

DOI: <https://doi.org/10.17816/EID108910>

# Доклиническое исследование токсикологического профиля нового соединения ХС221G1

С.А. Суханова<sup>1</sup>, О.В. Проскурина<sup>1</sup>, Е.А. Джайн<sup>2</sup>, А.А. Глобенко<sup>2</sup>, М.И. Багаева<sup>2</sup>,  
А.В. Рыдловская<sup>3</sup>, В.Е. Небольсин<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Всесоюзный научный центр по безопасности биологически активных веществ, Старая Купавна, Российская Федерация

<sup>2</sup> Валента Фарм, Москва, Российская Федерация

<sup>3</sup> Фарминтерпрайсез, Москва, Российская Федерация

## АННОТАЦИЯ

Ключевой особенностью COVID-19 является интенсивное вирусиндуцированное воспаление в жизненно важных структурах организма и пространственно-временная дисрегуляция синтеза про- и противовоспалительных цитокинов и хемокинов, что выражается непредсказуемостью клинического течения и высоким риском формирования «цитокинового шторма». Состояние «цитокинового шторма» является патогенетической основой развития грозных осложнений, поэтому актуальной задачей ставится подбор эффективных и безопасных схем терапии, позволяющих управлять вирусиндуцированным воспалением в рамках упреждающей противовоспалительной терапии.

В работе представлена токсикологическая характеристика оригинального низкомолекулярного соединения ХС221G1 (1-[2-(1-метилимидазол-4-ил)-этил] пергидроазин-2,6-дион) по результатам доклинических исследований. Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии у ХС221G1 токсического действия при многократном длительном применении. Все животные хорошо переносили введение соединения, доза без видимого нежелательного эффекта (NOAEL) составляла 30 мг/кг в сутки для собак и 450 мг/кг в сутки для крыс. Установлено отсутствие влияния ХС221G1 на форменные элементы крови, систему кроветворения и гемостаза, отсутствие у соединения цитотоксических, мутагенных, генотоксических и канцерогенных свойств, а также анафилактического и иммунотоксического действия.

Все известные данные позволяют классифицировать ХС221G1 как малотоксичное соединение и считать профиль безопасности нового соединения обоснованно благоприятным.

**Ключевые слова:** COVID-19; упреждающая противовоспалительная терапия; ХС221G1; токсикология.

## Как цитировать

Суханова С.А., Проскурина О.В., Джайн Е.А., Глобенко А.А., Багаева М.И., Рыдловская А.В., Небольсин В.Е. Доклиническое исследование токсикологического профиля нового соединения ХС221G1 // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2021. Т. 26, № 5. С. 200–213. DOI: <https://doi.org/10.17816/EID108910>

DOI: <https://doi.org/10.17816/EID108910>

# Toxicity profile of the new compound XC221G1 from pre-clinical studies

Svetlana A. Suhanova<sup>1</sup>, Oksana V. Proskurina<sup>1</sup>, Ekaterina A. Jain<sup>2</sup>, Aleksander A. Globenko<sup>2</sup>, Madina I. Bagaeva<sup>2</sup>, Anastasia V. Rydlovskaya<sup>3</sup>, Vladimir E. Nebolsin<sup>3</sup>

<sup>1</sup> All-Union Scientific Center for the Safety of Biologically Active Substances, Staraja Kupavna, Russian Federation

<sup>2</sup> Valenta Pharm Pharmaceutical Company, Moscow, Russian Federation

<sup>3</sup> Farminterprayses, Moscow, Russian Federation

## ABSTRACT

The major feature of COVID-19 is intensive virus-induced inflammation in vital body organs and spatiotemporal dysregulation of pro- and anti-inflammatory cytokines and chemokines synthesis. All this leads to unpredicted clinical progression and high risk of "cytokine storm" development. The "cytokine storm" is the pathogenetic basis for further development of life-threatening complications. Thus, there is a huge need to select effective and safe approaches that allow to control virus-induced inflammation as a part of preventive anti-inflammatory therapy.

This article presents toxicological characteristics of the original low-molecular compound XC221G1 (1-[2-(1-methylimidazole-4-yl)-ethyl]perhydroazin-2,6-dione) from pre-clinical studies.

The obtained results demonstrate that the XC221G1 does not have any toxic effect in repeated long-term administration. The compound was well tolerated by all animals. The no-observed-adverse-effect level (NOAEL) was 30 mg/kg per day for dogs and 450 mg/kg per day for rats. There were no effects of XC221G1 on blood count, hematopoiesis and hemostasis. As well as no cytotoxic, mutagenic, genotoxic, carcinogenic properties or anaphylactogenic and immunotoxic activity were revealed for XC221G1. All known data enable to classify XC221G1 as a low toxic compound and consider its safety profile as reasonably favorable.

**Keywords:** COVID-19; preventive anti-inflammatory therapy; XC221G1; toxicology.

## To cite this article

Suhanova SA, Proskurina OV, Jain EA, Globenko AA, Bagaeva MI, Rydlovskaya AV, Nebolsin VE. Toxicity profile of the new compound XC221G1 from pre-clinical studies. *Epidemiology and Infectious Diseases*. 2021;26(5):200–213. DOI: <https://doi.org/10.17816/EID108910>

Received: 30.06.2022

Accepted: 06.07.2022

Published: 11.08.2022

## ВВЕДЕНИЕ

Вспышка новой коронавирусной инфекции (COVID-19) в 2019 году стремительно приобрела статус важной медицинской проблемы, и уже в марте 2020 года была объявлена Всемирной организацией здравоохранения чрезвычайной ситуацией международного значения [1]. Особенностью COVID-19 является интенсивное вирусиндуцированное воспаление в жизненно важных структурах организма и пространственно-временная дисрегуляция синтеза про-/противовоспалительных цитокинов и хемокинов, что выражается в непредсказуемости клинического течения и высоком риске формирования «цитокинового шторма». Состояние «цитокинового шторма» является патогенетической основой развития таких грозных осложнений, как тромбозомболические события [2], острый респираторный дистресс-синдром [3], полиорганный недостаточность [4]. В результате ряда исследований установлено, что клинические проявления и инструментальные признаки вирусной пневмонии могут развиваться уже через 24–72 ч от начала репликации вируса в респираторном тракте [5].

В этой ситуации актуальной задачей практического здравоохранения является подбор эффективных и безопасных схем терапии, позволяющих управлять вирусиндуцированным воспалением в рамках упреждающей противовоспалительной терапии.

В настоящей работе представлена токсикологическая характеристика оригинального низкомолекулярного соединения XC221G1 (1-[2-(1-метилимидазол-4-ил)-этил]пергидроазин-2,6-дион) по результатам доклинических исследований. Соединение XC221G1 (разработчик ООО «ФарминтерпрайсеЗ») активно изучалось с 2014 года в качестве противовоспалительного и противовирусного средства для лечения и профилактики заболеваний, вызываемых респираторными вирусами (респираторно-синцитиальный вирус, вирус гриппа, риновирус, SARS-CoV-1 и др.). Полученные результаты характеризуют уникальный фармакодинамический профиль XC221G1, выражающийся в возможности управления уровнем продукции ключевых маркеров воспаления ИЛ-6, ИЛ-8 и CXCL10. В связи с этим у разработчиков было достаточно оснований полагать, что XC221G1 проявит благоприятный профиль польза/риск при лечении пациентов с COVID-19, что и было подтверждено в последующих клинических исследованиях.

**Цели исследования** — оценка токсикологического профиля соединения XC221G1 при однократном и многократном введении; изучение генотоксичности, канцерогенного потенциала, репродуктивной токсичности, аллергизирующего действия и иммунотоксичности.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования на животных выполняли с соблюдением принципов надлежащей лабораторной практики (Good laboratory practice, GLP; ГОСТ 33044-2014 «Принципы

надлежащей лабораторной практики»<sup>1</sup>, Приказ Минздрава России от 01.04.2016 N 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики»<sup>2</sup>), а также других рекомендаций по содержанию и использованию животных [6]. Лабораторных животных получали из питомников ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий» Федерального медико-биологического агентства России, питомника Charles River (Германия) или исследовательской организации MediTox s.r.o. (Чехия).

## Этическое утверждение

Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с согласованными авторскими рекомендациями (IAVES, 23.07.2010<sup>3</sup>). Протоколы исследований одобрены соответствующими комиссиями по биоэтике (заключения №№ 3/2016-1, 6/2016-1, 2/2017-1, 3/2016-3, 18/2016-2, 26/2016-1, 5-2016\_1, 16/2016-1, 12/2016-2, 12/2016-4, 6/2016-2, 12/2016-3, 73/2018).

