

## РАЗРАБОТКА ОПТИМАЛЬНЫХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ СХЕМ ВВЕДЕНИЯ ИММОБИЛИЗИРОВАННОГО ИНТЕРФЕРОНА $\alpha$ -2b

Шитикова О.Г.<sup>1</sup>, Шерстобоев Е.Ю.<sup>1</sup>, Масная Н.В.<sup>1</sup>, Данилец М.Г.<sup>1</sup>, Трофимова Е.С.<sup>1</sup>, Лигачева А.А.<sup>1</sup>, Мадонов П.Г.<sup>2</sup>, Киншт Д.Н.<sup>2</sup>, Ершов К.И.<sup>2</sup>, Шилова М.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> НИИ фармакологии им. Е.Д. Гольдберга, г. Томск

<sup>2</sup> ЗАО «Сибирский центр фармакологии и биотехнологии», г. Новосибирск

### РЕЗЮМЕ

В рамках общей программы доклинического изучения проведена разработка оптимальных экспериментальных терапевтических схем введения иммобилизованного интерферона  $\alpha$ -2b (ЗАО «Сибирский центр фармакологии и биотехнологий», Новосибирск). Исследуемый препарат применялся внутривенно курсом в течение 3, 5 и 7 сут в терапевтической дозе ( $1,8 \cdot 10^5$  МЕ/кг). Экспериментальная оценка иммуотропных свойств иммобилизованного интерферона  $\alpha$ -2b проводилась в опытах *in vivo* на аутобредных мышцах-самцах CD1 с использованием следующих тестов: исследование влияния препарата на фагоцитарную активность перитонеальных нейтрофилов (оценивали относительное число фагоцитов и количество поглощенных бактерий одним фагоцитом); изучение влияния препарата на гуморальный иммунный ответ (определяли общее количество спленоцитов, относительное и абсолютное количество антителообразующих клеток и их функциональную активность); оценка влияния исследуемого препарата на клеточный иммунный ответ с использованием реакции гиперчувствительности замедленного типа, индуцированной эритроцитами барана. На основании полученных данных сделан вывод, что наиболее эффективно фагоцитоз нейтрофилов и гуморальный иммунный ответ усиливает курсовое введение терапевтической дозы иммобилизованного интерферона  $\alpha$ -2b в течение 5 сут. Клеточный иммунный ответ (влияние на Т-эффекторы) значительно повышается после семикратного применения исследуемого препарата.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** пегилирование, иммобилизованный интерферон  $\alpha$ -2b, аутобредные мыши, схема введения.

### Введение

В настоящее время препараты интерферона  $\alpha$ -2b широко используются в практике здравоохранения для лечения многих вирусных заболеваний, большого круга онкологических болезней и для профилактики гриппа и ОРЗ [1]. Клиническая значимость интерферонов (ИФН) определяется противовирусной, иммуномодулирующей активностью, а также противоопухолевым эффектом [2–4]. Но, к сожалению, при интерферонотерапии наблюдается ряд нежелательных эффектов. Наиболее частыми являются гриппоподобный синдром, артралгия, диарея, депрессивные состояния, галлюцинации, кожные высыпания, аллергия, заболевания кроветворной системы, выпадение волос, наблюдаемые у больных при применении высоких доз ИФН.

У 30% больных при длительном применении больших доз ИФН образовывались нейтрализующие противовирусную активность препарата антитела, что сопровождалось развитием резистентности к интерферонотерапии [5, 6]. Являясь белками, ИФН легко разрушаются ферментами в желудочно-кишечном тракте и протеазами крови, что снижает их биодоступность. Все это ограничивает применение препаратов ИФН, а при опасных побочных явлениях требует отмены, что приводит к снижению эффективности проводимой терапии, и служит стимулом к разработке новых лекарственных средств [7]. Основная цель при создании препаратов на основе ИФН состоит в получении более безопасного и качественного лекарства с улучшенными физико-химическими и биологическими свойствами.

Современная технология иммобилизации активного белка с полиэтиленгликолем с помощью электронно-лучевого синтеза модифицирует фармакокинетические характеристики соединения, позволяя создавать

✉ Шитикова Ольга Геннадьевна, тел. 8-913-800-23-10; e-mail: Olya.lya@mail.ru

лекарственные препараты с высокой терапевтической активностью и низкой токсичностью [8]. Результатом такой модификации является возрастание биодоступности ИФН, снижение колебаний уровня активного вещества в крови, более длительное сохранение эффективной концентрации в органах-мишенях, что и повышает эффективность интерферонотерапии [9]. Однако проявление того или иного иммуотропного эффекта в существенной мере зависит от дозовых и временных параметров применения препарата. Поэтому задачей данного исследования в рамках общей программы доклинического изучения является разработка оптимальных экспериментальных терапевтических схем введения иммобилизованного интерферона  $\alpha$ -2b.

## Материал и методы

Исследование было проведено на 210 аутбредных мышах-самцах CD1 6–8-недельного возраста с массой тела 19–23 г, полученных из отдела экспериментальных биологических моделей НИИ фармакологии им. Е.Д. Гольдберга (г. Томск) (сертификат имеется). Животные содержались в неполной барьерной системе в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986). Экспериментальные исследования выполнены в соответствии с правилами лабораторной практики (GLP), приказом МЗ РФ № 708н от 23.08.2010 г. «Об утверждении правил лабораторной практики».

