

ИССЛЕДОВАНИЕ СОПОСТАВИМОСТИ ФАРМАКОДИНАМИЧЕСКИХ, ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИХ И ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ РЕФЕРЕНТНОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА ПУЛЬМОЗИМ И БИОАНАЛОГИЧНОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА ТИГЕРАЗА

М.С. Аксёнова¹, Е.Н. Бочарова¹, С.Г. Аббасова¹, А.С. Пономарёв², В.В. Логинова¹, М.В. Болотникова¹, Н.В. Бельская^{1,*}, А.А. Казаров¹, А.Е. Лисова¹, Н.К. Кудина¹, М.С. Пантюшенко¹, М.В. Жилиева¹, Д.С. Копеин¹, Ю.М. Карелов², Г.Г. Эрастов², М.В. Лыков¹, Р.А. Хамитов¹

¹ АО «ГЕНЕРИУМ»

601125, Российская Федерация, Владимирская обл., Петушинский р-н,
п. Вольгинский, Владимирская ул., 14Б

² ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Минобороны России
141306, Российская Федерация, Московская обл., Сергеево-Посадский г.о.,
терр. Сергеев Посад-6, Октябрьская ул., 11

Представлены результаты исследований препарата Тигераза® (р-р для ингаляций, производитель АО «ГЕНЕРИУМ», Россия), проведённые для получения доказательств его подобности (сопоставимости) референтному препарату Пульмозим® (р-р для ингаляций, производитель «Хоффманн-Ля Рош Лтд.», Швейцария). Оба препарата содержат в качестве действующего вещества человеческую рекомбинантную дезоксирибонуклеазу I — дорназу альфа, предназначены для лечения кистозного фиброза с лёгочными проявлениями (муковисцидоза). Изучена ферментативная активность дорназы альфа, содержащейся в изучаемых препаратах, *in vitro* и *ex vivo* на образцах гнойной мокроты больных. Изучены фармакокинетические параметры препаратов в сыворотке крови, бронхах и лёгких и основные физиологические показатели (масса и температура тела, состояние сердечно-сосудистой, дыхательной, выделительной систем, гематологические и биохимические параметры крови, патоморфологические изменения внутренних органов, включая состояние роговицы глаз, показатели смертности) в сравнительных исследованиях субхронической токсичности на ювенильных и половозрелых крысах при 28-дневном ингалировании в дозах 0,2 мг/кг половозрелым и 0,26 мг/кг ювенильным животным (доза в 6 раз превышала рекомендованную для клинического применения). Результаты исследований позволяют сделать вывод о сопоставимости препаратов по ферментативной, муколитической (секретолитической) ДНКазной активности, профилю безопасности и основным фармакокинетическим параметрам.

Ключевые слова: дорназа альфа, муковисцидоз, биоаналог, ДНКазная активность

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Аксёнова М.С., Бочарова Е.Н., Аббасова С.Г., Пономарёв А.С., Логинова В.В., Болотникова М.В., Бельская Н.В., Казаров А.А., Лисова А.Е., Кудина Н.К., Пантюшенко М.С., Жилиева М.В., Копеин Д.С., Карелов Ю.М., Эрастов Г.Г., Лыков М.В., Хамитов Р.А. Исследование сопоставимости фармакодинамических, токсикологических и фармакокинетических свойств референтного лекарственного препарата Пульмозим и биоаналогичного лекарственного препарата Тигераза. *Биомедицина*. 2023;19(1):47–60. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-19-1-47-60>

Поступила 11.08.2022

Принята после доработки 12.12.2022

Опубликована 10.03.2023

COMPARABILITY OF THE REFERENCE DRUG PULMOZIM AND A SIMILAR DRUG TIGERASE IN TERMS OF THEIR PHARMACODYNAMIC, TOXICOLOGICAL AND PHARMACOKINETIC PROPERTIES

Maria S. Aksenova¹, Eugenia N. Bocharova¹, Svetlana G. Abbasova¹,
Alexander S. Ponomarev², Valentina V. Loginova¹, Maria V. Bolotnikova¹,
Nataliya V. Belskaya^{1,*}, Aleksander A. Kazarov¹, Alena E. Lisova¹, Nataliya K. Kudina¹,
Marina S. Pantyushenko¹, Maria V. Zhilyaeva¹, Damir S. Kopein¹, Yuri M. Karelov²,
Georgiy G. Erastov², Maksim V. Lykov¹, Ravil A. Chamitov¹

¹ AO "GENERIUM"

601125, Russian Federation, Vladimir Region, Petushinskiy District,
Vol'ginskiy Village, Vladimirskaaya Str., 14Б

² 48 Central Research Institute of the Ministry of Defense of Russia

141306, Moscow Region, Sergiev Posad City District, Sergiev Posad-6 Territory, Oktyabrskaya Str., 11

This work presents research studies into the comparability of Tigerase® (inhalation solution, manufactured by JSC «GENERIUM», Russia) to the reference drug Pulmozim® (inhalation solution, manufactured by Hoffmann-La Roche Ltd., Switzerland). Both drugs contain human recombinant deoxyribonuclease I – dornase alpha as an active substance and are intended for the treatment of cystic fibrosis with pulmonary manifestations (cystic fibrosis). The specific enzymatic activity of dornase alpha was studied *in vitro* and *ex vivo* using samples of patients' purulent sputum. The pharmacokinetic parameters of the drugs were studied in the blood serum, bronchi and lungs. The main physiological parameters (body weight and temperature, the state of the cardiovascular, respiratory, excretory systems, hematological and biochemical blood parameters, pathomorphological changes in the internal organs, including the state of the cornea of the eyes, mortality rates) were assessed in comparative studies of subchronic toxicity in juvenile and sexually mature rats using 28-day inhalation in doses of 0.2 mg/kg to sexually mature and 0.26 mg/kg to juvenile animals (the dose was 6 times higher than the recommended dose for clinical use). It was concluded that the drugs were comparable in terms of their enzymatic, mucolytic (secretolytic) DNase activity, safety profile, and basic pharmacokinetic parameters.