## Статистический анализ

Статистический анализ проводили с помощью программы Graph PadPrism (версия 5) и с использованием программного пакета Statistica v. 7. Для показателей рассчитывали медианы, средние арифметические значения, стандартные ошибки средних арифметических значений и стандартные отклонения. Данные для самцов и самок анализировали отдельно. Для межгрупповых сравнений в экспериментах использовали тест Крускала–Уоллиса с пост-тестом Данна (при малом количестве наблюдений) или однофакторный дисперсионный анализ с пост-тестом Даннета (после подтверждения нормального характера распределения по критерию Колмогорова–Смирнова и однородности дисперсии по критерию Бартлетта или F-критерию). При попарных сравнениях применяли t-критерий (при нормальном распределении) или критерий Манна–Уитни (при распределении, отличающемся от нормального). Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## Изучение токсичности при однократном введении

Использовали аутбредных (нелинейных) лабораторных мышей обоих полов (масса тела самцов 21–25 г, масса тела самок 20–24 г) и аутбредных крыс обоих полов (масса тела самцов 195–205 г, масса тела самок 190–205 г). Фармацевтическую субстанцию применяли в форме

<sup>1</sup> Межгосударственный стандарт. Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/1200115791>. Дата обращения: 15.02.2021.

<sup>2</sup> Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/420350679>. Дата обращения: 15.02.2021.

<sup>3</sup> International Association of Veterinary Editors. Consensus Author Guidelines on Animal Ethics and Welfare for Veterinary Journals. [Internet]. Режим доступа: <https://static1.squarespace.com/static/53e16b74e4b0528c244ec998/t/543acda6e4b094d04bcacacd/1413139878532/IAVE-AuthorGuidelines.pdf>. Дата обращения: 15.02.2021.

раствора; в качестве носителя использовали 1% раствор полисорбата-80 в дистиллированной воде. Мышам ( $n=6$  каждого пола в группе) однократно внутрижелудочно вводили ХС221G1 в дозе 5000 мг/кг или носитель. Крысы в эксперименте с внутрижелудочным дозированием ( $n=4$  каждого пола в группе) получали однократно ХС221G1 в дозе 5000 мг/кг (максимальная доза, которую технически можно было ввести мышам или крысам) или носитель. До введения исследуемого соединения оценивали массу тела животных, в течение 60 мин после дозирования наблюдали за состоянием особей: оценивали признаки угнетения или возбуждения центральной нервной системы, судороги, тремор, признаки изменения активности вегетативной нервной системы. На протяжении дня после дозирования оценивали смертность. За выжившими животными наблюдали в течение 14 дней после введения ХС221G1; осмотр выполняли 2 раза в день. По завершении наблюдения всех выживших животных умерщвляли путём ингаляции диоксида углерода с последующим обескровливанием.

### Изучение токсичности при многократном введении

В исследовании по подбору доз все животные получали исследуемое соединение внутрижелудочно. Во всех экспериментах половину животных умерщвляли на следующий день после завершения дозирования, оставшихся особей — на следующий день по окончании периода наблюдения. Массу тела измеряли еженедельно. Электрокардиографию (ЭКГ) с помощью электрокардиографа «Поли-Спектр-8/В» (ООО «Нейрософт, Россия), измерение артериального давления (АД) неинвазивным методом (МК-2000ST NP-NIBP Monitor, Muromachi Kikai CO, Ltd., Япония) и подсчёт частоты дыхательных движений (ЧДД) выполняли после 14 дней дозирования и по завершении восстановительного периода. Спонтанную двигательную активность крыс в тесте «открытое поле» оценивали на 15-й и 30-й дни в прямоугольной камере [7]. На 15-й и 30-й дни отбирали также образцы крови для клинического и биохимического анализа, собирали образцы мочи для общего анализа. При клиническом анализе крови оценивали количество эритроцитов, средний объём эритроцита, уровень гемоглобина, гематокрит, среднее содержание гемоглобина в клетке, среднюю концентрацию гемоглобина на клетку, количество лейкоцитов, лейкоцитарную формулу, количество тромбоцитов при помощи автоматического анализатора (BC-2800Vet, Китай). Биохимический анализ крови выполняли при помощи диагностических наборов (Ольвекс диагностикум, Россия), уровень глюкозы оценивали с использованием глюкометра (One touch Select, Швейцария), оптическую плотность измеряли с помощью фотометра (iMark, Bio-Rad, США); параметры биохимического анализа крови включали активность аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспартатаминотрансферазы (АСТ) и щелочной фосфатазы, уровень

креатинина, мочевины, триглицеридов, глюкозы, общего белка, альбуминов, глобулинов, холестерина и соотношение альбуминов и глобулинов. В общем анализе мочи (анализатор Doc UReader, Венгрия) оценивали удельную массу, pH, содержание билирубина, кетоновых тел, глюкозы, белка, эритроцитов и лейкоцитов.

Крыс или кроликов умерщвляли путём ингаляции диоксида углерода с последующим обескровливанием. Во всех экспериментах при патоморфологическом исследовании оценивали проявления раздражающего действия исследуемой субстанции или готовой лекарственной формы на слизистую оболочку желудка.

**Двухнедельное исследование токсичности на крысах.** Использовали самцов (масса тела 220–250 г) и самок (масса тела 200–220 г) аутбредных крыс. По 12 особей каждого пола распределяли для внутрижелудочного введения ХС221G1 в дозе 17,4; 87 или 174 мг/кг в сутки или носителя в течение 14 дней; выбранные дозы исследуемого соединения соответствовали эквиваленту терапевтической дозы (ТД), 5 ТД или 10 ТД для человека. Дважды в день проводили осмотр животных для регистрации смертности и оценки признаков токсичности, изменения поведения и общего состояния. После умерщвления крыс выполняли патоморфологическое исследование с оценкой массы и гистологической структуры внутренних органов.

**Исследование токсичности с тридцатидневным дозированием на крысах.** Использовали аутбредных крыс (масса тела самцов 230–260 г, масса тела самок 200–230 г). Методология исследования, изученные дозы ХС221G1, количество животных в группах и распределение по полу соответствовали дизайну, использованному для двухнедельного эксперимента. Длительность дозирования составляла 30 дней, продолжительность восстановительного периода — 30 дней.

**Исследование токсичности с трёхмесячным дозированием на крысах.** Использовали аутбредных крыс обоих полов (масса тела самцов 220–260 г, масса тела самок 210–250 г). Дизайн эксперимента был идентичен методам эксперимента с введением соединения в течение месяца, за исключением длительности дозирования (90 дней). Продолжительность восстановительного периода составила 30 дней. Оценку АД, показателей ЭКГ, ЧДД, тест «открытое поле», отбор образцов крови и мочи для анализов выполняли на 91-й день от начала дозирования и на 31-й день восстановительного периода.

**Исследование токсичности на кроликах.** Исследования проводили на кроликах породы Советская шиншилла обоих полов (масса тела 2,25–3,3 кг). Дизайн исследований на кроликах соответствовал методологии, использованной для исследований на крысах, описанной выше, за исключением оценки поведения и двигательной активности, которую проводили в ходе клинического осмотра без применения специальных методик. В группах из 12 самцов и самок животные получали внутрижелудочно ХС221G1 в дозе 9,1; 45,5 или 91 мг/кг в сутки (ТД, 5 ТД

и 10 ТД соответственно). Кроликам из контрольной группы (12 самцов и самок) вводили носитель. Проведены три серии экспериментов, в которых ХС221G1 вводили в течение разных периодов времени: 14 дней; 28 дней с восстановительным периодом 28 дней; 3 мес с восстановительным периодом 30 дней.

**Исследование с четырёхнедельным дозированием на собаках.** Собаки обоих полов ( $n=32$ , возраст 6–8,5 мес, масса тела самцов 8,4–14,4 кг, масса тела самок 7,6–13,3 кг) получали ХС221G1 перорально в форме твёрдых желатиновых капсул в дозе 6 (3 самки и 3 самца), 30 (3 самки и 3 самца) или 60 мг/кг в сутки (5 самок и 5 самцов) в течение 28 сут, что соответствовало ТД, 5 ТД и 10 ТД для человека. Животные из контрольной группы (5 самок и 5 самцов) получали твёрдые желатиновые капсулы без действующего вещества в том же количестве, что и животные из группы высшей дозы. По два животных из группы контроля и группы высшей исследуемой дозы использовали для оценки по окончании 14-дневного периода наблюдения после прекращения введения исследуемого соединения. Состояние животных оценивали 2 раза/сут в течение периода введения ХС221G1 и далее по 1 разу/сут в течение периода наблюдения. Расширенное обследование проводили 1 раз/нед. Офтальмоскопию проводили до начала введения ХС221G1, после его прекращения и по окончании периода наблюдения. До начала применения исследуемого соединения, через 1 и 3 ч после введения и по окончании периода наблюдения регистрировали температуру тела, ЧДД и оценивали АД неинвазивным методом (S+Bmed VET, Германия); измеряли ЭКГ с использованием электрокардиографа SEIVA ECG Praktik Veterinary (SEIVA, Чехия). До начала введения ХС221G1, по окончании введения и в конце периода наблюдения отбирали образцы крови для клинического и биохимического анализа (общий белок, альбумин, глобулин, отношение альбумина и глобулина, глюкоза, общий билирубин, электролиты, холестерин, триглицериды, креатинин, щелочная фосфатаза, трансаминазы, гамма-глутамилтранспептидаза, лактатдегидрогеназа), а также для оценки свёртывающей системы крови, что включало анализ общего количества тромбоцитов, активированного частичного тромбопластинового (АЧТВ) и протромбинового (ПВ) времени. Для клинического анализа использовали гематологический анализатор Pentra 60 C+ (Horiba ABX, Франция), для биохимического анализа крови — анализатор Dimension Vista 500 (Siemens Healthcare Diagnostics, Германия). АЧТВ и ПВ определяли коагулометром SStart 4 (Diagnostics Stago, Франция). Отбирали мочу для общего анализа до и после окончания введения препарата, а также после окончания периода наблюдения. Для анализа мочи использовали анализатор Urilyzer 100 Pro с тест-полосками Combi Screen PLUS (Analyticon Biotechnologies AG, Германия).