В работе использовали иммобилизованный с помощью ионизирующего излучения на полиэтиленгликоле с молекулярной массой 1,5 кДа интерферон  $\alpha$ -2b – конъюгат интерферона  $\alpha$ -2b с низкомолекулярным полиэтиленгликолем (ЗАО «Сибирский центр фармакологии и биотехнологии», Новосибирск). Для конъюгации с полимером использован интерферон  $\alpha$ -2b, получаемый с применением *Escherichia coli* в качестве продуцента. Это кислый гликопротеид молекулярной массой 19 265 Да, состоящий из 165 аминокислотных остатков. Первичная последовательность его идентична нативному интерферону  $\alpha$ -2b, но белок не содержит сайта гликозилирования. Применение полиэтиленгликоля (ПЭГ) в качестве основы позволяет защитить белковую молекулу ИФН от действия протеолитических ферментов и тем самым обеспечивает возможность его перорального применения. Выход готового продукта составляет 98%, активность препарата не менее  $1 \cdot 10^6$  МЕ/мл, молекулярная масса не менее  $(19,5 \pm 0,5)$  кДа.

Исследуемое вещество вводили животным внутривенно курсом в течение 3, 5 и 7 сут в терапевти-

ческой дозе  $1,8 \cdot 10^5$  МЕ/кг, которая была пересчитана, исходя из средней терапевтической дозы интерферона альфа 2 для человека (1 000 000 МЕ), в объеме 10 мл/кг фосфатно-солевого буфера (MP Biomedicals, США), контрольные животные получали в эквивалентном объеме растворитель (фосфатно-солевой буфер). При изучении влияния препарата на фагоцитарную активность перитонеальных нейтрофилов в качестве фона использовали интактных животных соответствующего пола и возраста. При исследовании влияния препарата на гуморальный иммунный ответ и интенсивность реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) в качестве фона использовали мышей, получивших антиген, но без курсового введения фосфатно-солевого буфера.

Фагоцитарная активность перитонеальных нейтрофилов оценивалась через 24 ч после окончания 3-, 5- и 7-дневного курса введения иммобилизованного интерферона  $\alpha$ -2b (имИФН- $\alpha$ -2b) по способности этих клеток поглощать суточную культуру *Staph. aureus*, штамм 209 (получена с кафедры микробиологии СибГМУ), концентрация взвеси микробов 20 млн/мл. Для этого животным вводили внутривенно 3%-й раствор пептона (Sigma, США) и через 2 ч их умерщвляли с помощью хлороформа. Клетки перитонеального экссудата выделяли по общепринятым методикам и доводили до концентрации 1–2 млн/мл по нейтрофилам. Затем в культуру вносили бактерии *Staph. aureus*, опсонизированных цуловой мышью сывороткой. О фагоцитарной функции нейтрофилов судили по проценту нейтрофилов, поглотивших микробы (фагоцитарный индекс – ФИ), и среднему числу стафилококков, поглощенных одной клеткой (фагоцитарное число – ФЧ) [10].

Влияние имИФН- $\alpha$ -2b на гуморальный иммунный ответ оценивали по следующим показателям: общее количество спленоцитов, относительное (%) и абсолютное ( $10^6$ /орган) число антителообразующих клеток (АОК) в селезенке и титр антител в сыворотке крови на 5-е сут после иммунизации эритроцитами барана (ЗАО «ЭКОлаб», Россия). Иммунизацию животных осуществляли внутривенно после окончания 3-, 5- и 7-дневного курса введения имИФН- $\alpha$ -2b минимальной дозой эритроцитов барана (ЭБ) –  $5 \cdot 10^6$  на мышь. Определение АОК осуществляли методом локального гемолиза [11], основанным на способности антиэритроцитарных антител, секретируемых антителообразующими клетками иммунизированных животных, лизировать в присутствии комплемента ЭБ (антиген). Уровень специфических антител, содержащихся в сыворотке крови иммунизированных животных, определяли с помощью реакции гемагглютинации [12]. Титр антител выражали величиной  $\log_2 T$ .

Для оценки влияния препарата на клеточный иммунный ответ использовали реакцию ГЗТ. Для этого мышей подвергали сенсибилизации путем подкожного введения  $1 \cdot 10^7$  ЭБ в объеме 100 мкл после окончания 3-, 5- и 7-дневного курса введения имИФН- $\alpha$ -2b. На 5-й день после сенсибилизации под апоневротическую пластинку одной из задних конечностей вводили разрешающую дозу антигена ( $1 \cdot 10^8$  в объеме 20 мкл). В контралатеральную лапу в качестве контроля вводили физиологический раствор в таком же объеме. Интенсивность реакции оценивали через 24 ч после введения разрешающей дозы антигена. Определяли индекс воспаления (ИВ) по разнице массы опытной (О) и контрольной (К) лап индивидуально для каждого животного по формуле:

$$\text{ИВ} = (O - K) / K \cdot 100\%.$$

При введении по этой схеме препарат в основном оказывает влияние на формирование клона антигенспецифических Т-лимфоцитов [10].