Keywords: dornase alfa, cystic fibrosis, biosimilar, DNase activity

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Aksenova M.S., Bocharova E.N., Abbasova S.G., Ponomarev A.S., Loginova V.V., Bolotnikova M.V., Belskaya N.V., Kazarov A.A., Lisova A.E., Kudina N.K., Pantyushenko M.S., Zhilyaeva M.V., Kopein D.S., Karelov Y.M., Erastov G.G., Lykov M.V., Chamitov R.A. Comparability of the Reference Drug Pulmozim and a Similar Drug Tigerase in Terms of their Pharmacodynamic, Toxicological and Pharmacokinetic Properties. *Journal Biomed.* 2023;19(1):47–60. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-19-1-47-60>

Submitted 11.08.2022

Revised 12.12.2022

Published 10.03.2023

Введение

Кистозный фиброз (муковисцидоз, МВ) — наследственное (аутосомно-рецессивное) хроническое заболевание, характеризующееся поражением экзокринных желёз и жизненно важных органов и систем, вызвано дисфункцией цАМФ-зависимого хлорно-

го канала вследствие мутации гена *CFTR* (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) [22], физиологическая роль которого заключается в регуляции транспорта электролитов (главным образом, ионов хлора) между эпителиальными клетками выводных протоков желёз внешней секре-

ции (потовых, слюнных, желёз в бронхах, поджелудочной железе, кишечнике, урогенитальном тракте) и внеклеточным матриксом [10]. Мутации гена *CFTR* вызывают затруднение выхода ионов хлора через канал и, как следствие, увеличение реабсорбции натрия и дегидратацию секрета, делая его более вязким и густым [3]. Затруднённый отток бронхиального секрета у более чем 90% пациентов с МВ приводит к хроническому поражению дыхательных путей. В России в 2019 г. имелось более 3000 пациентов с МВ, их средний возраст составлял 13,2±9,8 года, доля пациентов старше 18 лет — 25,5% [7].

Одним из препаратов для лечения кистозного фиброза с лёгочными проявлениями (муковисцидоза) и других заболеваний нозологической группы МБК-10 [6] является препарат Пульмозим® (Pulmozyme®, р-р для ингаляций, производства «Хоффманн-Ля Рош Лтд.», Швейцария) — отхаркивающее муколитическое средство.

Муковисцидоз (МВ) относится к социально значимым заболеваниям, поскольку частота встречаемости этой наследственной болезни очень высокая (по разным оценкам, от 1:3500 до 1:12000), проявляется в самом раннем возрасте, и её лечение является существенным социально-экономическим бременем [4]. Тигераза® — лекарственный препарат в форме р-ра для ингаляций производства АО «ГЕНЕРИУМ», содержащий в качестве действующего вещества человеческую рекомбинантную дезоксирибонуклеазу I — дорназу альфа (код CAS 9003-98-9), разрабатывался как биоаналог Пульмозима®. Следует отметить, что разработка биоаналогов в настоящее время переросла в самостоятельную отрасль, поскольку стоимость и длительность её существенно ниже, чем оригинальных биотехнологических лекарственных средств [2, 14]. Однако создание биоаналогов, несмотря на кажущуюся простоту, является очень сложным технологическим

процессом, а подтверждение сопоставимости их свойств с референтным препаратом строго регламентируется [12, 14, 19].

Данное исследование выполнено в соответствии с существующими международными нормами, предъявляемыми к исследованиям, доказывающим подобность (сопоставимость) свойств биоаналога и референтного препарата [15, 16, 17].

Цель работы — доказать сопоставимость фармакологической активности и безопасности лекарственного препарата Тигераза® производства АО «ГЕНЕРИУМ» (Россия) и референтного препарата Пульмозим® производства «Хоффманн-Ля Рош Лтд.» (Швейцария).

Материалы и методы

Исследуемые вещества

Лекарственные формы дорназы альфа производства АО «ГЕНЕРИУМ», Россия (Тигераза®, далее по тексту — Д-Т, опыт) и производства «Хоффманн-Ля Рош Лтд.», Швейцария (Пульмозим®, далее по тексту — Д-П, контроль-2), плацебо (контроль-1) — фосфатно-солевой буфер на основе натрия хлорида, кальция хлорида дигидрата (вспомогательные вещества препарата Тигераза®).

Определение специфической активности дорназы альфа

Последовательные разведения стандартного (Д-П) и испытуемого (Д-Т) образцов (от 0,0055 до 50 мкг/мл) в буферном р-ре (25 мМ НЕРЕС, 5,4 мМ CaCl₂, 4 мМ MgCl₂, 0,1% бычьего сывороточного альбумина, 0,01% NaN₃ и 0,05% полисорбата 20, рН=7,5) помещали в планшеты из несорбирующего пластика и добавляли субстрат (комплекс ДНК-метиловый зелёный), инкубировали 4 ч (37 °С) и измеряли оптическую плотность. Для расчёта полумаксимальной эффективной концентрации ингибирования (IC₅₀) находили разницу значений оптической плотности при длине волны 620 и 492 нм и вычитали среднее

значение оптической плотности буферного р-ра, затем строили кривую зависимости оптической плотности от логарифма концентрации с использованием 4-параметрической логистической модели (коэффициент достоверности аппроксимации не менее 0,95) и определяли IC_{50} . Специфическую активность испытуемого образца вычисляли по формуле: $АСО \times (IC_{50 \text{ Д-П}} / IC_{50 \text{ Д-Т}})$, где АД-П — активность стандартного образца, $IC_{50 \text{ Д-П}}$ и $IC_{50 \text{ Д-Т}}$ — полумаксимальные эффективные концентрации ингибирования стандартного (Д-П) и испытуемого (Д-Т) образцов.

Определение муколитической активности дорназы альфа *ex vivo*

Образцы мокроты собирали у детей в возрасте от 2 до 16 лет с хроническими заболеваниями лёгких (в ФГБУ «Научно-исследовательский институт пульмонологии» ФМБА), замораживали и хранили при -20°C . Непосредственно перед измерением образцы мокроты размораживали и объединяли в общий пул (от 10 пациентов). К 0,5 мл пулированного образца добавляли 10 мкл р-ра Д-Т или Д-П (в буферном р-ре 150 мМ NaCl, 1,35 мМ CaCl₂), инкубировали 15 мин при 37°C и измеряли вязкость смеси на вискозиметре Брукфильда DV2TLV с использованием шпинделя CPA-52Z (при скорости вращения шпинделя 1 об./мин). Результаты представляли в мПа·сек.

Животные

Исследование проводили на половозрелых и ювенильных аутбредных крысах (*Rattus* sp.) обоего пола стока Sprague-Dawley (CD) в возрасте на начало исследования 3–4 и 8–9 недель с массой тела ювенильных животных около 50 г, половозрелых — 190–220 г (самки) и 290–320 г (самцы), всего 102 половозрелых и 332 ювенильных особей. Использование ювенильных животных связано с тем, что основная часть пациентов — дети. Все животные SPF-статуса, поставщик — Питомник лабо-

раторных животных «Пушино» ФИБХ РАН. Животных содержали группами в индивидуально вентилируемых клетках из расчёта 200–250 см² пола клетки на 1 животное, обеспечивая свободный доступ к воде и корму. Корм «ЧАРА» для разведения лабораторных животных SPF-категории (ООО «Ассортимент Агро») и «ВАКА» (ООО «БИОСФЕРА») перед раздачей автоклавировали. Для поения использовали воду, прошедшую подготовку в обратно-осмотической установке и обработанную УФ (ЗАО «Научно-производственная компания Медиана-Фильтр»), разлитую в проавтоклавируемые бутылочки. В качестве подстила использовали автоклавированную смесь подстила «Золотой Кот» (ООО «ЗКК «Золотой Почагок», Россия) и «Safe®» (J. Rettenmaier & Sohne GmbH, Германия) в соотношении 1:4. После приёма животные проходили адаптацию в течение 5 дней, в начале и в конце адаптации проводили клинический осмотр. Распределение животных по группам осуществляли случайным образом, но так, чтобы индивидуальная масса животных в группе не отличалась от средней массы животных одного пола более чем на 10%. Состояние животных в эксперименте оценивали ежедневно по следующим показателям: состояние шерсти и кожи; наличие/отсутствие выделений из естественных отверстий; активность/сон; движения (нормальные, аномальные); потребление корма/воды; состояние фекалий (консистенция, количество); реакция на руки (беспокойство, любопытство, вокализация); тургор кожи и состояние видимых слизистых оболочек. Эвтаназию проводили ингаляцией углекислым газом (основной метод) с последующим обескровливанием (вспомогательный метод).