Образцы крови для токсикокинетического исследования отбирали у животных из групп низкой, средней

и высокой исследуемых доз (по 3 самца и 3 самки из каждой группы) на 1-е и 28-е сут периода введения ХС221G1 непосредственно до и в течение 24 ч после введения ХС221G1. Для определения плазменных концентраций ХС221G1 применяли валидированную методику высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС) с использованием хромато-масс-спектрометрической системы Quattro Premier XE (Waters, США) и хроматографической колонки Kinetex 1.7 $\mu$ m HILIC 100 Å, 100 $\times$ 2.1 (Phenomenex, США); нижний предел количественного определения для ХС221G1 составлял 20 нг/мл, для его метаболита ХС221А (5-([2-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)этил]амино)-5-оксогексановая кислота) — 2 нг/мл. В ходе токсикокинетического исследования определяли фармакокинетические параметры ХС221G1 и образуемого путём гидролиза метаболита ХС221А. После введения последней дозы ХС221G1 умерщвляли всех животных из групп низкой и средней доз и по 3 животных из групп контроля и высшей дозы. Остальных животных умерщвляли по окончании периода наблюдения. Для умерщвления использовали внутривенное введение барбитуратов. Во всех случаях выполняли макроскопическое патологическое исследование. Животных, умерщвлённых после периода наблюдения, использовали для гистопатологического исследования печени, почек, лёгких, системы кроветворения, репродуктивной системы.

## Мутагенный потенциал

**Определение потенциальных метаболитов ХС221G1.** ХС221G1 инкубировали с микросомами печени человека и микросомами печени крыс в течение 5–45 мин. Из среды инкубации отбирали образцы, в которых методом ВЭЖХ-МС/МС (API6500, API6500+ и API4000, колонки ACQUITY-BEH-C18 и Hypersil GOLD aQ) оценивали содержание оставшегося ХС221G1. ХС221G1 инкубировали с рекомбинантными изоферментами цитохрома P450 (cytochrome P450, CYP) для оценки потенциально ответственного за метаболизм соединения фермента. Использовали CYP1A2 (контроль — фенацетин), CYP2B6 (контроль — бупропион), CYP2C18 (стандарт — паклитаксел), CYP2C9 (стандарт — диклофенак), CYP2C19 (контроль — S-мефенитоин), CYP3A4 (контроль — мидазолам) и CYP2D6 (контроль — буфуралол).

**Тест Эймса.** В первой серии экспериментов тест Эймса проводили с использованием *Salmonella typhimurium* штаммов TA97, TA 98 и TA100. Микроорганизмы инкубировали с ХС221G1 в 1% растворе полисорбата-80. В экспериментах без метаболической активации использовали ХС221G1 в концентрациях 0,23; 2,27; 22,73; 227,27 или 2272,73 мкг/мл, при метаболической активации соединение применяли в концентрации 0,19; 1,85; 18,52; 185,19 или 1851,85 мкг/мл. Для метаболической активации применяли S9 фракцию гепатоцитов самцов крыс линии Вистар, которые за 5 дней до отбора клеток печени

внутрибрюшинно получали Совол в дозе 300 мг/кг. Длительность инкубации составляла 48 ч. Тест считали положительным при превышении числа ревертантных колоний под воздействием исследуемого соединения в  $\geq 2$  раза по сравнению с показателем, полученным для отрицательного контроля. Во второй серии экспериментов для теста Эймса использовали *S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535 и TA1537 *Escherichia coli* WP2 *uvrA* в условиях метаболической активации в присутствии S9 фракции печени крыс (индуктор фенобарбитал/ $\beta$ -нафтофлавон) и без метаболической активации. Исследование включало предварительный тест на растворимость, тест на цитотоксичность, начальный и подтверждающий тесты на мутацию. Выбор исследуемого диапазона концентраций основывался на результатах теста определения диапазона концентраций и рекомендациях руководства OECD<sup>4</sup> (OECD Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test) для растворимых нетоксичных соединений. Для этих соединений максимальная рекомендуемая исследуемая концентрация составляет 5000 мкг на чашку. XC221G1 использовали в концентрации 16; 160; 500; 1600 или 5000 мкг на чашку.

**Тест на индукцию хромосомных аберраций.** Первый эксперимент провели на клетках лёгкого китайского хомячка линии V79 в соответствии с руководством OECD (OECD Test No. 473: In vitro Mammalian Chromosome Aberration Test). Для цитогенетических экспериментов выбраны концентрации XC221G1 250; 500; 1000; 2000 мкг/мл на основании результатов предварительного теста без метаболической активации и с метаболической активацией в присутствии S9 фракции гепатоцитов крыс. В качестве положительного контроля использовали растворы этилметансульфоната в концентрациях 0,4 или 1,0 мкл/мл или циклофосфамида 5 мкг/мл. По окончании инкубации клеточные культуры обрабатывали колхицином в концентрации 0,2 мкг/мл за 2,5 ч до отбора клеток.

Кластогенный и анеугенный потенциал соединения XC221G1 изучали в микроядерном тесте на клетках млекопитающих *in vitro* в соответствии с руководством OECD (OECD Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test). Исследование провели на лимфоцитах периферической крови человека с метаболической активацией в присутствии S9 фракции печени самцов крыс линии Вистар (индуктор Ароклор 1254) и без неё. На основании результатов предварительного тестирования были выбраны 3 исследуемые концентрации соединения XC221G1 — 1; 2 и 5 мг/мл культуры. В качестве носителя использовали воду для инъекций. В эксперименте использовали положительный контроль (колхицин в финальной концентрации 0,1 мкг/мл, циклофосфамид в финальной концентрации 0,1 мкг/мл) и негативный контроль (вода для инъекций). Для предоставления результатов использовали методы описательной статистики.

Для изучения влияния XC221G1 на хромосомные аберрации *in vivo* использовали мышей линий CBA $\times$ C57BL/6 (масса тела 20–22 г). На первом этапе животные (самцы,  $n=5$  в группе) однократно внутрибрюшинно получали XC221G1 в дозе 2,86 мг/кг или 2000 мг/кг. Самцам мышей ( $n=5$  в группе) из группы положительного контроля внутрибрюшинно вводили циклофосфамид в дозе 20 мг/кг, в качестве отрицательного контроля использовали носитель (1% раствор полисорбата-80). На втором этапе исследования мышам (5 самцов и 5 самок в группе) внутривенно вводили XC221G1 в дозе 2,86 мг/кг в сутки или носитель в течение 5 дней. На обоих этапах через сутки после завершения дозирования мышей умерщвляли смещением шейных позвонков, за 2–3 ч до умерщвления вводили 0,01 мл/г 0,04% раствора колхицина. Получали образцы костного мозга из бедренных костей; из осадка образцов готовили препараты, окрашивали красителем Романовского и выполняли анализ не менее 100 метафазных пластинок.

**Тест щелочной элюции.** Тест комет дезоксирибонуклеиновой кислоты (тест ДНК-комет) проводили для оценки генотоксического и канцерогенного потенциала. Эксперимент проводили с использованием самцов-гибридов первого поколения мышей линий CBA $\times$ C57BL/6 (масса тела 20–22 г). Животные ( $n=10$  в группе) однократно внутривенно получали XC221G1 в 1% растворе полисорбата-80 в дозе 36; 360 или 3600 мг/кг. В качестве положительного контроля использовали мышей, которым однократно внутривенно вводили циклофосфамид в дозе 50 мг/кг; положительным контролем служили мыши, получавшие носитель. Половину животных умерщвляли смещением шейных позвонков через 3 ч после дозирования, остальных — через 18 ч. Изолировали бедренные кости, срезали эпифизы, вымывали клетки костного мозга охлаждённым фосфатным буфером с добавлением этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) в концентрации 20 ммоль/л и 10% диметилсульфоксида. Печень, почки и селезёнку изолировали, готовили гомогенаты. Препараты подготовленных клеток окрашивали SYBR Green (разведение 1:10 000 в буфере TE с 50% раствором глицерина), выполняли флуоресцентную микроскопию и получали цифровые изображения препаратов; при помощи программного обеспечения CASP 1.2.2 анализировали содержание ДНК в хвосте ДНК-комет. Статистический анализ проводили методом Даннета.

