

ТОКСИКОЛОГИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

ДОКЛИНИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ БЕЗОПАСНОСТИ НОВОГО ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОГО ВЕЩЕСТВА AV0012 ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ГЕПАТИТА С

А. В. Иващенко^{1–3}, П. М. Яманушкин^{*1}, О. Д. Митькин¹, Е. В. Ежова¹,
О. М. Корзинов^{1,4}, Н. А. Шевкун¹, Р. Н. Карапетян¹, В. В. Бычко³,
А. А. Иващенко^{1,4}, В. З. Агрба⁵, Б. А. Лапин⁵, С. В. Орлов⁵, И. Э. Кузнецов⁶

Проведена доклиническая оценка безопасности AV0012 — ингибитора HCV, включающая изучение острой, субхронической и хронической токсичности соединения при разных путях введения на мышах линии SHK, крысах линии Wistar и обезьянах вида Rhesus macaques, а также оценку мутагенных свойств AV0012 в тесте Эймса и методом учета хромосомных aberrаций в клетках костного мозга мышей линии C57BL/6. Показано, что AV0012 характеризуется низкой токсичностью при однократном и повторном длительном введении животным разных видов (мышам, крысам и обезьянам) и не обладает мутагенной активностью. Результаты оценки общетоксического действия и мутагенных свойств соединения AV0012, представленные в данной работе, а также опубликованные ранее результаты изучения фармакологической активности, фармакокинетики и метаболизма AV0012 позволяют рассматривать это соединение в качестве кандидата на проведение клинических исследований фазы I.

Ключевые слова: этиловый эфир 2,4-бис-диметиламинометил-1-метил-6-пиридин-3-ил-1*H*-индол-3-карбоновой кислоты; острая токсичность; максимально переносимая доза; субхроническая токсичность; хроническая токсичность; мутагенность.

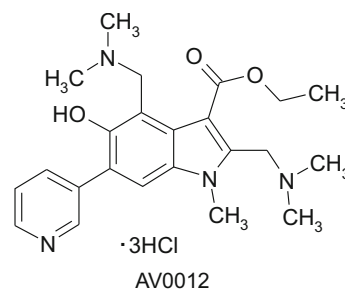
ВВЕДЕНИЕ

Ранее мы сообщали об открытии ингибитора вируса гепатита С (HCV) AV0012, блокирующего раннюю стадию вирусной инфекции и подавляющего ее распространение, осуществляемое через клеточный контакт [1, 2]. В рамках доклинических исследований AV0012 были изучены его растворимость и стабильность, фармакологическая активность и селективность, фармакокинетика, биодоступность и др. [2]. В данной работе представлены результаты доклинического исследования оценки безопасности AV0012, которое включало изучение острой токсичности и максимально переносимой дозы на мышах, субхронической и хронической токсичности на мышах, крысах и

обезьянах, а также мутагенности в тесте Эймса и в экспериментах по учету хромосомных повреждений в клетках костного мозга мышей.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

AV0012 (гидрохлорид этилового эфира 2,4-бис-диметиламинометил-5-гидрокси-1-метил-6-пиридин-3-ил-1*H*-индол-3-карбоновой кислоты) представляет собой белый или белый с слегка желтоватым оттенком мелкокристаллический порошок, с температурой плавления 220–226 °С (с разложением), растворим в воде, спирте, диметилформамиде, устойчив при стандартных условиях хранения.



Эксперименты на животных проводили в соответствии с Руководством по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ [4]. Эксперименты на животных были проведены в строгом соответствии с законодательной базой и

¹ Исследовательский институт химического разнообразия, 114401 Химки, Московская область, Россия, e-mail: ypm@ihr.ru.

² ASAVI LLC, Hallandale Beach, FL 33009 USA, 1835 E. Hallandale Beach Blvd, #442, e-mail: av@asavillc.com

³ ChemDiv, Inc., 6605 Nancy Ridge Drive, San Diego, CA 92121 USA.

⁴ Московский физико-технический институт, 141700 Долгопрудный, Московской обл., Россия, e-mail: okr@pharmcluster.ru

⁵ ФБГУ “Научно-исследовательский институт медицинской приматологии” РАН, 354376 Сочи, Адлерский р-н, Краснодарский край, Россия, e-mail: agrba_vz@mail.ru

⁶ Национальный фармацевтический университет, 61002 Харьков, ул. Пушкинская, 53, Украина.