Ингаляционное введение, дозы

Ингаляционную камеру (0,6×0,6×0,5 м из нержавеющей стали с клапаном для компенсации внутреннего давления) соединяли с небулайзером «Pari LC Sprint» с компрес-

сором «Pari Boy SX» (PARI GmbH, Германия) и пробоотборником, размещали внутри камеры животных и распыляли вещества. В предварительных экспериментах (выполнены в ФГБУ «48 ЦНИИ Минобороны России — ВЦ», г. Сергиев Посад) установлено, что аэрозоль в камере достигал равновесного значения через 10 мин после начала его продуцирования, по размеру частиц являлся стабильным во времени и однородным по объёму камеры, массовый медианный аэродинамический диаметр и размер частиц аэрозоля обоих препаратов идентичны, средняя массовая концентрация генерируемого аэрозоля составляла 4,0 мг/л и сохранялась на этом уровне в течение всего времени экспозиции. Контроль массовой концентрации аэрозоля и массовый медианный аэродинамический диаметр при ингаляции животным проводили через 20, 30, 40 и 50 мин валидированной методикой с использованием спектрофлуориметра CM 2203 («Solar», Белоруссия). Исследуемые вещества (Д-Т или Д-П) животным вводили в дозах 0,2 мг/кг (половозрелые) и 0,26 мг/кг (ювенильные) животные (время экспозиции в камере составляло 55 и 70 мин соответственно). Данные дозы более чем 6-кратно превышали рекомендуемую для клинического применения. Плацебо ингалировали аналогично — по 55 и 70 мин.

Дизайн исследования

Формировали по три группы (плацебо, Д-Т и Д-П) половозрелых и ювенильных животных, препараты вводили ингаляционно 1 раз в день в течение 28 дней. На протяжении всего исследования животных ежедневно осматривали, еженедельно взвешивали и измеряли температуру тела, каждые две недели оценивали физиологические параметры, проводили общие анализы мочи и крови, определяли биохимические показатели крови. Часть животных эвтаназируют и вскрывали на 29-й день (через 1 сут после последнего введения), оставшихся —

на 57-й день (через 28-дневный период восстановления). Перед эвтаназией проводили офтальмоскопию. При вскрытии оценивали наличие изменений внутренних органов и тканей. Для изучения фармакокинетики кровь отбирали после первого и последнего (28-го) введения через 5 мин, 2, 8 и 24 ч после окончания ингаляции. На 29-й и 57-й день животных эвтаназировали и отбирали лёгкие и кровь, в которых измеряли содержание дорназы альфа. Для изучения иммуногенности кровь отбирали по окончании введения (29-й и 57-й день) и определяли в ней антилекарственные антитела (АЛА).

Количественное определение

содержания дорназы альфа в образцах

Лёгкие разделяли на верхушечную и срединную части, отделяли и взвешивали бронхи и фрагменты лёгочной ткани; кровь центрифугировали и отделяли сыворотку. Образцы сыворотки, бронхов и лёгких замораживали и хранили при температуре -80°C . Через 6–12 ч образцы лёгких гомогенизировали в ледяной бане в калий-фосфатном буферном р-ре (50 мМ однозамещённый фосфат калия тригидрат, двузамещённый фосфат калия моногидрат, рН=6,5), центрифугировали (13 000 об./мин, 15 мин, 4°C), собирали надосадочную жидкость, в которой определяли содержание дорназы альфа. Сыворотку перед анализом разбавляли в 5 раз холодным калий-фосфатным буферным р-ром. Количественное содержание дорназы альфа в гомогенатах образцов лёгких и бронхов и сыворотке определяли с помощью оригинальной методики (валидацию проводили в соответствии с руководством [13]) со следующими валидационными характеристиками: диапазон устойчивой градуировочной кривой — 0,156–20 нг/мл, нижний предел количественного определения (НПКО) — 0,4 нг/мл, аналитический диапазон — 0,4–200 нг/мл, минимально необходимое разведение образца — 1/5. Крысиные антитела к дорназе альфа иммобилизовали в лунках 96-луночного ИФА-

планшета, удаляли не связавшиеся с пластиком антитела, блокировали свободные центры связывания пластика буферным р-ром PBST (0,01 М фосфатно-солевой буфер с 0,0137 моль/л NaCl, 0,0027 моль/л KCl, 0,05% полисорбата 20, pH=7,2–7,4), содержащим 1,0% бычьего сывороточного альбумина, инкубировали в течение 1 ч при температуре 37 °С, и после отмывки добавляли разведённые образцы и градуировочные р-ры. После инкубации (1 ч, 37 °С) лунки 5 раз промывали PBST и добавляли конъюгированные с пероксидазой хрена крысиные поликлональные антитела к дорназе альфа, инкубировали (1 ч, 37 °С) и после отмывки вносили хромогенный субстрат пероксидазы хрена ТМБ. Инкубировали в темноте 15 мин (15–25 °С), останавливали реакцию добавлением 2 М р-ра серной кислоты и измеряли оптическую плотность при длине волны 450 нм (спектрофотометр xMark, «Bio-Rad», США). Содержание дорназы альфа в образцах определяли с помощью градуировочной кривой зависимости оптической плотности (ОП) от десятичного логарифма концентрации дорназы альфа с использованием программного обеспечения Microplate Manager, v. 6.1 (xMark, «Bio-Rad», США).