Статистическая обработка результатов осуществлялась с применением пакета статистических программ Statistica 5.0 for Windows с предварительной оценкой нормальности распределения и использованием *t*-критерия Стьюдента. Для выборки подчиняющейся нормальному распределению вычисляли среднее значение величины признака *X* и ошибку средней *m* [13].

## Результаты

Курсовое введение имИФН- $\alpha$ -2b в течение 3, 5 и 7 сут приводило к достоверному повышению относительного количества фагоцитирующих нейтрофилов (ФИ) в перитонеальной полости экспериментальных животных по сравнению с контрольными значениями (табл. 1). Наиболее значимое увеличение доли активных перитонеальных нейтрофилов наблюдалось при применении 7-дневного курса, при этом ФИ был достоверно выше не только относительно показателя в соответствующей группе контроля, но и по сравнению с группой мышей, получивших исследуемый препарат трехкратно, а также с фоновой группой. Среднее количество поглощенных одной клеткой бактерий (ФЧ) увеличивалось по сравнению с контрольными группами у мышей, получавших имИФН- $\alpha$ -2b в течение 3 и 5 сут (табл. 1). В экспериментальной группе с 5-дневным курсовым введением имИФН- $\alpha$ -2b число поглощенных одной клеткой бактерий было статистически значимо выше, чем в группе животных с применением исследуемого препарата трехкратно. У животных с применением имИФН- $\alpha$ -2b более длительным курсом отмечалось статистически значимое снижение фагоцитарной активности (ФЧ) перитонеальных нейтрофилов

по сравнению с группой мышей, получавших изучаемый препарат в течение 5 сут, а также с фоновой группой, хотя относительно показателя в соответствующей контрольной группе достоверных отличий не наблюдалось.

Таблица 1

| Оценка влияния 3-, 5- и 7-дневного курсового введения лекарственного средства на основе иммобилизованного интерферона $\alpha$ -2b в терапевтической дозе ( $1,8 \cdot 10^7$ МЕ/кг) на фагоцитарную активность перитонеальных нейтрофилов аутобредных мышей ( $X \pm m, p$ ) |                                                                               |                                                          |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| Группа экспериментальных животных                                                                                                                                                                                                                                            | Исследуемый показатель                                                        |                                                          |
|                                                                                                                                                                                                                                                                              | ФИ, %                                                                         | ФЧ                                                       |
| Группа 1<br>Фон ( $n = 10$ )                                                                                                                                                                                                                                                 | $20,80 \pm 1,06$                                                              | $2,38 \pm 0,10$                                          |
| Группа 2<br>Контроль 3 сут ( $n = 10$ )                                                                                                                                                                                                                                      | $17,50 \pm 0,95$<br>$p_{1-2} < 0,05$                                          | $1,49 \pm 0,08$<br>$p_{1-2} < 0,05$                      |
| Группа 3<br>имИФН- $\alpha$ -2b 3 сут ( $n = 10$ )                                                                                                                                                                                                                           | $22,60 \pm 1,29$<br>$p_{2-3} < 0,01$                                          | $2,19 \pm 0,12$<br>$p_{2-3} < 0,001$                     |
| Группа 4<br>Контроль 5 сут ( $n = 10$ )                                                                                                                                                                                                                                      | $20,10 \pm 0,85$                                                              | $2,22 \pm 0,08$                                          |
| Группа 5<br>имИФН- $\alpha$ -2b 5 сут ( $n = 10$ )                                                                                                                                                                                                                           | $24,10 \pm 1,50$<br>$p_{4-5} < 0,05$                                          | $2,60 \pm 0,07$<br>$p_{3-5} < 0,01$<br>$p_{4-5} < 0,01$  |
| Группа 6<br>Контроль 7 сут ( $n = 10$ )                                                                                                                                                                                                                                      | $18,10 \pm 1,12$                                                              | $2,02 \pm 0,08$<br>$p_{1-6} < 0,05$                      |
| Группа 7<br>имИФН- $\alpha$ -2b 7 сут ( $n = 10$ )                                                                                                                                                                                                                           | $27,50 \pm 1,11$<br>$p_{1-7} < 0,05$<br>$p_{3-7} < 0,05$<br>$p_{6-7} < 0,001$ | $1,91 \pm 0,07$<br>$p_{1-7} < 0,05$<br>$p_{5-7} < 0,001$ |

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3:  $p_{2-4} < 0,05$  – различия между соответствующими группами достоверны; *n* – количество животных в группе.

В данном исследовании было установлено, что курсовое введение имИФН- $\alpha$ -2b в течение исследуемых сроков не приводило к изменению клеточности селезенки мышей (табл. 2). Однако у мышей, получавших имИФН- $\alpha$ -2b в течение 5 и 7 сут, отмечалось статистически значимое повышение относительного и абсолютного количества антителопродукторов в селезенке по сравнению с соответствующими фоновыми и контрольными значениями (табл. 2). Титр сывороточных иммуноглобулинов М, G и суммарный титр гемагглютининов был выше после 5-дневного курсового применения имИФН- $\alpha$ -2b как по сравнению с контрольной группой с применением растворителя пятикратно, так и с данными фоновой группы (табл. 2).