* Автор для переписки, e-mail: ypm@ihr.ru

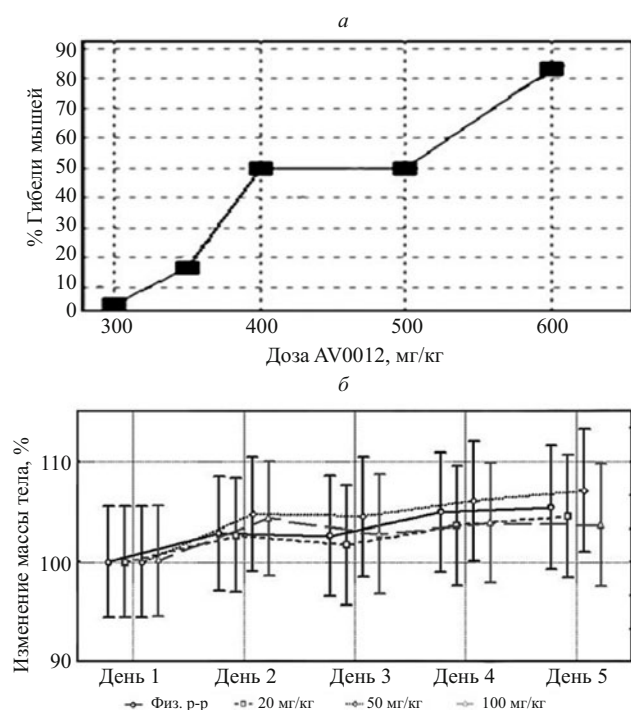


Рис. 1. Смертность мышей в ходе изучения острой токсичности AV0012 при в/б ведении (а) и изменения средней массы тела мышей по отношению к исходному значению, принятому за 100 % ($M \pm m$), при изучении МПД AV0012 при в/б ведении (б).

соблюдением принципов гуманного обращения с животными.

В исследованиях использовались самцы мышей линии SHK массой 20–25 г (питомник “Андреевка” РАМН), мыши линии C57BL/6 массой 18–20 г в возрасте 8–12 недель (питомник “Столбовая” РАМН), аутбредные крысы, выведенные на базе линии Wistar (виварий института физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины), возраст которых к началу введения составил 8 недель, и здоровые обезьяны вида Rhesus macaques возрастом 4,5–5 лет (питомник ФГБУ НИИ медицинской приматологии РАМН).

Мыши и крысы содержались в стандартных поликарбонатных клетках группами по 10–12 животных при 12-часовом световом режиме и температуре 22–24 °С, на стандартном брикетированном корме, при свободном доступе к воде и пище. Обезьяны в течение 2 последних месяцев не использовались в экспериментах и находились в жилых клетках и в свободном двигательном режиме. Рацион кормления обезьян включал натуральные продукты, рекомендуемые для данного вида приматов.

Изучение острой и субхронической токсичности, а также оценку максимально переносимой дозы (МПД) AV0012 проводили при внутрибрюшинном (в/б) введении препарата в физиологическом растворе мышам линии SHK в объеме 10 мл раствора на 1 кг массы тела. Субхроническую токсичность AV0012 изучали на обезьянах путем ежедневного перорального (п/о)

введения AV0012 в стерильном физиологическом растворе. При изучении хронической токсичности использовали внутрижелудочное (в/ж) введение AV0012 крысам с помощью зонда в виде суспензии в 1 % крахмальном клейстере (5 мл/кг). Контрольным животным вводили 1 % крахмальным клейстер в эквивалентных объемах. Растворы AV0012 в стерильном физиологическом растворе и суспензию в 1 % крахмальном клейстере готовили непосредственно перед применением.

При исследовании уровня хромосомных aberrаций суспензию AV0012 готовили с 0,5 % раствором Tween-80 и вводили мышам линии C57BL/6 перорально с помощью зонда. Мышам контрольной группы (негативный контроль) вводили эквивалентные количества 0,5 % раствора Tween-80. В качестве позитивного контроля использовали циклофосфамид, который вводили в/б.

При исследовании субхронической токсичности на обезьянах и хронической токсичности на крысах использовали п/о и в/ж введение соединения, поскольку п/о введение является планируемым способом введения человеку. При выборе тестируемых доз для изучения хронической токсичности руководствовались значениями ЛД₅₀ и МПД, которые были определены в более ранних экспериментах. Введение в высшей дозе, 100 мг/кг (мыши, субхроническая токсичность), 160 мг/кг (крысы, хроническая токсичность) предполагало выявление возможных токсических эффектов. Минимальная исследуемая доза 40 мг/кг (крысы и обезьяны) соответствовала планируемой терапевтической дозе для человека. Третья доза 80 мг/кг (крысы, хроническая токсичность) являлась промежуточной.