Определение антилекарственных антител (АЛА)

АЛА (антитела к дорназе альфа) в крови определяли по оригинальной валидированной методике иммуноферментного анализа (валидацию проводили в соответствии с рекомендациями [21] и руководством [13]). Образцы крови центрифугировали, отделяли сыворотку и определяли содержание АЛА в три последовательных этапа: 1 — скрининг, 2 — подтверждающий тест положительных в скрининге образцов, 3 — определение титра общих АЛА. В лунках ИФА-планшетов иммобилизовали Д-Т (0,5 мкг на лунку), блокировали свободные центры связывания пластика буферным р-ром PBST, содержащим 1,0% бычь-

его сывороточного альбумина, и отмывали р-ром PBST. Подготовленные таким образом планшеты использовали при проведении скрининга, подтверждающего теста и определении титра антител, для чего в лунки вносили разведённые образцы, инкубировали 1 ч (25 °С), трижды отмывали лунки PBST и вносили антикрысиные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена, инкубировали 50 мин (25 °С), после отмывки добавляли хромогенный субстрат пероксидазы хрена ТМБ, инкубировали в темноте 5 мин (15–25 °С), останавливали реакцию добавлением 0,5 М р-ра серной кислоты и измеряли оптическую плотность при длине волны 450 нм с использованием планшетного спектрофотометра (xMark, «Bio-Rad», США). Результат скрининга считали положительным, если среднее значение оптической плотности лунок с образцом, делённое на оптическую плотность буферного р-ра, использованного для разведения образцов, составляло не менее 1,6. Наличие АЛА верифицировали подтверждающим тестом, для чего образцы разводили в 100 раз подтверждающим р-ром № 1, содержащим дорназу альфа в качестве специфичного антигена, и подтверждающим р-ром № 2, содержащим рекомбинантную имиглюцеразу в качестве неспецифичного антигена, и буферным р-ром для разведения. По окончании анализа рассчитывали коэффициенты K1 и K2 по формулам:

$$K1 = \frac{OD_{\text{обр}}}{OD_{K1}}; \quad K2 = \frac{OD_{\text{обр}}}{OD_{K2}}$$

где OD_{K1} — среднее значение ОП образца при его разведении подтверждающим р-ром № 1; OD_{K2} — среднее значение ОП образца при его разведении подтверждающим р-ром № 2; $OD_{\text{обр}}$ — среднее значение ОП образца при его разведении буферным р-ром.

Результаты оценивали следующим образом:

– если $K1 > 1,6$, $K2 \leq 1,6$, то наличие АЛА подтверждено;

– если $K1 \geq 1,6$, $K2 \geq 1,6$, то наличие АЛА не подтверждено (повышение сигнала не специфично);

– если $K1 \leq 1,6$, $K2 \leq 1,6$, то наличие АЛА не подтверждено (повышение сигнала не специфично).

После подтверждения наличия антител к дорназе альфа определяли их титр, за титр принимали последнее разведение образца, при котором значение коэффициента $K1$ составляло не менее 1,6.

Физиологические и клинические исследования животных

Температуру тела измеряли ректально термометром электронным WT-04 stand art. Оценку физиологических параметров производили с использованием аппарата для электрофизиологических исследований MP150WSW («BIOPAC Systems, Inc.», США): артериальное давление (АД) измеряли неинвазивным способом (модуль NIBP200A и датчик-манжета RXTC-UFSSENSOR), частоту дыхательных движений (ЧДД) измеряли наложением датчика пневмографии TSD110 на грудную клетку (модуль RSP100C), частоту сердечных сокращений (ЧСС) и уровень сатурации крови (SpO_2) определяли неинвазивно при помощи модуля OXY200 и датчика пульсоксиметрии TSD270B. Полученные при помощи аппарата MP150WSW данные обрабатывали прилагательной к нему программой AcqKnowledge® («BIOPAC Systems, Inc.», США).

Оценку состояния роговицы глаз у животных проводили с использованием бинокулярной щелевой лампы «SHINN-NIPPON» (10×), состояние обоих глаз оценивали по наличию или отсутствию повреждения роговицы и признаков конъюнктивита с использованием прижизненной окраски поверхности роговицы (1% р-ром флюоресцеина натрия). Гематологический анализ проводили с использованием ав-

томатического гематологического анализатора Abacus Junior 5 Vet («Diatron», Австрия). Биохимические показатели крови (креатинин, ЛДГ, щелочная фосфатаза, глюкоза, общий билирубин, мочевина, холестерин, АЛТ, АСТ, общий белок) оценивали при помощи автоматического биохимического анализатора ChemWell 2900 (Т) («Awareness», США). Анализ мочи проводили с использованием тест-полосок COMBINA 13 на мочевом анализаторе Combilyzer 13 («HUMAN GmbH», Германия).

Патоморфологические исследования

При вскрытии проводили макроскопическое исследование внутренних органов грудной и брюшной полостей — селезёнки, печени, надпочечников, почек, сердца, лёгкие взвешивали. Для гистологического анализа отбирали образцы тонкой и толстой кишки, селезёнки, печени, почек, сердца, лёгких, лимфатических узлов (брыжейки и шейных), пищевода, трахеи, бронхов, роговицы глаза, а также органы, в которых выявлены макроскопические изменения. После фиксации формалиновым буфером образцы обезвоживали на станции гистологической проводки Leica TP 1020, заливали в парафин на станции заливки парафином Leica EG 1150 H, изготавливали срезы толщиной 3–5 мкм на микротоме Thermo Microm HM 340 E, окрашивали гематоксилином-эозином. Оценку изменений производили с использованием микроскопа Leica DM4000.

Методы статистической обработки данных

Для всех количественных данных вычисляли групповое среднее арифметическое (\bar{x}), стандартную ошибку среднего (s) либо среднеквадратическое отклонение (σ). Обработку данных производили с использованием программ SPSS STATISTICS и Graphpad Prism 6.0. Значимость различий показателей средних в группах определяли с использованием критериев t-Стьюдента.

та, Фишера, Уилкоксона–Манна–Уитни. Сравнение параметров функций проводили с использованием критерия Фишера для добавочной суммы квадратов. Межгрупповое сравнение количества особей, выработавших АЛА, проводили по точному критерию Фишера. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследований

Фармакологическая активность

Известно, что для оценки эффективности терапии муковисцидоза адекватных биологических моделей пока не разработано [8, 20], поэтому исследование фармакологической активности дорназы альфа проводили двумя методами: 1 — *in vitro* по ферментативной активности со стандартным субстратом (комплекс ДНК-метиленовый зелёный) и 2 — *ex vivo*, по способности снижать вязкость гнойной мокроты больных МВ [9]. Результаты анализа ферментативной активности трёх серий препаратов, выполненного в трёх повторностях, показали, что среднее значение величины ЕС50 составило $28,66 \pm 0,73$ мкг/мл для Д-Т и $28,24 \pm 0,34$ мкг/мл для Д-П. Дорназа альфа дозозависимо снижала вязкость мокроты (зависимость нелинейная), значимых различий между происхождением фермента и его муколитической (секретолитической) активностью не наблюдали (в табл. 1

представлены усреднённые результаты, полученные на трёх сериях препаратов).

Субхроническая токсичность

В течение 28-дневного ингаляционного введения гибели животных и клинических признаков нарушения здоровья не наблюдали, одно животное было выведено на 42-й день по причине наличия признаков бактериальной инфекции.