Применение исследуемого препарата 3-дневным курсом повышало интенсивность реакции ГЗТ лишь по сравнению с фоновой группой мышей (табл. 3). Курсовое введение имИФН- $\alpha$ -2b в течение 5 сут не влияло на клеточный иммунный ответ. При этом ИВ в данной экспериментальной группе статистически значимо снижался относительно показателя в группе мышей, получавших имИФН- $\alpha$ -2b в течение 3 сут.

Оценка влияния 3-, 5- и 7-дневного курсового введения иммобилизованного интерферона  $\alpha$ -2b в терапевтической дозе ( $1,8 \cdot 10^5$  МЕ/кг) на гуморальный иммунный ответ аутобредных мышей на 5-е сут после иммунизации ( $X \pm m, p$ )

| Группа экспериментальных животных                  | Исследуемый показатель |                                                                               |                                                          |                                                                             |                                                         |                                                                              |
|----------------------------------------------------|------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
|                                                    | ОКС, $\cdot 10^6$      | АОК, %                                                                        | АОК, $\cdot 10^6$                                        | IgM, $\log_2 T$                                                             | IgG, $\log_2 T$                                         | IgM + IgG, $\log_2 T$                                                        |
| Группа 1<br>Фон ( $n = 10$ )                       | 219,10 $\pm$ 13,46     | 9,94 $\pm$ 0,35                                                               | 22,45 $\pm$ 1,97                                         | 1,0 $\pm$ 0,21                                                              | 4,80 $\pm$ 0,25                                         | 5,80 $\pm$ 0,36                                                              |
| Группа 2<br>Контроль 3 сут ( $n = 10$ )            | 215,50 $\pm$ 10,75     | 11,22 $\pm$ 0,36<br>$p_{1-2} < 0,05$                                          | 24,32 $\pm$ 1,65                                         | 1,10 $\pm$ 0,23                                                             | 4,90 $\pm$ 0,18                                         | 6,00 $\pm$ 0,37                                                              |
| Группа 3<br>имИФН- $\alpha$ -2b 3 сут ( $n = 10$ ) | 221,30 $\pm$ 11,71     | 12,04 $\pm$ 0,44<br>$p_{1-3} < 0,05$                                          | 26,86 $\pm$ 1,96                                         | 1,20 $\pm$ 0,20                                                             | 5,30 $\pm$ 0,30                                         | 6,50 $\pm$ 0,45                                                              |
| Группа 4<br>Контроль 5 сут ( $n = 10$ )            | 211,50 $\pm$ 10,37     | 11,38 $\pm$ 0,35<br>$p_{1-4} < 0,05$                                          | 24,33 $\pm$ 1,84                                         | 0,90 $\pm$ 0,23                                                             | 4,80 $\pm$ 0,20                                         | 5,70 $\pm$ 0,30                                                              |
| Группа 5<br>имИФН- $\alpha$ -2b 5 сут ( $n = 10$ ) | 237,50 $\pm$ 11,46     | 12,56 $\pm$ 0,32<br>$p_{1-5} < 0,05$<br>$p_{4-5} < 0,05$                      | 30,03 $\pm$ 1,92<br>$p_{1-5} < 0,05$<br>$p_{4-5} < 0,05$ | 2,10 $\pm$ 0,23<br>$p_{1-5} < 0,05$<br>$p_{3-5} < 0,01$<br>$p_{4-5} < 0,01$ | 5,80 $\pm$ 0,20<br>$p_{1-5} < 0,05$<br>$p_{4-5} < 0,01$ | 7,90 $\pm$ 0,38<br>$p_{1-5} < 0,05$<br>$p_{3-5} < 0,05$<br>$p_{4-5} < 0,001$ |
| Группа 6<br>Контроль 7 сут ( $n = 10$ )            | 221,80 $\pm$ 10,44     | 11,68 $\pm$ 0,22<br>$p_{1-6} < 0,05$                                          | 25,98 $\pm$ 1,54                                         | 1,10 $\pm$ 0,18                                                             | 5,0 $\pm$ 0,21                                          | 6,10 $\pm$ 0,35                                                              |
| Группа 7<br>имИФН- $\alpha$ -2b 7 сут ( $n = 10$ ) | 235,40 $\pm$ 12,89     | 13,28 $\pm$ 0,28<br>$p_{1-6} < 0,05$<br>$p_{3-7} < 0,05$<br>$p_{6-7} < 0,001$ | 31,39 $\pm$ 2,02<br>$p_{1-6} < 0,05$<br>$p_{6-7} < 0,05$ | 1,20 $\pm$ 0,20<br>$p_{3-7} < 0,01$                                         | 4,80 $\pm$ 0,25<br>$p_{3-7} < 0,01$                     | 6,0 $\pm$ 0,42<br>$p_{3-7} < 0,01$                                           |

У мышей, получивших имИФН- $\alpha$ -2b в течение 7 сут, наблюдалось максимальное повышение индекса реакции ГЗТ. Исследуемый показатель в данной экспериментальной группе был статистически значимо выше значений в соответствующей контрольной группе, а также фоновой и группе животных с введением имИФН- $\alpha$ -2b в течение 5 сут (табл. 3).

