

БЕЗОПАСНОСТЬ И ПЕРЕНОСИМОСТЬ ГЕЛЕВОЙ ФОРМЫ РЕКОМБИНАНТНОГО АНГИОГЕНИНА ЧЕЛОВЕКА ПОД ТОРГОВЫМ НАЗВАНИЕМ «ФАРМАГЕН» ПРИ НАРУЖНОМ ПРИМЕНЕНИИ У ЗДОРОВЫХ ДОБРОВОЛЬЦЕВ

А. Е. Гуляев, З. Т. Шульгау, Ш. Д. Сергазы, З. И. Ашуева, А. А. Толыбекова

Разработка лекарственного препарата на основе ангиогенина человека является инновационной, поскольку в настоящее время на фармацевтическом рынке не существует лекарственных препаратов ангиогенина. Получена и сертифицирована для проведения клинических исследований опытно-промышленная партия рекомбинантного ангиогенина человека в гелевой лекарственной форме для наружного применения (оригинальный препарат «Фармаген»). Проведена первая фаза клинических исследований препарата «Фармаген» на 28 здоровых добровольцах, установлена безопасность наружного применения и высокая степень переносимости. Исследована фармакокинетика препарата «Фармаген» при наружном применении, установлено, что при нанесении данного препарата на неповрежденную кожную поверхность у здоровых добровольцев биодоступность ангиогенина отсутствует.

Ключевые слова: цитокины, ангиогенин, клиническое исследование, фармакокинетика

ВВЕДЕНИЕ

Цитокины человека в качестве источников получения лекарственных средств используются последние 30 лет. Являясь физиологически активными молекулами, цитокины уже вскоре после их открытия стали апробировать в качестве лекарственных средств. Основное направление лечения препаратами цитокинов – использование рекомбинантных молекул для восполнения недостатка или усиления действия эндогенных цитокинов [1–3].

Общепринято лекарственные средства (ЛС), созданные на основе цитокинов человека, относить в группу биологических или биотехнологических средств. Согласно данным, приведенным в отчете «Assessing biosimilar uptake and competition in European markets» компании «IMS Health», объем продаж препаратов биологического происхождения (биопрепараты и биосимиляры) составляет около 27 % общего объема продаж ЛС в странах Европейского союза. Данный сегмент фармацевтического рынка характеризуется опережающими темпами роста по сравнению с рынком ЛС в целом. Так, по итогам 2012–2013 гг. объем

продаж препаратов биологического происхождения в странах – членах Европейского союза увеличился на 5,5 % по сравнению с 1,5 % увеличением общего объема продаж ЛС [4].

С учетом вышеприведенной статистики разработка как новых оригинальных лекарственных препаратов на основе рекомбинантных цитокинов, так и биосимиляров известных препаратов, является чрезвычайно перспективной темой научно-исследовательских проектов во всем мире.

В настоящем проекте предметом исследования является препарат рекомбинантного ангиогенина человека. Ангиогенин (АНГ) – полипептид, обладающий уникальной рибонуклеазной активностью и являющийся мощным стимулятором образования кровеносных сосудов. Помимо этого он снижает уровень синтеза белка гидролизом клеточной РНК [5–7]. Известно, что ангиогенез является критическим процессом в ходе заживления ран [8–9]. Вновь образующиеся кровеносные сосуды участвуют в инициации формирования грануляционной ткани и обеспечивают

GEL FORM SAFETY AND TOLERABILITY STUDY OF RECOMBINANT HUMAN ANGIOGENIN UNDER TRADE NAME “FARMAGEN” FOR APPLICATION IN HEALTHY VOLUNTEERS

A. E. Gulyayev, Z. T. Shulgau, Sh. D. Sergazy, Z. I. Ashueva, A. A. Tolybekova

Development of the medicament on the basis of human angiogenin is innovative, because at the moment there are no angiogenin medications based drugs in the pharmaceutical market. Pilot batch of the recombinant human angiogenin in gel dosage form for external application was synthesized and certified for clinical trials (original medicament “Farmagen”). First phase clinical trials of “Farmagen” medicament was conducted on 28 healthy volunteers. Results of the first phase clinical trials showed safety for external application and high degree of tolerability of “Farmagen”. Pharmacokinetics of “Farmagen” for external use was investigated and it was found that when applied to an intact skin surface in healthy volunteers the bioavailability of angiogenin is absent.

Keywords: cytokines, angiogenin, clinical study, pharmacokinetics.

питанием и кислородом вновь образованные растущие ткани. АНГ, а также сосудистый эндотелиальный фактор роста, кислотные и основные факторы роста фибробластов, β -трансформирующий фактор роста, фактор некроза опухолей α , тромбоцитарный фактор роста и интерлейкин-8 относятся к числу наиболее мощных ангиогенных цитокинов в ране [10]. Их кооперация при регуляции имеет важнейшее значение для заживления раны [11]. Перспективы прямого и опосредованного использования рекомбинантного АНГ в процессе стимуляции заживления ран и язв оцениваются как достаточно высокие [12]. Хотя в настоящее время биологическая роль АНГ окончательно не ясна, интерес к нему весьма значителен, прежде всего, из-за перспективы создания на его основе эффективных препаратов для лечения ран, язв и ожогов [13–14].

С учетом всех приведенных фактов создание первого оригинального отечественного препарата ангиогенина с ранозаживляющим эффектом является целью данного проекта.

Цель работы – оценка безопасности и переносимости гелевой формы рекомбинантного ангиогенина человека под торговым названием «Фармаген» при наружном применении в рамках 1 фазы клинического исследования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследований явился рекомбинантный ангиогенин человека в гелевой лекарственной форме для наружного применения.

