

ИВАНОВА Ольга Сергеевна

**БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ РАЗРАБОТКИ НОВЫХ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ АНАЛОГА ИНТЕРФЕРОНА ГАММА**

03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Автореферат диссертации
на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Кольцово

2016

Работа выполнена в Институте медицинской биотехнологии - Филиале Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителя и благополучия человека (ИМБТФБУН ГНЦ ВБ Роспотребнадзора)

**Научный
руководитель:**

Левагина Галина Михайловна, кандидат биологических наук, Институт медицинской биотехнологии - Филиал Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», заведующая отделом разработки технологии и пилотного производства биопрепаратов

**Официальные
оппоненты:**

Афанасьев Станислав Степанович, Заслуженный деятель науки РФ, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное бюджетное учреждение науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, заместитель директора по биотехнологии, г. Москва

Бровко Федор Александрович, доктор биологических наук, Филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, заведующий лабораторией иммунохимии, г. Пушкино

**Ведущая
организация:**

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины» Федерального агентства научных организаций России, г. Новосибирск

Защита состоится «27» января 2017 г. в 11-00 часов на заседании диссертационного совета Д 350.002.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации по адресу: 142279, Московская обл., Серпуховский район, пос. Оболенск.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Автореферат разослан « » 2016 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук



Фурсова Надежда Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Инфекционные и онкологические заболевания занимают одно из первых мест в структуре заболеваемости населения РФ и в мире. По данным ВОЗ, ежегодно регистрируется до 75-80 млн. заболеваний гриппом и ОРВИ. Аналитики прогнозируют, что к 2030 г. уровень смертности от онкологических заболеваний в мире достигнет 13 млн. человек, то есть, увеличится за два десятилетия более, чем на 70 %. Россия входит в первую десятку стран по заболеваемости раком, причем, до 60% из впервые выявленных случаев злокачественных новообразований в нашей стране представляют собой запущенные формы заболевания с очагами метастазирования.

Отсутствие выраженного защитного эффекта вакцинопрофилактики, возникающая резистентность к химиопрепаратам, недостаточная эффективность противовирусных и противоопухолевых препаратов обуславливают необходимость разработки новых лекарственных средств.

В последние годы не теряют своей актуальности способы лечения инфекционных и онкологических заболеваний с помощью стимуляторов системы неспецифической резистентности, в частности, интерферонов и их индукторов. Среди интерферонов разных типов особый интерес представляет интерферон гамма (ИФН- γ) в силу разнообразия и выраженности иммуномодулирующего действия, способности индуцировать защитные реакции в отношении внутриклеточных бактерий, паразитов и вирусов (Ершов Ф.И., 1996; Шмелев В.А., 2008). Противоопухолевые свойства ИФН- γ , такие как подавление роста опухолевых клеток, усиление активности цитотоксических лимфоцитов, ингибирование ангиогенеза (Шмелев В.А., 2008, Khan T.A. et al., 2016; Ligocki A.J. et al., 2016) его роль как регулятора ремоделирования костной ткани (Takayanagi H. et al., 2005; Ji J.D. et al., 2009) позволяют рассматривать данный цитокин как перспективное средство лечения не только вирусных, но и онкологических заболеваний, в частности, злокачественных новообразований, склонных к образованию костных метастазов.

Одним из главных недостатков препаратов ИФН- γ , препятствующих в настоящее время его широкому клиническому применению, является и высокая чувствительность к ферментам деградации (Шмелев В.А., 2008) и нестабильность белка при хранении. Для решения проблемы протеолитической лабильности и повышения эффективности ИФН- γ могут быть использованы разные методические подходы, среди которых следует выделить: получение мутантных аналогов ИФН- γ с аминокислотными заменами в сайтах протеолиза, введение белка в состав транспортных форм, обеспечивающих повышение его стабильности, адресность доставки, накопление в области патологического очага.