### Репродуктивная токсичность

Во всех экспериментах использовали половозрелых самцов и самок крыс. XC221G1 вводили внутривенно в 1% растворе полисорбата-80 в суточной дозе 17,4 или 174 мг/кг, эквивалентной ТД и 10 ТД для человека. Животные из контрольных групп получали носитель.

**Влияние на фертильность.** Самки крыс ( $n=20$  в группе) получали исследуемое соединение или носитель в течение 15 дней (3 эстральных цикла), затем их на 10 дней помещали в клетку к интактным самцам. Исходно, во время беременности и на 20-й день беременности оценивали

<sup>4</sup> Organisation for Economic Co-operation and Development. Режим доступа: <https://www.oecd.org/>. Дата обращения: 15.02.2021.

массу тела самок. На 20-й день беременности половину животных умерщвляли, оценивали число жёлтых тел в яичниках и мест имплантации в матке, а также число мёртвых и живых плодов. За оставшимися самками наблюдали в течение месяца после родов: оценивали развитие, физическое состояние, динамику массы тела и смертность потомства. Индекс фертильности рассчитывали как отношение числа беременных самок к числу самок, подсаженных к самцам (%). В эксперименте на самцах животные ( $n=10$  в группе) получали ХС221G1 или носитель на протяжении 48 дней, после чего их помещали в одну клетку с интактными самками. Оценивали число мёртвых и живых плодов у самок.

**Влияние на эмбриофетальное развитие.** Беременные самки крыс ( $n=10$  в группе) с 1-го по 19-й день беременности получали ХС221G1 или носитель. На 20-й день беременности самок умерщвляли, извлекали плоды и оценивали массу плодов, затем проводили патоморфологическое исследование внутренних органов по Стейплсу, скелета — методом Доусона с окрашиванием ализарином.

**Влияние на пренатальное и постнатальное развитие.** Беременные самки крыс ( $n=10$  в группе) получали ХС221G1 или носитель с 6-го дня беременности до родов. После родов оценивали число живых и мёртвых крысят, на 7-е и 21-е сутки после рождения измеряли массу тела потомства  $F_1$ , оценивали признаки нарушения постнатального развития (сроки отлипания ушных раковин, появления первичного волосяного покрова, открытия глаз и прорезывания резцов). Для оценки неврологического развития потомства проводили тесты на отрицательный геотаксис, маятниковый рефлекс, переворачивание на плоскости, избегание обрыва, обонятельную реакцию, реакцию на акустический стимул, переворачивание в свободном падении, спонтанную двигательную активность, а также тест «открытое поле».

### Аллергизирующее действие

Аллергизирующее действие изучали на морских свинках-альбиносах (масса тела 250–300 г) и гибридах первого поколения мышей линий СВА×С57BL/6. Морским свинкам вводили ХС221G1 в дозе 15,5 или 155 мг/кг, что соответствовало ТД и 10 ТД для человека. В качестве положительного контроля использовали овальбумин. У морских свинок проводили тест на индукцию системной и кожной анафилаксии, гиперчувствительность немедленного и замедленного типа при накожном или интраконтрактивном нанесении. При оценке системной анафилаксии рассчитывали анафилактический индекс по Weigle. Оценку гиперчувствительности замедленного типа выполняли также у мышей [8].

### Иммунотоксичность

Эксперименты проводили на самцах гибридов первого поколения мышей линий СВА×С57BL/6 (масса тела 20–22 г,  $n=10$  в группе). ХС221G1 в дозе 28,6 или 286 мг/кг

в сутки или носитель вводили внутрижелудочно в течение 21 дня. В последний день дозирования внутрибрюшинно вводили суспензию эритроцитов барана ( $2,5 \times 10^8$  клеток); через 7 дней мышей умерщвляли и отбирали образцы крови, в которых оценивали содержание гемагглютининов (реакция гемагглютинации с эритроцитами барана) и гемолизинов (метод микротитрации с использованием эритроцитов барана и комплемента морских свинок с помощью микротитратора «Такачи») в сыворотке крови для оценки влияния ХС221G1 на гуморальное звено иммунитета. В другом опыте со схожим дизайном животных умерщвляли на 5-й день после иммунизации; из селезёнки получали кровь, в которой оценивали фагоцитарную активность в тесте с тетразолиевым красителем, а также выполняли оценку розеткообразования для оценки Т- и В-клеточного звена иммунитета. При оценке влияния на гиперчувствительность замедленного типа животные получали ХС221G1 в дозе 28,6 или 286 мг/кг в сутки или носитель внутрижелудочно в течение 10 дней; в последний день дозирования внутрибрюшинно вводили суспензию эритроцитов барана ( $2,5 \times 10^8$  клеток). Разрешающую дозу эритроцитов барана ( $10^8$  клеток) вводили субплантарно через 5 дней, спустя сутки оценивали толщину подушечки лапы.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Токсичность при однократном введении

В дозе 5000 мг/кг при внутрижелудочном введении соединения ХС221G1 не вызывало гибели мышей независимо от пола. Изменений в поведении животных не отмечали, на следующий день после дозирования состояние мышей оставалось в пределах нормы. Как и мыши, все крысы выжили после внутрижелудочного введения ХС221G1 в дозе 5000 мг/кг. Дозирование не приводило к появлению внешних признаков токсичности, на следующий день после введения состояние животных оставалось в пределах физиологической нормы.

### Токсичность при многократном введении

**Исследование по подбору доз.** В экспериментах не выявили признаков токсичности или других нежелательных эффектов при однократном внутрижелудочном введении крысам ХС221G1 в диапазоне доз от 90 до 2000 мг/кг. Признаков токсичности ХС221G1 не зарегистрировали и при многократном введении соединения крысам в диапазоне доз от 18 до 450 мг/кг. Клинически значимых изменений уровней эритроцитов, лейкоцитов, коагулограммы не наблюдалось. Показатели биохимического анализа крови также клинически значимо не изменялись. При однократном пероральном введении крысам ХС221G1 доза без видимого нежелательного эффекта (No Observed Adverse Effect Level, NOAEL) составила 2000 мг/кг, при многократном пероральном введении в течение 14 сут — 450 мг/кг.

## Исследования на крысах

**Двухнедельное исследование токсичности.** На фоне ежедневного внутрижелудочного введения ХС221G1 в дозе 17,4–87 мг/кг в сутки выжили все крысы. Статистически значимых различий жизненно важных показателей по сравнению с данными, полученными у животных на фоне введения носителя, не обнаружили ( $p > 0,05$  во всех случаях межгруппового сравнения). Прирост массы тела в течение периода дозирования и восстановительного периода были сопоставимыми у животных всех групп ( $p > 0,05$  во всех случаях межгруппового сравнения). Среди самцов и самок показатели ЭКГ, АД, ЧДД и поведения в тесте «открытое поле» у животных из опытных групп статистически значимо не отличались от данных, полученных на фоне введения носителя. Параметры клинического анализа крови были сопоставимыми у животных всех групп как на 15-й, так и на 30-й день исследования. Параметры общего анализа мочи как на 15-й, так и на 30-й день исследования были сопоставимыми у крыс обоих полов всех групп ( $p > 0,05$  во всех случаях межгруппового сравнения). В ходе патоморфологического исследования установили соответствие изученных структур животных контрольной и опытной групп физиологической норме. Масса внутренних органов у самцов и самок на 15-й и 30-й дни исследования была сопоставимой у особей всех групп ( $p > 0,05$  при межгрупповом сравнении).

**Исследование токсичности с тридцатидневным дозированием.** При введении ХС221G1 внутрижелудочно в дозе 17,4–174 мг/кг в сутки самкам и самцам аутбредных крыс на протяжении месяца все животные выжили. На протяжении дозирования и восстановительного периода общее состояние животных, их внешний вид, потребление корма и воды оставались удовлетворительными. Введение исследуемого соединения не приводило к отклонениям в показателях ЭКГ, АД, ЧДД и поведения в тесте «открытое поле». Различий в показателях клинического анализа крови и общего анализа мочи не обнаружено. При патоморфологическом исследовании как у самцов, так и у самок группы высокой дозы ХС332G1 отмечали увеличение относительной массы печени на 31-й день ( $p < 0,05$  при сравнении с показателем, полученным на фоне введения носителя). К концу восстановительного периода масса печени животных группы высокой дозы была сопоставима с показателем, полученным у крыс контрольной группы ( $p > 0,05$  при межгрупповом сравнении). Отклонений гистологической картины печени и других органов не обнаружено.