Острую токсичность определяли на мышах при в/б введении AV0012 в дозах 300, 350, 400 и 500 мг/кг. Каждая группа включала по 6 самцов мышей. Величины летальных доз рассчитывали по методу Финни с помощью программы BioStat-2006 на основании данных о смертности в течение 14 сут после введения AV0012 (рис. 1, а).

Максимально переносимую дозу (МПД > 100 мг/кг) определяли на самцах мышей линии SHK при в/б введении AV0012 в дозах 20, 50 и 100 мг/кг 1 раз в сутки в течение 5 дней (рис. 1, б) по ранее описанной методике [2]. Каждая экспериментальная группа включала 8 животных. Учитывали массу тела и смертность мышей. Животные наблюдались в течение 2 недель после последнего введения AV0012.

Субхроническую токсичность AV0012 на 20 мышах изучали в плацебо-контролируемом эксперименте при в/б введении препарата в дозе 100 мг/кг 1 раз в сутки в течение 2 недель. Учитывали смертность животных и изменения массы тела (рис. 2, а), также проводили биохимический анализ крови (рис. 2, б, в). Спустя 24 ч после последнего введения AV0012 половину животных в каждой группе декапитировали, отбирали пробы крови и проводили биохимическое исследова-

ние крови. Наблюдение за оставшимися животными продолжалось в течение последующих 14 дней с целью выявления отставленных эффектов препарата.

Изучение биохимических показателей проводили на полуавтоматическом биохимическом анализаторе Sapphire 120 (Audit Diagnostics, Ирландия) с использованием диагностических наборов для фотометрического определения активности аланин- и аспаргатаминотрансферазы, а также содержания глюкозы и мочевины в плазме крови.

Субхроническую токсичность AV0012 на обезьянах изучали при п/о введении препарата в дозе 40 мг/кг в течение 30 дней. В эксперимент было вовлечено 6 обезьян (3 самца и 3 самки).

После предварительной внутривенной (в/в) транквилизации обезьян смесью Ксила и Золетила в соотношении 0,1 и 0,05 мл/кг вводили AV0012 п/о в дозе 10 мг/кг в 5 мл физиологического раствора и затем дополнительно давали запить 5 – 10 мл физиологического раствора. Введение AV0012 осуществляли ежедневно 1 раз в день в первой половине дня. Осмотр каждого животного проводили в течение первого часа после введения препарата. В случае установления отклонений в состоянии животных клинический осмотр проводили ежедневно, а в случае стремительного развития неблагоприятных признаков — не менее 2 раз в день. Животных взвешивали еженедельно в ходе всего эксперимента. Ежедневно отмечали потребление корма и воды животными, содержащимися в отдельных клетках. В ходе эксперимента кровь у всех подопытных обезьян брали из левой локтевой вены перед началом и на 31 день исследования. У всех животных пробы крови брали в объеме 200 – 400 мкл, в которых определяли активированное тромбопластиновое и протромбиновое время. Определение показателей гемостаза проводили на коагулометре “Солар” (Россия) с использованием стандартных методов и наборов реактивов “АЧТВ-тест” и “Ренампластин” НПО “Ренам” (Россия).

Гематологические исследования были выполнены перед началом введения препарата и на 31 день исследования. В образцах цельной крови определяли следующие параметры: количество эритроцитов (RBC), среднее содержание гемоглобина в клетке (MCH) (расчетное значение), уровень гемоглобина (Hb), средняя концентрация гемоглобина в клетке (MCHC) (расчетное значение), гематокрит (HCT), средний объем эритроцита (MCV) (расчетное значение), количество лейкоцитов (WBC), количество тромбоцитов (PLT) и лейкоформулу.

Биохимический анализ плазмы крови осуществляли перед началом и на 31 день исследования. В образцах плазмы крови определяли активность аланин- и аспаргатаминотрансферазы и щелочной фосфатазы, содержание общего белка, альбумина, глобулина (расчетное значение), альбумин/глобулиновый индекс