Степень разработанности темы исследования. Ранее в ГНЦ ВБ «Вектор» был сконструирован мутантный аналог ИФН- γ Дельтаферон, отличающийся от нативного белка делецией 10 аминокислот на С-конце молекулы и точечными заменами в сайтах протеолиза (арг129-лиз130-арг131 на гли129-сер130-ала131), что обеспечивает его более длительную циркуляцию в организме (Татьков С.И. и др., 2000). Помимо повышенной ферментативной устойчивости, особенностью данного белка являлся секреторный тип продукции в бактериальных клетках, позволивший повысить выход целевого белка в 4 раза.

Для стабилизации и адресной доставки терапевтических белков в ГНЦ ВБ «Вектор» была разработана оригинальная транспортная система, представляющая собой молекулярную конструкцию, которая содержит в центральной части двуспиральные РНК (дсРНК), покрытую полисахаридной оболочкой, и терапевтический белок, экспонированный на поверхности (патенты РФ №2190018, Патент РФ № 2386447). Преимуществом данной конструкции перед известными биodeградируемыми средствами доставки является возможность экспозиции на поверхности частиц, помимо целевого

белка, векторных молекул, а также наличие в составе конструкции компонентов синергидного действия.

Учитывая достоинства ИФН- γ как универсального средства лечения вирусных заболеваний и возможность стабилизации его свойств в составе средства доставки, актуальной является разработка технологии получения молекулярной конструкции, содержащей аналог ИФН- γ Дельтаферон.

Можно предположить, что дополнительное введение в состав конструкции векторной молекулы для адресной доставки белка в патологический очаг, например, в область опухолевых метастазов костей, позволит обеспечить накопление и реализацию антиметастатического действия ИФН- γ . В качестве «направляющих» молекул для доставки лекарств в кость большой интерес представляют бифосфонаты, отличающиеся способностью к быстрому и массивному накоплению в костной ткани (Caraglia M. et al., 2010). Однако данных относительно использования бифосфонатов в качестве векторных молекул для «нацеливания» конструкций, переносящих белки-цитокины, в доступной литературе не обнаружено.

Наряду с инъекционной формой препарата аналога ИФН- γ несомненный интерес представляет разработка его лекарственных форм для непарентерального, в частности, интраназального применения в составе молекулярной конструкции. Интраназальная лекарственная форма, как известно, способна обеспечить повышенную концентрацию действующего начала в «воротах инфекции» и как следствие, его высокую эффективность при минимальном воздействии на организм. В то же время сведения относительно способов получения интраназальных лекарственных форм ИФН- γ в средстве доставки в настоящее время в литературных источниках отсутствуют.

На основании вышеуказанного можно заключить, что разработка технологии получения препаратов ИФН- γ в средстве доставки для системного и интраназального применения для целей противовирусной и противоопухолевой терапии является актуальной и научно обоснованной.

Цель исследования. Цель исследования - разработка технологии получения новых лекарственных форм аналога интерферона гамма в составе средства доставки для противоинойфекционной и противоопухолевой терапии.

Задачи исследования:

1. Оптимизировать метод получения полисахаридной оболочки молекулярной конструкции, несущей аналог интерферона гамма Дельтаферон.
2. Оценить влияние технологических параметров и отработать условия сборки молекулярной конструкции на основе дсРНК и конъюгата декстрана с Дельтафероном.
3. Исследовать физико-химические и биологические свойства препарата молекулярной конструкции, содержащей дсРНК и Дельтаферон.
4. Выбрать условия получения интраназальной формы Дельтаферона в составе молекулярной конструкции, исследовать физико-химические и биологические свойства интраназальной формы.
5. Разработать метод получения полисахаридной оболочки молекулярной конструкции, несущей аналог интерферона гамма Дельтаферон и бифосфонат алендроновую кислоту.
6. Исследовать физико-химические свойства препарата молекулярной конструкции, содержащей Дельтаферон и алендроновую кислоту.
7. Исследовать противоопухолевую активность молекулярной конструкции, содержащей Дельтаферон и алендроновую кислоту, на экспериментальной модели костных метастазов.

