен ГФ XII, ч. 1, ОФС42-0074-07 : дата введения 2016-01-01 // Кодекс : электрон. фонд правовой и норматив.-техн. информ. URL: <https://docs.cntd.ru/document/554031173?ysclid=lmosfwo7xa771488143> (дата обращения 16.02.2023). Режим доступа: для зарегистрир. пользователей.
48. United States Environmental Protection Agency. Health Effects Test Guidelines : OPPTS 870.4100 Chronic Toxicity, ICH - S4 : дата введения август 1998 г. // US EPA : Агентство США по охране окружающей среды : официальный сайт. URL: <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyNET.exe/P100IRTR.TXT?ZyActionD=ZyDocument&Client=EPA&Index=1995+Thru+1999&Docs=&Query=&Time=&EndTime=&SearchMethod=1&TocRestrict=n&Toc=&TocEntry=&QField=&QFieldYear=&QFieldMonth=&QFieldDay=&IntQFieldOp=0&ExtQFieldOp=0&XmlQuery=&File=D%3A%5Czyfiles%5CIndex%20Data%5C95thru99%5CTxt%5C00000034%5CP100IRTR.txt&User=ANONYMOUS&Password=anonymous&SortMethod=h%7C-&MaximumDocuments=1&FuzzyDegree=0&ImageQuality=r75g8/r75g8/x150y150g16/i425&Display=hpfr&DefSeekPage=x&SearchBack=ZyActionL&Back=ZyActionS&BackDesc=Results%20page&MaximumPages=1&ZyEntry=1&SeekPage=x&ZyPURL> (дата обращения 16.02.2023).
49. U.S. Food and Drug Administration. FDA Guideline for Industry Toxicokinetics: The Assessment of Systemic Exposure in Toxicity Studies и ICH - M4S : дата введения май 2018 г. // FDA : Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств Департамента по здравоохранению и

- социальному обслуживанию США : офиц. сайт. URL: <https://www.fda.gov/media/100027/download> (дата обращения 16.02.2023).
50. OECD. Guideline for testing of chemicals : Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure No 420 : введено 17 декабря 2001 г. // OECD-library : информационный ресурс Организации экономического сотрудничества и развития. URL: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-420-acute-oral-toxicity-fixed-dose-procedure_9789264070943-en (дата обращения 16.02.2023).
51. WHO. European Centre for Disease Prevention and Control : HIV/AIDS surveillance in Europe 2022-2021 data // ECDC : Всемирная организация здравоохранения, Европейский центр по контролю и предотвращению заболеваний : официальный сайт. URL: https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/2022-Annual_HIV_Report_final.pdf (дата обращения 16.02.2023).
52. hivinfo.nih.gov : информационный ресурс США о ВИЧ/СПИД. - URL: <https://hivinfo.nih.gov/home-page> (дата обращения 16.02.2023).
53. OECD. Guideline for testing of chemicals : Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure No 420 : введено 17 декабря 2001 г. // National Toxicology Program, U.S. Department of Health and Human Services : официальный сайт. URL: https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocus/oecd/oecd_gl420.pdf (дата обращения 16.02.2023).
54. OECD. Guideline for the testing of chemicals : Test № 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus test : введено 29 июля 2016 г. // OECD-library : информационный ресурс Организации экономического сотрудничества и развития. URL: <https://www.oecd.org/env/test-no-474-mammalian-erythrocyte-micronucleus-test-9789264264762-en.htm> (дата обращения 16.02.2023).
55. OECD. Guideline for the testing of chemicals : Test № 489: In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay : введено 29 июля 2016 г. // OECD-library : информационный ресурс Организации экономического сотрудничества и развития. URL: <https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-489-in-vivo>

- mammalian-alkaline-comet-assay_9789264264885-en (дата обращения 16.02.2023).
56. Merck & Co. SAFETY DATA SHEET : Efavirenz Solid Formulation // Фармацевтическая компания «Merck» : официальный сайт. URL: https://www.merck.com/docs/product/safety-data-sheets/hh-sds/Efavirenz%20Solid%20Formulation_HH_US_EN.pdf (дата обращения 16.02.2023).
57. SDS.chemicalsafety.com. SAFETY DATA SHEET : Nevirapine // ChemicalSafety : база данных паспортов безопасности лекарственных средств. URL: <https://sds.chemicalsafety.com/sds/pda/msds/getpdf.ashx?action=msdsdocument&auth=200C200C200C200C2008207A200D2078200C200C200C200C200C200C200C2008¶m1=ZmRwLjFfNDUwNzgxMjNORQ==&unique=1680543431&session=0d868cbe86c59c870ec796ac744d9ce6&hostname=62.117.109.179> (дата обращения 16.02.2023).
58. WHO.int/ru : русскоязычный информационный ресурс Всемирной организации здравоохранения // who.int/ru : офиц. сайт. - URL: <https://www.who.int/ru/> (дата обращения 16.02.2023).
59. Физиологические, биохимические и биометрические показатели нормы экспериментальных животных : справочник / Т. В. Абрашова, Я. А. Гуцин, М. А. Ковалева [и др.] ; под. редакцией В. Г. Макарова, М. Н. Макаровой. – Санкт-Петербург : ЛЕМА, 2013. – 116 с. – ISBN 978-5-98709- 619-2. – Текст : непосредственный.
60. Бартлетт, Дж. Клинические аспекты ВИЧ-инфекции / Дж. Бартлетт, Дж. Галлант, П. Фам. – Москва : Р. Валент, 2010. – 490 с. – ISBN 978-5-93439-298-8. – Текст : непосредственный.
61. ВИЧ-инфекция: алгоритм формирования развернутого клинического диагноза / Н. А. Беляков, В. В. Рассохин, Е. В. Степанова [и др.] // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. – 2018. – Т. 10. – № 1. – С. 7-24.

62. Моделирование и общие закономерности циркуляции субтипов и рекомбинантных форм ВИЧ / Н. А. Беляков, В. В. Розенталь, Н. Е. Дементьева [и др.] // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. – 2012. – Т. 4. – № 2. – С. 7-18.
63. Бобкова, М.Р. История и некоторые результаты генотипирования ВИЧ в России / М.Р. Бобкова // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. – 2015. – Т. 4. – № 7. – С. 7-16.
64. Бобкова, М.Р. Лекарственная устойчивость ВИЧ / М.Р. Бобкова ; – Москва : Человек, 2014. – 288 с. – ISBN 978-5-906131-42-3. Текст : непосредственный.
65. Валуев-Эллистон, В. Т. Новые ингибиторы обратной транскриптазы ВИЧ-1 на основе производных пиримидинов : специальность 03.01.03 «Молекулярная биология» : диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Валуев-Эллистон Владимир Треворович ; ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук. – Москва, 2016. – 153 с.
66. Исследование специфических видов токсичности оригинального нуклеозидного 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) [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2021. Т. 66. – № 4. – С. 279-288.
67. Анализ лекарственной устойчивости ВИЧ / Л. А. Грезина, Н. Е. Дементьева, Н. Н. Зайцева [и др.] // Лабораторная служба. – 2017. – Т. 6. – № 3. – С. 217-237.
68. Дементьева, Н. Е. Анализ субтипов и фармакорезистентных вариантов ВИЧ, циркулирующих среди ВИЧ-инфицированных пациентов Санкт-Петербурга / Н. Е. Дементьева, Н. В. Сизова, З. Н. Лисицына // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. – 2011. – Т. 3. – № 4. – С. 34-44.

69. Проблемы субтипирования ВИЧ-1 на основе анализа гена *pol* и способы их разрешения / Е. В. Казеннова, И. А. Лаповок, А. В. [и др.] // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. – 2010. – Т. 2. – № 3. – С. 42-48.
70. Российская Федерация. Министерство здравоохранения. Клинические рекомендации «ВИЧ-инфекция у взрослых» : утверждены в 2020 г. // СудАкт : Судебные и нормативные акты РФ. URL: https://sudact.ru/law/klinicheskie-rekomendatsii-vich-infektsiia-u-vzroslykh-utv-minzdravom_1/klinicheskie-rekomendatsii/ (дата обращения 16.02.2023)
71. Миронов, А.Н. Руководство по доклиническим исследованиям лекарственных средств. Т. 1 / А.Н. Миронов – М.: ФГБУ «НЦЭСМП», 2012. – 942 с. – Текст : непосредственный.
72. Миронов, А. Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / А. Н. Миронов, Н. Д. Бунатян, А. Н. Васильев ; под редакцией А. Н. Миронова. – М.: Гриф и К, 2012. – 944 с. – ISBN 978-5-. – Текст : непосредственный.
73. Новые N-[2-(Бензоилфенокси) этил] производные нуклеиновых оснований-синтез и анти-ВИЧ-1 активность *in vitro* / А. А. Озеров, М. С. Новиков, А. И. Луганченко [и др.] // Волгоградский научно-медицинский журнал. – 2012. – № 4. – С. 15-18.
74. Пиримидиновые ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы ВИЧ-1 - история разработки и перспективы / А. А. Озеров, М. С. Новиков, Ю. А. Тимофеева [и др.] // Вестник ВолгГМУ. – 2012. – № 3. – С. 10-17.
75. Синтез и анти-ВИЧ-1 активность 1-[ω -(фенокси)алкил- и алкенил]производных урацила / М. П. Парамонова, Д. А. Бабков, В. Т. Валуев-Эллистон [и др.] // Хим.-фарм. журн. – 2013. – Т. 47. – № 9. – С. 30-34.
76. Кластерный подход к созданию биотехнологических лекарственных средств / В. И. Петров, М. С. Новиков, А. И. Луганченко [и др.] // Медицинская этика. – 2014. – № 1. – С. 28–31.
77. Дизайн новых производных урацила, обладающих ингибиторной активностью в отношении обратной транскриптазы мутанта K103N/Y181C