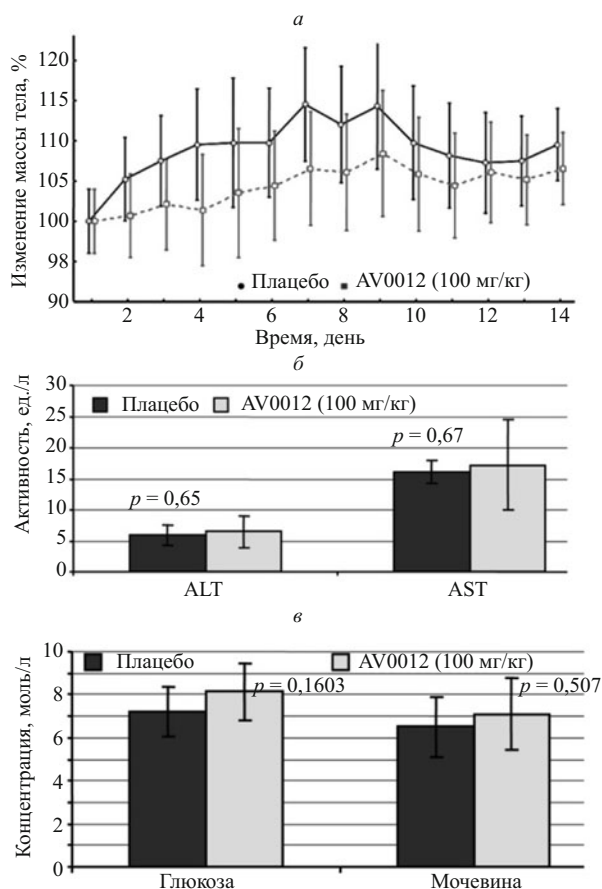


Рис. 2. Изменения средней массы тела мышей по отношению к исходному значению, принятому за 100 %, при изучении подострой токсичности AV0012 при в/б введении (а); средние значения активности ALT и AST (Ед./л) (б), а также концентрация глюкозы и мочевины (ммоль/л) (в) в плазме крови мышей после 2 недель в/б введения AV0012 ($M \pm m$).

(расчетное значение), мочевины, креатинина, триглицеридов, холестерина, общего билирубина и глюкозы.

Для анализа данных использовали описательную статистику: рассчитывали средние значения показателей и их стандартные ошибки ($M \pm m$). При нормальном распределении (по критерию Колмогорова-Смирнова) достоверность различий показателей между группами определяли с помощью *t*-критерия Стьюдента. Анализ был выполнен для каждого пола отдельно с помощью статистического программного пакета Statistica 6. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Хроническую токсичность AV0012 на крысах изучали в условиях 6-месячного эксперимента при в/ж введении крысам в дозах 40, 80 и 160 мг/кг. В эксперименте было использовано 160 крыс, возраст которых к началу введения составил 8 недель. Животные были разделены на 4 группы: по 20 самцов и 20 самок в каждой. Экспериментальные группы формировались методом случайной выборки с учетом массы тела в качестве ведущего показателя (рис. 3). Индивидуальные

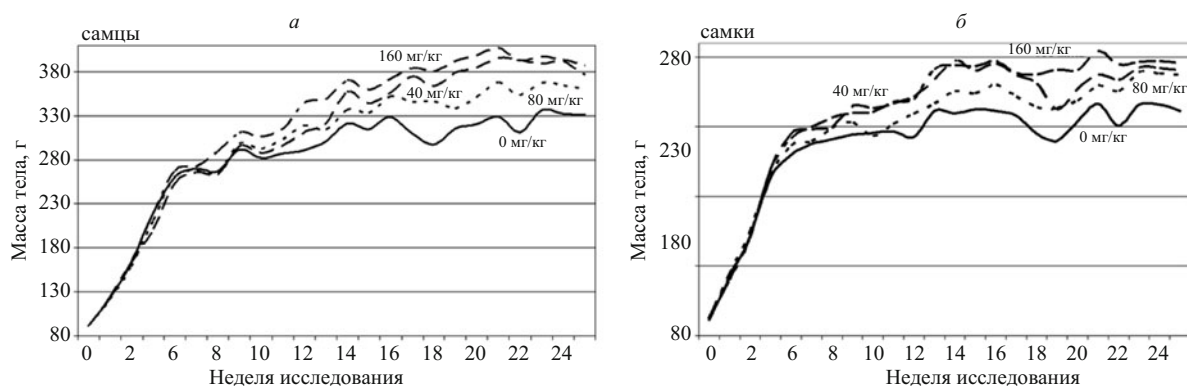


Рис. 3. Динамика изменения средней массы тела крыс контрольной (а) и опытных (б) групп в ходе изучения хронической (6 мес) токсичности соединения AV0012 при длительном в/ж введении.

значения массы отличались от среднего значения в пределах одного пола не более чем на 10 %.