Научная новизна и теоретическая значимость. Впервые экспериментально установлены параметры проведения процесса конъюгирования декстрана, белка Дельтаферона и спермидина: а) оптимальные количественные соотношения полисахарида и окислителя периодата натрия (25-50 молей окислителя на моль декстрана) и

длительность инкубации (60 мин инкубации вне зависимости от температуры); б) оптимальное соотношение спермидин/декстран - 10/1- 15/1.

Впервые продемонстрировано влияние количественного соотношения компонентов конструкции (дсРНК, Дельтаферона) и технологических параметров скорости перемешивания и внесения компонентов в реакционную среду на размер частиц и специфическую активность образцов молекулярной конструкции. Методом просвечивающей электронной микроскопии показано, что наиболее однородные сферические частицы размером до 200 нм были получены при соотношении дсРНК и Дельтаферона 1:5 (по массе) или 1:120-150 (моль/моль). Специфическая активность образцов наночастиц, полученных при соотношении дсРНК и Дельтаферона 1:5 (по массе), в культуре клеток L-68 составила $1,0 \times 10^5$ МЕ/мг.

В результате исследования структурных характеристик молекулярной конструкции, содержащей Дельтаферон и дсРНК, методами ультрафиолетовой спектроскопии и кругового дихроизма впервые установлено отсутствие конформационных перестроек во вторичной структуре белкового и нуклеинового компонентов созданной молекулярной конструкции.

Впервые в процессе гранулометрической характеристики образцов молекулярных конструкций, содержащих Дельтаферон и дсРНК, было показано, что в результате сборки образуются относительно однородные по размеру сферические наночастицы с диаметром около 200 нм (94% от общего количества частиц), которые сохраняются после лиофилизации и хранения в составе лиофилизированных образцов.

Впервые установлено, что Дельтаферон, экспонированный на поверхности конструкции, отличался устойчивостью при хранении в течение суток в широком диапазоне температур (от - 4 °С до +20 °С), в отличие от исходного белка Дельтаферон, который был стабилен лишь при + 6 °С. Установлено, что Дельтаферон и дсРНК в составе молекулярной конструкции более устойчивы к ферментативному воздействию трипсина и рибонуклеазы, чем свободный Дельтаферон и дсРНК, соответственно.

Впервые показано, что молекулярная конструкция, содержащая Дельтаферон, в дозе 50 тыс. МЕ на мышь повышает уровень ИФН- α и ИФН- γ , повышает противовирусную устойчивость мышей, инфицированных вирусом гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2).

Впервые разработана интраназальная форма Дельтаферона в составе молекулярной конструкции. Показано, что препарат обладал повышенной противовирусной активностью в культуре клеток L-68, проявлял способность повышать уровень ИФН- α в тканях носоглотки, легких и крови мышей и выживаемость животных, инфицированных вирусом гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2).

Впервые разработана технология получения препарата на основе аналога интерферона гамма Дельтаферона и алендроновой кислоты в составе молекулярной конструкции для лечения костных метастазов опухолей. Выбраны условия получения конъюгата полисахарида с Дельтафероном и алендроновой кислотой и сборки молекулярной конструкции. Методом электронной микроскопии показано наличие в препарате округлых наночастиц размером от 20 до 55 нм. В результате исследования физико-химических свойств молекулярной конструкции, содержащей Дельтаферон и алендроновую кислоту, доказана сохранность структуры и биологических свойств Дельтаферона в составе конструкции.

Впервые установлена способность молекулярной конструкции, несущей Дельтаферон и алендроновую кислоту, связываться с костной тканью в системе *in vitro*. На модели костных метастазов, индуцированных введением мышам клеток меланомы B16-F10, продемонстрированы противоопухолевые свойства Дельтаферона в составе конструкции.

Практическая значимость работы. На примере аналога ИФН- γ доказана перспективность использования искусственной молекулярной конструкции в качестве

транспортной формы терапевтических белков, обеспечивающей повышение их протеолитической стабильности. На примере бифосфоната алендроновой кислоты показана возможность использования векторных молекул в составе оболочки конструкции для адресной доставки терапевтических белков в патологический очаг.