Клиническое исследование безопасности и переносимости гелевой формы рекомбинантного ангиогенина человека «Фармаген» при наружном применении у здоровых добровольцев проводили в республиканском государственном предприятии на праве хозяйственного ведения (РГП на ПХВ) «Научно-исследовательский кожно-венерологический институт» Министерства здравоохранения и социального развития Республики Казахстан (МЗ СР РК), г. Алматы в соответствии с приказом от 28.08.2015 № 694 Комитета контроля медицинской и фармацевтической деятельности МЗ СР РК «О разрешении на проведение клинического исследования лекарственного препарата». Протокол клинического исследования и брошюра исследователя разработаны в соответствии с приказом МЗ СР РК от 19.11.09 № 744 «Об утверждении Правил проведения клинических исследований и (или) испытаний фармакологических и лекарственных средств, изделий медицинского назначения и медицинской техники».

Клиническое исследование препарата «Фармаген» в рамках 1-й фазы стало открытым исследованием, которое проводилось на здоровых добровольцах, общее количество участников исследования – 28 человек. Основные показатели, которые определялись в процессе 1-й фазы клинического исследования препарата «Фармаген» – безопасность и переносимость при наружном применении у здоровых добровольцев. Оценивали безопасность и переносимость гелевой формы рекомбинантного ангиогенина человека при нанесении его однократно в повышающихся дозах у здоровых добровольцев и повторно в течение 10 суток в фиксированной дозе у здоровых добровольцев. Второстепенным показателем, который определяли в процессе исследования, явилась био-

доступность ангиогенина после кожного нанесения препарата «Фармаген» здоровым добровольцам.

Добровольцы клинического исследования препарата «Фармаген» были поделены на следующие группы:

Подгруппа 1а. Однократное нанесение препарата «Фармаген» на кожу наружной поверхности предплечья на поверхности 5×3 см равномерным тонким слоем (до 0,2 граммов геля на 1 см^2), создавая равномерную пленку толщиной до 1,5 мм. Количество субъектов исследования – 7 добровольцев.

Подгруппа 1b. Однократное нанесение препарата «Фармаген» на кожу наружной поверхности предплечья на поверхности 10×3 см равномерным тонким слоем (до 0,2 граммов геля на 1 см^2), создавая равномерную пленку толщиной до 1,5 мм. Количество субъектов исследования – 7 добровольцев.

Подгруппа 1с. Однократное нанесение препарата на кожу наружной поверхности предплечья на поверхности 20×3 см равномерным тонким слоем (до 0,2 граммов геля на 1 см^2), создавая равномерную пленку толщиной до 1,5 мм. Количество субъектов исследования – 7 добровольцев. В данной подгруппе для исследования биодоступности ангиогенина за 30 мин до нанесения исследуемого препарата и после однократного нанесения препарата на кожу наружной поверхности предплечья на поверхности 20×3 см через 30 мин, 60 мин, 3 ч и 6 ч назначены пробы крови (3 мл) из локтевой вены для определения уровня концентрации ангиогенина в сыворотке крови.

2-я группа добровольцев. Повторное нанесение препарата на кожу наружной поверхности предплечья на поверхности 10×3 см равномерным тонким слоем (до 0,2 грамма геля на 1 см^2), 2 раза в сутки (утро – вечер с промежутком 12 ч), создавая равномерную пленку толщиной до 1,5 мм. Курс применения 10 дней. Количество субъектов исследования – 7 добровольцев.

Опытно-промышленная партия препарата «Фармаген» была произведена по опытно-промышленному регламенту получения лекарственного препарата «Фармаген» на основе цитокина «рекомбинантный ангиогенин человека». В основе регламента производства лежат стандартные методы биотехнологического синтеза и получения рекомбинантной субстанции АНГ, полученного из генетически модифицированного штамма продуцента *E.coli* BL21(DE3)/pJZZS-A сорбированного на геле полиэтиленоксида.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На базе филиала РГП «Национальный центр биотехнологии» в г. Степногорск совместно с ООО «Вихревые технологии» получена опытно-промышленная партия препарата ангиогенина в виде геля для наружного применения под названием «Фармаген», сертифицированного в Национальном центре экспертизы лекарственных средств, изделий медицинского назначения и медицинской техники. Имеется заключение Управления фармацевтической экспертизы лекарственных средств для получения разрешения на проведение клинических исследований препарата «Фармаген», гель.

При производстве опытно-промышленной партии были валидированы: установка выращивания микроорганизмов, процесс синтеза рек-ангиогенина, метод определения рек-ангиогенина в препарате «Фармаген», процесс стерилизующей фильтрации и асепти-

Динамика показателей общего анализа крови добровольцев из группы 1а

Изучаемые параметры	Дни исследования		
	1-й	4-й	12-й
Гемоглобин, г/л	144,43 ± 6,48	144,00 ± 6,54, p = 0,964	131,14 ± 3,11, p = 0,090
Эритроциты, 10 ¹² /л	4,77 ± 0,16	4,74 ± 0,22, P = 0,918	4,40 ± 0,09, p=0,059
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	7,57 ± 0,45	6,24 ± 0,38, p = 0,044*	7,04 ± 0,58, p = 0,484
Сегменты, %	71,17 ± 1,34	64,69 ± 3,14, p = 0,082	62,06 ± 3,27, p = 0,024 *
Палочки, %	3,29 ± 0,36	3,43 ± 0,30, p = 0,765	3,57 ± 0,30, p = 0,552
Моноциты, %	4,94 ± 0,38	5,56 ± 0,30, p = 0,232	4,74 ± 0,51, p = 0,760
Эозинофилы, %	2,86 ± 0,26	3,57 ± 0,20, p = 0,051	3,71 ± 0,18, p = 0,020*
Лимфоциты, %	24,03 ± 1,21	29,76 ± 3,05, p = 0,106	32,60 ± 3,08, p = 0,024*

Примечание: p – уровень значимости, достоверными считаются различия, если параметр «p» не превышает 0,05;

* – достоверность различий по сравнению с исходными значениями, измеренными в 1-й день исследования.