**Трёхмесячное исследование токсичности.** За 3 мес дозирования не зарегистрировано гибели животных. Влияние ХС221G1 на прирост массы тела было в целом сопоставимо с результатами, полученными в месячном эксперименте. Отклонений в показателях ЭКГ, АД, ЧДД на протяжении всего эксперимента не выявлено ( $p > 0,05$  во всех случаях межгруппового сравнения). У самцов

после 3 мес введения ХС221G1 по результатам теста «открытое поле» наблюдали статистически значимое дозозависимое повышение общей двигательной активности, числа пересечённых секторов и стоек ( $p < 0,05$  во всех случаях сравнения с показателем, полученным у крыс контрольной группы). У самок, напротив, ХС221G1 в дозе 87 или 174 мг/кг в сутки вызывало снижение общей двигательной активности и числа пересечённых секторов ( $p < 0,05$  во всех случаях сравнения с показателем, полученным у крыс контрольной группы). Независимо от пола, за месяц после прекращения дозирования отмечали восстановление показателей в тесте «открытое поле» ( $p > 0,05$  во всех случаях межгруппового сравнения). В клиническом анализе крови и общем анализе мочи показатели оставались сопоставимыми на протяжении всего эксперимента. У самцов соединение ХС221G1 не оказывало влияния на показатели биохимического состава крови. Среди самок после 3 мес дозирования отмечали небольшое, но статистически значимое увеличение активности АЛТ в сыворотке крови у особой группы высокой дозы и снижение активности АСТ у животных групп средней и высокой дозы ( $p < 0,05$  во всех случаях межгруппового сравнения). При патоморфологическом исследовании отмечали только статистически значимое повышение относительной массы печени и щитовидной железы у самок группы высокой дозы ХС221G1 ( $p < 0,05$  по сравнению с показателем, полученным у крыс контрольной группы), которое разрешалось к концу восстановительного периода. Изменение массы органов не сопровождалось отклонениями их гистологической структуры.

## Исследования на кроликах

В исследованиях на кроликах с двухнедельным, тридцатидневным и трёхмесячным дозированием независимо от дозы не обнаружили клинически значимого влияния исследуемого соединения на общее состояние, внешний вид, прибавку массы тела, потребление пищи и воды среди кроликов ( $p > 0,05$  во всех случаях сравнения с показателями, которые получили на фоне введения носителя). Показатели ЭКГ, ЧДД, клинического и биохимического анализа крови, а также общего анализа мочи оставались сопоставимыми на протяжении всего исследования ( $p > 0,05$  во всех случаях межгруппового сравнения). При патоморфологическом исследовании не обнаружили клинически значимого влияния исследуемого соединения на массу, макроскопическую и микроскопическую структуру внутренних органов.

## Исследование токсичности и токсикокинетики на собаках

Статистически значимые изменения массы тела, потребления пищи и температуры тела на фоне введения ХС221G1 отсутствовали ( $p > 0,05$ ). При обследовании, включая офтальмоскопию, не выявили патологических



изменений. Показатели ЭКГ, ЧДД и АД статистически значимо не различались у животных опытных и контрольной групп ( $p > 0,05$ ). Клинически значимых изменений в результатах общего и биохимического анализов крови и общего анализа мочи не выявлено. При оценке массы внутренних органов не обнаружили изменений, связанных с исследуемым соединением. Введение ХС221G1 не вызывало макроскопических или гистопатологических изменений в печени и почках, которые могли бы указывать на наличие токсического эффекта. Со стороны желудочно-кишечного тракта и других органов также не выявлено макроскопических и микроскопических изменений. Таким образом, для собак доза без наблюдаемого эффекта (No Observed Effect Level, NOEL) составляла 30 мг/кг в сутки.

Результаты токсикокинетического анализа (табл. 1) подтвердили уровень системной экспозиции ХС221G1, соответствующий результатам исследования токсичности,

при этом наиболее высокие значения  $C_{max}$  зарегистрировали у животных группы высшей дозы ХС221G1. Коэффициенты кумуляции рассчитывали для ХС221G1 и ХС221A отдельно для каждой дозы. Коэффициенты кумуляции для ХС221G1 и ХС221A после введения дозы 60 мг/кг были выше 1,25, поэтому для высшей исследуемой дозы была подтверждена кумуляция для обоих соединений. Доля площади под фармакокинетической кривой (area under curve, AUC) для метаболита ХС221A по отношению к доле AUC для ХС221G1 рассчитывалась отдельно для каждой дозы. Доля AUC «концентрация-время» от начального момента времени до последней определяемой концентрации во временной точке  $t$  ( $AUC_{0-t}$ ) ХС221A от  $AUC_{0-t}$  ХС221G1 была максимальной для дозы 60 мг/кг (от 10,8 до 16,76%) и наименьшей для дозы 6 мг/кг (от 4,6 до 11,8%). Пропорциональность доз была рассчитана для параметров  $C_{max}$ ,  $AUC_{0-t}$  и AUC «концентрация-

**Таблица 1.** Токсикокинетические показатели соединения ХС221G1 у собак породы бигль, получавших ХС221G1 перорально в течение 28 сут в различных дозах

**Table 1.** Toxicokinetic indicators ХС221G1 in beagle dogs treated ХС221G1 orally within 28 days

| Группа  | ХС221G1         |           |                  |             |                  |             |
|---|-----------------|-----------|------------------|-------------|------------------|-------------|
|   | 6 мг/кг в сутки |           | 30 мг/кг в сутки |             | 60 мг/кг в сутки |             |
| Количество животных                             | 3 самца         | 3 самки   | 3 самца          | 3 самки     | 3 самца          | 3 самки     |
| ХС221G1 после введения первой дозы в день 1     |                 |           |                  |             |                  |             |
| $C_{max}$ , нг/мл                               | 1100±214        | 1079±170  | 4536±738         | 4363±789    | 6650±1430        | 7113±2164   |
| $t_{max}$ , ч                                   | 0,7±0,3         | 0,7±0,3   | 0,4±0,1          | 0,5±0,0     | 0,7±0,3          | 0,6±0,4     |
| $K_{el}$ , ч                                    | 1,2±0,2         | 1,2±0,3   | 0,3±0,1          | 0,3±0,1     | 0,3±0,3          | 0,2±0,0     |
| $t_{1/2}$ , ч                                   | 0,6±0,1         | 0,6±0,1   | 2,3±0,9          | 2,5±1,1     | 3,8±2,4          | 3,0±0,3     |
| $AUC_{0-t}$ , нг*ч/мл                           | 1385±570        | 1343±561  | 10 462±3843      | 11 011±3820 | 12 607±3769      | 15 206±1645 |
| $AUC_{0-\infty}$ , нг*ч/мл                      | 1481±672        | 1439±672  | 10 573±4013      | 11 203±3910 | 12 782±3769      | 15 356±1602 |
| MRT, ч  | 1,2±0,3         | 1,2±0,3   | 2,4±0,9          | 2,9±1,4     | 2,7±1,2          | 2,8±0,5     |
| ХС221G1 после введения последней дозы в день 28 |                 |           |                  |             |                  |             |
| $C_{max}$ , нг/мл                               | 1128±576        | 1109±567  | 4246±966         | 4734±328    | 5974±1314        | 9026±1937   |
| $t_{max}$ , ч                                   | 0,7±0,3         | 0,7±0,3   | 0,7±0,3          | 0,4±0,1     | 0,8±0,3          | 0,4±0,1     |
| $K_{el}$ , ч                                    | 1,0±0,9         | 1,0±0,5   | 0,4±0,2          | 0,3±0,1     | 0,3±0,1          | 0,2±0,1     |
| $t_{1/2}$ , ч                                   | 0,8±0,4         | 0,8±0,4   | 2,0±1,1          | 2,1±0,4     | 3,5±1,9          | 4,0±2,2     |
| $AUC_{0-t}$ , нг*ч/мл                           | 1771±1290       | 1750±1317 | 9730±4612        | 9674±2679   | 14 102±3646      | 20 845±6933 |
| $AUC_{0-\infty}$ , нг*ч/мл                      | 1823±1288       | 1799±1317 | 9884±4616        | 9779±2665   | 14 289±3776      | 21269±7157  |
| MRT, ч  | 1,4±0,4         | 1,4±0,4   | 2,4±0,9          | 2,1±0,2     | 2,9±0,9          | 3,2±0,8     |

**Примечание.**  $C_{max}$  — максимальная концентрация;  $t_{max}$  — время достижения максимальной концентрации;  $K_{el}$  — константа элиминации;  $t_{1/2}$  — период полувыведения;  $AUC_{0-t}$  — площадь под фармакокинетической кривой «концентрация-время» от начального момента времени до последней определяемой концентрации во временной точке  $t$ ;  $AUC_{0-\infty}$  — площадь под фармакокинетической кривой «концентрация-время» от начального момента времени до бесконечности; MRT — среднее время удерживания.

**Note:**  $C_{max}$  — maximum concentration;  $t_{max}$  — is the time to reach the maximum concentration;  $K_{el}$  — elimination constant;  $t_{1/2}$  — half-life;  $AUC_{0-t}$  — the area under the pharmacokinetic curve “concentration-time” from the initial moment to the last determined concentration at the time point  $t$ ;  $AUC_{0-\infty}$  — the area under the pharmacokinetic curve “concentration-time” from the initial moment to infinity; MRT — mean retention time.