Доказана перспективность создания на основе молекулярной конструкции, несущей Дельтаферон и дсРНК, нового лекарственного препарата для лечения гриппозной инфекции, для инъекционного и интраназального применения.

Доказана перспективность создания на основе молекулярной конструкции, содержащей Дельтаферон и алендроновую кислоту, нового лекарственного препарата для лечения костных метастазов.

Методология и методы исследования.

Для получения экспериментальных образцов молекулярных конструкций использовали аналог интерферона гамма рекомбинантный человеческий Дельтаферон со специфической активностью $6,4 \cdot 10^5$ МЕ/мг, полученный в соответствии с «Инструкцией по изготовлению и контролю Дельтаферона (субстанция)» ИК-15/02-2013 (ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»); препарат натриевой соли двуспиральной рибонуклеиновой кислоты (дсРНК), полученный из киллерного штамма дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, соответствующий требованиям ФСП 42-0769-08 «Натриевая соль двуспиральной рибонуклеиновой кислоты, субстанция». В работе были использованы сорбенты для хроматографии (сефадекс G-25, сефароза 6В, Pharmacia, Швеция), реактивы для электрофореза (акриламид, Gerbu, Германия; агароза, Bio-Rad, США); химические реактивы отечественного и зарубежного производства чистотой не ниже «х.ч».

Обработку методов синтеза конъюгатов декстрана с Дельтафероном и спермидином или декстрана с Дельтафероном, спермидином и алендроновой кислотой, а также молекулярных конструкций на основе конъюгатов и дсРНК проводили в соответствии с описанным в [Патент РФ № 2386447]. Получение конъюгатов и конструкций контролировали методом электрофореза в 15% полиакриламидном геле (ПААГ) или 1%-ном геле агарозы в денатурирующих условиях с последующим окрашиванием красителем Кумасси R-250 или этидиум бромидом, соответственно.

Определение концентрации белка в конъюгатах декстрана и конструкциях осуществляли методом Лоури (Paterson G.L., 1979) или Варбурга (Скоупс Р., 1985), дсРНК- по методу А.С. Спирина, определение концентрации алендроновой кислоты с помощью набора реагентов «Фосфор-Ново» (ЗАО «Вектор-Бест», Кольцово).

Визуализацию молекулярных конструкций проводили методом просвечивающей электронной микроскопии с использованием негативного контрастирования (0,5-1% водный раствор уранилацетата) либо 2% раствором фосфорно-вольфрамовой кислоты при ускоряющем напряжении 80 кВ. Анализ электронных снимков (определение размеров частиц) осуществляли при помощи программного пакета iTEM (Olympus, Германия).

Анализ гранулометрического состава образцов молекулярной конструкции осуществляли на анализаторе Z-потенциала ZetaPlus в соответствии с инструкцией производителя.

Спектры поглощения образцов в ультрафиолетовой области исследовали с помощью спектрофотометра Shimadzu UV-2100 в диапазоне длин волн 190-350 нм с разрешением 0,1 нм, шириной щели 1 нм. Спектры кругового дихроизма записывали на спектрополяриметре Jasco J-600 в диапазоне длин волн 190-350 нм с разрешением 0,1 нм, шириной щели 1 нм, скоростью сканирования 20 нм/мин и чувствительностью 50 мград.

Определение молекулярной массы Дельтаферона в составе конъюгатов и конструкций проводили методом электрофореза в 15%-ном ПААГ в денатурирующих условиях в соответствии с (Laemmli U.K., 1970.)

Оценку стабильности Дельтаферона в составе конструкции при хранении в различных температурных режимах (минус 4°C , $+37^{\circ}\text{C}$) и в условиях воздействия протеаз ($26 \cdot 10^{-7}$ - $26 \cdot 10^{-6}$ е.а. трипсина) проводили методом электрофореза в 12% ПААГ в

денатурирующих условиях (Laemmli U.K., 1970). Сохранность структуры дсРНК в составе молекулярной конструкции при инкубации с рибонуклеазой E.coli (0,1 – 10 е.а.) оценивали электрофорезом в 1%-ном геле агарозы с окрашиванием бромистым этидием.

