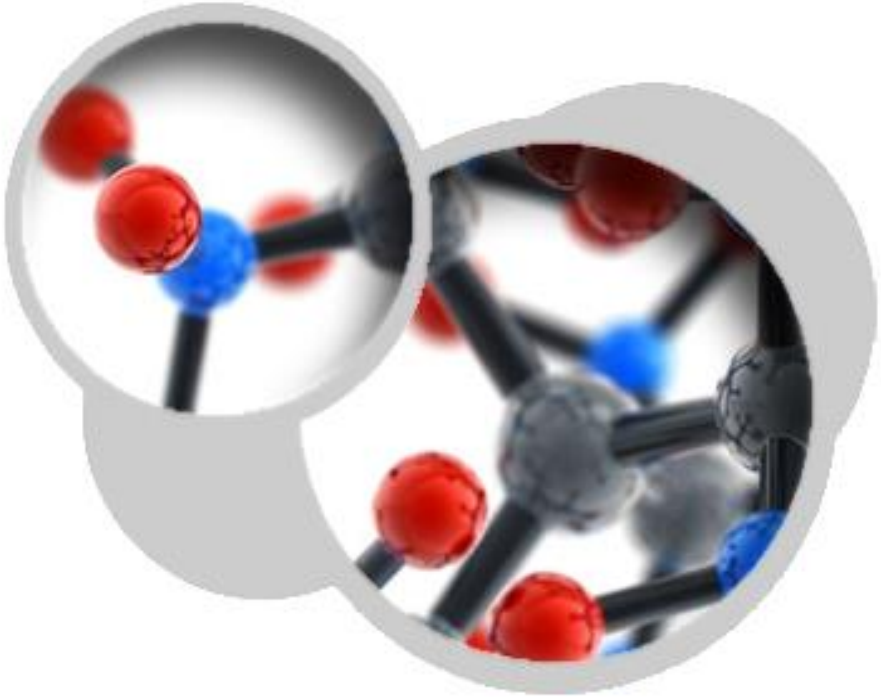
ПАМ

Альянс компетенций



ПАМ-1

противовирусный препарат для предупреждения развития пневмонии, вызванной вирусами гриппа и ОРВИ

Обнинск, 2020

Резюме

ПАМ
Альянс компетенций

- ПАМ-1 препятствует проникновению вируса внутрь эпителиальных клеток, выстилающих поверхности бронхов и легких, соответственно предупреждает развитие вирусной пневмонии.

- Данное свойство препарата обеспечивается:
- - выраженным вирусоспецифическим действием посредством изменения конформации вирусного белка НА (гемагглютинин), ответственного за прикрепление вируса к поверхности эпителиальных клетки и расширение «пор» на ее мембране для проникновению частицы вируса внутрь
- - существенным изменением гибкости и повышением устойчивости мембран эпителиальных клеток за счёт преимущественного распределения и накопления препарата на поверхности этих клеток и взаимодействия с ее белково-липидным слоем
- - созданием специфической иммунной защиты к вирусу гриппа или ОРВИ через доступ защитных клеток организма к расположенному на поверхности клетки вирусу и выработки к нему иммунитета

- Результаты разработки позволяют рекомендовать ПАМ-1 к применению до- и во время вирусной эпидемии, когда есть опасность заражения в результате контакта с вирусоносителями, при появлении первых симптомов простуды, субфебрильной температуры, насморка, при этом практически независимо от вида гриппа и ОРВИ.

- Основная цель применения препарата - предупреждение развития вирусной пневмонии, которая является главным осложнением гриппа и других вирусных инфекций (ОРВИ, включая коронавирусы).

Оглавление

1. Характеристика действующего вещества

2. Исследование механизма действия ПАМ-1

3. Исследования in vitro

4. Исследования in vivo

5. Исследования безопасности

6. Клинические исследования на добровольцах 1 фаза

7. Новая формуляция ПАМ-1

8. Возможности изготовления ПАМ-1 в новой формуляции

1. Характеристика действующего вещества

» Фармацевтическая субстанция под названием ПАМ-1 внесена в **Государственный реестр лекарственных средств** *(номер реестровой записи ФС-000175 от 28.09.2011)*

» Стандартный образец ПАМ-1а зарегистрирован

» Получено **7 патентов (EA,US,RU и др.)**.

» Подана заявка на патент

2. Исследование механизма действия

ПАМ
Альянс компетенций

» **Задачи исследования:**

» Провести молекулярный докинг ПАМ-1 в активный центр гемагглютинина - поверхностного белка вируса.