время» от начального момента времени до бесконечности ( $AUC_{0-\infty}$ ) в 1-й и 28-й дни была подтверждена на основании  $C_{max}$  и AUC для ХС221G1 по результатам дисперсионного анализа ( $p < 0,05$ ) и коэффициенту детерминации ( $R^2 > 0,90$ ). Для  $C_{max}$  и  $AUC_{0-t}$  не выявили половых различий для всех исследуемых доз и дней введения препарата (день 1 и день 28).

## Мутагенный потенциал

### Определение потенциальных метаболитов ХС221G1.

При инкубации ХС221G1 с микросомами печени в течение 45 мин отношение концентраций исходного соединения ХС221G1 и его гидролитического метаболита ХС221А составляло 0,09 при использовании микросом печени крыс и 0,08 при использовании микросом печени человека.

При инкубации ХС221G1 с изоферментами СYP не обнаружили ингибирующего действия соединения на СYP1A2, СYP2C9, СYP2C19, СYP2D6, СYP3A4, СYP2B6 или СYP2C8.

**Тест Эймса.** В тесте Эймса без метаболической активации, независимо от использованных штаммов микроорганизмов, результаты были отрицательными. В экспериментах с метаболической активацией S9 фракцией гепатоцитов крыс ХС221G1 во всех исследуемых концентрациях также не повышал частоты обратных мутаций.

**Тесты на индукцию хромосомных aberrаций.** В экспериментах на клетках лёгкого китайского хомячка линии V79 не отмечали существенного увеличения числа aberrантных клеток при сравнении с показателями, полученными в контрольных экспериментах. В условиях метаболической активации при концентрации ХС221G1 1000 или 2000 мкг/мл частота aberrаций находилась в пределах референсных значений (5 aberrантных клеток без хроматидных разрывов / 150 клеток при референсном показателе 2–5), однако 95% доверительные интервалы (ДИ) незначительно превышали контрольные пределы (4,11 и 4,34 aberrантных клеток, исключая пробелы / 150 клеток). Существенных статистически значимых различий во всех случаях не обнаружено ( $p > 0,05$ ). Полиплоидных или эндоредуплицированных метафаз

не регистрировали ни в одном эксперименте. По результатам теста соединение ХС221G1 классифицировано как некластогенное вещество.

После однократного введения ХС221G1 частота выявления aberrантных метафаз составляла 0,6%, независимо от дозы соединения, что было сопоставимо с результатами, полученными при введении носителя ( $p > 0,05$  при межгрупповом сравнении). После введения циклофосфида частота выявления aberrантных метафаз составляла 27,2% ( $p < 0,05$  по сравнению с показателем, полученным при введении носителя).

При многократном внутрижелудочном введении ХС221G1 или носителя самцам крыс частота выявления aberrантных метафаз составляла 0,6% ( $p > 0,05$  при межгрупповом сравнении). У самок после введения носителя показатель составил 0,6%, а при дозировании исследуемого соединения — 0,8% ( $p > 0,05$  при межгрупповом сравнении).

**Микроядерный тест.** В микроядерном тесте на клетках млекопитающих *in vitro* не выявили статистически значимого ( $p > 0,05$  при сравнении с контролем) повышения доли бинуклеарных клеток с микроядрами в клеточных культурах для исследуемых концентраций ХС221G1. При проведении повторных тестов с использованием тех же концентраций ХС221G1 не регистрировали увеличения доли aberrантных клеток. Не наблюдали дозозависимого увеличения доли aberrантных клеток. Таким образом, соединение ХС221G1 не оказывало кластогенного или анеугенного действия в отношении культуры лимфоцитов периферической крови человека.

**Тест щелочной элюции.** Результаты теста ДНК-комет у мышей после 3 ч экспозиции представлены в табл. 2. На фоне введения циклофосфида во всех клетках отмечали статистически значимое повышение содержания ДНК в хвосте ДНК-комет, что указывало на повышение частоты разрывов ДНК ( $p < 0,05$  во всех случаях сравнения с показателем, полученным при введении носителя).

Соединение ХС221G1 ни в одной из исследованных доз не повышало частоты разрывов ДНК, содержание

**Таблица 2.** Содержание ДНК в хвосте ДНК-комет после 3 ч экспозиции, %

**Table 2.** Content of DNA in the tail of DNA-comets after 3 h of exposure, %

| Группа                  | Печень      | Почки       | Селезёнка  | Костный мозг |
|-------------------------|-------------|-------------|------------|--------------|
| Носитель                | 5,55±0,49   | 5,52±0,41   | 5,18±0,37  | 5,79±0,51    |
| Циклофосфамид, 50 мг/кг | 17,32±1,42† | 15,18±1,61† | 7,44±0,68† | 15,74±1,74†  |
| ХС221G1, 36 мг/кг       | 5,83±0,50   | 6,58±0,54   | 6,33±0,61  | 6,65±0,35    |
| ХС221G1, 360 мг/кг      | 6,58±0,52   | 5,71±0,62   | 5,85±0,16  | 6,7±0,51     |
| ХС221G1, 3600 мг/кг     | 6,71±0,52   | 6,38±0,30   | 5,53±0,31  | 7,08±0,19    |

**Примечание.** Данные представлены в виде средних значений и стандартных ошибок среднего. † — различия достоверны по сравнению с контрольной группой ( $p < 0,05$ , критерий Даннета). ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота.

**Note:** The data is presented in the form of averages and standard errors of the mean. † — differences are significant compared with the control group ( $p < 0,05$ , Dunnett's test). DNA — deoxyribonucleic acid.

ДНК в хвосте ДНК-комет оставалось сопоставимым с показателем, полученным у мышей группы отрицательного контроля, во всех типах клеток ( $p > 0,05$  во всех случаях межгруппового сравнения). При увеличении времени экспозиции до 18 ч результаты оставались сопоставимыми.

### Репродуктивная токсичность

**Влияние на фертильность.** Введение ХС221G1 самкам крыс до спаривания не оказывало влияния на изменение массы тела животных. Не выявили изменений частоты постимплантационной гибели плодов и изменения индекса фертильности ( $p > 0,05$  при сравнении с показателями, полученными на фоне введения носителя). В постнатальном периоде развитие потомства протекало без отклонений, включая сроки отлипания ушных раковин, появления первичного волосяного покрова, прорезывания зубов и открытия глаз ( $p > 0,05$  при сравнении с показателем, полученным у потомства самок контрольной группы). У самок, которые спаривались с самцами, получавшими ХС221G1, не отмечали повышения частоты пред- и постимплантационной гибели эмбрионов. Индекс фертильности был сопоставим с показателем, полученным на фоне введения самцам носителя. Повышения частоты аномалий развития плодов также не наблюдали.

**Влияние на эмбриофетальное развитие.** Темпы прироста массы тела у самок основных групп не отличались от показателей, полученных у животных контрольной группы ( $p > 0,05$  при межгрупповом сравнении). Частота предимплантационной гибели плодов и постимплантационная смертность были сопоставимы между группами ( $p > 0,05$  при межгрупповом сравнении). Отклонений внутриутробного развития среди потомства животных, которые получали ХС221G1, не наблюдали. Развитие скелета у потомства самок, получавших исследуемое соединение, было сопоставимо с таковым у потомства крыс контрольной группы.

**Влияние на пренатальное и постнатальное развитие.** Все крысята родились живыми, средняя масса тела была сопоставимой у потомства самок всех групп как на 7-й, так и на 21-й день после рождения ( $p > 0,05$  при межгрупповом сравнении). Сроки отлипания ушей, появления первичного волосяного покрова, прорезывания зубов и открытия глаз не отличались у потомства животных опытных и контрольной группы ( $p > 0,05$  при межгрупповом сравнении). Не обнаружено существенных различий в результатах тестов по оценке неврологического развития потомства ( $p > 0,05$  при межгрупповом сравнении).

### Аллергизирующее действие

ХС221G1 не вызвал анафилактического шока ни у одной морской свинки (индекс Weigle составил 0 баллов). В тесте активной кожной анафилаксии диаметр зоны распределения красителя после внутрикожного введения разрешающей дозы ХС221G1 не превышал 3 мм,

что указывало на отрицательный результат эксперимента. У морских свинок при интраконтрактивальном или накожном нанесении ХС221G1 не отмечено развития реакций гиперчувствительности замедленного или немедленного типа, у мышей введение исследуемого соединения также не вызывало гиперчувствительности замедленного типа.

### Иммунотоксичность

У мышей введение ХС221G1 в дозе 28,6–286 мг/кг внутрижелудочно не оказывало влияния на формирование гемагглютининов и гемолизинов в ответ на введение эритроцитов барана. В других экспериментах не выявлено воздействия ХС221G1 на интенсивность реакции гиперчувствительности замедленного типа, реакцию розеткообразования и фагоцитарную активность нейтрофилов крови.

### Местнораздражающее действие

В ходе исследований токсичности при многократном внутрижелудочном введении крысам или кроликам в течение 2 нед–3 мес при проведении аутопсии не обнаруживали существенных признаков раздражения или повреждения слизистой оболочки желудка.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии у ХС221G1 токсического действия при многократном длительном применении и позволяют считать профиль безопасности нового соединения обоснованно благоприятным.