Специфическую противовирусную активность препаратов оценивали на культуре диплоидных фибробластов человека L-68 либо MRC-5 по подавлению цитопатического действия тест-вируса энцефаломиелокардита штамм Колумбия в дозе 100 ЦПД₅₀ (Yousefi S., 1985).

Способность к накоплению конструкций, содержащих Дельтаферон и алендроновую кислоту, в костной ткани в условиях *in vitro* оценивали по показателям десорбции образцов с гидроксилпатита линейным градиентом натрия хлорида от 0,1 до 1,0 (1,5) М, рН 7,0 (Скоупс Р. 1985). Для анализа хроматографических фракций использовали метод электрофореза в 15%-ом ПААГ и 1% геле агарозы.

Для оценки *интерферониндуцирующей активности Дельтаферона в составе молекулярной конструкции в сравнении с Дельтафероном* препараты вводили белым беспородным мышам в дозе 50 тыс. МЕ однократно внутрибрюшинно или интраназально. Содержание интерферонов (ИФН- α , ИФН- γ) в сыворотке крови мышей после внутрибрюшинного введения определяли через 3 и 24 часа после введения иммуноферментным методом с помощью наборов VeriKine Mouse Interferon Alpha ELIS Kit (PBL Interferon Source) и Mouse IFN- γ Immunoassay (R&D Systems).

Титры интерферона в сыворотке крови, супернатантах гомогенатов тканей носоглотки и легких животных, взятых через 3 часа после интраназального введения, определяли в тесте на культуре клеток мышинных фибробластов L68 в отношении тест-вируса энцефаломиокардита, штамм «Колумбия» в дозе 100 ЦПД 50.

Изучение противовирусной активности препарата молекулярной конструкции, содержащей Дельтаферон, и его интраназальной формы проводили на самках мышей линии Valb/c. Препараты Дельтаферона вводили внутрибрюшинно или интраназально в дозах 10³ МЕ и 10⁵ МЕ на мыш, трехкратно, за 3 ч до заражения, через 1 и 2 суток после заражения вирусом гриппа A/Aichi/2/68. В качестве препарата сравнения использовали Тамифлю (Хоффманн - Ля Рош Лтд, Швейцария), контролем служили инфицированные мыши без введения препаратов. Противовирусную активность препаратов тестировали по динамике гибели мышей и продолжительности жизни.

Исследование противоопухолевой активности молекулярной конструкции, содержащей Дельтаферон и алендроновую кислоту, проводили на экспериментальной модели костных метастазов, индуцированных введением мышам C57BL/6 клеток меланомы B16-F10 (10⁵ клеток на животное, внутрисердечно). Инъекции препарата молекулярной конструкции, содержащей Дельтаферон, вводили внутривенно трехкратно с интервалом в один день в дозе 5*10⁴ МЕ на животное, начиная инъекции с 13 суток после перевивки. Контрольным мышам вводили физиологический раствор. Через сутки после последней инъекции у мышей опытной и контрольной групп забирали на гистологический анализ бедренные кости задних конечностей с костными метастазами в эпифизе, которые готовили для светооптического исследования по стандартной методике. Исследование гистологических срезов бедренных костей проводили с помощью светового микроскопа Leica DM 2500 (Лейка, Германия), фотосъемку - с помощью цифровой камеры Leica DFC420 C (Лейка, Германия).

Статистическую обработку и сравнение результатов всех биологических экспериментов осуществляли стандартными методами с помощью пакета компьютерных программ «Statistica 6,0» (Stat Soft Inc.) и «Statgraphics 5.0» (Statistical Graphics Corp., USA). В качестве критериев использовали критерию χ^2 , непараметрический U-критерий Манна-Уитни либо t-критерий Стьюдента. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез (p) принимали равным 0,05.

Положения, выносимые на защиту.

1. Молекулярная конструкция, содержащая в центральной части дрожжевые двуспиральные РНК, а на поверхности аналог интерферона гамма Дельтаферон, обеспечивает получение частиц диаметром порядка 200 нм, сохраняет структурные характеристики Дельтаферона и дсРНК, специфическую активность Дельтаферона в составе конструкции, повышает ферментативную устойчивость компонентов.