- ВИЧ-1 / С. В. Печинский, А. А. Озеров, А. Г. Курегян, М. С. Новиков // Хим.-фарм. журн. – 2015. – Т. 49. – № 10. – С. 40-43.
78. Покровский, В.В. Избранные лекции по ВИЧ-инфекции. Часть 2. / под редакцией В.В. Покровского. — Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2016. – 328 с. – ISBN 978-5-9704-3662-2. – Текст : непосредственный.
79. Лекции по ВИЧ-инфекции / под ред. В. В. Покровского. – 2-е изд., перераб. и доп. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2018. – 848 с. : ил. – ISBN 978-5-9704-4374-3. – Текст : непосредственный.
80. Формирование резистентности к высокоактивной антиретровирусной терапии у ВИЧ-инфицированных пациентов / А. Г. Рахманова, Н. Г. Захарова, С. Э. Торопов [и др.] // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. – 2012. – Т. 4. – № 2. – С. 55-63.
81. Фармацевтические субстанции. Требования Государственной фармакопеи к их стандартизации / Е. И. Саканян, Т. Б. Шемерянкина, А. В. Бармин [и др.] // Антибиотики и химиотерапия. – 2017. – Т. 62. – № 5-6. – С. 63-67.
82. Количественное определение нового производного аденина, обладающего противовирусной активностью / Л. А. Смирнова, Е. А. Сучков, А. Ф. Рябуха [и др.] // Хим.-фарм. журн. – 2014. – Т. 48. – № 11. – С. 54-56.
83. Синтез и количественное определение 1-[2-(2-бензоилфенокс) этил]-6-метилурацила методом спектрофотометрии / Ю. В. Сысуева, А. И. Луганченко, Г. Н. Солодунова, А. А. Озеров // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2015. – № 8-1. – С. 113-115.
84. Nature, position, and frequency of mutations made in a single cycle of HIV-1 replication / M. E. Abram, A. L. Ferris, W. Shao [et al.] // Journal of virology. – 2010. – Vol. 84. – № 19. – P. 9864-9878.
85. Molecular epidemiology of HIV-1 subtype A in former Soviet Union countries / L. Aibekova, B. Foley, G. Hortelano [et al.] // PLoS One. – 2018. – Vol. 13. – № 2. – P. e0191891.
86. Molecular basis for drug resistance in HIV-1 protease / A. Ali, R. M. Bandaranayake, Y. Cai [et al.] // Viruses. – 2010. – Vol. 2. – P. 2509–2535.

87. HIV nucleoside reverse transcriptase inhibitors / F. Amblard, D. Patel, E. Michailidis [et al.] // *European journal of medicinal chemistry*. – 2022. – Vol. 240. – C. 114554.
88. TMC125, a novel next-generation nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor active against nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor-resistant human immunodeficiency virus type 1 / K. Andries, H. Azijn, T. Thielemans [et al.] // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2004. – Vol. 48. – № 12. – C. 4680-4686.
89. HIV drug resistance against strand transfer integrase inhibitors / K. Anstett, B. Brenner, T. Mesplede [et al.] // *Retrovirology*. – 2017. – Vol. 14. – № 1. – P. 36.
90. Anthony, N.J. HIV-1 integrase: a target for new AIDS chemotherapeutics / N.J. Anthony // *Curr Top Med Chem*. – 2004. – Vol. 4. – № 9. – P. 979-990.
91. Phenotypic mechanism of HIV-1 resistance to 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT): increased polymerization processivity and enhanced sensitivity to pyrophosphate of the mutant viral reverse transcriptase / D. Arion, N. Kaushik, S. McCormick [et al.] // *Biochemistry*. – 1998. – Vol. 37. – P. 15908–15917.
92. Atta, M. G. Clinical Pharmacology in HIV Therapy / M. G. Atta, S. de Seigneux, G. M. Lucas // *Clin J Am Soc Nephrol*. – 2019. – Vol. 14. – № 3. – P. 435-444.
93. TMC278, a next-generation nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI), active against wild-type and NNRTI-resistant HIV-1 / H. Azijn, I. Tirry, J. Vingerhoets [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother*. – 2010. – Vol. 54. – P. 718–727.
94. Highly potent and selective inhibition of HIV-1 replication by 6-phenylthiouracil derivatives / M. Baba, S. Shigeta, H. Tanaka [et al.] // *Antiviral Res*. – 1992. – Vol. 17. – № 4. – P. 245-264.
95. Preclinical evaluation of MKC-442, a highly potent and specific inhibitor of human immunodeficiency virus type 1 in vitro / M. Baba, S. Shigeta, S. Yuasa [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother*. – 1994. – Vol. 38. – № 4. – P. 688-692.

96. Scaffold hopping: Exploration of acetanilide-containing uracil analogues as potential NNRTIs / D. A. Babkov, V. T. Valuev-Elliston, M. P. Paramonova [et al.] // *Bioorg Med Chem.* – 2015. – Vol. 23. – № 5. – P. 1069-1081.
97. Barmania, F. C-C chemokine receptor type five (CCR5): An emerging target for the control of HIV infection / F. Barmania, M. S. Pepper // *Appl Transl Genom.* – 2013. – Vol. 2. – P. 3–16.
98. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS) / F. Barre-Sinoussi, J. C. Chermann, F. Rey [et al.] // *Science.* – 1983. – Vol. 220. – P. 868–871.
99. Barré-Sinoussi, F. present and future: 30 years of HIV research / F. Barré-Sinoussi, A. L. Ross, J. F. Past Delfraissy // *Nat Rev Microbiol.* – 2013. – Vol. 11. – № 12. – P. 877-883.
100. Battini, L. Challenges and approaches in the discovery of human immunodeficiency virus type-1 non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors / L. Battini, M. Bollini // *Med Res Rev.* – 2019. – Vol. 39. – № 4. – P. 1235-1273.
101. Bbosa, N. HIV subtype diversity worldwide / N. Bbosa, P. Kaleebu, D. Ssemwanga // *Curr Opin HIV AIDS.* – 2019. – Vol. 14. – № 3. – P. 153-160.
102. Molecular epidemiology of HIV-1 infection in Europe: An overview / A. Beloukas, A. Psarris, P. Giannelou [et al.] // *Infect Genet Evol.* – 2016. – Vol. 46. – P. 180-189.
103. Drug resistance mutations in HIV: new bioinformatics approaches and challenges / L. Blassel, A. Zhukova, C. J. Villabona-Arenas [et al.] // *Curr Opin Virol.* – 2021. – Vol. 51. – P. 56-64.
104. Boden, D. Resistance to human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitors / D. Boden, M. Markowitz // *Antimicrob Agents Chemother.* – 1998. – Vol. 42. – P. 2775–2783.
105. Bonney, E. Y. HIV cure: an acceptability scientific agenda / E. Y. Bonney, H. Lamptey, G. B. Kyei // *Curr Opin HIV AIDS.* – 2023. – Vol. 18. – № 1. – P. 12-17.

106. State of the Art in HIV Drug Resistance: Science and Technology Knowledge Gap / C. A. Boucher, M. R. Bobkova, A. M. Geretti [et al.] // *AIDS Rev.* – 2018. – Vol. 20. – № 1. – P. 27-42.
107. Past and future of HIV infection. A document based on expert opinion / E. Bouza, J. R. Arribas, B. Alejos [et al.] // *Rev Esp Quimioter.* – 2022. – Vol. 35. – № 2. – P. 131-156.
108. Boyd, M. A. Novel antiretroviral agents and universal access to HIV care / M. A. Boyd, D. A. Cooper // *Lancet HIV.* – 2016. – Vol. 3. – № 1. – P. e2–3.
109. SJ-3366, a unique and highly potent nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) that also inhibits HIV-2 / R. W. Buckheit, K. Watson, V. Fliakas-Boltz [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2001. – Vol. 45. – № 2. – P. 393-400.
110. Capetti, A. Choosing appropriate pharmacotherapy for drug-resistant HIV / A. Capetti, G. Rizzardini // *Expert Opin Pharmacother.* – 2019. – Vol. 20. – № 6. – P. 667-678.
111. Carr, A. HIV protease inhibitor-related lipodystrophy syndrome / A. Carr // *Clin Infect Dis.* – 2000. – Vol. 30. – № 2. – P. 135-142.
112. Pathogenesis of HIV-1-protease inhibitor-associated peripheral lipodystrophy, hyperlipidaemia, and insulin resistance / A. Carr, K. Samaras, D. J. Chisholm [et al.] // *Lancet.* – 1998. – Vol. 351. – № 9119. – P. 1881-1883.
113. Casado, J.L. Renal and bone toxicity with the use of tenofovir: understanding at the end / J.L. Casado // *AIDS Rev.* – 2016. – Vol. 18. – P. 59–68.
114. Human Immunodeficiency Virus Type 2: The Neglected Threat / G. Ceccarelli, M. Giovanetti, C. Sagnelli [et al.] // *Pathogens.* – 2021. – Vol. 10. – № 11. – P. 1377.
115. Novel benzophenones as non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors of HIV-1 / J. H. Chan, G. A. Freeman, J. H. Tidwell [et al.] // *J Med Chem.* – 2004. – Vol. 47. – № 5. – P. 1175-1182.
116. Chaudhuri, S. Innovation and trends in the development and approval of antiviral medicines: 1987-2017 and beyond / S. Chaudhuri, J. A. Symons, J. Deval // *Antiviral Res.* – 2018. – Vol. 155. – P. 76-88.