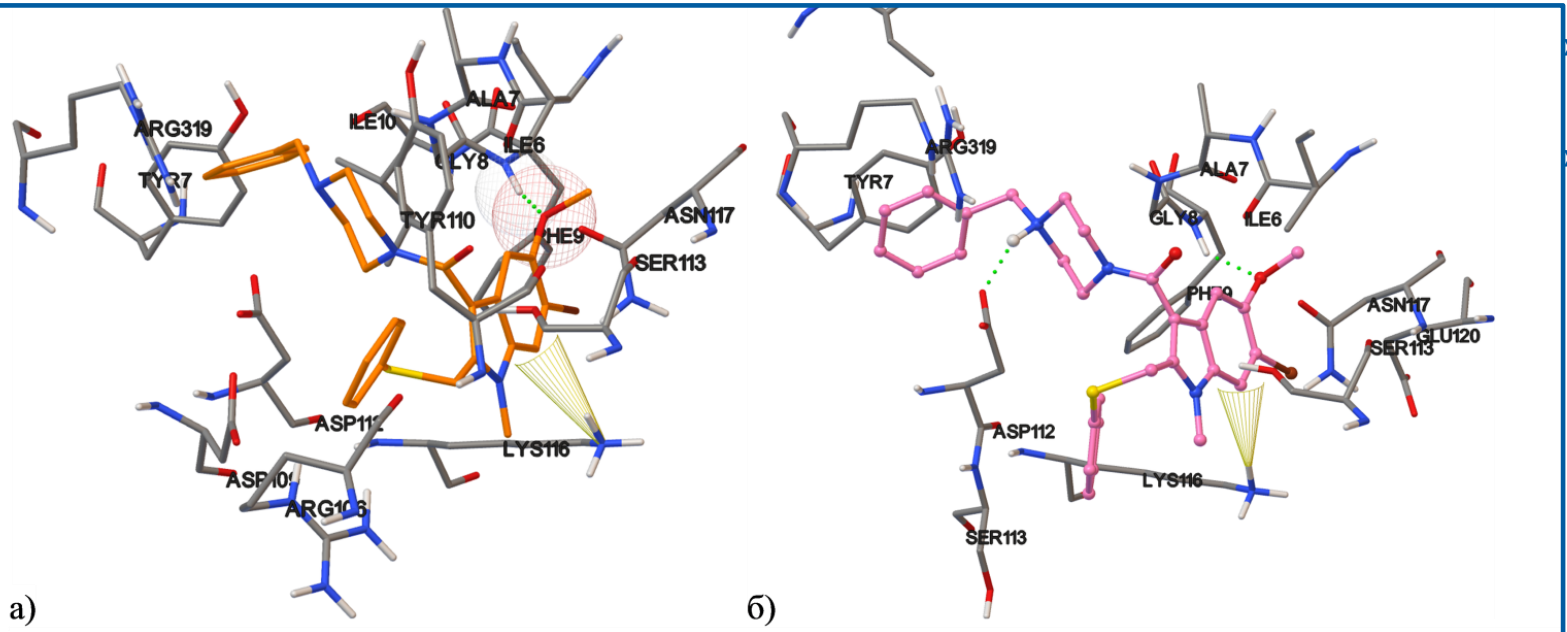
» Изучить влияние ПАМ-1 на механические свойства липидных мембран в модели липидных нанотрубок. Исследование механизма действия противовирусного препарата ПАМ-1,

» **Выводы**:

» Биомишенью ПАМ-1 является поверхностный белок вируса гриппа гемагглютинин (HA) с энергией образования комплекса ПАМ1/HA 6.27 ккал/моль

» ПАМ-1 встраивается в бислойную липидную мембрану и приводит к значительному (в 3 раза) уменьшению изгибной жесткости последней. Это обеспечивает локальные топологические перестройки мембран эпителиальных клеток.

2.1 Исследование механизма действия . Докинг ингибиторов в активный центр гемагглютинина



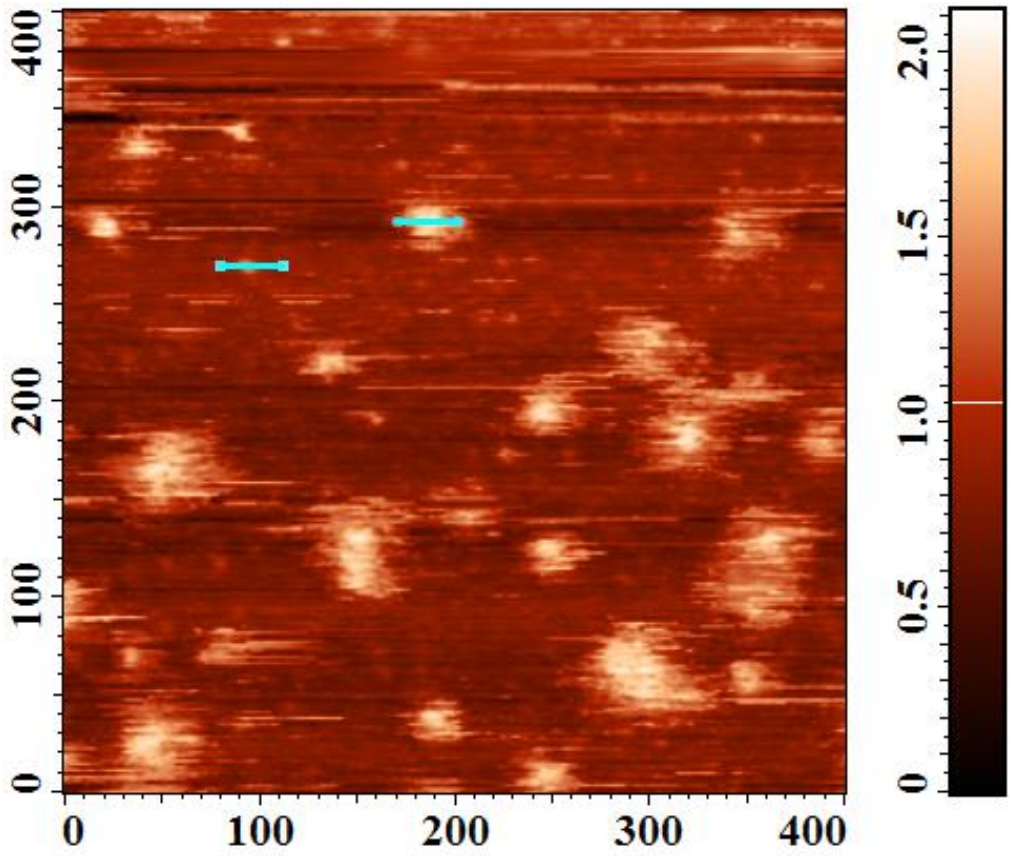
Способы связывания ПАМ-1 в нейтральной (а) и протонированной (б) формах, характеризующиеся наличием взаимодействий индольного фрагмента с Phe9 и Lys116. Водородные связи и солевые мостики помечены зелёными шарами, π-катионные взаимодействия — жёлтым конусом.