2. Молекулярная конструкция, несущая Дельтаферон, в виде лиофилизата для приготовления назального раствора 50000 МЕ, содержащая в качестве вспомогательных компонентов поливинилпирролидон и трилон Б, обеспечивает повышенную стабильность белка при хранении и повышенную специфическую активность в культуре клеток L-68.

3. Дельтаферон в составе молекулярной конструкции при внутрибрюшинном введении обладает способностью повышать уровень интерферона в сыворотке крови, при интраназальном в крови, тканях носоглотки и легких мышей и отличается умеренно выраженной противовирусной активностью в отношении вируса гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) при обоих способах введения.

4. Введение в оболочку молекулярной конструкции, несущей Дельтаферон, в качестве векторной молекулы бифосфоната алендроновой кислоты обеспечивает повышенную тропность конструкции к костной ткани и противоопухолевую активность в отношении костных метастазов, индуцированных введением клеток меланомы мышей B16- F10.

Апробация работы.

Степень достоверности результатов исследований подтверждается использованием современных валидированных методов исследования, поверенного и сертифицированного оборудования, статистических методов обработки данных. Материалы диссертации представлены на Международном форуме по нанотехнологии «Rusnanotech-09» и 2-м международном конкурсе научных работ молодых учёных в области нанотехнологий (Москва, 2009), 6-й международной конференции «Молекулярная медицина и биобезопасность» (Москва, 2009), 14-м Международном конгрессе по реабилитации в медицине и иммунореабилитации (Тель-Авив, Израиль, 2009), Третьей Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Биомедицинская инженерия и биотехнология» (Курск, 2010), VI Московском международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2011), Конференции молодых ученых и специалистов ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» (Кольцово, 2011) (лауреат конкурса молодых ученых и специалистов им. Н.К. Кольцова за лучшую научную работу), Научно-практической конференции «Диагностика и профилактика инфекционных болезней» (Новосибирск, 2013), Объединённом иммунологическом форуме (Н. Новгород, 2013), Российском научном форуме на Урале (Екатеринбург, 2014); Научно-практической конференции «Диагностика и профилактика инфекционных болезней на современном этапе» (Новосибирск, 2016).

Публикации. Основное содержание работы отражено в 15 научных публикациях, включая 8 статей в научных журналах (6 статей в журналах, рекомендованных в списке ВАК).

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 133 страницах и включает введение, обзор литературы, описание методов исследования, результаты и обсуждение результатов, заключение, выводы, список использованной литературы, Приложения на 3 стр. Работа иллюстрирована 14 таблицами и 30 рисунками. Список литературы содержит 154 источников, из них 101 – зарубежных авторов.

Вклад автора.

Работы по оптимизации метода получения полисахаридной оболочки молекулярной конструкции, оценке влияния технологических параметров и выбору условий сборки конструкции на основе дсРНК и конъюгата декстрана с Дельтафероном, выбору технологической схемы и получению интраназальной формы Дельтаферона в составе конструкции, оформлению разделов Инструкций по изготовлению и контролю препарата Дельтаферона в транспортной системе и Дельтаферона, лиофилизата для приготовления

раствора для интраназального применения, проведены автором работы лично. Кроме того, автор принимал участие в исследовании физико-химических свойств конструкции, содержащей Дельтаферон, или Дельтаферон и алендроновую кислоту, оценке способности молекулярной конструкции, содержащей Дельтаферон и алендроновую кислоту, связываться с костной тканью на экспериментальной модели *in vitro*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка технологии получения препаратов аналога интерферона гамма Дельтаферона в средстве доставки для противовирусной терапии

Молекулярная конструкция, использованная в качестве средства доставки Дельтаферона, представляет собой двухслойную частицу, ядро которой образовано двуспиральной РНК из дрожжей *S.cerevisiae*, покрытой полисахаридной оболочкой, а на поверхности экспонирован белок, конъюгированный с основным компонентом оболочки декстраном. Для обеспечения положительного заряда, необходимого для ионной связи конъюгата декстрана и белка с отрицательно заряженной молекулой дсРНК, в состав конъюгата введены молекулы спермидина.