117. Recent advances in DAPYs and related analogues as HIV-1 NNRTIs / X. Chen, P. Zhan, D. Li [et al.] // *Curr Med Chem.* – 2011. – Vol. 18. – № 3. – P. 359-376.
118. Cilento, M. E. Avoiding Drug Resistance in HIV Reverse Transcriptase / M. E. Cilento, K. A. Kirby, S. G. Sarafianos // *Chem Rev.* – 2021. – Vol. 121. – № 6. – P. 3271-3296.
119. Ciuffi, A. The benefits of integration / A. Ciuffi // *Clin Microbiol Infect.* – 2016. – Vol. 22. – № 4. – P. 324-332.
120. Clutter, D. S. HIV-1 drug resistance and resistance testing / D. S. Clutter, M. R. Jordan, S. Bertagnolio // *Infect Genet Evol.* – 2016. – Vol. 46. – P. 292-307.
121. Coffin, J.M. HIV Population Dynamics in Vivo: Implications for Genetic Variation, Pathogenesis, and Therapy / J.M. Coffin // *Science.* – 1995. – Vol. 267. – P. 483–489.
122. The spread, treatment, and prevention of HIV-1: evolution of a global pandemic / M. S. Cohen, N. Hellmann, J. A. Levy [et al.] // *J Clin Invest.* – 2008. – Vol. 118. – № 4. – P. 1244-1254.
123. Colomer-Lluch, M. Anti-HIV Factors: Targeting Each Step of HIV's Replication Cycle / M. Colomer-Lluch, L. S. Gollahon, R. Serra-Moreno // *Curr HIV Res.* – 2016. – Vol. 14. – № 3. – P. 175-82.
124. Lersivirine, a nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor with activity against drug-resistant human immunodeficiency virus type 1 / R. Corbau, J. Mori, C. Phillips [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2010. – Vol. 54. – № 10. – P. 4451-4463.
125. Impact of antiretroviral therapy on lipid metabolism of human immunodeficiency virus-infected patients: Old and new drugs / J. da Cunha, L. M. Maselli, A. C. Stern [et al.] // *World J Virol.* – 2015. – Vol. 4. – P. 56–77.
126. Adverse neuropsychiatric events and recreational use of efavirenz and other HIV-1 antiretroviral drugs / D. A. Dalwadi, L. Ozuna, B. H. Harvey [et al.] // *Pharmacological reviews.* – 2018. – Vol. 70. – № 3. – C. 684-711.

127. Das, K. HIV-1 reverse transcriptase and antiviral drug resistance. Part 2 / K. Das, E. Arnold // *Current opinion in virology*. – 2013b. – Vol. 3. – № 2. – P. 119-128. – DOI : 10.1016/j.coviro.2013.03.014.
128. Das, K. HIV-1 reverse transcriptase and antiviral drug resistance. Part 1 / K. Das, E. Arnold // *Curr Opin Virol*. – 2013a. – Vol. 3. – № 2. – P. 111-118.
129. Roles of Conformational and Positional Adaptability in Structure Based Design of TMC125-R165335 (Etravirine) and Related Non-nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors That Are Highly Potent and Effective against Wild-Type and Drug Resistant HIV-1 Variants / K. Das, J. Clark, J. Heeres [et al.] // *J. Med. Chem.* – 2004. – Vol. 47. – P. 2550–2256.
130. de Bethune, M. P. Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs), their discovery, development, and use in the treatment of HIV-1 infection: a review of the last 20 years (1989-2009) / M. P. de Bethune // *Antiviral Res.* – 2010. – Vol. 85. – № 1. – P. 75-90.
131. de Clercq, E. Approved antiviral drugs over the past 50 years / E. De Clercq, G. Li // *Clin Microbiol Rev.* – 2016. – Vol. 29. – P. 695-747.
132. Deeks, E.D. Doravirine: First Global Approval / E.D. Deeks // *Drugs.* – 2018. – Vol. 78. – № 15. – P. 1643-1650.
133. Development of dapivirine vaginal ring for HIV prevention / B. Devlin, J. Nuttall, S. Wilder [et al.] // *Antiviral Res.* – 2013. – Vol. 100. – № 1. – P. 3-8.
134. Ding, J. Knowledge From London and Berlin: Finding Threads to a Functional HIV Cure / J. Ding, Y. Liu, Y. Lai // *Front Immunol.* – 2021. – Vol. 12.
135. Structure of HIV-1 RT/TIBO R 86183 complex reveals similarity in the binding of diverse nonnucleoside inhibitors / J. Ding, K. Das, H. Moereels [et al.] // *Nat Struct Biol.* – 1995. – Vol. 2. – P. 407–415.
136. Ding, L. Druggability modification strategies of the diarylpyrimidine-type non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors / L. Ding, C. Zhuang, F. Chen // *Med Res Rev.* – 2021. – Vol. 41. – № 3. – P. 1255-1290.
137. Improving druggability of novel diarylpyrimidine NNRTIs by a fragment-based replacement strategy: from biphenyl-DAPYs to heteroaromatic-biphenyl-DAPYs /

- L. Ding, C. Pannecouque, E. De Clercq [et al.] // *J Med Chem.* – 2021. – Vol. 64. – P. 10297–10311.
138. Dionne, B. Key Principles of Antiretroviral Pharmacology / B. Dionne // *Infect Dis Clin North Am.* – 2019. – Vol. 33. – № 3. – P. 787-805.
139. Doitsh, G. Dissecting How CD4 T Cells Are Lost During HIV Infection / G. Doitsh, W. C. Greene // *Cell Host Microbe.* – 2016. – Vol. 19. – № 3. – P. 280-91.
140. OLEX2: a complete structure solution, refinement and analysis program / O. V. Dolomanov, L. J. Bourhis, R. J. Gildea [et al.] // *J Appl Cryst.* – 2009. – Vol. 42. – P. 339-341.
141. Engelman, A. N. Cellular and molecular mechanisms of HIV-1 integration targeting / A. N. Engelman, P. K. Singh // *Cell Mol Life Sci.* – 2018. – Vol. 75. – № 14. – P. 2491-2507.
142. Engelman, A. N. Multimodal Functionalities of HIV-1 Integrase / A. N. Engelman, M. Kvaratskhelia // *Viruses.* – 2022. – Vol. 14. – № 5. – P. 926.
143. New insights into pathogenesis point to HIV-1 Tat as a key vaccine target / B. Ensoli, S. Moretti, A. Borsetti [et al.] // *Arch Virol.* – 2021. – Vol. 166. – № 11. – P. 2955-2974.
144. Doravirine suppresses common nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor-associated mutants at clinically relevant concentrations / M. Feng, N. A. Sachs, M. Xu [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2016. – Vol. 60. – P. 2241–2247.
145. In vitro resistance selection with doravirine (MK-1439), a novel nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor with distinct mutation development pathways / M. Feng, D. Wang, J. A. Grobler [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2015. – Vol. 59. – P. 590–598.
146. Structural modifications of DAPY analogues with potent anti-HIV-1 activity / X. Q. Feng, Y. H. Liang, Z. S. Zeng [et al.] // *ChemMedChem.* – 2009. – Vol. 4. – № 2. – P. 219-224.
147. The efficacy of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. A double-blind, placebo-controlled trial / M. A. Fischl, D. D. Richman, M. H. Grieco [et al.] // *N Engl J Med.* – 1987. – Vol. 317. – P. 185–191.

148. Virulence and pathogenesis of HIV-1 infection: an evolutionary perspective / C. Fraser, K. Lythgoe, G. E. Leventhal [et al.] // *Science*. – 2014. – Vol. 343. – № 6177.
149. PREAD Programme. Limited cross-border infections in patients newly diagnosed with HIV in Europe / D. Frentz, A. M. Wensing, J. Albert [et al.] // *Retrovirology*. – 2013. – Vol. 10. – № 36.
150. Garg, K. Recent developments in CCR5 regulation for HIV cure /K. Garg, A. R. Khan, P. Taneja // *Adv Protein Chem Struct Biol*. – 2021. – Vol. 126. – P. 123-149.
151. Highly efficient synthesis of HIV NNRTI doravirine / D. R. Gauthier, Jr, B. D. Sherry, Y. Cao [et al.] // *Org Lett*. – 2015. – Vol. 17. – № 6. – P. 1353-1356.
152. 1,6-Bis[(benzyloxy)methyl]uracil derivatives - novel antivirals with activity against HIV-1 and influenza H1N1 virus / A. N. Geisman, V. T. Valuev-Elliston, A. A. Ozerov [et al.] // *Bioorg Med Chem*. – 2016. – Vol. 24. – № 11. – P. 2476-2485.
153. Ghosh, A. K. Recent Progress in the Development of HIV-1 Protease Inhibitors for the Treatment of HIV/AIDS / A. K. Ghosh, H. L. Osswald // *J Med Chem*. – 2016. – Vol. 59. – № 11. – P. 5172-5208.
154. HIV / J. Ghosn, B. Taiwo, S. Seedat [et al.] // *Lancet*. – 2018. – Vol. 392. – № 10148. – P. 685-697.
155. Goodsell, D.S. Illustrations of the HIV life cycle / D.S. Goodsell // *Curr Top Microbiol Immunol*. – 2015. – Vol. 389. – P. 243-52.
156. Gorry, P. R. Coreceptors and HIV-1 pathogenesis / P. R. Gorry, P. Ancuta // *Curr HIV/AIDS Rep*. – 2011. – Vol. 8. – № 1. – P. 45-53.
157. Goto, T. The life-cycle of human immunodeficiency virus type 1 / T. Goto, M. Nakai, K. Ikuta // *Micron*. – 1998. – Vol. 29. – № 2/3. – P. 123-138.
158. Recent progress in HIV-1 inhibitors targeting the entrance channel of HIV-1 non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor binding pocket / S. X. Gu, T. Xiao, Y. Y. Zhu [et al.] // *Eur J Med Chem*. – 2019. – Vol. 174. – P. 277–291.
159. Advances in diarylpyrimidines and related analogues as HIV-1 nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors / S. X. Gu, H. H. Lu, G. Y. Liu [et al.] // *Eur J Med Chem*. – 2018. – Vol. 158. – P. 371-392.