Животные набирали вес в пределах своей физиологической нормы, по динамике массы тела в период введения (6–7-й, 13–14-й, 20–21-й и 27–28-е дни) и по окончании введения (на 34-й, 41–42-й, 48–49-й и 55–56-й дни) различий между группами, получавшими плацебо и препараты, не выявили. Физиологические (температура тела, ЧСС, ЧДД, АД, SpO₂) и гематологические показатели половозрелых и ювенильных животных в период введения (14-й, 27-й день) и по окончании введения (42-й и 56-й день) не отличались от показателей, полученных до начала введения, не отмечено также различий по изученным показателям между группами, получавшими дорназу альфа (Д-Т или Д-П) и плацебо, как и между группами Д-Т и Д-П. Биохимические показатели крови половозрелых животных в середине и в конце периода введения (14-й и 27-й день) не отличались от полученных до начала введения, а также не было различий между группами, получавшими Д-Т,

Таблица 1. Вязкость образцов мокроты (мПа × сек) после инкубации с различными разведениями препаратов дорназы альфа производства АО «ГЕНЕРИУМ» (Д-Т) и Хоффманн-Ля Рош Лтд. (Д-П)

Table 1. Sputum sample viscosity (MPa × sec) after incubation with the dornase alpha produced by АО “GENERIUM” (D-T) and Hoffmann-La Roche Ltd. (D-P)

Концентрация дорназы альфа, мкг/мл мокроты	Исследуемое вещество		Соотношение вязкости Д-Т/Д-П
	Д-Т	Д-П	
0	5565±490	5750±630	0,968
1	5029±365	5303±410	0,948
2	5007±320	5204±181	0,962
5	1612±250	1524±340	1,058
10	24±10	27±12	0,889
20	19±6	19±5	1,000

Д-П или плацебо как в период введения, так и после него (42-й и 56-й день). Некоторые биохимические показатели крови ювенильных животных, получавших Д-Т или Д-П, отличались от начального уровня (до начала введения): отмечено снижение содержания в сыворотке крови белка (29-й день), снижение активности ЩФ (29-й и 57-й день), повышение содержания креатинина (самцы, 29-й день), увеличение активности АЛТ (самцы, 29-й день), снижение содержания глюкозы (57-й день). При этом различий с показателями группы плацебо не было. В моче животных, получавших дорназу альфа (14-й, 28-й, 42-й и 56-й день), не наблюдали изменений по сравнению с соответствующими показателями до начала введения. Также по данным показателям не различались группы животных, получавших дорназу альфа разных производителей. На следующий день после окончания ингаляций (29-й день) и позже (57-й день) признаков конъюнктивита не выявлено, однако обнаружены поверхностные дефекты роговицы. По количеству дефектов роговицы различий между животными, получавшими Д-Т или Д-П, не зафиксировано. Не было различий между группой плацебо и животными, получавшими препараты дорназы альфа.

При некропии животных (половозрелых и ювенильных) всех групп по окончании 28-дневного введения (29-й и 57-й день) макроскопических изменений внутренних органов, которые могли быть вызваны препаратами, не обнаружено. Введение препаратов не оказало влияния на массу внутренних органов животных (селезёнку, печень, почки, надпочечники, сердце, правое и левое лёгкое), взятых на следующий день после окончания ингаляций и через 28 дней (57-й день эксперимента), различий массовых характеристик между животными, получавшими дорназу альфа разных производителей, не наблюдалось. При гистологическом исследовании

лёгких, бронхов, трахеи ювенильных животных, получавших препараты или плацебо, патоморфологических изменений не выявлено; у половозрелых крыс отмечали утолщение стенок альвеол и выход экссудата в область альвеол как на следующий день после окончания курса введения, так и 28 дней спустя. При гистологическом исследовании пищевода, тонкой и толстой кишки, сердца, селезёнки, шейных и брыжеечных лимфатических узлов ювенильных и половозрелых животных патологических изменений не выявлено. У некоторых ювенильных животных, вскрытых сразу после окончания введения, выявлено подкисление цитоплазмы некоторых канальцев в почках (ацидоз): у 1 самца группы плацебо, у 1 самки и 3 самцов группы Д-Т, у 1 самки в группе Д-П, через 28 дней после последнего введения эти изменения не наблюдали. У некоторых половозрелых животных наблюдали начальную стадию зернистой дистрофии печени, однако частота встречаемости данного отклонения одинакова во всех группах. У части ювенильных крыс, вскрытых сразу по окончании введения, выявлены отёки в цитоплазме гепатоцитов — гидропическая дистрофия: в группе плацебо — у 6 самок и 5 самцов; в группе Д-Т — у 3 самок и 3 самцов, в группе Д-П — у 4 самок и 3 самцов. Однако через 28 дней после последнего введения эти изменения исчезали. При исследовании морфологии роговицы глаза изменений в структуре не выявлено, у некоторых животных встречалась повышенная митотическая активность, свидетельствующая о регенеративных процессах в роговице, однако по частоте встречаемости группы не различались.

Фармакокинетические параметры

Содержание дорназы альфа в сыворотке крови половозрелых и юных животных через 5 мин, 2 ч и 8 ч после окончания первой и последней (28-й) ингаляции во всех группах оказалось ниже НПКО (0,4 нг/мл).

В лёгких (верхушка и середина) и бронхах половозрелых крыс через сутки после последнего (28-го) ингаляционного введения препаратов содержание дорназы альфа находилось в следующих диапазонах: у самок — от 486 ± 304 до 658 ± 269 нг/г ткани, у самцов — от 634 ± 392 до 829 ± 184 нг/г ткани; в группе плацебо: у самок — 6–7, у самцов — 10–14 нг/г ткани. Группы Д-Т и Д-П по содержанию дорназы альфа значимо не различались. У ювенильных крыс в эти же сроки в лёгких содержание дорназы альфа было близко к показателям половозрелых животных, сравнение в разные временные точки (5 мин, 2 и 8 ч после первой ингаляции) показало, что максимум приходился на срок 5 мин после начала ингаляции (в верхушке лёгкого — 4093–4561, в середине лёгкого — 3415–3600 нг/г ткани). Результаты определения содержания дорназы альфа в лёгких и бронхах ювенильных животных до начала 28-й ингаляции и через 5 мин, 2, 8 и 24 ч после неё представлены на рисунке. На основании полученных данных были рассчитаны фармакокинетические параметры: содержание дорназы альфа снижалось существенно быстрее в бронхах (период полувыведения $T_{1/2}$ составлял 3–4 ч) в сравнении с верхушкой и серединой лёгкого (период полувыведения — 10–11 и 8–10 ч соответственно). При этом накопление препарата, оценённое по St_{ax} и AUC_{0-t} , отмечено в бронхах (индексы накопления по St_{ax} — около 5–6, по AUC_{0-t} — около 3–4) и практически не выражено для верхушки и середины лёгкого (индексы накопления — около 1). Данные эффекты значимо не отличаются между группами Д-Т и Д-П.