- Энергии образования комплекса:
- ПАМ-1 /НА 6,27ккал/моль
- Исследования проведены на кафедре органической химии МГУ им. М.В. Ломоносова, руководитель исследования к.х.н. доцент Палюлин В.А.

- Биомишенью является поверхностный белок вируса гриппа гемагглютинин (НА).
- ПАМ -1 взаимодействует с НА, снижая его способность к конформационным изменениям, происходящим при низком pH, и ингибирует процесс слияния оболочки вируса с эндосомной мембраной, препятствуя проникновению вируса в клетки.

2.2 Исследование механизма действия. Изучение мембраностабилизирующих свойств ПАМ-1

В модели липидных нанотрубок показано, что ПАМ-1 встраивается в бислойную липидную мембрану и приводит к значительному (в 3 раза) уменьшению изгибной жесткости последней. Это обеспечивает локальные топологические перестройки мембран эпителиальных клеток, что существенно затрудняет возможность проникать через такую «гибкую» мембрану.



- Изображение адсорбированного из водного раствора на поверхности слюды препарата ПАМ-1. Все шкалы приведены в нм.

- Отчет «Исследование механизма действия противовирусного препарата пам-1», руководитель исследования к.ф.-м.н., доцент Батищев О.В., лаборатория биоэлектрохимии Института физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина Российской академии наук, 2016 г.

3. Исследования in vitro

ПАМ
Альянс компетенций

» **Задачи исследования:**

» Изучить активность ПАМ-1 в отношении эпидемических штаммов вируса гриппа А и В, вируса гриппа птиц H5N1 в клетках культуры ткани MDCK и аллантоисной полости куриных эмбрионов

» **Выводы**:

» Фармацевтическая субстанция ПАМ-1 обладает широким спектром противовирусной активность в отношении различных штаммов вирусов гриппа *A* и *B*.

» ПАМ-1 эффективно подавляет репродукцию различных штаммов вирусов гриппа *A* и *B* человека, включая ремантадин- и озельтамивиррезистентные штаммы вируса гриппа *A*.

» ПАМ-1 подавляет вирусную репродукцию пандемических вирусов гриппа 2009 *H1N1* человека, а также высокопатогенных вирусов гриппа *H5N1* в культуре клеток МДСК.

» ПАМ-1 ингибирует репродукцию штаммов высокопатогенных вирусов гриппа, при этом ингибирование увеличивается с повышением его концентрации и уменьшается с усилением множественности заражения, что свидетельствует о вирусспецифическом характере ингибирования.

3.1. Исследования in vitro

- **Изучение противовирусной активности соединения ПАМ-1 в отношении эпидемических штаммов вируса гриппа А и В, вируса гриппа птиц H5N1 в клетках культуры ткани MDCK**
- **Материалы**:
- Перевиваемые культуры клеток почки эмбрионов собаки MDCK на минимальной среде Игла с добавлением 10% фетальной сыворотки .
- Аллантоисные пулы эпидемических штаммов вирусов гриппа А и В человека, эталонный штамм, подобный свиному A/California/7/2009(H1N1)v и пандемический штамм A/IIV-Moscow/02/2009(H1N1)v.
- Вирусы гриппа птиц
- A/chicken/Moscow/2/07, изолированный от домашней птицы в очаге эпизоотии в Москве, генотип 2.2 HPAI/H5N1;
- A/chicken/Primorje/1/08, изолированный от домашней птицы в очаге эпизоотии в Приморском крае, генотип 2.3.2 HPAI/H5N1;
- В качестве сравнения использовалась фармацевтическая субстанция Умифеновир
- **Методы**:
- Вирусы культивировали в культуре клеток МДСК и/или аллантоисной полости 9-10-дневных куриных эмбрионов (КЭ). Инфекционную и гемагглютинирующую активность вируса определяли согласно методам, рекомендованным ВОЗ.

3.2 Исследования in vitro

- **Влияние соединения ПАМ-1 на репродукцию эпидемических штаммов вируса гриппа А и В в культуре клеток MDCK**
  - Изучена противовирусная активность фармацевтической субстанции ПАМ-1 в отношении эпидемических штаммов вируса гриппа А и В в культуре клеток MDCK методом ИФА.
  - Изучено действие соединения на репродукцию ремантадинрезистентных вирусов гриппа А (RR) (H3N2) А/Москва/38/07 и А/Владивосток/11/08, вируса гриппа В (В/Москва/79/08) в сравнении с фармацевтической субстанцией ремантадин, а также озельтамивиррезистентного (OsR) вируса гриппа А А/Москва/3/08 (H1N1).
  - Во всех опытах в качестве сравнения была использована фармацевтическая субстанция умифеновир, относящегося к тому же химическому классу, как и соединение ПАМ-1.

Вирусы	Ингибирующая концентрация ИК50, (мкг/мл)		
	ПАМ-1	Умифеновир	Ремантадин
А/Новая Каледония/20/99 (H1N1)	5,8	6,0	<5
А/Владивосток/11/08 (H3N2) Ремантадинрезистентный	6,0	4,5	>20
А/Москва/38/07 (H3N2) Ремантадинрезистентный	7,0	8,0	>20
А/Москва/3/08 (H1N1) Озельтамивиррезистентный	6,0	5,5	<5
В/Москва/79/08	6,0	5,5	>20

3.3 Исследования in vitro

» **Влияние соединения ПАМ-1 на репродукцию высокопатогенных вирусов гриппа птиц A/H5N1 в культуре клеток МДСК**

» Для изучения влияния соединения ПАМ-1 на репродукцию вируса гриппа использовали вирусы гриппа A/chicken/Moscow/2/07(генотип 2.2 HPAI/H5N1) и A/chicken/Primorje/1/08(генотип 2.3.2 HPAI/H5N1). В качестве контроля использовали умифеновир.