Изучение острой и хронической токсичности ХС221G1 на 5 видах животных (мыши, крысы, морские свинки, кролики, собаки) показало, что все исследуемые животные хорошо переносят введение ХС221G1. Значимые изменения в поведении животных, потреблении ими корма и воды не отмечались. На всём протяжении периодов дозирования и восстановления гибель животных не зарегистрирована. В экспериментах *in vivo* не выявлено признаков токсичности или других нежелательных эффектов при однократном введении ХС221G1 аутбредным мышам и крысам обоих полов в дозе 5000 мг/кг (максимальная доза для определения класса токсичности химических веществ в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76<sup>5</sup>), а также при многократном введении крысам, кроликам и собакам обоих полов в исследованиях с двухнедельным, четырёхнедельным, тридцатидневным и трёхмесячным дозированием ХС221G1 в широком диапазоне доз (от 6 до 174 мг/кг в сутки), что с учётом коэффициентов межвидовых пересчётов соответствовало ТД, 5 ТД и 10 ТД для человека (суточная ТД для человека составляет 200 мг).

<sup>5</sup> Межгосударственный стандарт. ГОСТ 12.1.007-76. Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности. Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/5200233>. Дата обращения: 15.02.2021.

Системная экспозиция ХС221G1 при введении в дозе 30 мг/кг в сутки собакам превышала возможную у человека в 10 раз, согласно результатам клинического исследования фармакокинетики возрастающих доз препарата при однократном и многократном пероральном применении у здоровых добровольцев (NCT03459391).

К моменту завершения восстановительного периода все показатели клинического (количество эритроцитов, уровень гемоглобина, среднее содержание гемоглобина в клетке, средняя концентрация гемоглобина в клетке, средний объем эритроцита, гематокрит, количество лейкоцитов, лейкоцитарная формула, количество тромбоцитов) и биохимического (активность АЛТ, АСТ, щелочной фосфатазы, гамма-глутамилтранспептидазы, лактатдегидрогеназы, уровень креатинина, мочевины, триглицеридов, глюкозы, общего белка, альбуминов, глобулинов, холестерина и соотношение альбуминов и глобулинов, общий билирубин, электролиты) анализов крови, коагулограммы (общее количество тромбоцитов, АЧТВ, ПВ), общего анализа мочи (удельная масса, рН, содержание билирубина, кетоновых тел, глюкозы, белка, эритроцитов и лейкоцитов) были сопоставимыми у животных всех групп. Параметры ЭКГ, АД, ЧДД и показатели поведения в тесте «открытое поле» у животных опытных групп статистически значимо не отличались от данных, полученных на фоне введения носителя.

При патоморфологическом исследовании у животных контрольных и опытных групп макроскопическая и гистологическая структура внутренних органов соответствовала физиологической норме. Кроме того, при проведении аутопсии не обнаруживали существенных признаков раздражения или повреждения слизистой оболочки желудка, что свидетельствовало об отсутствии у препарата местно-раздражающего действия.

В панели стандартных *in vitro* и *in vivo* тестов (тест Эймса, тест на индукцию хромосомных aberrаций, микроядерный тест, тест щелочной элюции) в широком диапазоне доз было подтверждено отсутствие у ХС221G1 цитотоксического, мутагенного, генотоксического и канцерогенного потенциала.

Установлено, что ХС221G1 не метаболизируется в печени, не влияет на систему цитохромов печени человека.

При изучении репродуктивной токсичности ХС221G1 на половозрелых самцах и самках крыс в суточной дозе 17,4 или 174 мг/кг, эквивалентной ТД и 10 ТД для человека, не выявлены изменения частоты постимплантационной гибели плодов и изменения индекса фертильности, а также влияние на эмбриофетальное, пренатальное и постнатальное развитие.

В исследовании по изучению иммунотоксичности не выявили отрицательного воздействия ХС221G1 на гуморальное (оценка антителообразования у животных) и клеточное (индукция реакции гиперчувствительности замедленного типа, количество Т- и В-лимфоцитов по реакции розеткообразования) звено иммунитета, активность фагоцитов (оценка фагоцитарной и бактерицидной активности фагоцитирующих клеток разной локализации). В исследовании аллергизирующего действия ХС221G1 в дозе,

эквивалентной 1 и 10 ТД для человека, не вызвал развития реакций гиперчувствительности замедленного или немедленного типа у исследуемых животных, не обладал анафилактическим потенциалом.

Таким образом, интегральная оценка токсикологического профиля позволяет классифицировать ХС221G1 как малотоксичное соединение и отнести к IV классу токсичности в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76<sup>6</sup>.

Представленные результаты исследования токсикологического профиля препарата ХС221G1 дополняют известные данные о его фармакодинамической активности и позволяют выделить преимущества этого препарата при использовании в качестве средства упреждающей противовоспалительной терапии COVID-19 в сравнении с рядом схем стандартной терапии COVID-19 [9]. К этим преимуществам ХС221G1 относится уникальный антицитокиновый профиль, позволяющий минимизировать избыточное подавление функций иммунной системы, благоприятный профиль метаболической безопасности в сравнении с глюкокортикостероидами и ингибиторами янус-киназ (барицитиниб, тофацитиниб) (COVID-19 Treatment Guidelines, 2021), а также небелковая химическая структура, исключающая характерные для препаратов моноклональных антител (тоцилизумаб, сарилумаб, левилимаб, анакинра) иммунологические риски [10–13].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ХС221G1 в серии исследований острой и хронической токсичности у грызунов и негрызунов не проявлял нежелательного действия в отношении желудочно-кишечного тракта, а также сердечно-сосудистой, дыхательной, нервной и мочеполовой систем, не обладал местнораздражающим действием, не вызывал признаки метаболических сдвигов во внутренней среде организма.

Не выявлено отрицательного влияния ХС221G1 на форменные элементы крови, систему кроветворения и гемостаза.

Величина NOAEL для ХС221G1 составила при однократном пероральном введении крысам 2000 мг/кг, при пероральном введении крысам в течение 14 сут — 450 мг/кг в сутки, при пероральном введении собакам в течение 28 дней — 30 мг/кг в сутки.

В панели стандартных *in vitro* и *in vivo* тестов ХС221G1 не проявлял цитотоксических, мутагенных, генотоксических и канцерогенных свойств.

ХС221G1 не обладал анафилактическим и иммунотоксическим действием, не проявлял аллергизирующих свойств, а также не оказывал репродуктивной токсичности.

Таким образом, профиль безопасности нового соединения ХС221G1 при многократном длительном применении является обоснованно благоприятным.

<sup>6</sup> Межгосударственный стандарт. ГОСТ 12.1.007-76. Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности. Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/5200233>. Дата обращения: 15.02.2021.

## ДОПОЛНИТЕЛЬНО

**Источник финансирования.** Работа финансировалась ООО «Фарминтепрайзес» (Россия) и АО «Валента Фарм» (Россия).

**Конфликт интересов.** Сотрудники ООО «Фарминтепрайзес» (Россия) отвечали за организацию и проведение исследований, научное консультирование и рецензирование публикации. Сотрудники АО «Валента Фарм» (Россия) участвовали в анализе данных и подготовке публикации.

**Вклад авторов.** Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации. Наибольший вклад распределён следующим образом: С.А. Суханова, О.В. Проскурина, А.В. Рыдловская, В.Е. Небольсин — поисково-аналитическая работа; Е.А. Джайн, А.А. Глобенко, М.И. Багаева — написание статьи, направление рукописи на публикацию.

**Благодарность.** Авторы выражают благодарность ООО «Статэндокс» (Россия) за помощь в подготовке публикации.

## ADDITIONAL INFORMATION

**Funding source.** The work was funded by Pharmenterprises LLC (Russia) and JSC Valenta Pharm (Russia).

**Competing interest.** Employees of Pharmenterprises LLC (Russia) were responsible for the organization and conduct of research, scientific advice and review of the publication. Employees of JSC Valenta Pharm (Russia) participated in the data analysis and preparation of the publication.

**Authors' contribution.** All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published. S.A. Suhanova, O.V. Proskurina, A.V. Rydlovskaya, V.E. Nebolsin — search and analytical work when writing a review article; E.A. Jain, A.A. Globenko, M.I. Bagaeva — writing an article, the direction of the manuscript for publication.