Таблица 3

| Оценка влияния 3-, 5- и 7-дневного курсового введения иммобилизованного интерферона $\alpha$ -2b в терапевтической дозе ( $1,8 \cdot 10^5$ МЕ/кг) на интенсивность реакции ГЗТ аутобредных мышей ( $X \pm m, p$ ) |                                                                               |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| Группа экспериментальных животных                                                                                                                                                                                 | Исследуемый показатель (ИВ)                                                   |
| Группа 1<br>Фон ( $n = 10$ )                                                                                                                                                                                      | 10,13 $\pm$ 1,06                                                              |
| Группа 2<br>Контроль 3 сут ( $n = 10$ )                                                                                                                                                                           | 13,66 $\pm$ 1,40                                                              |
| Группа 3<br>имИФН- $\alpha$ -2b 3 сут ( $n = 10$ )                                                                                                                                                                | 16,70 $\pm$ 1,90<br>$p_{1-3} < 0,05$                                          |
| Группа 4<br>Контроль 5 сут ( $n = 10$ )                                                                                                                                                                           | 11,67 $\pm$ 0,92                                                              |
| Группа 5<br>имИФН- $\alpha$ -2b 5 сут ( $n = 10$ )                                                                                                                                                                | 9,30 $\pm$ 1,15<br>$p_{3-5} < 0,01$                                           |
| Группа 6<br>Контроль 7 сут ( $n = 10$ )                                                                                                                                                                           | 11,80 $\pm$ 1,0                                                               |
| Группа 7<br>имИФН- $\alpha$ -2b 7 сут ( $n = 10$ )                                                                                                                                                                | 18,93 $\pm$ 1,75<br>$p_{1-7} < 0,05$<br>$p_{3-7} < 0,001$<br>$p_{6-7} < 0,01$ |

## Обсуждение

В результате проведенного исследования было установлено, что модифицированная форма имИФН- $\alpha$ -2b

с ПЭГ обладает иммулотропными свойствами. Пегилированная молекула интерферона комплексно влияла на клетки иммунной системы, стимулируя клеточный, гуморальный иммунный ответ мышей линии СВА/СаЛас, а также фагоцитарное звено иммунитета. Важно отметить, что иммулотропная активность имИФН- $\alpha$ -2b наблюдалась при пероральном приеме. Наиболее вероятной причиной эффективности исследуемого имИФН- $\alpha$ -2b является изменение его фармакокинетических свойств при присоединении молекулы ПЭГ. Предположительно, пегилированная молекула ИФН сохраняет биологическую активность в желудочно-кишечном тракте и всасывается в кровь, распределяясь по органам и тканям в отличие от несвязанного ИФН, который легко разрушается протеазами. Несмотря на то что механизм всасывания имИФН- $\alpha$ -2b в желудочно-кишечном тракте до конца не ясен, известно, что при пероральном введении пегилированных препаратов, полученных с помощью электронно-лучевого синтеза, биодоступность составляет 4,3%, что значительно превышает биодоступность нативных белков, которая составляет не более 1% [8]. Пегилированные препараты активно адсорбируются по всей поверхности кишечной ворсинки, в отличие от нативных белков, которые проникают лишь на апикальную поверхность кишечных ворсин. Это указывает на более выраженную биодоступность белка конъюгата с низкомолекулярным ПЭГ [8, 9].

Технология пегилирования значительно улучшает кинетику нативных белковых соединений. Присоединение ПЭГ к рекомбинантному ИФН приводит к уве-

личению размера молекулы, в том числе радиуса Стокса. Увеличенный размер белковой молекулы способствует удлинению адсорбции и периода полувыведения белка из организма, тем самым увеличивая период «эффективной» полужизни активного ИФН [7, 14]. Другим важным фактором удлинения времени активной циркуляции ПЭГ-модифицированных пептидов является структура ПЭГ-цепочек. Известно, что разветвленная молекула ПЭГ замедляет метаболизм препарата. С разветвленной структурой цепочек ПЭГ связана и значительно меньшая иммуногенность модифицированных препаратов при сохранении их основных фармакологических свойств [14, 15].

Еще одна из важнейших особенностей модифицированных ПЭГ-молекул – высокая гидрофильность, формирующаяся за счет способности молекулы ПЭГ связывать молекулы воды [5, 14, 16]. Вероятно, это своеобразное «водное облако» значительно повышает растворимость и биодоступность имИФН- $\alpha$ -2b, а также защищает молекулу от нейтрализующих антител и комплемента [5]. Таким образом, имИФН- $\alpha$ -2b лучше защищен от опсонизации и активного фагоцитоза клетками макроорганизма, что непосредственно дает ему преимущество перед препаратами стандартного ИФН. Кроме того, полагают, что пегилирование вызывает уменьшение иммуногенных и антигенных свойств рекомбинантного ИФН и может снизить риск аллергических реакций [14].