Процесс получения молекулярной конструкции двухстадийный и включает стадию получения конъюгата декстрана с белком и спермидином и стадию сборки конструкции из конъюгата и дсРНК.

Оптимизация условий активации декстрана и образования его конъюгатов со спермидином. Для активации декстрана использовали реакцию Малапрада, селективное окисление периодатом натрия органических соединений с винициальными ОН-группами. В процессе оптимизации метода конъюгирования были установлено, что в диапазоне соотношений концентраций периодат/ декстран от 10/1 до 75/1 (моль/моль) число реакционно-способных альдегидных групп декстрана, определенных методом Сабокса, возрастало пропорционально количеству добавленного окислителя, достигая плато при значении соотношений 200/1 (моль/моль) и выше. Максимальный выход продукта реакции наблюдался через 60 мин. Снижение температуры реакционной смеси до 6⁰ С приводило к уменьшению количества альдегидных групп, по сравнению с реакцией при комнатной температуре (22⁰С).

Проведение реакции конъюгации декстрана со спермидином при разной степени окисления декстрана показало, что гомогенный продукт реакции с кажущейся молекулярной массой 100±20 кДа визуализировался на электрофореграмме при соотношении декстран/периодат натрия и декстран/спермидин 1/25 (моль/моль) (рис.1). Увеличение степени окисления декстрана и соотношения декстран/спермидин до 1/75 (моль/моль) и выше приводило к сдвигу молекулярной массы конъюгата в низкомолекулярную область, вероятно, вследствие разрывов молекул декстрана. Оптимальная степень окисления декстрана достигается при количестве внесенного периодата 25-50 молей на моль декстрана.

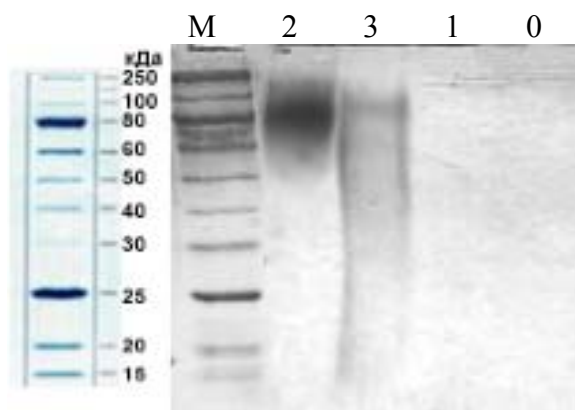


Рисунок 1. Электрофореграмма конъюгатов декстран/спермидин в 15% ПААГ в денатурирующих условиях. Окраска Кумасси R-250.

1-3 – продукты конъюгации при соотношении декстран/периодат и декстран/спермидин. 1/10, 1/25 и 1/100, соответственно;

0 – смесь неактивированного декстрана и спермидина;

М – маркеры молекулярных масс

Содержание спермидина в конъюгатах декстрана с Дельтафероном, оптимальное для сборки молекулярных конструкций, определяли по эффективности образования комплексов конъюгатов с дсРНК. Как видно на электрофореграмме (рис.2), комплексы двуспиральной РНК (L- и М-формы), покрытой конъюгатом декстран-спермидин, имели заметно меньшую подвижность, по сравнению с исходной дсРНК, начиная с молярных соотношений спермидин/декстран от 10/1 и выше. Этот эффект можно объяснить увеличением молекулярной массы дсРНК в результате образования комплекса и тем, что положительно заряженный спермидин частично нейтрализует отрицательный заряд РНК.