Вирусы	$ИК_{50}$ (мкг/мл) Множественность заражения			
	0,01 ТЦИД/кл		0,001 ТЦИД/кл	
	Умифеновир	ПАМ-1		ПАМ-1
A/chicken/Moscow/2/07	12,6	18,7	8,5	13,7
A/chicken/Primorje/1/08	12,8	19,9	9,2	14,7

» ПАМ-1 и умифеновир ингибировали репродукцию обоих штаммов высокопатогенного вируса гриппа птиц (A/H5N1), при этом ингибирование увеличивалось с увеличением концентрации препаратов и уменьшалось с увеличением множественности заражения, что свидетельствует о вирусспецифическом характере ингибирования.

» ПАМ-1 эффективно подавляет размножение изученных высокопатогенных штаммов вирусов гриппа птиц A/H5 в культуре клеток МДСК.

4. Исследования in vivo

» **Задачи**:

» Исследовать эффективность ПАМ-1 на модели гриппозной пневмонии мышей

» **Выводы**:

» Установлено, что препарат ПАМ-1 в дозах 20, 30 и 60 мг/кг является эффективным средством для лечения гриппозной пневмонии. Активность имеет дозозависимый характер, увеличиваясь с повышением дозы

» По результатам исследований противовирусной активности ПАМ-1 рекомендован на клинические испытания в качестве противогриппозного средства

4.1 Исследования in vivo

- **Оценка специфической активности ПАМ-1 на модели гриппозной инфекции у мышей (вирус А/Аичи/2/69)**
  - **Материалы**: штамм вируса гриппа А/Аичи/2/69 (H3M2) (титр ЭИД50/мл 7-8 lg, адаптированный к лёгким белых мышей
  - Белые беспородные мыши N=10 в группе. 4 группы: 1.контроль без лечения, 2-4 лечение ПАМ-1, дозы, соответственно, 10, 20 и 60 мг/кг в день
  - За животными велось ежедневное наблюдение в течение 16 дней. В первые 5 дней после инфицирования мышей взвешивали каждый день, далее - через день. Химиотерапевтическую активность соединений на модели гриппозной пневмонии мышей оценивали по трем критериям:
  - защита от смертельной вирусной инфекции;
  - увеличение средней продолжительности жизни;
  - уменьшение снижения веса в группах животных, леченных препаратами по сравнению с контрольной группой.
  - Использовали следующие схемы применения соединения ПАМ-1:
  - За 24 часа и 1 час до инфицирования, далее через 8, 24, 48, 72, и 96 часов после заражения.
  - За 24 часа и 1 час до инфицирования, далее через 24, 48, 72, и 96 часов после заражения.
  - За 24 часа и 1 час до инфицирования, через 7 часов после инфицирования, далее 2 раза в день через 8 часов в течение 4 дней.

4.2 Исследования in vivo.

ПАМ
Альянс компетенций

Эффективность соединений на модели гриппозной пневмонии у мышей (вирус А/Аичи/2/69)

	Выживаемость	Смертность (%)	Показатель снижения смертности (%)	Средняя продолжительность жизни(дни)**
Per os (10 мг/кг/день) ПАМ-1	5/10	50	40	10,9
Per os (20 мг/кг/день) ПАМ-1	7/10	30	57	12,8
Per os (60 мг/кг/день) ПАМ-1	8/10	20	61	13,1
Вирусный контроль (10 LD_{50})	3/16	81		8,1

» Соединение ПАМ-1 в дозах 10,20 и 60 мг/кг/ день является эффективным при лечении мышей, инфицированных вирусом А/Аичи/2/69 (H3N2) и имеет дозозависимый характер.

» **Соединение ПАМ-1 можно отнести к ерспективным противогриппозным средствам.**

5. Исследования безопасности на лабораторных животных

ПАМ
Альянс компетенций

- **Задачи**:
- Изучить общетоксические и специфические виды токсичности ПАМ-1 на лабораторных животных

- **Выводы**:
- Установлено, что ПАМ-1 относится к малотоксичным соединениям при однократном его введении
- Показано, что ПАМ-1 при многократном введении животным в течение 3-х месяцев не вызывает их гибели, не влияет негативно на функционирование органов и систем
- ПАМ-1 не обладает аллергизирующими, иммуннотоксическими, мутагенными, канцерогенными, эмбриотоксическими, тератогенными свойствами, репродуктивной токсичностью
- По результатам доклинических токсикологических исследований препарат ПАМ-1 рекомендован на клинические испытания

5.1. Исследования безопасности

- **Доклинические исследования безопасности проведены в полном объёме и в соответствии с требованиями Министерства здравоохранения:**
- ГОСТ Р -53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики» (п. 4.8.1, 4.8.2).
- Приказ Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н. «Об утверждении правил лабораторной практики» (п.48 ч.V).
- ФЗ РФ от 12.04.2010г № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств».
- Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая, Часть вторая – М.:Гриф и К, 2012.

- **Объем исследований:**
- оценка острой токсичности
- оценка подострой, субхронической, хронической токсичности
- оценка аллергизирующего действия
- оценка иммунотоксического действия
- оценка репродуктивной токсичности
- оценка мутагенности
- оценка канцерогенности

5.2 Исследования безопасности

- **Результаты проведенных исследований**
- ПАМ-1 является малотоксичным соединением: LD50 для мышей составляет 9800 мг на 1 кг массы тела и LD50 для крыс - более 6000 мг на 1 кг массы тела; терапевтический индекс для препарата ПАМ-1 превосходит 40.
- Абсолютная биодоступность ПАМ-1 из ГЛФ составила 10,0±2,1%;
- При хроническом введении препарата при патоморфологических и гистологических исследованиях органов и тканей, а также в биохимических и гематологических показателях крови у животных не было выявлено никаких отклонений