Иммуномодулирующая способность ИФН заключается в контроле взаимодействия клеток, участвующих в иммунном ответе, регулируя экспрессию на мембранах клеток молекул главного комплекса гистосовместимости 1-го типа или в непосредственной активации иммунокомпетентных клеток. ИФН 1-го типа стимулируют функциональную активность макрофагов, естественных киллеров, цитотоксических Т-лимфоцитов, способствуют дифференциации и пролиферации В-лимфоцитов. ИФН принимают активное участие в подготовке и регуляции механизмов специфического иммунного ответа, регулируют баланс Th1 и Th2 [3, 4, 17]. Исходя из полученных результатов, иммунотропная активность ИФН, конъюгированного с ПЭГ и применяемого перорально, не уступает свободному ИФН, вводимому внутримышечно или подкожно [3]. Так, курсовое введение имИФН- $\alpha$ -2b в течение 3, 5 и 7 сут в терапевтической дозе приводило к постепенному повышению фагоцитарной активности нейтрофилов перитонеальной полости экспериментальных животных. Исследуемый препарат, применяемый курсом в течение 5 сут, способствовал симуляции гуморального иммунного ответа мышей за счет повышения количества АОК в селезенке, титра специфических антител

в сыворотке крови. Клеточный иммунный ответ (влияние на Т-эффекторы) значительно повышался после 7-кратного применения пегилированного препарата. Это может свидетельствовать о сохраненной структуре нативного ИФН в процессе электронно-лучевого пегилирования. ПЭГ может быть связан с протеином в нескольких позициях, однако известно, что соединение с белком в месте атома азота Е-аминогруппы лизина или в месте имидазольной группы гистидина улучшает противовирусную активность интерферона  $\alpha$ -2b [14]. Также известно, что рецепторсвязывающая и противовирусная активности интерферона  $\alpha$ -2b локализованы в N-концевой части молекулы, а антипролиферативная активность в C-концевой последовательности полипептидной цепи [3]. Вероятно, технология электронно-лучевого синтеза модифицирует фармакокинетические характеристики интерферона  $\alpha$ -2b, не изменяя конформационную структуру белка, а иммобилизованные участки ПЭГ не влияют на связывания ИФН с его рецепторами.

Таким образом, современная технология пегилирования с помощью физического способа связывания позволяет улучшить ряд фармакодинамических и фармакокинетических свойств рекомбинантного интерферона  $\alpha$ -2b, что дает возможность значительно расширить область применения препарата в практической медицине.

## Заключение

Экспериментальное исследование показало, что наиболее эффективно фагоцитоз нейтрофилов (относительное число фагоцитов и количество поглощенных бактерий одним фагоцитом) и гуморальный иммунный ответ (количество антителопродуцентов и их функциональная активность) усиливает курсовое введение терапевтической дозы иммобилизованного на полиэтиленгликоле с помощью физического способа связывания интерферона  $\alpha$ -2b в течение 5 сут. Клеточный иммунный ответ (влияние на Т-эффекторы) значительно повышается после 7-кратного применения исследуемого препарата. Полученные данные свидетельствуют о перспективности энтерального способа назначения иммобилизованного интерферона  $\alpha$ -2b с помощью электронно-лучевого синтеза, альтернативного парентеральному применению.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках Федеральной целевой программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 г. и дальнейшую перспективу» (государственный контракт № 16.N08.12.1017 от 14.05.12).*

## Литература

1. Наровлянский А.Н., Ершов Ф.И., Гинцбург А.А. Интерфероны: перспективные направления исследований // Иммунология. 2013. № 3. С. 168–172
2. Caraglia M., Marra M., Pelaia G., Maselli R., Caputi M., Marsico S.A., Abbruzzese A. Alpha-interferon and its effects on signal transduction pathways // Journal of Cellular Physiology. 2005. V. 202. P. 323–335.
3. Ершов Ф.И., Киселев О.И. Интерфероны и их индукторы (от молекул до лекарств). М.: ГЭОТАР-МЕД, 2005. 368 с.
4. Goodbourn S., Didcock L., Randall R.E. Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures // Journal of General Virology. 2000. V. 81, № 10. P. 2341–2364.
5. Карабельский А.В., Падкина М.В. Рекомбинантные интерфероны-альфа человека пролонгированного действия // Вестник СПбГУ. 2007. Сер. 3. Вып. 4. С. 45–53.
6. Fried M.W. Side effects of therapy of hepatitis C and their management // Hepatology. 2002. V. 36. P. 237–244.
7. Grace M., Cutler D. Pegylating IFNs at His-34 improves the in vitro antiviral activity through the JAK/STAT pathway // Antiviral Chemistry & Chemotherapy. 2004. V. 15, № 6. P. 287–297.
8. Мадонов П.Г., Ершов К.И., Дубровин А.В., Мирошников П.Н., Шилова М.А., Киншт Д.Н. Электронно-лучевая модификация препаратов белковой природы для улучшения их фармакологических свойств // Медицина и образование. 2013. № 4. URL: [http://ngmu.ru/cozo/mos/article/text\\_full.php?id=1115](http://ngmu.ru/cozo/mos/article/text_full.php?id=1115)
9. Нанотехнологии в фармакологии / А.М. Дыгай, А.В. Артамонов, А.А. Бекарев, В.В. Жданов, Г.Н. Зюзьков, П.Г. Мадонов, В.В. Удуг. М.: Изд-во РАМН, 2011. 136 с.
10. Хабриев Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: Медицина, 2005. 832 с.
11. Cunningham A.I. A method of increased sensitivity for detecting single antibody-forming cells // Nature. 1965. V. 207, № 5001. P. 1106–1107.
12. Гемагглютинация и реакции антителозависимого гемолиза. Антитела. Методы / под ред. Д. Кэтти. М.: Мир, 1991. 328 с.
13. Трухачева Н.В. Математическая статистика в медико-биологических исследованиях с применением пакета Statistica. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. 384 с.
14. Grace M., Cutler D., Bordens R. Пегилированные интерфероны при хроническом гепатите С. // Рецепт: научно-практический журнал для фармацевтов и врачей. 2006. № 6. С. 118–128.
15. Foster G.R. Pegylated interferons for the treatment of chronic hepatitis C: pharmacological and clinical differences between peginterferon- $\alpha$ -2a and peginterferon- $\alpha$ -2b // Drugs. 2010. V. 70, № 2. P. 147–165.
16. Thomas T., Foster G. Nanomedicines in The Treatment of Chronic Hepatitis C—Focus on Pegylated Interferon alpha-2a // Int. J. Nanomedicine. 2007. V. 2, № 1. P. 19–24.
17. Goodbourn S., Didcock L., Randall R.E. Interferons: Cell signalling, immune modulation, antiviral responses and virus countermeasures // J. Gen. Virol. 2000. V. 81. P. 2341–2364.