160. Gupta, P. K. HIV/AIDS: Current Updates on the Disease, Treatment and Prevention / P. K. Gupta, A. Saxena // Proc Natl Acad Sci India Sect B Biol Sci. – 2021. – Vol. 91. – № 3. – P. 495-510.
161. International AIDS Society-USA panel. Treatment for Adult HIV Infection: 2006 Recommendations of the International AIDS Society-USA Panel / S. M. Hammer, M. S. Saag, M. Schechter [et al.] // JAMA. – 2006. – Vol. 296. – P. 827–843.
162. Hayashi, M. An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test / M. Hayashi, T. Sofuni, M. Ishidate, Jr // Mutation Res. – 1983. – Vol. 120. – P. 241–247.
163. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides / M. Hayashi, T. Morita, Y. Kodama [et al.] // Mutation Res. – 1990. – Vol. 245. – P. 245-249.
164. Hazuda, D.J. HIV integrase as a target for antiretroviral therapy / D.J. Hazuda // Curr Opin HIV AIDS. – 2012. – Vol. 7. – № 5. – P. 383-389.
165. Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000–2007 / J. Hemelaar, E. Gouws, P. D. Ghys [et al.] // AIDS. – 2011. – Vol. 25. – № 5. – P. 679–689.
166. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection / D. Ho, A. U. Neumann, A. S. Perelson [et al.] // Nature. – 1995. – Vol. 373. – P. 123–126.
167. Complexes of HIV-1 reverse transcriptase with inhibitors of the HEPT series reveal conformational changes relevant to the design of potent non-nucleoside inhibitors / A. L. Hopkins, J. Ren, R. M. Esnouf [et al.] // J Med Chem. – 1996. – Vol. 39. – № 8. – P. 1589-1600.
168. Structures of Tyr188Leu mutant and wild-type HIV-1 reverse transcriptase complexed with the non-nucleoside inhibitor HBY 097: inhibitor flexibility is a useful design feature for reducing drug resistance / Y. Hsiou, K. Das, J. Ding [et al.] // J Mol Biol. – 1998. – Vol. 284. – № 2. – P. 313-323.

169. The Lys103Asn mutation of HIV-1 RT: a novel mechanism of drug resistance / Y. Hsiou, J. Ding, K. Das [et al.] // *J Mol Biol.* – 2001. – Vol. 309. – № 2. – P. 437-445.
170. Long-lasting enfuvirtide carrier pentasaccharide conjugates with potent anti-human immunodeficiency virus type 1 activity / T. Huet, O. Kerbarh, D. Schols [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2010. – Vol. 54. – P. 134–142.
171. Hui, D. Y. Effects of HIV protease inhibitor therapy on lipid metabolism / D. Y. Hui // *Prog Lipid Res.* – 2003. – Vol. 42. – № 2. – P. 81-92.
172. Huzicka, I. Could bone marrow transplantation cure AIDS? / I. Huzicka // *Med Hypotheses.* – 1999. – Vol. 52. – № 3. – P. 247-57.
173. Crystal structure of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase complexed with double-stranded DNA at 3.0 Å resolution shows bent DNA / A. Jacobo-Molina, J. Ding, R. G. Nanni [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1993. – Vol. 90. – P. 6320–6324.
174. Characterisation and study of 1- [2- (2-benzoylphenoxy) ethyl] -6-methyluracil mechanism of action / E. A. Jain (Korsakova), D. V. Demchenko, A. A. Ozerov [et al.] // *Pharmacy & Pharmacology.* – 2021. Vol. 9. – № 2. – P. 114-129. / Характеризация и исследование механизма действия 1-[2-(2-бензоилфеноксид)этил]-6-метилурацила / Е. А. Джайн (Корсакова), Д. В. Демченко, А. А. Озеров [и др.] // *Фармация и Фармакология.* – 2021. Т. 9. – № 2. – С. 114-129.
175. In search of a novel anti-HIV drug: multidisciplinary coordination in the discovery of 4-[[4-[[4-[(1E)-2-cyanoethenyl]-2,6-dimethylphenyl]amino]-2-pyrimidinyl]amino]benzonitrile (R278474, rilpivirine) / P. A. Janssen, P. J. Lewi, E. Arnold [et al.] // *J Med Chem.* – 2005. – Vol. 48. – P. 1901–1909.
176. Jaworski, J. P. Novel preventive and therapeutic strategies against HIV infection / J. P. Jaworski, C. Frola, P. Cahn // *Medicina (B Aires).* – 2019. – Vol. 79. – № 6/1. – P. 534-539.
177. Improving the positional adaptability: structure-based design of biphenyl-substituted diaryltriazines as novel non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase

- inhibitors / K. Jin, M. Liu, C. Zhuang [et al.] // *Acta Pharm Sin B.* – 2020. – Vol. 10. – P. 344–357.
178. Jóźwik, I. K. Structural Biology of HIV Integrase Strand Transfer Inhibitors / I. K. Jóźwik, D. O. Passos, D. Lyumkis // *Trends Pharmacol Sci.* – 2020. – Vol. 41. – № 9. – P. 611-626.
179. Exploring the hydrophobic channel of NNIBP leads to the discovery of novel piperidine-substituted thiophene[3,2-d]pyrimidine derivatives as potent HIV-1 NNRTIs / D. Kang, D. Feng, T. Ginex [et al.] // *Acta Pharm Sin B.* – 2020. – Vol. 10. – P. 878–894.
180. Identification and Characterization of Transmitted and Early Founder Virus Envelopes in Primary HIV-1 Infection / B. F. Keele, E. E. Giorgi, J. F. Salazar-Gonzalez [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2008. – Vol. 105. – P. 7552–7557.
181. Discovery of piperidin-4-yl-aminopyrimidines as HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. N-benzyl derivatives with broad potency against resistant mutant viruses / ed. by D. J. Kertesz, C. Brotherton-Pleiss, M. Yang [et al.] // *Bioorg Med Chem Lett.* – 2010. – Vol. 20. – № 14. – P. 4215-4218.
182. Kim, J. G. Beyond Inhibition: A Novel Strategy of Targeting HIV-1 Protease to Eliminate Viral Reservoirs / J. G. Kim, L. Shan // *Viruses.* – 2022. – Vol. 14. – № 6. – P. 1179.
183. Enfuvirtide antiretroviral therapy in HIV-1 infection / C. M. Kitchen, M. Nuño, S. G. Kitchen [et al.] // *Ther Clin Risk Manag.* – 2008. – Vol. 4. – P. 433–439.
184. Knight, C.L. Physical Examination in Human Immunodeficiency Virus Disease / C.L. Knight // *Med Clin North Am.* – 2022. – Vol. 106. – № 3. – P. 527-536.
185. Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor / L. A. Kohlstaedt, J. Wang, J. M. Friedman [et al.] // *Science.* – 1992. – Vol. 256. – P. 1783–1790.
186. Update on Adverse Effects of HIV Integrase Inhibitors / A. Kolakowska, A. F. Maresca, I. J. Collins [et al.] // *Curr Treat Options Infect Dis.* – 2019. – Vol. 11. – № 4. – P. 372-387.

187. Targeting Integrase Enzyme: A Therapeutic Approach to Combat HIV Resistance / D. Komal, J. Khushboo, S. Aaftaab [et al.] // *Mini Rev Med Chem.* – 2020. – Vol. 20. – № 3. – P. 219-238.
188. Krishnan, A. Stem cell transplantation in HIV-infected patients / A. Krishnan // *Curr Opin HIV AIDS.* – 2009. – Vol. 4. – № 1. – P. 11-15.
189. Kuritzkes, D.R. Drug resistance in HIV-1 / D.R. Kuritzkes // *Curr Opin Virol.* – 2011. – Vol. 1. – № 6. – P. 582-589.
190. Combinatorial Strategies for Long-term Control of HIV Infection / D. Kwon, M. J. Han, K. W. Seo [et al.] // *AIDS Rev.* – 2020. – Vol. 22. – № 4. – P. 175-182.
191. In vitro characterization of MK-1439, a novel HIV-1 nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor / M. T. Lai, M. Feng, J. P. Falgoutyret [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2014. – Vol. 58. – P. 1652–1663.
192. Mechanistic Study of Common Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor-Resistant Mutations with K103N and Y181C Substitutions / M. T. Lai, V. Munshi, M. Lu [et al.] // *Viruses.* – 2016. – Vol. 8. – № 10.
193. Enfuvirtide, an HIV-1 fusion inhibitor, for drug-resistant HIV infection in North and South America / J. P. Lalezari, K. Henry, M. O'Hearn [et al.] // *N Engl J Med.* – 2003. – Vol. 348. – P. 2175–2185.
194. Dynamics of HIV-1 Recombination in Its Natural Target Cells / D. N. Levy, G. M. Aldrovandi, O. Kutsch [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2004. – Vol. 101. – P. 4204–4209.
195. Li, G. HIV Genome-Wide Protein Associations: a Review of 30 Years of Research / G. Li, E. De Clercq // *Microbiol Mol Biol Rev.* – 2016. – Vol. 80. – № 3. – P. 679-731.
196. Design, synthesis, and SAR of naphthyl-substituted Diarylpyrimidines as non-nucleoside inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase / Y. H. Liang, X. Q. Feng, Z. S. Zeng [et al.] // *ChemMedChem.* – 2009. – Vol. 4. – № 9. – P. 1537-1545.
197. London, R.E. HIV-1 Reverse Transcriptase: A Metamorphic Protein with Three Stable States / R.E. London // *Structure.* – 2019. – Vol. 27. – № 3. – P. 420-426.