При проведении эксперимента осуществляли ежедневный контроль общего состояния и поведения животных, потребления корма и воды. Оценивали состояние шерсти, открытых участков кожи, видимых слизистых оболочек, характер выделений из естественных отверстий тела. Полное обследование животных проводили трижды — на 31, 91 и 181 день исследования. При этом часть животных из каждой группы выводили из эксперимента для проведения гематологических, биохимических и патоморфологических исследований. Животных подвергали эвтаназии в CO_2 -камере и полной некропии. Гематологические показатели определяли с помощью анализатора “ALcon 871” фирмы “AL-systems” (Германия). Определяли стандартный набор показателей (см. изучение субхронической токсичности у обезьян). Лейкоцитарную формулу крови и клеточный состав костного мозга определяли в окрашенных мазках методом световой микроскопии. Окраску мазков производили по методу Паппенгейма. Для оценки гемостаза определяли протромбиновое и активированное тромбопластиновое время по методу Квика с использованием стандартных наборов фирмы “Технология стандарт” (Барнаул).

Стандартный набор биохимических показателей и сыворотки крови (см. изучение субхронической токсичности у обезьян) определяли с помощью полуавтоматического анализатора “RA-50” фирмы “Bayer” (Германия) с использованием унифицированных методов и биохимических наборов, выпускаемых фирмами “PLIVA — Lachema Diagnostika” (Чехия), “ДИА-КОН-ДС” (Россия) и “Bio Systems SA” (Испания).

Морфологическое состояние внутренних органов оценивали визуально при вскрытии и микроскопически при изучении гистологических препаратов. Результаты внешнего осмотра, грудной, брюшной и черепной полостей, массу органов регистрировали в протоколах вскрытия животных. Микроскопическому исследованию подвергали препараты сердца, легких, печени (2 доли), почек, селезенки, мозга (3 отдела: пе-

редний, средний и задний), щитовидной железы, тимуса, подчелюстной слюнной железы с лимфатическими узлами, поджелудочной железы, стенки желудка, пищевода, трахеи, аорты, надпочечников, яичников у самок и яичек с эпидидимисами у самцов. Кусочки органов фиксировали в 10 % растворе нейтрального формалина в течение 1 сут. После стандартной проводки по спиртам кусочки заливали парафином. Срезы толщиной 5–6 мкм готовили с помощью санного микротомата, окрашивали гематоксилин-эозином и заключали в целлоидин. Анализ гистологических препаратов проводили с помощью светового микроскопа “Olympus CX 41”.

Статистическую обработку полученных результатов исследования проводили методами вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента.

Тестирование AV0012 проводили с использованием теста Эймса MPF™ (Xenometrix, Швейцария) в 384-луночных платах с гистиридиновым ауксотрофом *Salmonella typhimurium* штаммов TA1537, TA98 (мутации, обусловленные сдвигом рамки считывания генетического кода) и TA100, TA1535 (замещение оснований) в соответствии с протоколом производителя. AV0012 использовали в концентрациях 10, 100 и 300 мкМ.

Цитогенетическую активность AV0012 исследовали методом учета хромосомных aberrаций в клетках костного мозга инбредных мышей линии C57BL/6. Однократное п/о введение AV0012 в дозах 18 и 70 мг/кг проводили в виде суспензии в Twin-80 с фиксацией клеточного материала через 24 ч. В отдельной серии экспериментов соединение вводили 5 дней подряд в дозе 18 мг/кг самцам и самкам с фиксацией клеточного материала через 6 ч после последнего введения. Мышам контрольной группы (негативный контроль) вводили эквивалентные количества растворителя (раствор Tween-80). В качестве позитивного контроля использовали циклофосфамид, который вводили в/б в дозе 20 мг/кг при длительности экспозиции — 24 ч.

Цитогенетические препараты костного мозга бедренных костей готовили стандартным суховоздушным

методом [6]. Во всех вариантах экспериментов за 2,5 ч до забоя животным вводили колхицин из расчета 4 мг/кг с целью подавления формирования ахроматинового веретена клеточного деления и накопления метафаз.

Окраску производили азур-эозином. Микроскопический анализ проводили на микроскопе Standart-20 (Carl Zeiss) при маслоиммерсионном увеличении 10×100 , в соответствии с принципами цитогенетического анализа, описанного ранее [5]. В отдельной категории – клетки с множественными повреждениями – выделяли метафазы, имеющие более 5 хромосомных повреждений. От каждого животного анализировали по 100 метафаз. Статистическую обработку (ϕ -критерий) проводили путем сравнения доли поврежденных метафаз в контрольной и экспериментальной группах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование острой токсичности, МПД и двухнедельной токсичности AV0012 при в/б введении мышам показало, что этот фармакологическое вещество малотоксично для мышей.

Величины летальных доз, рассчитанные по методу Финни на основании полученных результатов при изучении острой токсичности AV0012 (рис. 1), составили: $LD_{50} = 467$ мг/кг и $LD_{10} = 288$ мг/кг. Значение LD_{50} при в/б введении мышам находилось в диапазоне 101 – 1000 мг/кг, что явилось основанием для отнесения AV0012 к IV классу малотоксичных соединений согласно общепринятой классификации [3].