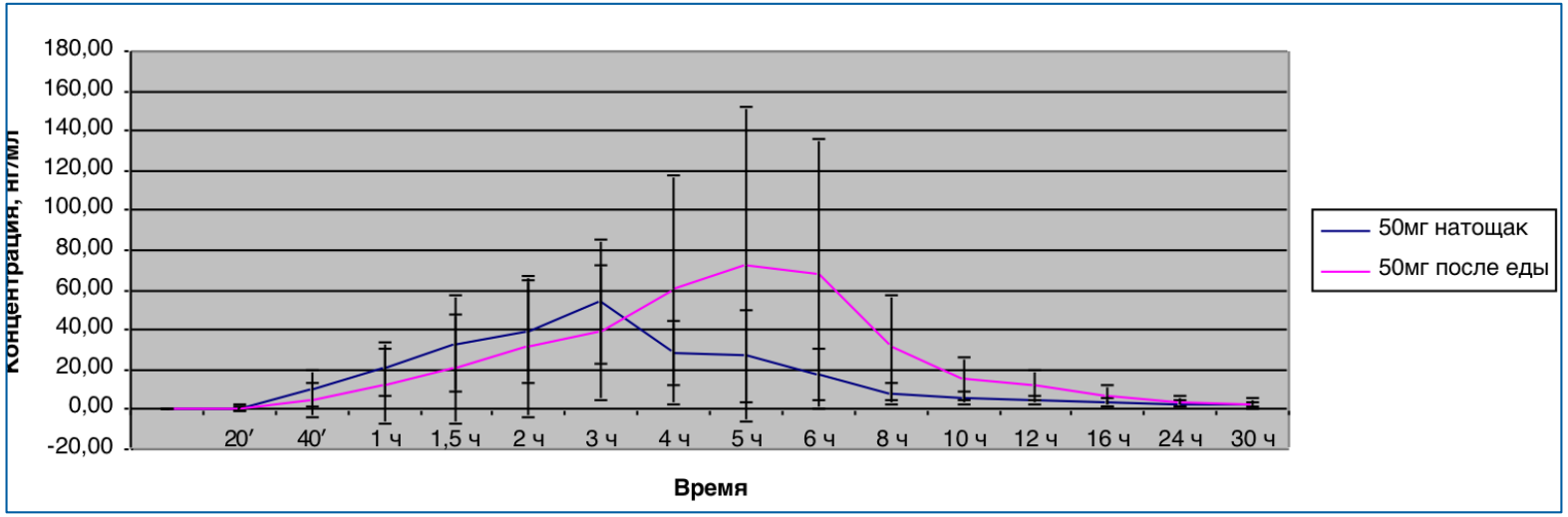
6. Клинические исследования ПАМ-1 на добровольцах, 1 фаза

ПАМ
Альянс компетенций

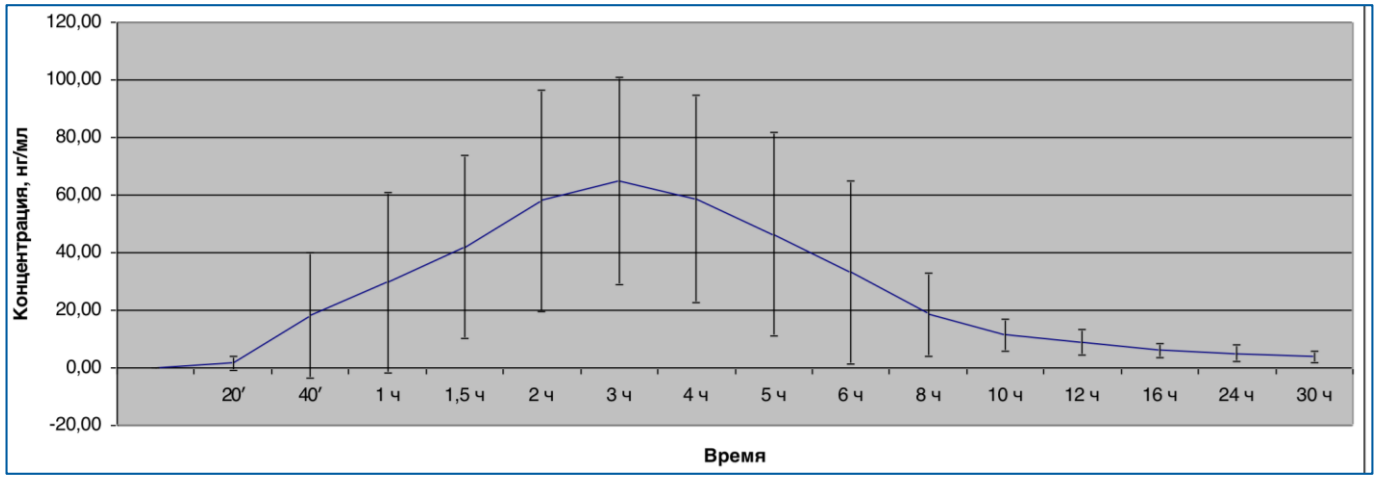
- **Задачи**:
- 1. Изучить безопасность и переносимость при однократном приеме здоровыми добровольцами ПАМ-1 в дозах 50 и 100 мг, а также многократном приеме в дозе 50 мг.
- 2. Оценить параметры фармакокинетики ПАМ-1 после однократного и многократного приема ПАМ-1 , в том числе:
- определение и сравнение фармакокинетических параметров при однократном и многократном приеме;
- определение интраиндивидуальной и интериндивидуальной вариации фармакокинетических параметров;
- определение влияния приема пищи на фармакокинетику ПАМ-1;
- определение величин флуктуации и фактора кумуляции при многократном дозировании;
- выявление наличия гендерных различий в фармакокинетике препарата;
- определение компартментности фармакокинетической модели;

- **Выводы**
- в ходе проведения 1 фазы клинических исследований серьезных нежелательных явлений не выявлено
- Принято решение о создании новой формуляции, которая обеспечит большую биодоступность и накопление препарата в бронхо-легочной системе при фактическом отсутствии побочных явлений