Таблица 2

Динамика биохимических показателей крови добровольцев из группы 1а

Изучаемые параметры	Дни исследования		
	1-й	4-й	12-й
АЛТ, мкмоль/(ч х мл)	0,48 ± 0,01	0,47 ± 0,01, p = 0,283	0,45 ± 0,01, p = 0,146
АСТ, мкмоль/(ч х мл)	0,48 ± 0,01	0,48 ± 0,01, p = 0,226	0,46 ± 0,01, p = 0,038*
Общий белок, г/л	68,96 ± 0,63	69,47 ± 0,68, p = 0,713	69,60 ± 0,58, p = 0,467
Глюкоза, моль/л	4,53 ± 0,29	4,58 ± 0,21, p = 0,903	4,51 ± 0,21, p = 0,969
Билирубин общий, мкмоль/л	13,40 ± 0,88	12,77 ± 0,93, p = 0,792	12,87 ± 0,82, p = 0,668
Креатинин, мкмоль/л	72,51 ± 2,58	70,35 ± 2,60, p = 0,729	69,83 ± 2,39, p = 0,459

Примечание: p – уровень значимости, достоверными считаются различия, если параметр «p» не превышает 0,05;

* – достоверность различий по сравнению с исходными значениями, измеренными в 1-й день исследования.

ческого розлива субстанции рек-ангиогенина, определение электрофоретической чистоты препарата «ангиогенин человеческий рекомбинантный, субстанция» методом электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия.

Временный аналитический нормативный документ (ВАНД) разработан в соответствии с требованиями приказа МЗ СР РК от 19 ноября 2009 № 754 «Об утверждении Правил составления, согласования и экспертизы нормативно-технического документа по контролю за качеством и безопасностью лекарственных средств» и в соответствии с требованиями Государственной Фармакопеи (ГФ) РК I издания. В ВАНД приведены спецификация качества, состав, описание препарата, методы идентификации, методы определения специфической активности, требования к упаковке, маркировке, транспортированию, условия хранения.

Все материалы данного клинического испытания были рассмотрены и одобрены Локальной этической комиссией РГП на ПХВ «Научно-исследовательский кожно-венерологический институт» МЗ СР РК (протокол от 2015 № 2). Информированное согласие от всех испытуемых было получено до прохождения испытания.

Для оценки безопасности и переносимости препарата «Фармаген» проводили следующие клинико-лабораторные исследования: гематологические показатели (уровень гемоглобина, эритроцитов, лейкоцитов, лейкоцитарная формула); биохимические показатели

крови (активность АЛТ, АСТ, концентрация общего билирубина, креатинина, общего белка); общий анализ мочи; физикальные методы исследований (ЧСС, артериальное давление, температура тела).

Динамика полученных результатов в 1а подгруппе добровольцев отражена в табл. 1–3.

При анализе данных общего анализа крови (табл. 1) среди добровольцев в группе 1а наблюдалось статистически достоверное снижение уровня лейкоцитов на 4-й день исследования.

Изменения находились в пределах допустимой нормы. Среди субпопуляций лейкоцитов наблюдалось снижение сегментоядерных клеток на 12-й день исследования, однако значения данного показателя находились в пределах допустимой нормы. Наблюдалось статистически значимое повышение уровня эозинофилов на 12-й день исследования, показатели находились в пределах допустимой нормы. Наблюдалось статистически значимое повышение уровня лимфоцитов на 12-й день исследования, показатели также находились в пределах допустимой нормы. В остальных показателях общего анализа крови изменений не выявлено. Все описанные изменения находились в пределах нормальных значений. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии токсического действия препарата «Фармаген» на клеточное звено иммунной системы.

При анализе данных биохимического исследования (табл. 2) добровольцев в группе 1а основные па-

Диагностические критерии добровольцев из группы 1а

Изучаемые параметры	Дни исследования				
	1-й	2-й	3-й	4-й	12-й
Температура тела, °С	36,54 ± 0,03	36,54 ± 0,03 p = 1,000	36,56 ± 0,02 p = 0,698	36,56 ± 0,02 p = 0,698	36,57 ± 0,03 p = 0,502
ЧСС, количество ударов в мин	73,9 ± 0,8	73,4 ± 1,1 p = 0,756	74,6 ± 1,0 p = 0,586	71,3 ± 1,2 p = 0,098	72,9 ± 0,9 p = 0,440
Систолическое артериальное давление, мм рт. ст.	114,3 ± 4,3	114,3 ± 4,3 p = 1,000	114,3 ± 4,3 p = 1,000	114,3 ± 4,3 p = 1,000	114,3 ± 4,3 p = 1,000
Диастолическое артериальное давление, мм рт. ст.	74,3 ± 3,0	74,3 ± 3,0 p = 1,000	74,3 ± 3,0 p = 1,000	74,3 ± 3,0 p = 1,000	75,7 ± 3,2 p = 0,748

Примечание: p – уровень значимости; достоверными считаются различия, если параметр «p» не превышает 0,05.

Таблица 4

Динамика показателей общего анализа крови добровольцев из группы 1b

Изучаемые параметры	Дни исследования		
	1-й	4-й	12-й
Гемоглобин, г/л	140,00 ± 6,71	140,86 ± 6,49, p = 0,928	145,43 ± 7,06, p = 0,587
Эритроциты, 1012/л	4,67 ± 0,18	4,86 ± 0,31, p = 0,613	4,70 ± 0,25, p = 0,917
Лейкоциты, 109/л	6,56 ± 0,43	8,33 ± 0,87, p = 0,094	6,07 ± 0,39, p = 0,419
Сегменты, %	64,64 ± 2,69	72,69 ± 3,03, p = 0,070	64,07 ± 3,02, p = 0,890
Палочки, %	2,14 ± 0,34	2,43 ± 0,30, p = 0,539	2,29 ± 0,36, p = 0,778
Моноциты, %	4,39 ± 0,55	4,76 ± 0,59, p = 0,655	4,54 ± 0,35, p = 0,814
Эозинофилы, %	1,14 ± 0,26	1,71 ± 0,29, p = 0,165	1,57 ± 0,30, p = 0,300
Лимфоциты, %	30,94 ± 2,27	22,56 ± 2,67, p = 0,034*	31,39 ± 2,90, p = 0,906

Примечание: p – уровень значимости; достоверными считаются различия, если параметр «p» не превышает 0,05; * – достоверность различий по сравнению с исходными значениями, измеренными в 1-й день исследования.