Поступила в редакцию 02.06.2014 г.

Утверждена к печати 09.10.2014 г.

Шитикова О.Г. (✉) — аспирант, лаборатория иммунофармакологии, НИИ фармакологии им. Е.Д. Гольдберга (г. Томск).

Шерстобоев Е.Ю. — д-р мед. наук, лаборатория иммунофармакологии, НИИ фармакологии им. Е.Д. Гольдберга (г. Томск).

Масная Н.В. — д-р мед. наук, лаборатория иммунофармакологии, НИИ фармакологии им. Е.Д. Гольдберга (г. Томск).

Данилец М.Г. — д-р биол. наук, лаборатория иммунофармакологии, НИИ фармакологии им. Е.Д. Гольдберга (г. Томск).

Трофимова Е.С. — канд. мед. наук, лаборатория иммунофармакологии, НИИ фармакологии им. Е.Д. Гольдберга (г. Томск).

Лигачева А.А. — канд. биол. наук, лаборатория иммунофармакологии, НИИ фармакологии им. Е.Д. Гольдберга (г. Томск).

Мадонов П.Г. — д-р мед. наук, Сибирский центр фармакологии и биотехнологии (г. Новосибирск).

Киншт Д.Н. — канд. мед. наук, Сибирский центр фармакологии и биотехнологии (г. Новосибирск).

Ершов К.И. — канд. биол. наук, Сибирский центр фармакологии и биотехнологии (г. Новосибирск).

Шилова М.А., Сибирский центр фармакологии и биотехнологии (г. Новосибирск).

✉ Шитикова Ольга Геннадьевна, тел. 8-913-800-23-10; e-mail: Olya.lya@mail.ru

## AZVANIA DEVELOPMENT OF OPTIMAL EXPERIMENTAL THERAPEUTIC REGIMENS ADMINISTRATION OF IMMOBILIZED INTERFERON $\alpha$ -2b

Shitikova O.G.<sup>1</sup>, Sherstoboev E.Yu.<sup>1</sup>, Masnaya N.V.<sup>1</sup>, Danilets M.G.<sup>1</sup>, Trofimova E.S.<sup>1</sup>,  
Ligacheva A.A.<sup>1</sup>, Madonov P.G.<sup>2</sup>, Kinsht D.N.<sup>2</sup>, Ershov K.I.<sup>2</sup>, Shilova M.A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ye.D. Goldberg Research Institute of Pharmacology, Tomsk, Russian Federation

<sup>2</sup>Siberian Center for Pharmacology and Biotechnology, Novosibirsk, Russian Federation

### ABSTRACT

The development of optimal experimental therapeutic schemes of immobilized interferon  $\alpha$ -2b (production of JSC «Siberian Center for Pharmacology and Biotechnology», Novosibirsk) administration was conducted in the frame of the common program of pre-clinical study. The drug being studied was administered intragastrically for 3, 5 and 7 days in the therapeutic dose ( $1.8 \cdot 10^3$  IU/kg). Experimental evaluation of immunotropic properties of immobilized interferon  $\alpha$ -2b was carried out at *in vivo* experiments in outbred CD1 male mice with using of following tests: the study of drug effect on the phagocytic activity of peritoneal leukocytes (the relative number of phagocytes and the number of bacteria which were assimilated by phagocytes were assessed); the study of drug effect on the humoral immune response (the total number of splenocytes, the relative and absolute number of antibody-forming cells and their functional activity were determined); estimation of drug effect on the cellular immune response with the using of delayed-type hypersensitivity test induced by sheep red blood cells. Based on these data we concluded that course administration of immobilized interferon  $\alpha$ -2b in the therapeutic dose for 5 days increased phagocytosis of neutrophils and humoral immune response most effectively. Cell-mediated immune response was significantly increased after 7-fold administration of studied drug.