6.1 Клинические исследования ПАМ-1 на добровольцах 1 фаза



50 мг натощак и после еды



100 мг, натощак

» **Открытое нерандомизированное исследование по оценке безопасности, переносимости и фармакокинетики при однократном и многократном приеме препарата здоровыми добровольцами в дозах 50 и 100 мг натощак и после еды.**

6.2 Клинические исследования ПАМ-1 на добровольцах 1 фаза

ПАМ
Альянс компетенций

- **В результате**:
- После завершения 1 фазы клинических исследований, несмотря на отсутствие значимых побочных явлений, нами был выявлен большой разброс фармакокинетических показателей в зависимости от завтрака (при жирном завтраке биодоступность была больше почти на 40%), а также присутствовал ряд нежелательных реакций у части исследуемых добровольцев (временная головная боль, тошнота и др.)

- **Принято решение:**
- О разработке оптимизированной лекарственной формы **новой формуляции**, которая за счет целенаправленной доставки и концентрации активного вещества в бронхо-легочной системе обеспечит эффективное подавление активности вируса и будет служить предупреждение и лечению пневмонии, вызванной вирусом гриппа и ОРВИ, включая коронавирусы

7. Новая формуляция ПАМ-1

ПАМ
Альянс компетенций

- **Задачи**:
- Разработать новую лекарственную форму ПАМ-1 на основе твердых липидных носителей, с улучшенной биодоступностью;
- Достичь целевого распределения в органы мишени (легкие и верхние дыхательные пути) с пролонгированным действием препарата;
- Снизить вероятность развития нежелательных явлений;

- **Выводы**:
- На модели гриппозной пневмонии мышей показана высокая активность новой формуляции ПАМ-1 при дозах в **4 и более раз ниже**, чем использовалась ранее при проведении КИ фаза 1;
- Исследования фармакокинетики новой формуляции ПАМ-1 свидетельствуют о повышении коэффициента тканевой доступности для легких и эпителия трахеи и бронхов **до 6 раз**;
- Новая формуляция ПАМ-1 при использовании может обеспечить максимальное и пролонгированное противовирусное действие в верхних и нижних дыхательных путях.
- **Необходимо проведение клинической апробации новой формуляции для предупреждения развития вирусной пневмонии, в том числе спровоцированной коронавирусом**

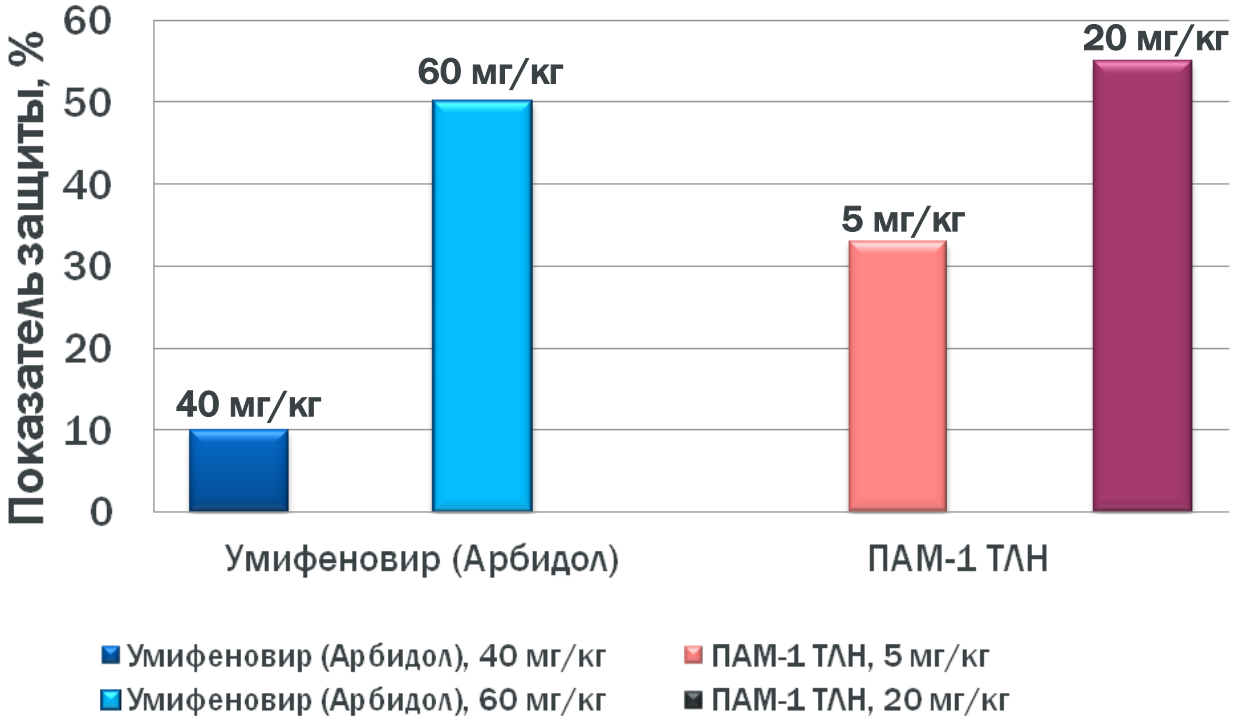
7.1 Характеристика новой формуляции ПАМ-1

ПАМ
Альянс компетенций

- 1 капсула 10 мг содержит:
- Активное вещество: ПАМ-1 - 10 мг
- Вспомогательные вещества
- Капсулы твердые желатиновые: титана диоксид (Е 171), желатин.