параметры не изменялись в течение 12 дней после нанесения исследуемого препарата, при этом все значения биохимических показателей укладываются в границы нормальных значений. Для показателя АСТ можно видеть статистически достоверное снижение на 12-й день исследования ($0,48 \pm 0,01$ и $0,46 \pm 0,01$, $p = 0,038$). Однако данные колебания клинически незначительны и находятся в пределах допустимой нормы для здорового человека. В динамике остальных показателей биохимического исследования крови существенных изменений не выявлено.

Таким образом, согласно данным биохимического мониторинга, препарат «Фармаген» при однократном наружном применении на площади 5×3 см не вызывает изменений основных биохимических параметров в течение 12 дней после его нанесения.

У добровольцев в группе 1а не выявлено изменений и отклонений от нормальных значений при анализе показателей общего анализа мочи по следующим параметрам: удельный вес, цвет, прозрачность, кислотность, содержание белка, лейкоциты, эритроциты, эпителиоциты и бактерии, уробилиноген, кетоновые тела, глюкоза. Фармаген при данной схеме применения не влияет на стандартные характеристики мочи.

Согласно данным ЧСС, АД и температуры тела (табл. 3) среди добровольцев в группе 1а все параметры сохранялись в пределах нормы, а в процессе

12-дневного наблюдения ЧСС, уровень АД и температура тела не отклонялись от нормальных величин. Можно считать, что исследуемый препарат при однократном наружном применении на площади 5×3 см не оказывает существенного влияния на показатели ЧСС, АД и ДД, температуры тела.

Динамика показателей в 1b группе добровольцев (однократное нанесение «Фармагена» на кожу наружной поверхности предплечья площадью 10×3 см) отражена в табл. 4–6.

При анализе данных общего анализа крови (табл. 4) среди добровольцев в группе 1b наблюдалось статистически достоверное снижение лимфоцитов на 4-й день исследования, однако значения данного показателя находились в пределах допустимой нормы и восстановились по отношению к исходному показателю на 12-й день наблюдения. В остальных показателях общего анализа крови изменений не выявлено. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии токсического действия препарата «Фармаген» на клеточное звено иммунной системы.

При анализе данных биохимических показателей (табл. 5) в группе добровольцев 1b наблюдалось статистически достоверное снижение показателя АЛТ ($0,48 \pm 0,01$ и $0,46 \pm 0,01$, $p = 0,040$) и АСТ ($0,49 \pm 0,01$ и $0,46 \pm 0,01$, $p = 0,039$) на 4-й день исследования. Однако данные показатели находились в пределах до-

Динамика биохимических показателей крови добровольцев из группы 1b

Исследуемые параметры	Дни исследования		
	1-й	4-й	12-й
АЛТ, мкмоль/(ч × мл)	0,48 ± 0,01	0,46 ± 0,01 p = 0,040*	0,46 ± 0,01 p = 0,011*
АСТ, мкмоль/(ч × мл)	0,49 ± 0,01	0,46 ± 0,01 p = 0,039*	0,46 ± 0,01 p = 0,014*
Общий белок, г/л	70,57 ± 0,72	70,97 ± 0,75 p = 0,708	71,06 ± 0,68 p = 0,633
Глюкоза, ммоль/л	4,67 ± 0,23	4,67 ± 0,16 p = 1,000	4,61 ± 0,14 p = 0,834
Билирубин общий, мкмоль/л	14,44 ± 0,77	14,07 ± 0,66 p = 0,720	13,06 ± 0,50 p = 0,158
Креатинин, мкмоль/л	70,47 ± 2,12	69,41 ± 1,81 p = 0,711	67,74 ± 1,70 p = 0,335

Примечание: p – уровень значимости; достоверными считаются различия, если параметр «p» не превышает 0,05; * – достоверность различий по сравнению с исходными значениями, измеренными в 1-й день исследования.

Таблица 6

Динамика диагностических критериев добровольцев из группы 1b

Исследуемые параметры	Дни исследования				
	1-й	2-й	3-й	4-й	12-й
Температура тела, °C	36,47 ± 0,03	36,50 ± 0,04 p = 0,594	36,50 ± 0,04 p = 0,55	36,53 ± 0,05 p = 0,322	36,50 ± 0,04 p = 0,558
ЧСС, количество ударов в мин	75,71 ± 2,24	75,14 ± 1,74 p = 0,844	74,00 ± 1,45 p = 0,533	75,14 ± 1,74 p = 0,844	75,43 ± 2,13 p = 0,929
Систолическое артериальное давление, мм рт.ст.	112,9 ± 2,9	112,9 ± 2,9 p = 1,000	115,0 ± 1,9 p = 0,543	115,0 ± 1,9 p = 0,543	14,3 ± 2,0 p = 0,690
Диастолическое артериальное давление, мм рт.ст.	74,3 ± 2,0	74,3 ± 2,0 p = 1,000	74,3 ± 2,0 p = 1,000	74,3 ± 2,0 p = 1,000	74,3 ± 2,0 p = 1,000

Примечание: p – уровень значимости, достоверными считаются различия, если параметр p не превышает 0,05.

пустимой нормы. В динамике остальных показателей биохимического исследования крови существенных изменений не выявлено.

У добровольцев в группе 1b не выявлено изменений и отклонений от нормальных значений при анализе показателей общего анализа мочи по следующим параметрам: цвет, прозрачность, кислотность, содержание белка, лейкоциты, эритроциты, эпителиоциты и бактерии, уробилиноген, кетоновые тела, глюкоза. В общем анализе мочи отмечено лишь статистически значимое повышение удельного веса мочи на 4-й день исследования ($1007,86 \pm 1,01$ и $1016,43 \pm 1,43$, $p = 0,00037$), однако данные показатели находились в пределах допустимой нормы. Других существенных изменений не выявлено. «Фармаген» при наружном применении у добровольцев в группе 1b не влияет на показатели анализа мочи у здоровых добровольцев.

При анализе данных ЧСС, АД и температуры тела (табл. 6) у добровольцев, получивших гель «Фармаген» наружно на кожу предплечья площадью 10×3 см, никаких существенных изменений не выявлено. Можно утверждать, что «Фармаген» при однократном наружном применении на площади 10×3 см не влияет на ЧСС, АД и температуру тела.