**KEY WORDS:** pegylation, immobilized interferon  $\alpha$ -2b, outbred mice, scheme of administration.

*Bulletin of Siberian Medicine*, 2014, vol. 13, no. 5, pp. 114–121

### References

1. Narovlyanskiy A.N., Ershov F.I., Gintsburg A.L. Interferons: perspective directions of research. *Immunologiya – Immunology*, 2013, vol 3, pp. 168–172 (in Russian).
2. Caraglia M., Marra M., Pelaia G., Maselli R., Caputi M., Marsico S. A., Abbruzzese A. Alpha-interferon and its effects on signal transduction pathways. *Journal of Cellular Physiology*, 2005, vol. 202, pp. 323–335.
3. Yershov F.I., Kiselev O.I. *Interferons and their inducers (from molecules to medicines)*. Moscow, GEOTAR-MED Publ., 2005. (in Russian).
4. Goodbourn S., Didcock L., Randall R.E. Interferons: cell signalling, immune modulation, anti-viral response and virus countermeasures. *Journal of General Virology*, 2000, vol. 81, no. 10, pp. 2341–2364.
5. Karabelsky A.V., Padkina M.V. The recombinant interferon – a long-acting. *Vestnik SPbGU*, 2007, vol. 3, no. 4, pp. 45–53 (in Russian).
6. Fried M.W. Side effects of therapy of hepatitis C and their management. *Hepatology*, 2002, vol. 36, pp. 237–244.
7. Grace M., Cutler D. Pegylating IFNs at His-34 improves the *in vitro* antiviral activity through the JAK/STAT pathway. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*, 2004, vol. 15, no. 6, pp. 287–297.
8. Madonov P.G., Yershov K.I., Dubrovin A.V., Miroshnikov P.N., Shilova M.A., Kinsht D.N. Electron beam modification of the protein drugs to improve their pharmacological properties. *Medicine and education*, 2013, no. 4. URL: [http://ngmu.ru/cozo/mos/article/text\\_full.php?id=1115](http://ngmu.ru/cozo/mos/article/text_full.php?id=1115) (in Russian).
9. Dygay A.M., Artamonov A.V., Bekarev A.A., Zhdanov V.V., Zyuzkov G.N., Madonov P.G., Udut V.V. *Nanotechnology in pharmacology*. Moscow, RAMN Publ., 2011. 136 p. (in Russian).
10. Habriev R.U. Manual on experimental (preclinical) study of new pharmacological agents. Moscow, Medicine Publ., 2005. 832 p. (in Russian).
11. Cunningham A.I. A method of increased sensitivity for detecting single antibody-forming cells. *Nature*, 1965, vol. 207, no. 5001, pp. 1106–1107.
12. Hemagglutination reaction and antibody-dependent hemolysis. *Antibodies. Methods*. Ed. D. Ketti. Moscow, World Publ., 1991. 328 p. (in Russian).
13. Trukhacheva N.V. *Mathematical statistics in biomedical research using the package Statistica*. Moscow, GEOTAR Media Publ., 2012. 384 p. (in Russian).
14. Grace M., Cutler D., Bordens R. Pegylated interferons in chronic hepatitis C. *Recipe: scientific journal for pharmacists and physicians*, 2006, no. 6, pp. 118–128 (in Russian).

15. Foster G.R. Pegylated interferons for the treatment of chronic hepatitis C: pharmacological and clinical differences between peginterferon- $\alpha$ -2a and peginterferon- $\alpha$ -2b. *Drugs*, 2010, vol. 70, no. 2, pp. 147–165.
16. Thomas T., Foster G. Nanomedicines in The Treatment of Chronic Hepatitis C—Focus on Pegylated Interferon alpha-2a. *Int. J. Nanomedicine*, 2007, vol. 2, no. 1, pp. 19–24.
17. Goodbourn S., Didcock L., Randall R.E. Interferons: Cell signalling, immune modulation, antiviral responses and virus countermeasures. *J. Gen. Virol.*, 2000, vol. 81, pp. 2341–2364.

Shitikova O.G. (✉), Ye.D. Goldberg Research Institute of Pharmacology, Tomsk, Russian Federation.

Sherstoboev Ye.Yu., Ye.D. Goldberg Research Institute of Pharmacology, Tomsk, Russian Federation.

Masnaya N.V., Ye.D. Goldberg Research Institute of Pharmacology, Tomsk, Russian Federation.

Danilets M.G., Ye.D. Goldberg Research Institute of Pharmacology, Tomsk, Russian Federation.

Trofimova Ye.S., Ye.D. Goldberg Research Institute of Pharmacology, Tomsk, Russian Federation.

Ligacheva A.A., Ye.D. Goldberg Research Institute of Pharmacology, Tomsk, Russian Federation.

Madonov P.G., Siberian Center for Pharmacology and Biotechnology, Novosibirsk, Russian Federation.

Kinsht D.N., Siberian Center for Pharmacology and Biotechnology, Novosibirsk, Russian Federation.

Yershov K.I., Siberian Center for Pharmacology and Biotechnology, Novosibirsk, Russian Federation.

Shilova M.A., Siberian Center for Pharmacology and Biotechnology, Novosibirsk, Russian Federation.

✉ Shitikova Olga G., Ph. +7-913-800-23-10; e-mail: Olya.lya@mail.ru