- Описание: Для дозировки 10 мг - капсулы твердые желатиновые №0, непрозрачные, корпус и крышечка капсулы белого цвета. Содержимое капсул - порошок от белого до белого с кремоватым оттенком цвета.
- Состав новой формуляции ПАМ-1 приводится в Инструкции по медицинскому применению (**защищен ноу-хау)**

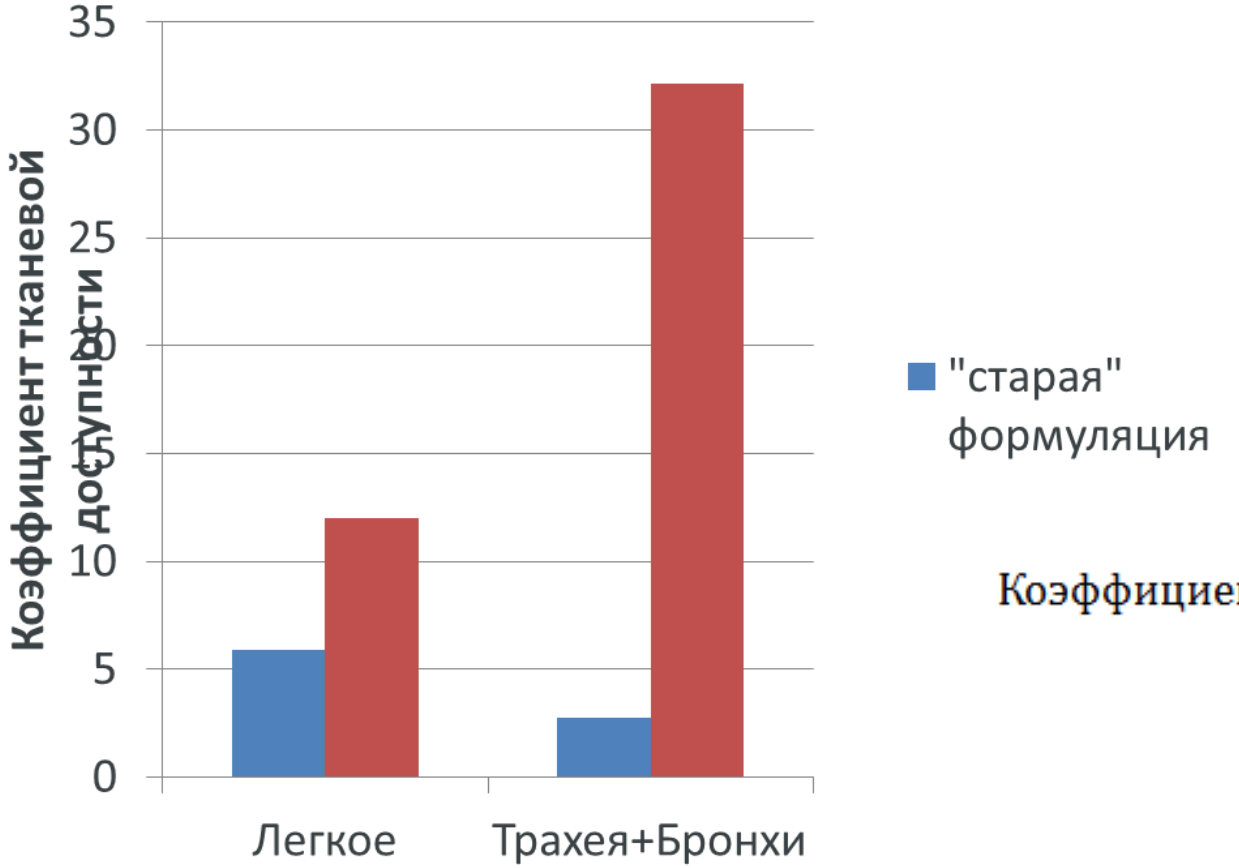
7.2 Изучение эффективности новой формуляции ПАМ-1 на модели гриппозной пневмонии мышей



- Тест-система: мыши, 12-14 г, вирусом гриппа А/Калифорния/04/2009 (H1N1), адаптированный к мышам, доза заражения 10 МЛД50.
- Схемы лечения
- ПАМ-1 в ТЛН (перорально) - за 24 и 1 час до инфекции, далее 1 раз в день в течение 5 дней
- Арбидол (перорально) - за 24 и 1 час до инфекции, далее 1 раз в день в течение 5 дней
- В контроле показатель защиты = 0 %

- По показателю «защита от смертности» ПАМ-1 в ТЛН в дозе 5 мг/кг превышает по активности умифеновир в дозе 40 мг/кг, а ПАМ-1 в дозе 20 мг/кг сопоставим по эффективности с троекратно большей дозой умифеновира (60 мг/кг).
- Исследование проведено в лаборатории экспериментальной вирусологии Научно-исследовательского института вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАН, под руководством д.б.н. Леневой И.А., Москва, 2017.