Иммуногенность

У юных животных при скрининге АЛА не обнаружены, у половозрелых животных обнаружены во все сроки наблюдения (табл. 2), за исключением дня накануне начала ингаляций. На 14-й день их титр во всех группах составлял 1/10–1/20, в кон-

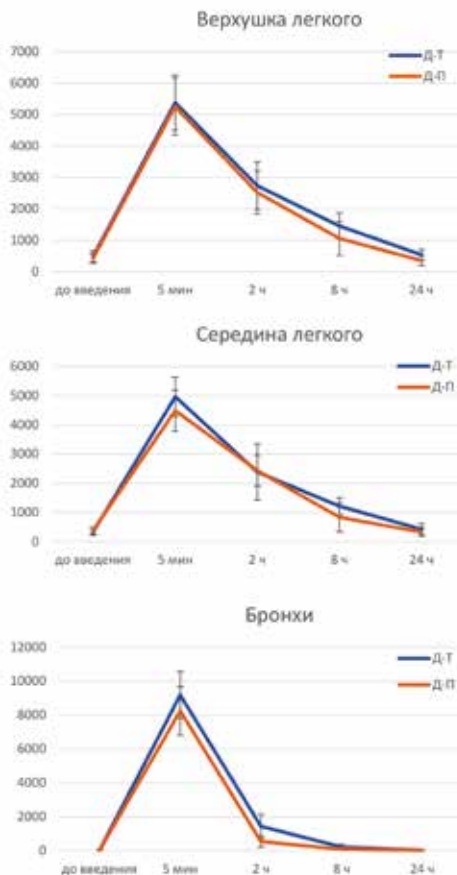


Рис. Содержание дорназы альфа (нг/г ткани) в лёгких и бронхах ювенильных крыс до начала 28-й ингаляции и через 5 мин, 2, 8 и 24 ч после ингаляции плацебо и препаратов дорназы альфа производства АО «ГЕНЕРИУМ» (Д-Т) или «Хоффманн-Ля Рош Лтд.» (Д-П): по оси абсцисс — время отбора ткани, по оси ординат — содержание дорназы альфа.

Fig. The content of dornase alpha (ng/g of tissue) in the lungs and bronchi of juvenile rats before and after the 28th inhalation (5 minutes, 2, 8 and 24 hours) of dornase alpha produced by AO "GENERIUM" (D-T) or Hoffmann-La Roche Ltd. (D-P): abscissa axis – the time of sampling, ordinate axis – the content of dornase alpha.

це периода введения (28-й день) повышался до 1/80, а через 14 и 28 дней после окончания введений в каждой группе только по одной крысе имели титр АЛА более 1/80.

Таблица 2. Количество половозрелых животных (суммарно самок и самцов) с АЛА в сыворотке крови и титр АЛА в разные сроки ингаляционного введения плацебо, препаратов дорназы альфа производства АО «ГЕНЕРИУМ» (Д-Т) или «Хоффманн-Ля Рош Лтд.» (Д-П)

Table 2. Number of mature rats (total females and males) with ALA in blood serums and ALA titers after inhalation of dornase alpha medical products manufactured by AO "GENERIUM" (D-T) or "Hoffmann-La Roche Ltd." (D-P)

День эксперимента	Вводимое вещество		
	Плацебо	Д-Т	Д-П
14-й день введения	0 (n=24)	1 (4,2%, n=24) 1:20 y 1 (100%)	3 (12,5%, n=24) 1:10 y 1 (33,3%) 1:20 y 2 (66,7%)
28-й день введения	0 (n=24)	7 (29,2%, n=24) 1:20 y 1 (14,3%) 1:40 y 1 (14,3%) 1:80 y 5 (71,4%)	8 (33,3%, n=24) 1:20 y 2 (25,0%) 1:40 y 1 (12,5%) 1:80 y 5 (62,5%)
42-й день (14 дней по окончании введения)	0 (n=12)	7 (58,3%, n=12), 1:10 y 2 (28,6%) 1:20 y 2 (28,6%) 1:80 y 2 (28,6%) >1:80 y 1 (14,3%)	8 (66,7%, n=12) 1:10 y 1 (12,5%) 1:80 y 2 (25,0%) >1:80 y 1 (12,5%)
56-й день (28 дней по окончании введения)	0 (n=12)	5 (41,7%, n=12) 1:10 y 2 (40,0%) 1:40 y 1 (20,0%) 1:80 y 1 (20,0%) >1:80 y 1 (20,0%)	4 (33,3%, n=12) 1:10 y 1 (25,0%) 1:40 y 1 (25,0%) 1:80 y 1 (25,0%) >1:80 y 1 (25,0%)

Обсуждение результатов

Ферментативная и муколитическая (секретолитическая) активность дорназы альфа производства АО «ГЕНЕРИУМ» была сопоставима с таковой производства «Хоффманн-Ля Рош Лтд.». Ингаляционное 28-дневное введение препаратов в дозе, 6-кратно превышающей рекомендуемую для клинического использования, хорошо переносилось животными (как ювенильными, так и взрослыми), не вызывало гибели и изменений со стороны сердечно-сосудистой, дыхательной, нервной и выделительной систем животных. У половозрелых животных всех групп, включая плацебо, выявлено утолщение стенок альвеол и выход экссудата в область альвеол. Трактовать данные изменения как альвеолит достаточных оснований нет, хотя наличие в крови животных антител к дорназе альфа может быть свидетельством экзогенного аллергического альвеолита. Однако по данным литературы, гистологическая картина, характерная для острой, подострой и хронической фазы экзогенного аллергического альвеолита, иная: в острой фазе выявляются воспалительный инфильтрат в стенках

альвеол, гранулемы в альвеолярных перегородках и стенках бронхиол, в подострую фазу появляются эпителиоидно-клеточные гранулемы, трансформирующиеся со временем в соединительнотканые структуры с последующим развитием фиброза [1, 5].

Выявленные изменения являются скорее реакцией на эвтаназию углекислым газом, а отсутствие клеточной инфильтрации подтверждает отсутствие воспалительной реакции в ткани. По этой же причине, вероятно, развился и ацидоз, выявленный в цитоплазме некоторых канальцев почек юных животных. Таким образом, 28-дневное введение Д-Т в дозе, 6-кратно превышающей терапевтическую рекомендованную для применения (0,20 и 0,26 мг/кг/день), не вызывает у половозрелых и юных животных функциональных и морфологических патологических изменений. По изученным показателям сравниваемые препараты Д-Т и Д-П не различались.

Содержание дорназы альфа после ингаляции Д-Т или Д-П в образцах тканей лёгких и бронхов животных достоверно не различалось при анализе в непарном параметрическом Т-тесте, а соотношение зна-

чений параметров $Stax$, AUC_{last} и $T1/2$ (ч) укладывалось в диапазон биоэквивалентности 0,8–1,25, что свидетельствует о биоаналогичности Д-Т.