При изучении МПД AV0012 дозы 20, 50 и 100 мг/кг не вызывали снижения массы тела мышей, по сравнению с контролем (рис. 1, б), а при наблюдении за мышами в течение 14 дней после последнего введения AV0012 не было обнаружено отставленных эффектов и гибели животных. Летальные дозы, рассчитанные при изучении острой токсичности, хорошо согласуются с величиной МПД, составлявшей > 100 мг/кг.

При изучении подострой токсичности AV0012 (ежедневное в/б введение в дозе 100 мг/кг в течение 14 дней) также не наблюдалось снижения массы тела мышей (рис. 2, а) и других проявлений общетоксического действия препарата. Биохимические исследования крови мышей, отобранной после завершения введения AV0012, не выявили отклонений, свидетельствующих о токсическом действии тестируемого соединения (рис. 2, б, в).

Изучение субхронической токсичности AV0012 на самцах и самках обезьян показало, что ежедневное п/о введение AV0012 в дозе 40 мг/кг в течение 30 дней не привело к снижению массы тела по сравнению с 1 днем введения препарата. Многократное п/о введение AV0012 в течение 1 мес эксперимента не вызвало статистически значимых изменений протромбинового и активированного тромбопластинового времени у обезьян обоего пола. Гематологические и биохимиче-

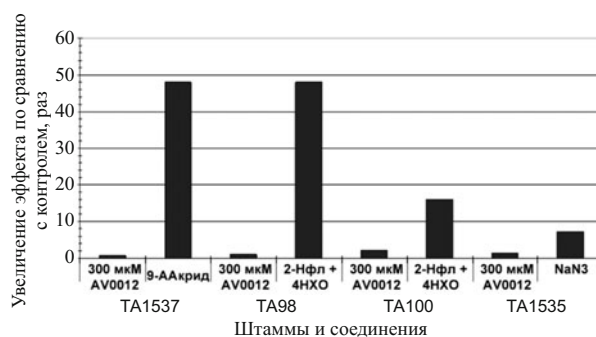


Рис. 4. Результаты теста Эймса. 9-ААкрид — 15 мкг/мл 9-аминоакридина, 2-НФл + 4НХО — 2 мкг/мл 2-нитрофлуорена + 0,1 мкг/мл 4-нитрохиолин-N-оксида, NaN₃ — 2 мкг/мл азида натрия.

ские показатели крови у подопытных обезьян находились в пределах физиологической нормы для данного вида животных.

За 3 месяца наблюдений после окончания приема AV0012 у обезьян не выявлено каких-либо нарушений общего состояния и поведения. Гематологические показатели — без отклонений от нормы. Психомоциональная сфера — без отклонений, животные адекватны, реагируют на внешние воздействия, двигательных нарушений не выявлено. Аппетит сохранен, стул оформлен. Моча, фекалии — нормального цвета, без патологических примесей. Кожные покровы, видимые слизистые, склеры глаз — естественного цвета.

В целом изучение субхронической токсичности AV0012 при многократном п/о введении обезьянам вида Rhesus macaques в дозе 40 мг/кг в течение 30 дней не обнаружило признаков токсического действия препарата и негативного влияния на физиологические показатели животных.

Изучение 6-месячной хронической токсичности AV0012 на крысах показало, что длительное в/ж введение AV0012 в дозах 40, 80 и 160 мг/кг не оказало негативного влияния на общее состояние и поведение животных. Клинические симптомы отравления отсутствовали. Крысы сохраняли обычную двигательную активность, опрятный вид: шерсть гладкая, блестящая; кожные покровы без повреждений. Потребление корма и воды соответствовало нормам, установленным для данного вида животных. На 3 неделе эксперимента в группе с максимальной дозой нагрузки была зафиксирована гибель одного животного, которая не была связана с эффектом препарата.

Анализ динамики изменений массы тела свидетельствует о том, что прирост массы тела крыс, получавших AV0012, превышал аналогичный показатель контрольной группы (рис. 3). К концу исследования средняя масса тела животных, которым AV0012 вводили в дозе 40 мг/кг, оказалась выше показателя параллельного контроля на 12 % у самок и на 17 % у самцов, в дозе 80 мг/кг — на 11 % у самок и 9 % у самцов и в дозе 160 мг/кг — на 14 % у крыс обоих полов.