198. Evolution of anti-HIV drug candidates. Part 1: From alpha-anilinophenylacetamide (alpha-APA) to imidoyl thiourea (ITU) / D. W. Ludovici, M. J. Kukla, P. G. Grous [et al.] // *Bioorg Med Chem Lett.* – 2001. – Vol. 11. – № 17. – P. 2225-2228.
199. Medicinal chemistry strategies for discovering antivirals effective against drug-resistant viruses / Y. Ma, E. Frutos-Beltrán, D. Kang [et al.] // *Chem Soc Rev.* – 2021. – Vol. 50. – № 7. – P. 4514-4540.
200. Mackie, N. Resistance to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors / N. Mackie. – Текст : непосредственный // *Antiretroviral Resistance in Clinical Practice. Chapter 2* / edited by A. M. Geretti. – London : Mediscript, 2006. – ISBN-13: 978-0-955-16690-7.
201. Resistance to nevirapine of HIV-1 reverse transcriptase mutants: loss of stabilizing interactions and thermodynamic or steric barriers are induced by different single amino acid substitutions / G. Maga, M. Amacker, N. Ruel [et al.] // *J Mol Biol.* – 1997. – Vol. 274. – № 5. – P. 738-747.
202. Progress towards 2020 global HIV impact and treatment targets / M. I. Mahy, K. M. Sabin, A. Feizzadeh [et al.] // *J Int AIDS Soc.* – 2021. – Vol. 24. – № 5.
203. Mansky, L.M. HIV Mutagenesis and the Evolution of Antiretroviral Drug Resistance / L.M. Mansky // *Drug Resist Updat.* – 2002. – Vol. 5. – P. 219–223.
204. Mansky, L. M. Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase / L. M. Mansky, H. M. Temin // *J Virol.* – 1995. – Vol. 69. – P. 5087–5094.
205. Use of abacavir and risk of cardiovascular disease among HIV-infected individuals / J. L. Marcus, R. S. Neugebauer, W. A. Leyden [et al.] // *J Acquir Immune Defic Syndr.* – 2016. – Vol. 71. – P. 413–419.
206. Curing HIV: Seeking to Target and Clear Persistent Infection / D. M. Margolis, N. M. Archin, M. S. Cohen [et al.] // *Cell.* – 2020. – Vol. 181. – № 1. – P. 189-206.
207. Mbhele, N. HIV-1 integrase strand transfer inhibitors: a review of current drugs, recent advances and drug resistance / N. Mbhele, B. Chimukangara, M. Gordon // *Int J Antimicrob Agents.* – 2021. – Vol. 57. – № 5.

208. Research progress on HIV-1 immune escape mechanisms / Y. Meng, J. Zhong, Y. Lv [et al.] // *AIDS Rev.* – 2022. – Vol. 24. – № 3. – P. 133-138.
209. Metzner, K.J. Technologies for HIV-1 drug resistance testing: inventory and needs / K.J. Metzner // *Curr Opin HIV AIDS.* – 2022. – Vol. 17. – № 4. – P. 222-228.
210. Unblocking of chain-terminated primer by HIV-1 reverse transcriptase through a nucleotide-dependent mechanism / P. R. Meyer, S. E. Matsuura, A. G. So [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1998. – Vol. 95. – P. 13471–13476.
211. HIV Diversity and Genetic Compartmentalization in Blood and Testes during Suppressive Antiretroviral Therapy / R. L. Miller, R. Ponte, B. R. Jones [et al.] // *J. Virol.* – 2019. – Vol. 93. – № 17. – P. e00755-19.
212. 3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy associated virus in vitro / H. Mitsuya, K. J. Weinhold, P. A. Furman [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1985. – Vol. 82. – P. 7096–7100.
213. A novel lead for specific anti-HIV-1 agents: 1-[(2-hydroxyethoxy)methyl]-6-(phenylthio)thymine / T. Miyasaka, H. Tanaka, M. Baba [et al.] // *J Med Chem.* – 1989. – Vol. – 32. № 12. – P.2507-2509.
214. Two-drug vs. three-drug combinations for HIV-1: Do we have enough data to make the switch? / S. Moreno, C. F. Perno, P. W. Mallon [et al.] // *HIV Med.* – 2019. – Vol. 20. – № 4. – P. 2-12.
215. The Journey of HIV-1 Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors (NNRTIs) from Lab to Clinic / V. Namasivayam, M. Vanangamudi, V. G. Kramer [et al.] // *J Med Chem.* – 2019. – Vol. 62. – № 10. – P. 4851-4883.
216. HIV and Drug-Resistant Subtypes / B. M. Nastro, P. Pagliano, C. Zannella [et al.] // *Microorganisms.* – 2023. – Vol. 15. – № 11(1). – P. 221.
217. UN. Globally Harmonized System of classification and labelling of chemicals (GHS). Fifth revised edition / United Nations ; – New York and Geneva, 2013. – 536 p. – ISBN978-92-1-117067-2. – Текст : непосредственный.

218. Prevalence of Antiretroviral Drug Resistance Mutations in Chronically HIV-Infected, Treatment-Naive Patients: Implications for Routine Resistance Screening before Initiation of Antiretroviral Therapy / R. M. Novak, L. Chen, R. D. MacArthur [et al.] // *Clin Infect Dis.* – 2005. – Vol. 40. – P. 468–474.
219. 1-[2-(2-Benzoyl- and 2-benzylphenoxy)ethyl]uracils as potent anti-HIV-1 agents / M. S. Novikov, O. N. Ivanova, A. V. Ivanov [et al.] // *Bioorg Med Chem.* – 2011. – Vol. 19. – № 19. – P. 5794-5802.
220. Synthesis and anti-HCMV activity of 1-[ω -(phenoxy)alkyl]uracil derivatives and analogues thereof / M. S. Novikov, D. A. Babkov, M. P. Paramonova [et al.] // *Bioorg Med Chem.* – 2013. – Vol. 21. – № 14. – P. 4151-4157.
221. Comparing HIV-1 and HIV-2 infection: Lessons for viral immunopathogenesis / S. Nyamweya, A. Hegedus, A. Jaye [et al.] // *Rev Med Virol.* – 2013. – Vol. 23. – № 4. – P. 221-240.
222. Vehicle and positive control values from the in vitro rodent comet assay and biomonitoring studies using human lymphocytes: historical database and influence of technical aspects / K. Pant, S. Springer, S. Bruce [et al.] // *Environ Mol Mutagen.* – 2014. – Vol. 55. – P. 633-642.
223. The application of HIV molecular epidemiology to public health / D. Paraskevis, G. K. Nikolopoulos, G. Magiorkinis [et al.] // *Infect Genet Evol.* – 2016. – Vol. 46. – P. 159-168.
224. Perelson, A. S. Modeling the Within-Host Dynamics of HIV Infection / A. S. Perelson, R. M. Ribeiro // *BMC Biol.* – 2013. – Vol. 11. – P. 96.
225. Pharmaceutical, clinical, and resistance information on doravirine, a novel non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor for the treatment of HIV-1 infection / H. T. Pham, M. A. Xiao, M. A. Principe [et al.] // *Drugs Context.* – 2020. – Vol. 9. – 2019-11-4. – DOI : 10.7573/dic.2019-11-4.
226. Phanuphak, N. HIV treatment and prevention 2019: current standards of care / N. Phanuphak, R. M. Gulick // *Curr Opin HIV AIDS.* – 2020. – Vol. 15. – № 1. – P. 4-12.

227. Prator, C. A. From Berlin to London: HIV-1 Reservoir Reduction Following Stem Cell Transplantation / C. A. Prator, J. Donatelli, T. J. Henrich // *Curr HIV/AIDS Rep.* – 2020. – Vol. 17. – № 4. – P. 385-393.
228. Recent Advances in Antiretroviral Agents: Potent Integrase Inhibitors / M. Psychogiou, G. Poulakou, D. Basoulis [et al.] // *Curr Pharm Des.* – 2017. – Vol. 23. – № 18. – P. 2552-2567.
229. Neutralizing Antibody and Anti-Retroviral Drug Sensitivities of HIV-1 Isolates Resistant to Small Molecule CCR5 Inhibitors / P. Pugach, T. J. Ketas, E. Michael [et al.] // *Virology.* – 2008. – № 377. – P. 401–407.
230. Zinc finger nuclease: a new approach for excising HIV-1 proviral DNA from infected human T cells / X. Qu, P. Wang, D. Ding [et al.] // *Mol Biol Rep.* – 2014. – Vol. 41. – № 9. – P. 5819-5827.
231. Twenty-Five Years of Lamivudine: Current and Future Use for the Treatment of HIV-1 Infection / R. Quercia, C. F. Perno, J. Koteff [et al.] // *J Acquir Immune Defic Syndr.* – 2018. – Vol. 78. – № 2. – P. 125-135.
232. Rai, M. A. Emerging reverse transcriptase inhibitors for HIV-1 infection / M. A. Rai, S. Pannek, C. J. Fichtenbaum // *Expert Opin Emerg Drugs.* – 2018. – Vol. 23. – № 2. – P. 149-157.
233. Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III / L. Ratner, W. Haseltine, R. Patarca [et al.] // *Nature.* – 1985. – Vol. 313. – P. 277–284.
234. Relationship of potency and resilience to drug resistant mutations for GW420867X revealed by crystal structures of inhibitor complexes for wild-type, Leu100Ile, Lys101Glu, and Tyr188Cys mutant HIV-1 reverse transcriptases / J. Ren, C. E. Nichols, P. P. Chamberlain [et al.] // *J Med Chem.* – 2007. – Vol. 50. – № 10. – P. 2301-2309.
235. Rock, A. E. Doravirine and Its Potential in the Treatment of HIV: An Evidence-Based Review of the Emerging Data / A. E. Rock, J. Lerner, M. E. Badowski // *HIV AIDS (Auckl).* – 2020. – Vol. 12. – P. 201-210.
236. Rosas, M. Global strategy in the treatment of HIV infection in 2022 / M. Rosas, S. Moreno // *Rev Esp Quimioter.* – 2022. – Vol. 35. – № 3. – P. 34-36.