У половозрелых животных, но не у юных, введение препаратов дорназы альфа вызвало появление АЛА (антител к дорназе альфа), пик пришёлся на 42-й день, при этом титр антител был довольно высоким (1:80 и выше у 42,9% крыс группы Д-Т и у 37,5% в группе Д-П). По количеству животных, у которых выявлены антитела, препараты значимо не различались. По данным клинических исследований, у препаратов, содержащих дорназу альфа, имеется слабо выраженная иммуногенность: у небольшой части больных (8,7%

и 2–4% при 12- или 24-недельном применении, соответственно) отмечено появление в сыворотке крови антител IgG к дорназе альфа, при этом анафилактических реакций не зафиксировано [11, 18].

Выводы

Лекарственный препарат Тигераза® производства АО «ГЕНЕРИУМ» по специфической ферментативной активности *in vitro*, муколитической (секретолитической) ДНКазной активности *ex vivo*, профилю безопасности, основным фармакокинетическим параметрам сопоставим с референтным лекарственным препаратом Пульмозим® производства «Хоффманн-Ля Рош Лтд.».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Авдеева О.Е., Авдеев С.Н., Чучалин А.Г. Экзогенный аллергический альвеолит. *Русский медицинский журнал*. 1997;17:6. [Avdeeva O.E., Avdeev S.N., Tchuchalin A.G. Ekzogeniyy allergitceskii alveolit [Exogenous allergic alveolitis]. *Russian medical journal*. 1997;17:6. (In Russian)].
2. Ельцова Е.А., Раменская Г.В., Смолярчук Е.А., Бушманова А.В. Биосимиляры – препараты будущего. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2015;1:12-15. [Eltsova E.A., Ramenskaia G.V., Smoliartshuk E.A., Bushmanova A.V. Biosimilari – preparati budushchego [Biosimilars are the drugs of the future]. *Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2015;1:12-15. (In Russian)].
3. Кистозный фиброз (муковисцидоз). *Клин. реком. Союз педиатров России, Ассоциация медицинских генетиков, Российское респираторное общество, Российское трансплантологическое общество, Ассоциация детских врачей Московской области*, 2021. [Cystic fibrosis. *Clinical recommendation*. Union of Pediatricians of Russia, Association of Pregnant Geneticists, Russian Respiratory Society, Russian Transplant Society, Association of Children's Doctors of the Moscow Region, 2021. (In Russian)]. URL: <https://mukoviscidoz.org/doc/%D0%9A%D0%A0372.pdf>
4. Колбин А.С., Гомон Ю.М., Карпов О.И., Балыкина Ю.Е., Проскурин М.А. Муковисцидоз как социально-экономическая проблема. *Качественная клиническая практика*. 2020;5:38-49. DOI: 10.37489/2588-0519-2020-5-38-49. [Kolbin A.S., Gomon Ju.M., Karpov O.I., Balikina Ju.E., Proskurin M.A. Mukovistsidoz kak sotsialno-ekonomiticheskaia problema [Cystic fibrosis as economic social problem]. *Kachestvennaia kliniticheskaia praktika [Good clinical practice]*. 2020;5:38-49. (In Russian)]. DOI: 10.37489/2588-0519-2020-5-38-49.
5. Косарев В.В., Бабанов С.А. Экзогенный аллергический альвеолит: проблемы диагностики. *Российский медицинский журнал*. 2013;7:388-392. [Kosarev V.V., Babanov S.A. Ekzogeniyy allergitceskii alveolit: problemi diagnostiki [Exogenous allergic alveolitis: problems in diagnosis]. *Russian medical journal*. 2013;7:388-392. (In Russian)].
6. *Международная классификация болезней 10-го пересмотра (МКБ-10)*. [Mezhdunarodnaia klassifikatsia boleznei 10-go peresmotra (МКБ-10) [International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems ICD-10 Updates (ICD-10)]. (In Russian)].
7. *Регистр больных муковисцидозом в Российской Федерации. 2019 год*. [Registr bolnih mukovistsedozom v Rossijskoi Federatsii [Register of patients with cystic fibrosis in the Russian Federation]. 2019. (In Russian)]. URL: https://mukoviscidoz.org/doc/registr/site_Registre_2019.pdf
8. Cooney A.L., McCray P.B. Jr., Sinn P.L. Cystic fibrosis gene therapy: Looking back, looking forward. *Genes (Basel)*. 2018;9(11):538–561. DOI: 10.3390/genes9110538.
9. Dayan A.D. Pharmacological-toxicological (Expert report on recombinant human Deoxyribonuclease I (rhDNase; PulmozymeTM). *Hum. Exper. Toxicology*. 1994;13:S2–S42. DOI: 10.1177/096032719401300101.

10. Dechecchi M.C., Tamanini A., Cabrini G. Molecular basis of cystic fibrosis: From bench to bedside. *Ann. Transl. Med.* 2018;6(17):334. DOI: 10.21037/atm.2018.06.48.
11. Eisenberg J.D., Aitken M.L., Dorkin H.L., Harwood I.R., Ramsey B.W., Schidlow D.V., Wilmott R.W., Wohl M.E., Fuchs H.J., Christiansen D.H., Smith A.L. Safety of repeated intermittent courses of aerosolized recombinant human deoxyribonuclease in patients with cystic fibrosis. *J. Pediatr.* 1997;131(1 Pt 1):118–124. DOI: 10.1016/s0022-3476(97)70134-3.
12. El-Bakry L. The future of biosimilars. *Int. J. Drug Delivery.* 2017;9:01–02. DOI: 10.5138/09750215.1930.
13. *Guideline on bioanalytical method validation. EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1 Corr. 2.* European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use, 2011. URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf.
14. Farfan-Portet M-I., Gerkens S., Lepage-Nefkens I., Vinck L., Hulstaert F. Are biosimilars the next tool to guarantee cost-containment for pharmaceutical expenditures? *Eur. J. Health Econ.* 2014;15(3):223–228. DOI: 10.1007/s10198-013-0538-4.
15. *Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: quality issues (revision 1).* EMA/CHMP/BWP/247713/2012. European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use, 2014. URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-similar-biological-medicinal-products-containing-biotechnology-derived-proteins-active_en-0.pdf.
16. *Guideline on similar biological medicinal products containing monoclonal antibodies – non-clinical and clinical issues.* CHMP/BMWP/403543/2010, European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use, 2012. URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-similar-biological-medicinal-products-containing-monoclonal-antibodies-non-clinical_en.pdf.
17. *Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as drug substance: non-clinical and clinical issues.* EMEA/CHMP/BMWP/42832/2005 Rev 1, European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use, 2014. URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-similar-biological-medicinal-products-containing-biotechnology-derived-proteins-active_en-2.pdf.
18. Hodson M.E. Aerosolized dornase alfa (rhDNase) for therapy of cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1995;151(3 Pt 2):S70–S74. DOI: 10.1164/ajrcm/151.3_Pt_2.S70.
19. Honavar S.G. From biologics to biosimilars and biobetters — democratization of high-end therapeutics. *Indian J. Ophthalmol.* 2021;69(2):207–208. DOI: 10.4103/ijo.IJO_150_21.
20. Semaniakou A., Croll R.P., Chappe V. Animal models in the pathophysiology of cystic fibrosis. *Front Pharmacol.* 2018;9:1475. DOI: 10.3389/fphar.2018.01475.
21. Shankar G., Devanarayan V., Amaravadi L., Barrett Y.C., Bowsher R., Finco-Kent D., Fiscella M., Gorovits B., Kirschner S., Moxness M., Parish T., Quarby V., Smith H., Smith W., Zuckerman L.A., Koren E. Recommendations for the validation of immunoassays used for detection of host antibodies against biotechnology products. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2008;48(5):1267–1281. DOI: 10.1016/j.jpba.2008.09.020.
22. Welsh M.J., Smith A.E. Molecular mechanism of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell.* 1993;73(7):1251–1254. DOI: 10.1016/0092-8674(93)90353-r.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Аксёнова Мария Сергеевна, АО «ГЕНЕРИУМ»;
[e-mail: Aksenova@ibcgenerium.ru](mailto:Aksenova@ibcgenerium.ru)