**Acknowledgement.** The authors are grateful to Statendox LLC (Russia) for assistance in preparing the publication.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Рюленс М., Ваутерс Я. COVID-19: испытания и потрясения для глобального управления в сфере здравоохранения // Вестник международных организаций. 2021. Т. 16, № 2. С. 70–98. doi: 10.17323/1996-7845-2021-02-05
2. Tang L., Yin Z., Hu Y., Mei H. Controlling cytokine storm is vital in COVID-19 // *Front Immunol.* 2020. Vol. 11. P. 570993. doi: 10.3389/fimmu.2020.570993
3. Павликова Е.П., Агапов М.А., Малахов П.С., и др. Эмфизема средостения — специфическое осложнение COVID-19 (клиническое наблюдение) // *Общая реаниматология.* 2021. Т. 17, № 2. С. 4–15. doi: 10.15360/1813-9779-2021-2-4-15
4. Pasrija R., Naime M. The deregulated immune reaction and cytokines release storm (CRS) in COVID-19 disease // *Int Immunopharm.* 2021. Vol. 90. P. 107225. doi: 10.1016/j.intimp.2020.107225
5. Griffin D.O., Brennan-Rieder D., Ngo B., et al. The Importance of understanding the stages of COVID-19 in treatment and trials // *AIDS Rev.* 2021. Vol. 23, N 1. P. 40–47. doi: 10.24875/AIDSRev.200001261
6. National Research Council (US) Institute for Laboratory Animal Research. Guide for the care and use of laboratory animals. Washington (DC): National Academies Press (US), 1996. doi: 10.17226/5140
7. Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Д.П. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения / пер. с англ. Е.Н. Живописцевой; под ред. А.С. Батуева. Москва: Высшая школа, 1991. 398 с.

8. Бунятян Н.Д., Васильев А.Н., Верстакова О.Л., и др. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / под ред. А.Н. Миронова. Москва: Гриф и К, 2012. 944 с.
9. Van de Veerdonk F.L., Giamarellos-Bourboulis E., Pickkers P., et al. A guide to immunotherapy for COVID-19 // *Nat Med.* 2022. Vol. 28, N 1. P. 39–50. doi: 10.1038/s41591-021-01643-9
10. Филиппова А.В., Колбин А.С., Вербицкая Е.В., и др. Вопросы безопасности лекарственных средств моноклональных антител, применяемых в ревматологии // *Качественная клиническая практика.* 2019. № 3. С. 44–52. doi: 10.24411/2588-0519-2019-10082
11. Колбин А.С., Харчев А.В. Безопасность биопрепаратов и малых молекул. Существуют ли различия? // *Педиатрическая фармакология.* 2013. Т. 10, № 3. С. 17–25.
12. Giezen T.J., Mantel-Teeuwisse A.K., Leufkens H.G. Pharmacovigilance of biopharmaceuticals: challenges remain // *Drug Saf.* 2009. Vol. 32, N 10. P. 811–817. doi: 10.2165/11316550-000000000-00000
13. Strangfeld A., Eveslage M., Schneider M., et al. Treatment benefit or survival of the first: what drives the time-dependent decrease in serious infection rates under TNF inhibition and what does this imply for the individual patient? // *Ann Rheum Dis.* 2011. Vol. 70, N 11. P. 1914–20. doi: 10.1136/ard.2011.151043

## REFERENCES

1. Ruelens M, Wouters J. COVID-19 and the trials and tribulations of global health governance. *Bulletin of International Organizations.* 2021;16(2):70–98. (In Russ). doi: 10.37690/1811-0193-2020-4-24-33
2. Tang L, Yin Z, Hu Y, Mei H. Controlling cytokine storm is vital in COVID-19. *Front Immunol.* 2020;11:570993. doi: 10.3389/fimmu.2020.570993
3. Pavlikova EP, Agapov MA, Malakhov PS, et al. Mediastinal emphysema as a specific complication of COVID-19 (case

- report). *General Reanimatology.* 2021;17(2):4–15. (In Russ). doi: 10.15360/1813-9779-2021-2-4-15
4. Pasrija R, Naime M. The deregulated immune reaction and cytokines release storm (CRS) in COVID-19 disease. *Int Immunopharm.* 2021;90:107225. doi: 10.1016/j.intimp.2020.107225
5. Griffin DO, Brennan-Rieder D, Ngo B, et al. The importance of understanding the stages of COVID-19 in treatment and trials. *AIDS Rev.* 2021;23(1):40–47. doi: 10.24875/AIDSRev.200001261

6. National Research Council (US) Institute for Laboratory Animal Research. Guide for the care and use of laboratory animals. Washington (DC): National Academies Press (US); 1996. doi: 10.17226/5140
7. Buresh Ya, Bureshova O, Houston DP. Methods and basic experiments on the study of the brain and behavior. Transl. from English by E.N. Pictortseva; ed. by A.S. Batuev. Moscow: Vysshaya shkola; 1991. 398 p. (In Russ.)
8. Bunyatyan ND, Vasiliev AN, Verstakova OL, et al. Guidelines for conducting preclinical studies of medicines. Ed. by A.N. Mironov. Moscow: Grif i K; 2012. 944 p. (In Russ.)
9. Van de Veerdonk FL, Giamarellos-Bourboulis E, Pickkers P, et al. A guide to immunotherapy for COVID-19. *Nat Med.* 2022;28(1):39–50. doi: 10.1038/s41591-021-01643-9
10. Philippova AV, Kolbin AS, Verbitskaya EV, et al. Safety issues of monoclonal antibodies used in rheumatology. *Good Clinical Practice.* 2019;(3):44–52. (In Russ.) doi: 10.24411/2588-0519-2019-10082
11. Kolbin AS, Kharchev AV. Safety of biological preparations and small molecules. Are there any differences? *Pediatric Pharmacology.* 2013;10(3):17–25. (In Russ.)
12. Giezen TJ, Mantel-Teeuwisse AK, Leufkens HG. Pharmacovigilance of biopharmaceuticals: challenges remain. *Drug Saf.* 2009;32(10): 811–817. doi: 10.2165/11316550-000000000-00000
13. Strangfeld A, Eveslage M, Schneider M, et al. Treatment benefit or survival of the fittest: what drives the time-dependent decrease in serious infection rates under TNF inhibition and what does this imply for the individual patient? *Ann Rheum Dis.* 2011;70(11):1914–1920. doi: 10.1136/ard.2011.151043

## ОБ АВТОРАХ

\* **Джайн Екатерина Александровна**, руководитель группы доклинических исследований АО «Валента Фарм»; адрес: Россия, 121471, Москва, ул. Рябиновая, д. 26, стр. 10; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0283-8598>; e-mail: [ekaterina.korsakova@valentapharm.com](mailto:ekaterina.korsakova@valentapharm.com)

**Суханова Светлана Алексеевна**, к.б.н.; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0548-4249>; e-mail: [ssuhanova46@gmail.com](mailto:ssuhanova46@gmail.com)

**Проскурина Оксана Владимировна**, к.м.н.; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5718-3301>; e-mail: [proskurina\\_ov@mail.ru](mailto:proskurina_ov@mail.ru)

**Глобенко Александр Александрович**, медицинский директор АО «Валента Фарм»; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9295-2663>; e-mail: [Aleksandr.Globenko@valentapharm.com](mailto:Aleksandr.Globenko@valentapharm.com)

**Багаева Мадина Ибрагимовна**, медицинский советник АО «Валента Фарм»; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4577-1832>; e-mail: [madina.bagaeva@valentapharm.com](mailto:madina.bagaeva@valentapharm.com)

**Рыдловская Анастасия Владимировна**, к.б.н.; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0241-156X>; e-mail: [rydlovskaya@pharmenterprises.ru](mailto:rydlovskaya@pharmenterprises.ru)

**Небольсин Владимир Евгеньевич**, к.х.м.; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5939-9341>; e-mail: [nv@pharmenterprises.ru](mailto:nv@pharmenterprises.ru)

## AUTHORS' INFO

\* **Ekaterina A. Jain**, Head of Preclinical research group, JSC Valenta Pharm pharmaceutical company; address: Ryabinovaya str., 26 buil. 10, Moscow, 121471, Russia; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0283-8598>; e-mail: [ekaterina.korsakova@valentapharm.com](mailto:ekaterina.korsakova@valentapharm.com)

**Svetlana A. Suhanova**, Cand. Sci. (Biol.); ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0548-4249>; e-mail: [ssuhanova46@gmail.com](mailto:ssuhanova46@gmail.com)

**Oksana V. Proskurina**, MD, Cand. Sci. (Med.); ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5718-3301>; e-mail: [proskurina\\_ov@mail.ru](mailto:proskurina_ov@mail.ru)

**Aleksander A. Globenko**, Medical director, JSC Valenta Pharm pharmaceutical company; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9295-2663>; e-mail: [Aleksandr.Globenko@valentapharm.com](mailto:Aleksandr.Globenko@valentapharm.com)

**Madina I. Bagaeva**, Medical advisor, JSC Valenta Pharm pharmaceutical company; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4577-1832>; e-mail: [madina.bagaeva@valentapharm.com](mailto:madina.bagaeva@valentapharm.com)

**Anastasia V. Rydlovskaya**, Cand. Sci. (Biol.); ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0241-156X>; e-mail: [rydlovskaya@pharmenterprises.ru](mailto:rydlovskaya@pharmenterprises.ru)

**Vladimir E. Nebolsin**, Cand. Sci. (Chem.); ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5939-9341>; e-mail: [nv@pharmenterprises.ru](mailto:nv@pharmenterprises.ru)

\* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author