237. 2019 update of the European AIDS Clinical Society Guidelines for treatment of people living with HIV version 10.0 / L. Ryom, A. Cotter, R. De Miguel [et al.] // *HIV Med.* – 2020. – Vol. 21. – P. 617–624.
238. Antiretroviral drugs for treatment and prevention of HIV infection in adults: 2020 recommendations of the International Antiviral Society-USA Panel / M. S. Saag, R. T. Gandhi, J. F. Hoy [et al.] // *J Am Med Assoc.* – 2020. – Vol. 324. – P. 1651–1669.
239. Sankaranantham, M. HIV—is a cure possible? / M. Sankaranantham // *Indian J Sex Transmit Disease AIDS.* – 2019. – Vol. 40. – № 1. – P. 1–5.
240. In vitro selection of mutations in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase that confer resistance to capravirine, a novel nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor / A. Sato, J. Hammond, T. N. Alexander [et al.] // *Antiviral Res.* – 2006. – Vol. 70, № 2. – P. 66-74.
241. HIV-1 Integrase Inhibitors: A Comparative Review of Efficacy and Safety / K. K. Scarsi, J. P. Havens, A. T. Podany [et al.] // *Drugs.* – 2020. – Vol. 80. – № 16. – P. 1649-1676.
242. Shin, Y. H. An Overview of Human Immunodeficiency Virus-1 Antiretroviral Drugs: General Principles and Current Status / Y. H. Shin, C. M. Park, C. H. Yoon // *Infect Chemother.* – 2021. – Vol. 53. – № 1. – P. 29-45.
243. Shirvani, P. Recent Advances in the Design and Development of Non-nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor Scaffolds / P. Shirvani, A. Fassihi, L. Saghaie // *ChemMedChem.* – 2019. – Vol. 14. – № 1. – P. 52-77.
244. Simon, V. HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment / V. Simon, D. D. Ho, Q. Abdool Karim // *Lancet.* – 2006. – Vol. 368. – № 9534. – P. 489-504.
245. Sluis-Cremer, N. Future of nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors / N. Sluis-Cremer // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2018. – Vol. 115. – № 4. – P. 637-638.
246. Sluis-Cremer, N. Mechanisms of inhibition of HIV replication by non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors / N. Sluis-Cremer, G. Tachedjian // *Virus Res.* – 2008. – Vol. 134. – № 1/2. – P. 147-156.

247. Smith, S. J. Integrase Strand Transfer Inhibitors Are Effective Anti-HIV Drugs / S. J. Smith, X. Z. Zhao, D. O. Passos // *Viruses*. – 2021. – Vol. 13. – № 2.
248. Rilpivirine and doravirine have complementary efficacies against NNRTI-resistant HIV-1 mutants / S. J. Smith, G. T. Pauly, A. Akram [et al.] // *J Acquir Immune Defic Syndr*. – 2016. – Vol. 72. – P. 485–491.
249. Soliman, M. Mechanisms of HIV-1 Control / M. Soliman, G. Srikrishna, A. Balagopal // *Curr HIV/AIDS Rep*. – 2017. – Vol. 14. – № 3. – P. 101-109.
250. Recent Advances in the Discovery and Development of Novel HIV-1 NNRTI Platforms (Part II): 2009-2013 Update / Y. Song, Z. Fang, P. Zhan [et al.] // *Curr Med Chem*. – 2014. – Vol. 2. – P. 329-355.
251. Rare occurrence of doravirine resistance-associated mutations in HIV-1-infected treatment-naive patients / C. Soulie, M. M. Santoro, C. Charpentier [et al.] // *J Antimicrob Chemother*. – 2019. – Vol. 74. – P. 614–617.
252. Prevalence of predicted resistance to doravirine in HIV-1-positive patients after exposure to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors / G. Sterrantino, V. Borghi, A. P. Callegaro [et al.] // *Int J Antimicrob Agents*. – 2019. – Vol. 53. – P. 515–519.
253. Sung, J. M. HIV Persistence on Antiretroviral Therapy and Barriers to a Cure / J. M. Sung, D. M. Margolis // *Adv Exp Med Biol*. – 2018. – Vol. 1075. – P. 165-185.
254. Cabotegravir/Rilpivirine: the last FDA-approved drug to treat HIV / E. Taki, F. Soleimani, A. Asadi [et al.] // *Expert Rev Anti Infect Ther*. – 2022. – Vol. 20. – № 8. – P. 1135-1147.
255. Tang, M. W. HIV-1 Antiretroviral Resistance: Scientific Principles and Clinical Applications / M. W. Tang, R. W. Shafer // *Drugs*. – 2012. – Vol. 72. – P. e1-25.
256. Taoda, Y. New designs for HIV-1 integrase inhibitors: a patent review (2018-present) / Y. Taoda, S. Sugiyama, T. Seki // *Expert Opin Ther Pat*. – 2023. – Vol. 33. – № 1. – P. 51-66.
257. Tarasova, O. HIV Resistance Prediction to Reverse Transcriptase Inhibitors: Focus on Open Data / O. Tarasova, V. Poroikov // *Molecules*. – 2018. – Vol. 23. – № 4. – P. 956.

258. Teer, E. The Role of Immunometabolism in HIV-1 Pathogenicity: Links to Immune Cell Responses / E. Teer, N. C. Mukonowenzou, M. F. Essop // *Viruses*. – 2022. – Vol. 14. – № 8. – P. 1813.
259. Recent Advances in the Development of Integrase Inhibitors for HIV Treatment / J. Trivedi, D. Mahajan, R. J. Jaffe [et al.] // *Curr HIV/AIDS Rep*. – 2020. – Vol. 17. – № 1. – P. 63-75.
260. Vanangamudi, M. Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs): a brief overview of clinically approved drugs and combination regimens / M. Vanangamudi, S. Kurup, V. Namasivayam // *Curr Opin Pharmacol*. – 2020. – Vol. 54. – P. 179-187.
261. 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, E. A. Jain (Korsakova) [et al.] // *Pharmacy & Pharmacology*. – 2021. Vol. 9. – № 3. – P. 205-221. / Экспериментальное изучение токсических свойств препарата VMU-2012-05 - оригинального нуклеозидного ингибитора обратной транскриптазы ВИЧ-1 / В. А. Вавилова, Е. В. Шекунова, Е. А. Джайн (Корсакова) [и др.] // *Фармация и Фармакология*. – 2021. Т. 9. – № 3. – С. 205-221.
262. DNA damage and repair / S. Venitt, H. Bartsch, G. Becking [et al.]. – Текст : непосредственный // *Long-term and Short-term Assays for Carcinogens: A Critical Appraisal* / edited by R. Montesano, I. I. Bartsch, H. Vainio [et al.] // *IARC Sci Publ*. – 1986. – NO. 83. – P. 129-142. – ISBN 92 832 1183 9.
263. Voshavar, C. Protease Inhibitors for the Treatment of HIV/AIDS: Recent Advances and Future Challenges / C. Voshavar // *Curr Top Med Chem*. – 2019. – Vol. 19. – № 18. – P. 1571-1598.
264. Wagner-Johnston, N. D. Blood and marrow transplant for lymphoma patients with HIV/AIDS / N. D. Wagner-Johnston, R. F. Ambinder // *Curr Opin Oncol*. – 2008. – Vol. 20. – № 2. – P. 201-205.
265. Nucleotide sequence of the AIDS virus, LAV / S. Wain-Hobson, P. Sonigo, O. Danos [et al.] // *Cell*. – 1985. – Vol. 40. – P. 9-17.