Клеточный состав периферической крови экспериментальных групп существенно не отличался от контроля. Изучение биохимических показателей крови показало, что наблюдавшиеся изменения выражены в небольшой степени, что свидетельствует о незначительных функциональных нарушениях, которые носили обратимый характер и не отмечались в конце эксперимента. Показатели гемостаза крыс при введении AV0012 в 3 экспериментальных дозах не отличались от показателей контрольных животных на протяжении всего эксперимента. Цитологический анализ костного мозга, проведенный в конце исследования, не выявил изменений миелограмм животных опытных групп.

Макроскопическое исследование не выявило различий между опытом и контролем. Шерсть крыс была блестящей, кожные покровы не повреждены. Видимые слизистые оболочки были бледными, гладкими. При осмотре брюшной и грудной полостей нарушений в положении внутренних органов не отмечалось. Серозные оболочки были тонкие, влажные, гладкие, блестящие.

Макроскопическое и микроскопическое исследование некропсийного материала, отобранного по завершению 180-дневного в/ж введения AV0012 не выявило существенных различий гистологической структуры изученных внутренних органов крыс (сердечная мышца, лёгкие, аорта, трахея, бронхи, слизистая пищевода, желудок, кишечник, селезёнка, почки, надпочечники, печень, поджелудочная железа, щитовидная железа, яичники, семенники, головной мозг, подчелюстные лимфатические узлы, слюнные железы, тимус) в опыте и контроле.

Средние значения массовых коэффициентов органов существенно не различались у животных контрольной и опытных групп. В конце эксперимента у самцов крыс всех опытных групп отмечено уменьшение массового коэффициента печени. Незначительное уменьшение коэффициента массы легких наблюдалось у животных обоего пола через 3 мес после введения вещества в максимальной дозе. Кроме того, в конце исследования у крыс, получавших AV0012 в максимальной дозе, массовые коэффициенты гонад превышали контрольные значения.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в/ж введение AV0012 в возрастающих дозах (40, 80 и 160 мг/кг) не оказало заметного влияния на состояние и поведение экспериментальных крыс, у которых не было отмечено клинических проявлений интоксикации в течение всего периода наблюдения (181 день). Потребление корма и воды крысами в опыте не отличалось от контроля, а величина прироста массы тела оказалась несколько выше, чем в контроле. Существенных изменений гематологических показателей у крыс под воздействием AV0012 не отмечалось. В системе гемостаза нарушений отмечено не было. Нарушений кроветворения не выявлено. В целом результаты исследования свидетельствуют об отсутствии токсиче-

ского действия AV0012 на систему крови. Средние значения исследованных биохимических показателей крови крыс опытных групп соответствовали показателям параллельного контроля и не выходили за пределы физиологической нормы для данного вида животных. Анализ результатов гистологического исследования органов и тканей экспериментальных крыс, подвергнутых многократному внутрижелудочному введению AV0012 в возрастающих дозах в разные сроки наблюдения (31, 91 и 181 день), не выявил каких-либо существенных отклонений. Не установлено местно-раздражающего действия препарата на слизистую при длительном в/ж введении. В целом анализ комплекса биологических показателей, характеризующих состояние основных физиологических систем организма крыс на фоне многократного внутрижелудочного введения AV0012 в дозах 40, 80 и 160 мг/кг, не выявил токсических изменений в течение 181 дня, что позволяет сделать вывод о том, что AV0012 не оказывает токсического действия на организм подопытных крыс в условиях хронического введения в указанных дозах.

Исследование мутагенности с использованием теста Эймса показало, что AV0012 в концентрациях до 300 мкМ не является мутагенным (рис. 4).

Исследование мутагенной активности AV0012 методом учета хромосомных aberrаций показало, что в клетках костного мозга самцов мышей контрольной группы уровень хромосомных aberrаций составил $1,4 \pm 0,5$ %. Введение циклофосамида в дозе 20 мг/кг вызвало увеличение уровня хромосомных aberrаций до $19,2 \pm 1,6$ %, что статистически значимо отличается от показателя контроля и соответствует литературным данным, характеризующим цитогенетический эффект мутагена. После однократного введения AV0012 в дозах 18 и 70 мг/кг уровень хромосомных aberrаций в клетках костного мозга самцов зарегистрирован на уровне $1,4 \pm 0,5$ и $1,6 \pm 0,6$ % соответственно. Статистическое сравнение полученных показателей с показателем негативного контроля не выявило значимых отличий. У самцов мышей после 5-кратного введения препарата в дозе 18 мг/кг уровень хромосомных aberrаций составил $1,6 \pm 0,6$ %, что также статистически не отличается от показателя негативного контроля.