Бочарова Евгения Николаевна, к.б.н.,
АО «ГЕНЕРИУМ»;
[e-mail: Varenik@ibcgenerium.ru](mailto:Varenik@ibcgenerium.ru)

Аббасова Светлана Георгиевна, д.б.н.,
АО «ГЕНЕРИУМ»;
[e-mail: Abbasova@ibcgenerium.ru](mailto:Abbasova@ibcgenerium.ru)

Пonomарёв Александр Сергеевич, ФГБУ
«48 Центральный научно-исследовательский
институт» Минобороны России

Логинова Валентина Викторовна,
АО «ГЕНЕРИУМ»;
[e-mail: loginova@ibcgenerium.ru](mailto:loginova@ibcgenerium.ru)

Maria S. Aksenova, АО “GENERIUM”;
[e-mail: Aksenova@ibcgenerium.ru](mailto:Aksenova@ibcgenerium.ru)

Eugenia N. Bocharova, Cand. Sci. (Biol.),
АО “GENERIUM”;
[e-mail: Varenik@ibcgenerium.ru](mailto:Varenik@ibcgenerium.ru)

Svetlana G. Abbasova, Dr. Sci. (Biol.),
АО “GENERIUM”;
[e-mail: Abbasova@ibcgenerium.ru](mailto:Abbasova@ibcgenerium.ru)

Aleksander S. Ponomarev, 48 Central Research
Institute of the Ministry of Defense of Russia

Valentina V. Loginova, АО “GENERIUM”;
[e-mail: loginova@ibcgenerium.ru](mailto:loginova@ibcgenerium.ru)

Болотникова Мария Валентиновна,
АО «ГЕНЕРИУМ»;
[e-mail: bolotnikova@ibcgenerium.ru](mailto:bolotnikova@ibcgenerium.ru)

Бельская Наталья Витальевна*, д.м.н.,
АО «ГЕНЕРИУМ»;
[e-mail: nvbelskaya@generium.ru](mailto:nvbelskaya@generium.ru)

Казаров Александр Александрович,
АО «ГЕНЕРИУМ»;
[e-mail: kazarov@ibcgenerium.ru](mailto:kazarov@ibcgenerium.ru)

Лисова Алёна Евгеньевна, АО «ГЕНЕРИУМ»;
[e-mail: aelisova@ibcgenerium.ru](mailto:aelisova@ibcgenerium.ru)

Кудина Наталья Константиновна,
АО «ГЕНЕРИУМ»;
[e-mail: kudina@ibcgenerium.ru](mailto:kudina@ibcgenerium.ru)

Пантюшенко Марина Семеновна, к.б.н.,
АО «ГЕНЕРИУМ»;
[e-mail: pantushenko@ibcgenerium.ru](mailto:pantushenko@ibcgenerium.ru)

Жилиева Мария Владимировна,
АО «ГЕНЕРИУМ»;
[e-mail: zhiliaeva@ibcgenerium.ru](mailto:zhiliaeva@ibcgenerium.ru)

Копейн Дамир Сергеевич, АО «ГЕНЕРИУМ»;
[e-mail: kopein@ibcgenerium.ru](mailto:kopein@ibcgenerium.ru)

Карелов Юрий Михайлович, ФГБУ
«48 Центральный научно-исследовательский
институт» Минобороны России

Эрастов Георгий Геннадьевич, ФГБУ
«48 Центральный научно-исследовательский
институт» Минобороны России

Лыков Максим Валерьевич, к.м.н.,
АО «ГЕНЕРИУМ»;
[e-mail: lykov@ibcgenerium.ru](mailto:lykov@ibcgenerium.ru)

Хамитов Равиль Авгатович, д.м.н., проф.,
Заслуженный деятель науки РФ,
АО «ГЕНЕРИУМ»

Maria V. Bolotnikova, АО “GENERIUM”;
[e-mail: bolotnikova@ibcgenerium.ru](mailto:bolotnikova@ibcgenerium.ru)

Nataliya V. Belskaya*, Dr. Sci. (Med.),
АО “GENERIUM”;
[e-mail: nvbelskaya@generium.ru](mailto:nvbelskaya@generium.ru)

Aleksander A. Kazarov, АО “GENERIUM”;
[e-mail: kazarov@ibcgenerium.ru](mailto:kazarov@ibcgenerium.ru)

Alena E. Lisova, АО “GENERIUM”;
[e-mail: aelisova@ibcgenerium.ru](mailto:aelisova@ibcgenerium.ru)

Nataliya K. Kudina, АО “GENERIUM”;
[e-mail: kudina@ibcgenerium.ru](mailto:kudina@ibcgenerium.ru)

Marina S. Pantyushenko, Cand. Sci. (Biol.),
АО “GENERIUM”;
[e-mail: pantushenko@ibcgenerium.ru](mailto:pantushenko@ibcgenerium.ru)

Maria V. Zhilyaeva, АО “GENERIUM”;
[e-mail: zhiliaeva@ibcgenerium.ru](mailto:zhiliaeva@ibcgenerium.ru)

Damir S. Kopein, АО “GENERIUM”;
[e-mail: kopein@ibcgenerium.ru](mailto:kopein@ibcgenerium.ru)

Yuri M. Karelov, 48 Central Research Institute
of the Ministry of Defense of Russia

Georgiy G. Erastov, 48 Central Research Institute
of the Ministry of Defense of Russia

Maksim V. Lykov, Cand. Sci. (Med.),
АО “GENERIUM”;
[e-mail: lykov@ibcgenerium.ru](mailto:lykov@ibcgenerium.ru)

Ravil A. Chamitov, Dr. Sci. (Med.), Prof.,
Honored Scientist of the Russian Federation,
АО “GENERIUM”

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author