266. Walmsley, S. Protease inhibitor-based regimens for HIV therapy: safety and efficacy / S. Walmsley // *J Acquir Immune Defic Syndr.* – 2007. – Vol. 45. – № 1. – P. 5-13.
267. Wang, L. Cutting into the substrate dominance: pharmacophore and structure-based approaches toward inhibiting human immunodeficiency virus reverse transcriptase-associated ribonuclease H / L. Wang, S. G. Sarafianos, Z. Wang // *Acc Chem Res.* – 2020. – Vol. 53. – P. 218–230.
268. Human immunodeficiency virus-1 core: The Trojan horse in virus-host interaction / W. Wang, Y. Li, Z. Zhang [et al.] // *Front Microbiol.* – 2022. – Vol. 13.
269. Selection with a peptide fusion inhibitor corresponding to the first heptad repeat of HIV-1 gp41 identifies two genetic pathways conferring cross-resistance to peptide fusion inhibitors corresponding to the first and second heptad repeats (HR1 and HR2) of gp41 / W. Wang, C. J. De Feo, M. Zhuang [et al.] // *J Virol.* – 2011. – Vol. 85. – № 5. – P. 12929–12938.
270. Wang, Y. Current and emerging non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) for HIV-1 treatment / Y. Wang, E. De Clercq, G. Li // *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* – 2019. – Vol. 15. – № 10. – P. 813-829.
271. Medicinal Chemistry of Anti-HIV-1 Latency Chemotherapeutics: Biotargets, Binding Modes and Structure-Activity Relationship Investigation / Y. K. Wang, L. Wei, W. Hu [et al.] // *Molecules.* – 2022. – Vol. 28. – № 1. – P. 3.
272. Design, synthesis and biological evaluation of novel acetamide-substituted doravirine and its prodrugs as potent HIV-1 NNRTIs / Z. Wang, Z. Yu, D. Kang [et al.] // *Bioorg Med Chem.* – 2019. – Vol. 27. – № 3. – P. 447-456.
273. Weber, I. T. Decoding HIV resistance: from genotype to therapy / I. T. Weber, R. W. Harrison // *Future Med Chem.* – 2017. – Vol. 9. – № 13. – P. 1529-1538.
274. Weichseldorfer, M. Past HIV-1 Medications and the Current Status of Combined Antiretroviral Therapy Options for HIV-1 Patients / M. Weichseldorfer, M. Reitz, O. S. Latinovic // *Pharmaceutics.* – 2021. – Vol. 13. – № 11. – P. 1798.

275. 2019 update of the drug resistance mutations in HIV-1 / A. M. Wensing, V. Calvez, F. Ceccherini-Silberstein [et al.] // *Top Antivir Med.* – 2019. – Vol. 27. – № 3. – P. 111-121.
276. Prevalence of Drug-Resistant HIV-1. Variants in Untreated Individuals in Europe: Implications for Clinical Management / A. M. J. Wensing., D. A. van de Vijver, G. Angarano [et al.] // *J Infect Dis.* – 2005. – Vol. 192. – P. 958–966.
277. Xavier Ruiz, F. Evolving understanding of HIV-1 reverse transcriptase structure, function, inhibition, and resistance / F. Xavier Ruiz, E. Arnold // *Curr Opin Struct Biol.* – 2020. – Vol. 61. – P. 113-123.
278. Molecular design, synthesis and biological evaluation of BP-O-DAPY and O-DAPY derivatives as non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors / S. Yang, C. Pannecouque, D. Daelemans [et al.] // *Eur J Med Chem.* – 2013. – Vol. 65. – P. 134-43.
279. The Determination of HIV-1 RT Mutation Rate, Its Possible Allosteric Effects, and Its Implications on Drug Resistance / J. Y. Yeo, G. R. Goh, C. T. Su [et al.] // *Viruses.* – 2020. – Vol. 12. – № 3. – P. 297.
280. Yoshimura, K. Current status of HIV/AIDS in the ART era / K. Yoshimura // *J Infect Chemother.* – 2017. – Vol. 23. – № 1. – P. 12-16.
281. HIV-1 integrase: from biology to chemotherapeutics / E. Zeinalipour-Loizidou, C. Nicolaou, A. Nicolaides [et al.] // *Curr HIV Res.* – 2007. – Vol. 5. – № 4. – P. 365-88.
282. Prodrugs of gamma-alkyl-modified nucleoside triphosphates: improved inhibition of HIV reverse transcriptase / C. Zhao, S. Weber, D. Schols [et al.] // *Angew Chem Int Ed Engl.* – 2020. – Vol. 59. – P. 22063–22071.
283. Development of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs): our past twenty years / C. Zhuang, C. Pannecouque, E. De Clercq [et al.] // *Acta Pharm Sin B.* – 2020. – Vol. 10. – № 6. – P. 961-978.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

(справочное)

Акт внедрения



Акционерное общество
**«Научно-производственное объединение
 «ДОМ ФАРМАЦИИ»**

188663, Россия, Ленинградская обл.,
 Всеволожский р-н, г.п. Кузьмоловский,
 Ул. Заводская, дом 3, корп. 245, комн. 4.34
 Тел: (812) 603-74-28
info@doclinika.ru, www.doclinika.ru

Исх. № 052-1/2023 от 20.05.2022

Акт внедрения №15

Результаты диссертационной работы Джайн Екатерины Александровны «Стандартизация и фармакологическое изучение оригинального ненуклеозидного ингибитора обратной транскриптазы ВИЧ-1 – VMU-2012-05» вошли в состав регистрационного досье оригинального антиретровирусного препарата «VMU-2012-05, таблетки, 50 мг», а именно в разделы:

- 3.2.S.3. «Описание характеристик АФС»
 - 3.2.S.3.1. «Подтверждение структуры и других характеристик»
 - 3.2.S.3.2. «Примеси»
- 3.2.S.4. «Контроль качества АФС»
 - 3.2.S.4.1. «Спецификация АФС»
 - 3.2.S.4.2. «Аналитические методики»
 - 3.2.S.4.3. «Валидация аналитических методик»
 - 3.2.S.4.5. «Обоснование спецификации»
- 4.2.1. «Фармакология»
 - 4.2.1.1. «Первичная фармакодинамика»
 - 4.2.1.3. «Фармакологическая безопасность»
- 4.2.3. «Токсикология»
 - 4.2.3.1. «Токсичность при однократном введении»
 - 4.2.3.2. «Токсичность при многократном введении»
 - 4.2.3.3.2. «Исследования генотоксичности in vivo»
 - 4.2.3.7.3. «Исследования механизма действия»

Директор
 АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ»



Макарова М.Н.

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

(справочное)

Протокол предварительной (частичной) валидации методик контроля качества фармацевтической субстанции

АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ»

188663, Россия, Ленинградская область, Всеволожский р-н,
ГП Кузьмолковский., улица Заводская дом 3,
корп. 245, комната 4.34

Тел.: +7 (812) 603-2432, 603-2433

УТВЕРЖДАЮ

Директор

АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ»,

д.м.н.,

 М.Н. Макарова

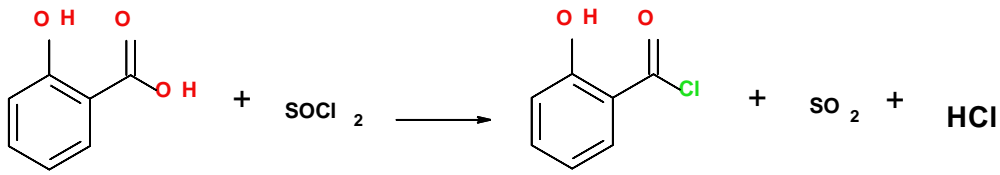
«30» сентября 2017 г.

**ПРОТОКОЛ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ (ЧАСТИЧНОЙ) ВАЛИДАЦИИ МЕТОДИК
КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ****ПО ГОСУДАРСТВЕННОМУ КОНТРАКТУ № 14.N08.11.0154
НА ВЫПОЛНЕНИЕ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЫ
«ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА НА
ОСНОВЕ ПИРИМИДИНОВОГО ПРОИЗВОДНОГО БЕНЗОФЕНОНА ДЛЯ ЛЕ-
ЧЕНИЯ ВИЧ-1 ИНФЕКЦИИ» (ШИФР 2017-14-N08-0033)**Научный руководитель ПНИЭР,
д.м.н. 30.09.2017 М.Н. Макарова
подпись, дата

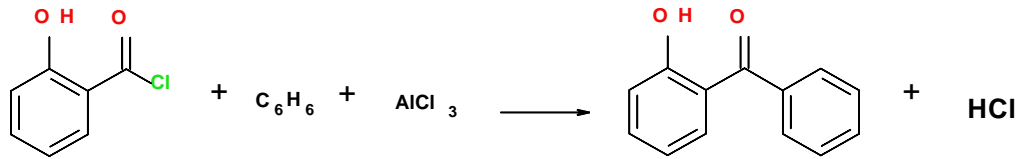
ПРИЛОЖЕНИЕ В

(справочное)