Динамика результатов в группе добровольцев 1с (однократное нанесение препарата «Фармаген» на

кожу наружной поверхности предплечья площадью 20×3 см) отражена в табл. 7–9.

Из табл. 7 видно, что у добровольцев, получавших «Фармаген» однократно наружно на кожу предплечья площадью 20×3 см, отмечено достоверное снижение гемоглобина на 4-й день исследования ($157,29 \pm 5,98$ и $138,86 \pm 2,96$, $p = 0,017$). Следует отметить, что данные показатели находятся в пределах нормальных значений, и к 12-му дню наблюдения уровень гемоглобина не отличался от исходных значений. Можно утверждать, что исследуемый препарат не оказывает существенного влияния на уровень гемоглобина добровольцев. Наблюдалось достоверное снижение уровня эритроцитов на 4-й день исследования ($5,16 \pm 0,19$ и $4,53 \pm 0,09$, $p = 0,011$). Следует отметить, что данные показатели находятся в пределах нормальных значений, и уровень числа эритроцитов в последующем на 12-й день исследования достоверно не отличался от исходных значений. Можно считать, что данная схема применения препарата «Фармаген» не оказывает существенного влияния на уровень эритроцитов. Выявлено статистически достоверное снижение лейкоцитов на 4-й день исследования ($9,73 \pm 0,97$ и $6,06 \pm 0,38$, $p = 0,004$) и на 12-й день исследования ($9,73 \pm 0,97$ и $6,33 \pm 0,33$, $p = 0,006$). Однако данные показатели находятся в пределах допустимой нормы. На остальные

Таблица 7

Динамика показателей общего анализа крови добровольцев из группы 1с

Изучаемые параметры	Дни исследования		
	1-й	4-й	12-й
Гемоглобин, г/л	157,29 ± 5,98	138,86 ± 2,96, p = 0,017*	122,57 ± 18,29, p = 0,096
Эритроциты, 10 ¹² /л	5,16 ± 0,19	4,53 ± 0,09, p = 0,011*	4,79 ± 0,14, p = 0,135
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	9,73 ± 0,97	6,06 ± 0,38, p = 0,004*	6,33 ± 0,33, p = 0,006*
Сегменты, %	66,26 ± 3,76	61,43 ± 3,10, p = 0,341	58,43 ± 3,68, p = 0,162
Палочки, %	2,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00, p = 1,000	2,29 ± 0,36, p = 0,442
Моноциты, %	3,91 ± 0,48	4,43 ± 0,37, p = 0,410	4,29 ± 0,18, p = 0,481
Эозинофилы, %	1,57 ± 0,20	1,43 ± 0,20, p = 0,626	1,43 ± 0,20, p = 0,626
Лимфоциты, %	29,83 ± 3,38	30,86 ± 2,72, p = 0,817	32,70 ± 3,05, p = 0,540

Примечание: p – уровень значимости; достоверными считаются различия, если параметр «p» не превышает 0,05;
* – достоверность различий по сравнению с исходными значениями, измеренными в 1-й день исследования.

Таблица 8

Динамика биохимических показателей крови добровольцев из группы 1с

Изучаемые параметры	Дни исследования		
	1-й	4-й	12-й
АЛТ, мкмоль/(ч × мл)	0,45 ± 0,01	0,42 ± 0,01, p = 0,154	0,41 ± 0,01, p = 0,019*
АСТ, мкмоль/(ч × мл)	0,44 ± 0,01	0,42 ± 0,01, p = 0,082	0,40 ± 0,01, p = 0,008*
Общий белок, г/л	74,96 ± 0,95	75,23 ± 0,97, p = 0,845	75,43 ± 0,92, p = 0,729
Глюкоза, ммоль/л	4,74 ± 0,13	4,60 ± 0,21, p = 0,573	4,71 ± 0,09, p = 0,857
Билирубин общий, мкмоль/л	13,20 ± 1,02	12,44 ± 0,82, p = 0,575	12,07 ± 0,75, p = 0,390
Креатинин, мкмоль/л	71,10 ± 1,65	68,99 ± 1,21, p = 0,321	68,19 ± 1,08, p = 0,165

Примечание: p – уровень значимости; достоверными считаются различия, если параметр p не превышает 0,05;
* – достоверность различий по сравнению с исходными значениями, измеренными в 1-й день исследования.

Таблица 9

Диагностические критерии добровольцев из группы 1с

Изучаемые параметры	Дни исследования				
	1-й	2-й	3-й	4-й	12-й
Температура тела, °C	36,50 ± 0,03	36,44 ± 0,03 p = 0,207	36,50 ± 0,04 p = 1,000	36,53 ± 0,05 p = 0,623	36,50 ± 0,04 p = 1,000
ЧСС, количество ударов в мин	73,71 ± 0,81	76,57 ± 1,36 p = 0,096	74,00 ± 1,45 p = 0,866	75,14 ± 1,74 p = 0,470	75,43 ± 2,13 p = 0,465
Систолическое артериальное давление, мм рт. ст.	115,7 ± 2,0	115,7 ± 2,0 p = 1,000	115,0 ± 1,9 p = 0,801	115,0 ± 1,9 p = 0,801	114,3 ± 2,0 p = 0,626
Диастолическое артериальное давление, мм рт. ст.	75,7 ± 2,0	75,7 ± 2,0 p = 1,000	74,3 ± 2,0 p = 0,626	74,3 ± 2,0 p = 0,626	74,3 ± 2,0 p = 0,626

Примечание: p – уровень значимости, достоверными считаются различия, если параметр «p» не превышает 0,05.

параметры общего анализа крови «Фармаген» в группе добровольцев 1с не оказывает существенного влияния на уровень субпопуляций лейкоцитов здорового человека.

По данным биохимического анализа (табл. 8) в группе добровольцев 1с установлено статистически значимое снижение показателей АЛТ ($0,45 \pm 0,01$ и $0,41 \pm 0,01$, $p = 0,019$) и АСТ ($0,44 \pm 0,01$ и $0,40 \pm 0,01$, $p = 0,008$) на 12-й день исследования. Однако данные показатели находились в пределах допустимой нормы и не имеют клинического значения. В динамике остальных показателей биохимического исследования крови изменений не выявлено.