Спонтанный уровень хромосомных aberrаций в клетках костного мозга самок составил $1,4 \pm 0,5$ %. После 5-кратного введения препарата в дозе 18 мг/кг у самок мышей уровень хромосомных aberrаций составил $1,2 \pm 0,4$ %. Статистическое сравнение полученных показателей с показателем негативного контроля не выявило значимых отличий.

Таким образом, установлено, что в исследованных дозах AV0012 не обладает мутагенной активностью.

ВЫВОДЫ

Исследование острой, подострой, субхронической и хронической токсичности AV0012 показало, что AV0012 характеризуется низкой токсичностью при разных путях введения экспериментальным животным разных видов (мыши линии SHK, крысы линии Wistar и обезьяны вида Rhesus macaques). Исследование генетической токсичности AV0012 в тесте Эймса и методом учета хромосомных aberrаций в клетках костного мозга мышей свидетельствует об отсутствии у AV0012 мутагенной активности. Результаты оценки общетоксического действия и мутагенных свойств соединения AV0012, представленные в данной работе, а также результаты изучения фармакологической активности, фармакокинетики и метаболизма AV0012, опубликованные в [2], позволяют рассматривать это соединение в качестве кандидата на проведение клинических исследований фазы I.

Авторы выражают глубокую благодарность Дурневу А. Д. д.м.н., проф., член-корр. РАМН, за обсуждение результатов работы и полезные советы.

ЛИТЕРАТУРА

1. А. В. Иващенко, П. М. Яманушкин, О. Д. Митькин и др., *Хим.-фарм. журн.*, **48**(9), 7 – 19 (2014); *Pharm. Chem. J.*, **48**(9) 571 – 583 (2014).
2. А. В. Иващенко, П. М. Яманушкин, О. Д. Митькин и др., *Эксперим. и клинич. фармакол.*, **77**(4), 33 – 41 (2014).
3. К. К. Сидоров, *Токсикология новых промышленных химических веществ*, Вып. 13. Медицина, Москва (1973), сс. 47 – 60.
4. Р. У. Хабриев, *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*, ЗАО “ИИА “Ремедиум”, Москва (2005), с. 47 – 60.
5. M. Ishidate, *Data book of chromosomal aberration test in vitro*, Elsevier, Amsterdam-NY-Oxford (1988).
6. R. J. Preston, B. J. Dean, S. Galloway, et al., *Mutation Res.*, **189**, 157 – 165 (1987).

Поступила 24.09.14

PRECLINICAL STUDY OF SAFETY OF THE NEW PHARMACOLOGICAL SUBSTANCE AV0012 TO TREAT HEPATITIS C

A. V. Ivashchenko^{1,2,3}, P. M. Yamanushkin^{1*}, O. D. Mit'kin¹, E. V. Ezhova¹, O. M. Korzinov^{1,4}, N. A. Shevkun¹, R. N. Karapetyan¹, V. V. Bychko³, A. A. Ivashchenko^{1,4}, V. Z. Agrba⁵, B. A. Lapin⁵, S. V. Orlov⁵, and I. E. Kuznetsov⁶

¹ Chemical Diversity Research Institute, ul. Rabochaya 2-a, Khimki, Moscow Reg., St. 2-a, 141401 Russia

² ASAVI LLC, E. Hallandale Beach Blvd. #442, 1835 Hallandale Beach, FL, 33009, United States

³ ChemDiv Inc., 6605 Nancy Ridge Drive, San Diego, CA, 92121, United States

⁴ The Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Moscow oblast, 141700 Russia

⁵ Research Institute of Medical Primatology, Russian Academy of Medical Sciences, Sochi-Adler, Krasnodar krai, 354376, Russia

⁶ National University of Pharmacy, ul. Pushkinskaya 53, 61002 Kharkov, Ukraine

* e-mail: ypm@ihr.ru

Pharmacological safety of a new type of HCV inhibitor, AV0012, was studied including acute, subchronic and chronic toxicity in mice, rats and monkeys. Genotoxicity was assessed using the Ames test and the chromosomal aberrations assay in the bone marrow cells of mice. It is established that AV0012 has low toxicity in SHK line mice, Wistar line rats, and monkey of Rhesus macaques species. Results obtained in the study of genetic toxicity showed that AV0012 exhibits no mutagenic activity. Data on general toxicity and mutagenicity discussed in this paper, together with data on the pharmacological activity, pharmacokinetics, and metabolism published previously, allow us to consider AV0012 as a candidate drug for clinical research phase I.

Keywords: 2,4-bis-dimethylaminomethyl-1-methyl-6-pyridin-3-yl-1H-indol-3-carboxylic acid ethyl ester; acute toxicity; maximum tolerated dose; subchronic toxicity; chronic toxicity; mutagenicity