Химическая схема производства

Салициловая
кислотаХлористый
тионил

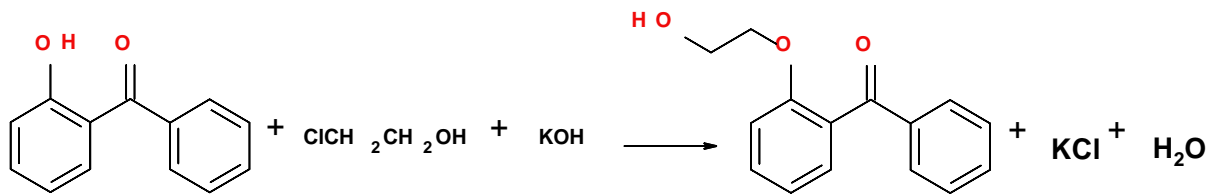
Салицилоилхлорид

Салицилоил-
хлорид

Бензол

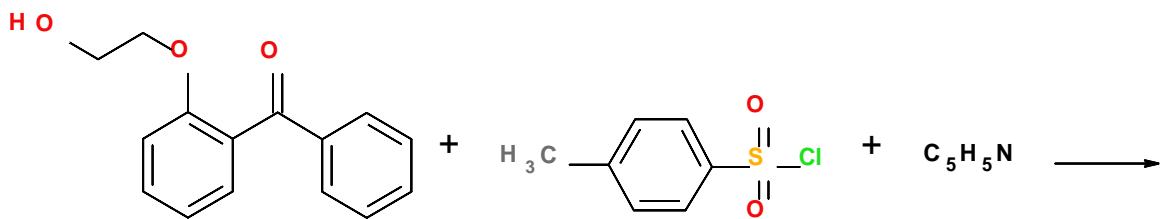
Алюминия
хлорид

2-Бензоилфенол



2-Бензоилфенол

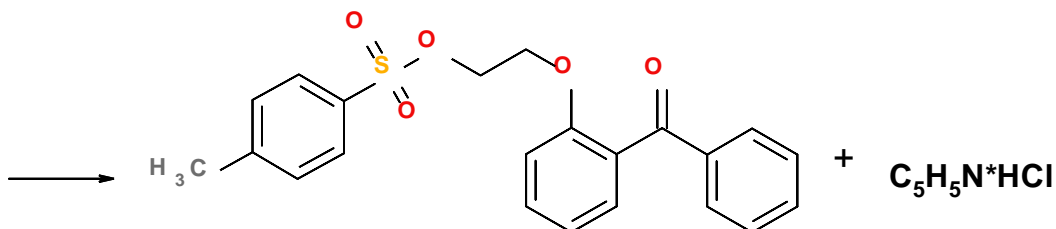
2-Хлорэтанол

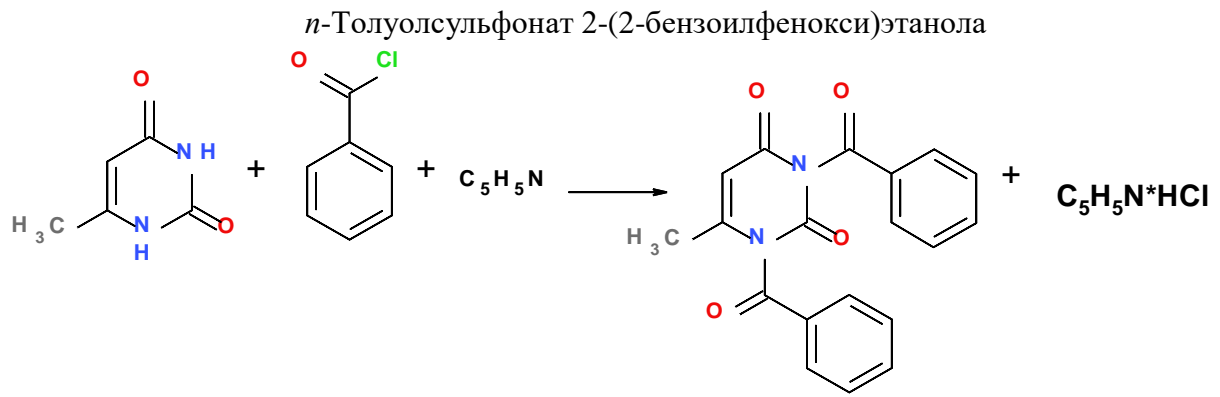
Калия
гидроксид2-(2-Бензоилфенокси)-
этанол

2-(2-Бензоилфенокси)этанол

n-Толуолсульфохлорид

Пиридин

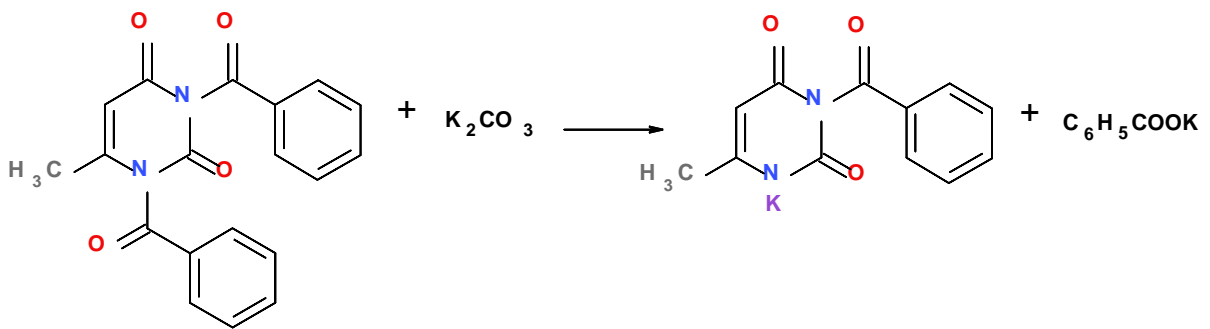
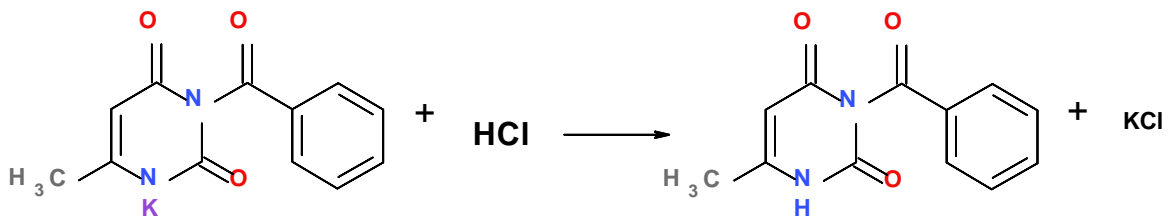




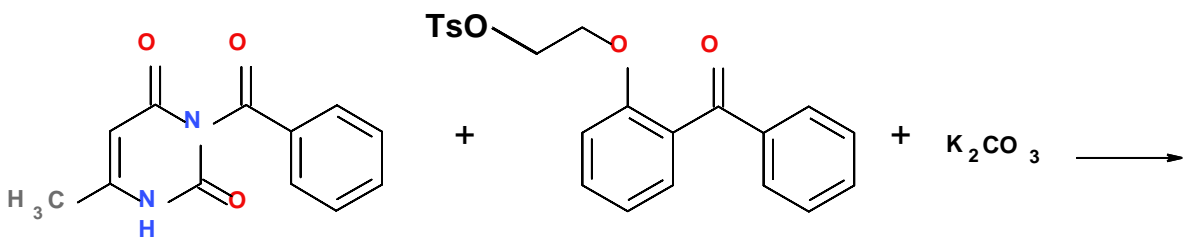
6-Метилурацил

Бензоил-
хлорид

Пиридин

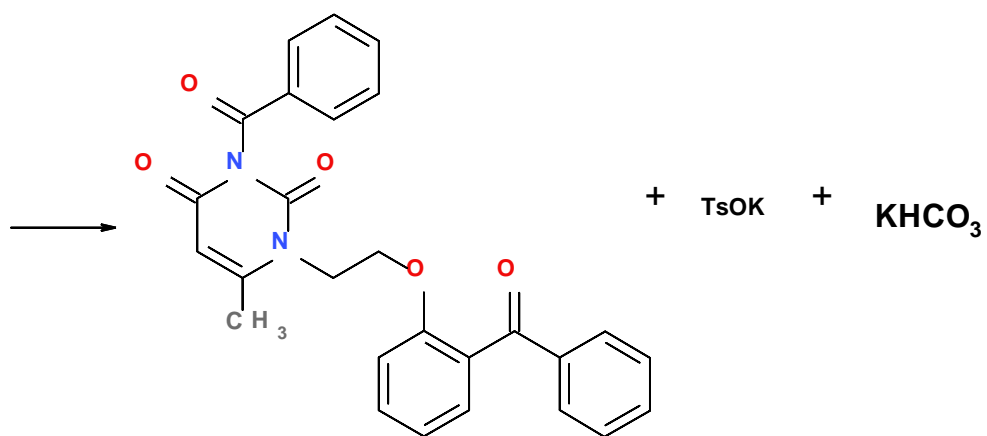
1,3-Дибензоил-6-метил-
урацил1,3-Дибензоил-6-метил-
урацилКалия
карбонатКалиевая соль 3-бензоил-
6-метилурацилаКалиевая соль 3-бензоил-
6-метилурацилаКислота хлоро-
водородная

3-Бензоил-6-метилурацил

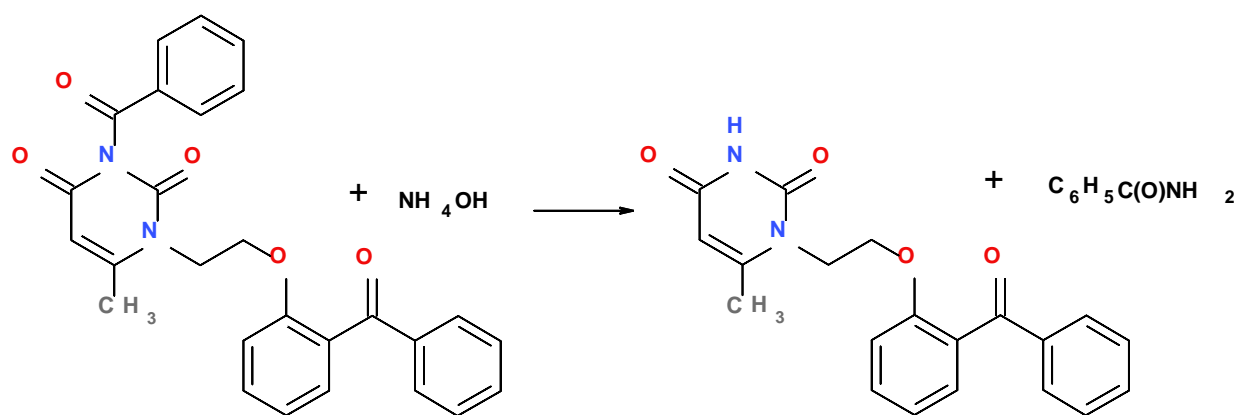


3-Бензоил-6-метилурацил

n-Толуолсульфонат
2-(2-бензоилфенокси)этанолаКалия
карбонат



1 - [2-(2-Бензоилфенокси)этил]-3-бензоил-
6-метилурацил



1 - [2-(2-Бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил

1 - [2-(2-Бензоилфенокси)этил]-
6-метилурацил
(VMU-2012-05)