У добровольцев в группе 1с не выявлено изменений и отклонений от нормальных значений при анализе показателей общего анализа мочи по следующим параметрам: удельный вес, цвет, прозрачность, кис-

лотность, содержание белка, лейкоциты, эритроциты, эпителиоциты и бактерии, уробилиноген, кетоновые тела, глюкоза. «Фармаген» при данной схеме применения не влияет на стандартные характеристики мочи.

Согласно данным ЧСС, АД и температуры тела (табл. 9), среди добровольцев, получавших «Фармаген» наружно на кожу предплечья площадью 20×3 см, никаких существенных изменений параметров в течение 12 дней не выявлено.

Динамика результатов во второй группе добровольцев, которые получали препарат «Фармаген» на кожу в течение 10 суток дважды в сутки на кожу наружной поверхности предплечья на поверхности 10×3 см отражена в табл. 10–12.

При анализе данных общего анализа крови добровольцев из группы 2 (табл. 10) отмечено статистически значимое увеличение числа моноцитов на 12-й день

Общий анализ крови добровольцев из группы 2, получавших препарат «Фармаген» в течение 10 суток дважды в сутки

Изучаемые параметры	Дни исследования			
	1-й	4-й	12-й	21-й
Гемоглобин, г/л	143,29 ± 6,77	139,71 ± 5,63, p = 0,692	141,43 ± 4,70, p = 0,826	141,29 ± 3,84, p = 0,802
Эритроциты, 10 ¹² /л	4,63 ± 0,18	4,52 ± 0,15, p = 0,674	4,66 ± 0,17, p = 0,892	4,83 ± 0,07, p = 0,312
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	7,56 ± 0,35	8,50 ± 0,37, p = 0,089	7,29 ± 0,43, p = 0,631	6,59 ± 0,58, p = 0,174
Сегменты, %	60,76 ± 3,22	67,70 ± 2,96, p = 0,138	67,69 ± 1,74, p = 0,082	63,84 ± 2,52, p = 0,464
Палочки, %	2,29 ± 0,29	2,29 ± 0,29, p = 1,000	2,71 ± 0,47, p = 0,454	2,29 ± 0,29, p = 1,000
Моноциты, %	4,37 ± 0,27	4,63 ± 0,36, p = 0,578	5,77 ± 0,50, p = 0,029*	4,63 ± 0,50, p = 0,656
Эозинофилы, %	1,86 ± 0,34	1,86 ± 0,34, p = 1,000	1,86 ± 0,34, p = 1,000	1,57 ± 0,30, p = 0,539
Лимфоциты, %	34,87 ± 3,03	27,67 ± 2,75, p = 0,104	26,54 ± 1,83, p = 0,037*	31,53 ± 2,57, p = 0,417

Примечание: p – уровень значимости; достоверными считаются различия, если параметр «p» не превышает 0,05; * – достоверность различий по сравнению с исходными значениями, измеренными в 1-й день исследования.

Таблица 11

Биохимический анализ крови добровольцев из группы 2, получавших препарат «Фармаген» в течение 10 суток дважды в сутки

Изучаемые параметры	Дни исследования			
	1 день	4 день	12 день	21 день
АлАТ, мкмоль/(ч × мл)	0,48 ± 0,01	0,45 ± 0,02, p = 0,152	0,45 ± 0,02, p = 0,118	0,44 ± 0,01, p = 0,014*
АсАТ, мкмоль/(ч × мл)	0,48 ± 0,01	0,44 ± 0,01, p = 0,050	0,44 ± 0,01, p = 0,019*	0,42 ± 0,01, p = 0,001
Общий белок, г/л	69,17 ± 0,34	70,30 ± 0,80, p = 0,219	70,26 ± 0,83, p = 0,250	69,64 ± 0,40, p = 0,391
Глюкоза, моль/л	4,41 ± 0,09	4,56 ± 0,09, p = 0,292	4,43 ± 0,09, p = 0,911	4,49 ± 0,05, p = 0,497
Билирубин общий, мкмоль/л	13,79 ± 0,94	12,76 ± 0,78, p = 0,416	13,06 ± 0,91, p = 0,589	12,39 ± 0,68, p = 0,251
Креатинин, мкмоль/л	67,16 ± 1,42	66,66 ± 1,41, p = 0,807	66,67 ± 1,35, p = 0,808	64,31 ± 1,18, p = 0,149

Примечание: p – уровень значимости; достоверными считаются различия, если параметр «p» не превышает 0,05; * – достоверность различий по сравнению с исходными значениями, измеренными в 1-й день исследования.

исследования, которое к 21-му дню исследования возвращается к исходным значениям. Увеличение числа моноцитов на 12-й день исследования не превышает границ нормальных значений для данного показателя. К 12-му дню достоверно снижается число лимфоцитов, которое к 21-му дню исследования возвращается к исходным значениям.

Снижение числа лимфоцитов не превышает границ нормальных значений для данного показателя. Можно утверждать, что исследуемый препарат не оказывает существенного влияния на параметры общего анализа крови добровольцев.

По данным биохимического анализа (табл. 11) в группе добровольцев, получавших «Фармаген» на кожу в течение 10 суток, установлено статистически достоверное снижение показателей АЛТ и АСТ на 12-й и 21-й день исследования. Однако, данные показатели находились в пределах допустимых нормальных значений. В динамике остальных показателей биохимического исследования крови существенных изменений не выявлено. Таким образом, согласно данным биохимического анализа, препарат «Фармаген» при наружном применении в течение 10 суток дважды в сутки не вызывает изменений основных биохимических параметров крови добровольцев.

При анализе показателей общего анализа мочи (удельный вес, цвет, прозрачность, кислотность, содержание белка, лейкоциты, эритроциты, эпителиоциты и бактерии, уробилиноген, кетоновые тела, глюкоза) среди добровольцев группы 2, получавших «Фармаген» на кожу в течение 10 суток дважды в сутки, существенных изменений отмечено не было.