7.3 Исследование фармакокинетики новой формуляции ПАМ-1



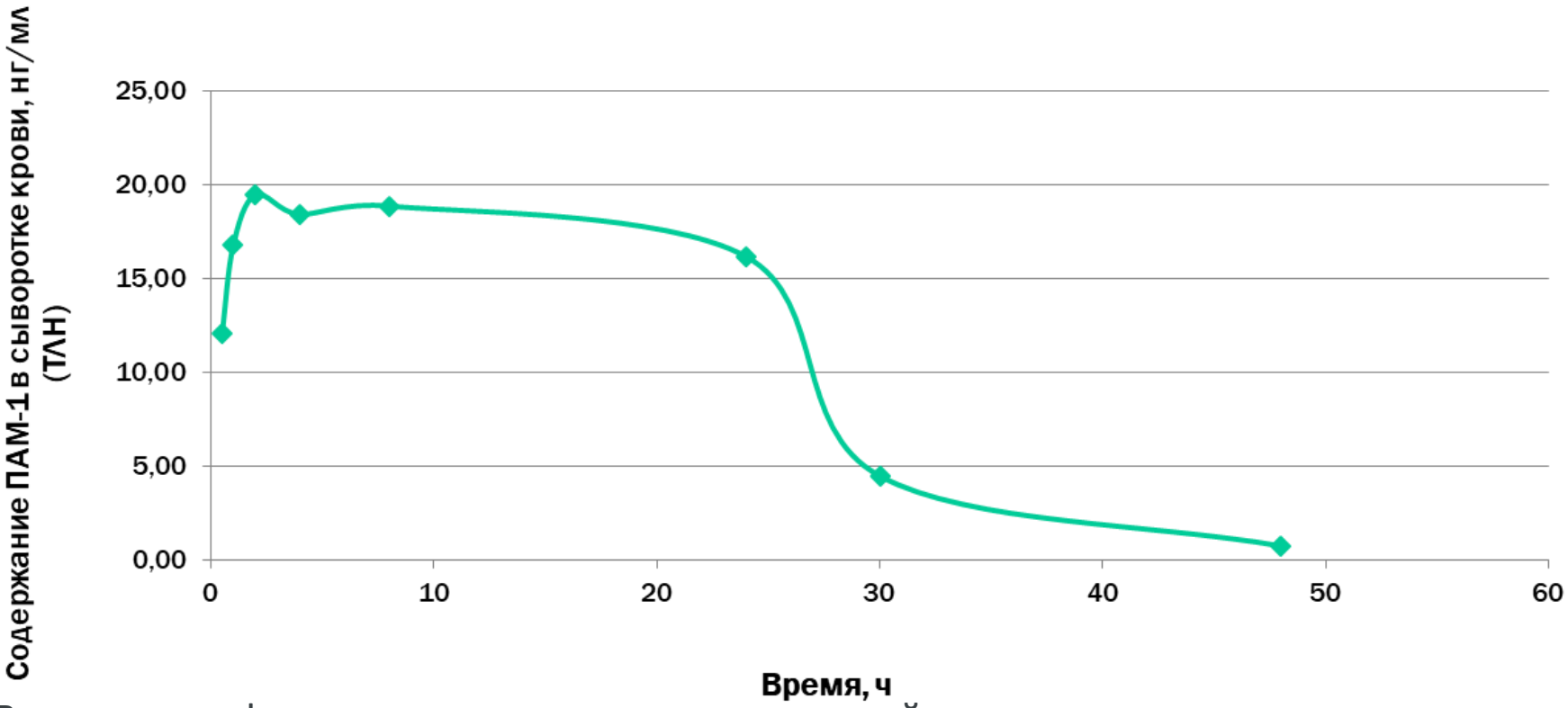
Коэффициент тканевой доступности определялся по формуле:

$$\text{Коэффициент распределения} = \frac{AUC(\text{ткани})}{AUC(\text{сыворотке крови})}$$

В результате фармакокинетических исследований при однократном внутрижелудочном введении крысам ПАМ-1 в виде новой формуляции выявлено значительное увеличение тканевой доступности в сравнении с ранее использованной формой препарата

7.4 Исследование фармакокинетики новой формуляции ПАМ-1

» **Фармакокинетическая кривая концентрации ПАМ-1 в сыворотке крови**



В результате фармакокинетических исследований при однократном внутрижелудочном введении крысам ПАМ-1 в виде новой формуляции выявлен пологий характер накопления и выведения препарата, что позволяет использовать однократное введение его в сутки

7.5. Токсикологические исследования новой формуляции ПАМ-1

ПАМ
Альянс компетенций

- ПАМ-1 в новой формуляции не отличается по показателям безопасности является безопасным и не отличается от фармацевтической субстанции ПАМ-1
- Максимальная введенная доза не вызывающая гибель мышей 25000 мг/кг
- Терапевтический индекс новой формуляции ПАМ-1 существенно выше, чем у применявшегося ранее и чем у умифеновира

«Старая» формуляции	«Новая формуляция»	Умифеновир
160	более 800	67

- **ПАМ-1 в новой формуляции рекомендован на клинические исследования**
- **в качестве безопасного противвирусного средства**

8. Производство ПАМ-1 в новой формуляции

ПАМ
Альянс компетенций

- Аптека производственная (Лицензия № ЛО-40-02-000908 от 30 марта 2017 года) в состоянии в начале апреля готово наработать необходимое количество для пациентов по рецептам и для клинической апробации
- В настоящее время новая формуляция ПАМ-1 изготавливается в малых объемах с полным спектром внутриаптечного контроля (физического, химического, органолептического, письменного, контроля при отпуске)
- Параллельно, в дальнейшем, после завершения всего объема клинических испытаний, можно наладить масштабное производство готовой лекарственной формы препарата.

Серия КЖ-40 004716

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ КАЛУЖСКОЙ ОБЛАСТИ
(наименование лицензирующего органа)

ЛИЦЕНЗИЯ

№ ЛО-40-02-000908 от «30» марта 2017 г.

На осуществление фармацевтической деятельности

Настоящая лицензия предоставлена (указывается полное и (в случае если имеется) сокращенное наименование (в том числе фирменное наименование), организационно-правовая форма юридического лица, фамилия, имя и (в случае если имеется) отчество индивидуального предпринимателя, наименование и реквизиты документа, удостоверяющего личность)

Общество с ограниченной ответственностью «ПАМ-препараты»

ООО «ПАМ-препараты»

Основной государственный регистрационный номер юридического лица (индивидуального предпринимателя) (ОГРН): 1154025000800

Идентификационный номер налогоплательщика: 4025442713

ПАМ

Альянс компетенций

Альянс компетенций «Парк активных молекул»
Инновационная биофармацевтика

Россия, 249031, Калужская область
город Обнинск, Киевское шоссе, дом 3
Тел./факс (484 39) 65 8 79, (495) 956-07-54
e-mail: office@pam-alliance.ru
www. pam-alliance.ru