Согласно данным ЧСС, АД и температуры тела (табл. 12), среди добровольцев группы 2, получавших «Фармаген» на кожу в течение 10 суток дважды в сутки, никаких существенных изменений данных параметров в течение 21 дня не выявлено.

В ходе 1-й фазы клинического исследования переносимости и безопасности препарата «Фармаген» побочные явления, случаи серьезных или непредвиденных побочных действий или явлений не зафиксированы. Установлено, что при однократном и повторном использовании для наружного нанесения препарата ангиогенина «Фармаген» каких-либо токсических эффектов не наблюдается. Функциональные показатели (АД, ЧСС, температура тела), гематологические и биохимические показатели в заданном дозовом диапазоне существенно не изменяются.

Таким образом, можно сделать вывод, что гелевая форма рекомбинантного человеческого ангиогенина препарат «Фармаген», при однократном нанесении

Таблица 12

Диагностические критерии добровольцев из группы 2, получавших препарат «Фармаген» в течение 10 суток дважды в сутки

Изучаемые параметры	Дни исследования			
	1-й	4-й	12-й	21-й
Температура тела, °C	36,51 ± 0,03	36,51 ± 0,03 p = 1,000	36,47 ± 0,03 p = 0,290	36,50 ± 0,03 p = 0,730
Частота сердечных сокращений, количество ударов в мин	71,71 ± 0,81	72,00 ± 0,87 p = 0,814	72,86 ± 1,37 p = 0,486	71,86 ± 0,77 p = 0,900
Систолическое артериальное давление, мм рт. ст.	112,86 ± 1,84	112,86 ± 1,84 p = 1,000	112,86 ± 1,84 p = 1,000	112,86 ± 1,84 p = 1,000
Диастолическое артериальное давление, мм рт. ст.	72,86 ± 1,84	72,86 ± 1,84 p = 1,000	72,86 ± 1,84 p = 1,000	72,86 ± 1,84 p = 1,000

Примечание: p – уровень значимости; достоверными считаются различия, если параметр «p» не превышает 0,05.

Таблица 13

Уровень концентрации ангиогенина в сыворотке крови здоровых добровольцев после кожного нанесения препарата «Фармаген»

Исследуемая сыворотка крови добровольцев	Уровень концентрации ангиогенина, нг/мл				
	Фоновое значение	30 мин	60 мин	180 мин	360 мин
№ 1	66,1	142,5	89,1	75,1	83,1
№ 2	160,5	89,7	137,4	89,7	229,6
№ 3	103,4	130,3	97,7	150,1	158,0
№ 4	131,7	165,4	109,4	124,1	109,4
№ 5	128,9	138,1	204,2	161,3	141,0
№ 6	260,6	184,5	-	186,3	157,2
№ 7	348,3	266,4	-	180,9	209,1
Среднее значение и стандартная ошибка среднего, M ± m	153,8 ± 25,8	159,6 ± 21,0	127,6 ± 20,8	138,2 ± 16,4	155,3 ± 19,5
Уровень значимости (p) в сравнении с фоновым показателем		0,800458	0,636058	0,429194	0,944916

Примечание: «-» – в данных образцах крови произошел гемолиз эритроцитов

равномерным тонким слоем (до 0,2 грамма геля на 1 см²) на площади 5 × 3 см, 10 × 3 см, 20 × 3 см и повторном (10-кратное) нанесении на площади 10 × 3 см поверхности предплечья здоровых добровольцев является безопасной и хорошо переносимой.

Результаты оценки биодоступности ангиогенина из препарата «Фармаген» при кожном нанесении здоровым добровольцам. У 7 добровольцев для исследования биодоступности ангиогенина за 30 мин до нанесения исследуемого препарата и после однократного нанесения препарата на кожу наружной поверхности предплечья на поверхности 20 × 3 см через 30 мин, 60 мин, 3 ч, 6 ч были отобраны пробы крови (3 мл) из локтевой вены, и в сыворотке крови был определен уровень концентрации ангиогенина.

В качестве тест-системы для определения концентрации ангиогенина в сыворотке крови использовали набор «Human Angiogenin ELISA Kit» (Sigma), концентрация ангиогенина определяли методом иммуноферментного анализа в соответствии с инструкцией производителя к данному набору.

Результаты определения концентрации ангиогенина в сыворотке крови здоровых добровольцев представлены в табл. 13.

Динамика концентрации ангиогенина в сыворотке крови добровольцев показана на рис. 1.

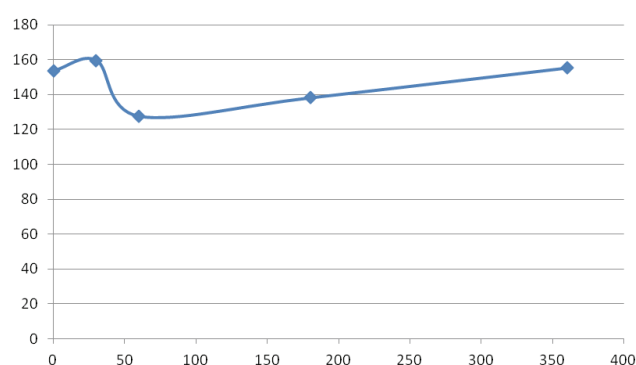


Рис. 1. Фармакокинетическая кривая «концентрация – время» препарата «Фармаген» в сыворотке крови добровольцев при кожном нанесении

Как видно из данных табл. 13 и рис. 1, статистически значимой разницы между средними арифметическими численными значениями, характеризующими фоновый уровень ангиогенина в сыворотке крови здоровых добровольцев и численными значениями, характеризующими уровень ангиогенина в крови после нанесения препарата «Фармаген», установить не удалось. Кожное нанесение препарата «Фармаген» в режиме, предусмотренном протоколом исследования, не меняет исходный, фоновый уровень концентрации эндогенного ангиогенина в сыворотке крови добровольцев. Биодоступность ангиогенина из пре-

парата «Фармаген» при кожном применении не отличается от нуля, что является свидетельством отсутствия значимого всасывания ангиогенина с места нанесения в кровь здоровых добровольцев.

Биодоступность ангиогенина при наружном однократном нанесении препарата Фармаген на площадь 20×3 см не определяется ввиду отсутствия значимого всасывания ангиогенина с места нанесения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Получена и сертифицирована для проведения клинических исследований опытно-промышленная

партия рекомбинантного ангиогенина человека в гелевой лекарственной форме для наружного применения (препарат «Фармаген»). Проведена первая фаза клинических исследований препарата «Фармаген» на 28 здоровых добровольцах, установлена безопасность наружного применения и высокая степень переносимости. Исследована фармакокинетика препарата «Фармаген» при наружном применении, установлено, что при нанесении данного препарата на неповрежденную кожную поверхность у здоровых добровольцев, биодоступность ангиогенина отсутствует.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кетлинский С. А., Симбирцев А. С. Цитокины. СПб.: Фолиант, 2008. 552 с.
2. Decker E. L., Parsons J., Reski R. Glyco-engineering for biopharmaceutical production in moss bioreactors // Front Plant Sci. 2014. Vol. 5. P. 1–7.
3. Nedoszytko B., Sokołowska-Wojdyło M., Ruckemann-Dziurdzińska K., Roszkiewicz J., Nowicki R. J. Chemokines and cytokines network in the pathogenesis of the inflammatory skin diseases: atopic dermatitis, psoriasis and skin mastocytosis // Postepy Dermatol Alergol. 2014. Vol. 31, № 2. P. 84–91.
4. IMS Health. URL: <http://www.imshealth.com> (дата обращения: 01.05.2016).
5. Hu G. F., Riordan J. F., Vallee B. L. A putative angiogenin receptor in angiogenin-responsive human endothelial cells // Proc Natl Acad Sci. U.S.A. 1997. Vol. 94. P. 2204–2209.
6. Komolova G. S., Ionova I. I. Biological functions and therapeutic properties of angiogenins // Eksp Klin Farmakol. 2010. Vol. 73. № 3. P. 40–44.
7. Shu J., Huang M., Tian Q., Shui Q., Zhou Y., Chen J. Downregulation of angiogenin inhibits the growth and induces apoptosis in human bladder cancer cells through regulating AKT/mTOR signaling pathway // J Mol Histol. 2015. Vol. 46. № 2. P. 157–171.
8. Tang C. H., Guo H. L. Progress in angiogenin and therapeutic angiogenesis [Article in Chinese] // Sheng Li KeXue Jin Zhan. 2011. Vol. 42. № 3. P. 210–213.
9. Kurzyk A. Angiogenesis – possibilities, problems and perspectives // Postepy Biochem. 2015. Vol. 61. P. 25–34.
10. Pavlov N., Hatzi E., Bassaglia Y., Frendo J. L., Brion D. E., Badet J. Angiogenin distribution in human term placenta, and expression by cultured trophoblastic cells // Angiogenesis. 2003. Vol. 6. № 4. P. 317–330.
11. Komolova G. S., Ionova I. I. Biological functions and therapeutic properties of angiogenins // Eksp Klin Farmakol. 2010. Vol. 73. № 3. P. 40–44.
12. Anderson P., Ivanov P. tRNA fragments in human health and disease // FEBS Lett. 2014. Vol. 588. № 23. P. 4297–4304.
13. Шестенко О. П., Никонова С. Д., Мертвецов Н. П. Ангиогенин и его роль в ангиогенезе // Молекулярная биология. 2001. Т. 35. 3. С. 349–371.
14. Koob T. J., Lim J. J., Massee M., Zabek N., Rennert R., Gurtner G., Li W. W. Angiogenic properties of dehydrated human amnion/chorion allografts: therapeutic potential for soft tissue repair and regeneration // Vasc Cell. 2014. Vol. 6. P. 1–10.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Гуляев Александр Евгеньевич – д. м. н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории токсикологии и фармакологии РГП «Национальный центр биотехнологии», Казахстан, г. Астана; e-mail: akin@mail.ru.

Шульгау Зарина Токтамысовна – к. м. н., заведующий лабораторией токсикологии и фармакологии РГП «Национальный центр биотехнологии», Казахстан, г. Астана; e-mail: shulgau@biocenter.kz.

Сергазы Шынгыс Даулетханулы – младший научный сотрудник РГП «Национальный центр биотехнологии», Казахстан, г. Астана; e-mail: shyngys.sergazy@nu.edu.kz.

Ашуева Зарина Исахановна – врач-дерматовенеролог РГП на ПХВ «Научно-исследовательский кожно-венерологический институт», Казахстан, г. Алматы; e-mail: kaznikvi@mail.ru.

Толыбекова Алима Алмасовна – к. м. н., ведущий научный сотрудник РГП на ПХВ «Научно-исследовательский кожно-венерологический институт», Казахстан, г. Алматы; e-mail: kaznikvi@mail.ru.

ABOUT THE AUTHORS

Gulyaev Alexander Evgenyevich – Doctor of Science (Medicine), Professor, Leading Researcher, Toxicology and Pharmacology Laboratory, National Centre for Biotechnology, Astana, Kazakhstan; e-mail: akin@mail.ru.

Shulgau Zarina Toktamysovna – PhD (Medicine), Head of Toxicology and Pharmacology Laboratory, National Centre for Biotechnology, Astana, Kazakhstan; e-mail: shulgau@biocenter.kz.

Sergazy Shyngys Dauletghanuly – Junior Researcher, Toxicology and Pharmacology Laboratory, National Centre for Biotechnology, Astana, Kazakhstan; e-mail: shyngys.sergazy@nu.edu.kz.

Ashueva Zarina Isahanovna – Dermatologist, Research Institute of Skin and Venereal Diseases, Almaty, Kazakhstan; e-mail: kaznikvi@mail.ru.

Tolybekova Alima Almasovna – PhD (Medicine), Leading Researcher, Research Institute of Skin and Venereal Diseases, Almaty, Kazakhstan; e-mail: kaznikvi@mail.ru.