И 1 2 3 4

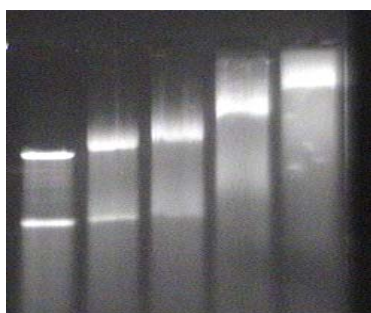


Рисунок 2. Электрофореграмма (1%-ный гель агарозы, окрашивание этидиум бромидом) образцов, содержащих дсРНК с конъюгатами декстран/спермидин при молярных соотношениях в конъюгатах: 1 – 1/5; 2 -1/10; 3 - 1/20;4 - 1/50; И - исходный препарат дсРНК

На основании этих данных было выбрано соотношение спермидин/декстран 10/1-15/1, при котором электрофоретическая подвижность дсРНК в оболочке из молекул конъюгата снижалась на 30-40% по сравнению с подвижностью исходной дсРНК.

Выбор условий получения конструкций на основе конъюгатов декстрана с Дельтафероном и дсРНК. Для уточнения оптимального соотношения компонентов в ходе синтеза молекулярной конструкции, содержащей Дельтаферон, было получено пять образцов с разным количественным соотношением двуспиральной РНК и Дельтаферона (1:2, 1:3, 1:5, 1:10 по массе, соответственно). На рисунках 3А и 3Б видно, что при сравнительно небольших различиях в весовом содержании дсРНК и белка (1:2-1:3) наблюдался значительный (5-10-кратный) разброс в размерах частиц.

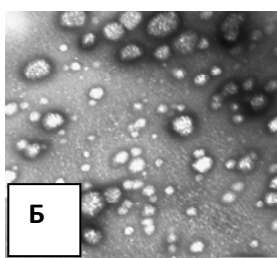
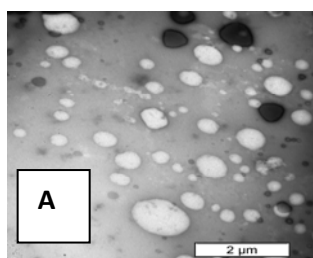
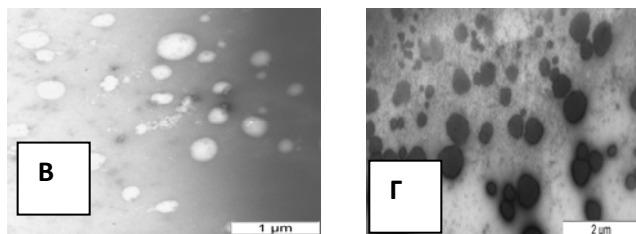


Рисунок 3. Электронно-микроскопические изображения структур, полученных в результате сборки молекулярных конструкций, при разном соотношении дсРНК и Дельтаферона (по массе): А-1:2; Б-



1:3; В-1:5; Г-1:10. Контрастирование уранил ацетатом.

Увеличение содержания Дельтаферона до 1:10 по отношению к содержанию дсРНК приводило к уменьшению размеров частиц при сохранении их гетерогенности. В образце регистрировали два типа частиц: диаметром 200-300 нм и более мелкие, 80-150 нм (рис.3Г). Наиболее однородные частицы размером порядка 200 нм были получены при соотношении дсРНК и Дельтаферона 1:5 (по массе) или 1:120-150 (моль/моль) (рис.3В).

Было показано, что сборка молекулярной конструкции, содержащей Дельтаферон, при скорости перемешивания раствора конъюгата 500 оборотов в минуту и медленном, дозированном по каплям, внесении раствора дсРНК приводило к образованию частиц размером 50-200 нм. Внесение дсРНК в раствор конъюгата путем быстрого впрыскивания к образованию частиц не приводило.

Таким образом, выбраны условия получения полисахаридной оболочки молекулярной конструкции, представляющей собой конъюгат декстрана с Дельтафероном и спермидином, а также условия сборки конструкции на основе двуспиральной РНК и конъюгата, позволяющие получать относительно однородные частицы размером порядка 200 нм.

Исследование физико-химических свойств молекулярной конструкции, содержащей Дельтаферон

Важной оценкой эффективности разработанной технологии с точки зрения стандартизации процесса получения являются показатели гранулометрического, а также сохранение структуры и биологических свойств компонентов в составе препаратов. *Электронно-микроскопические* исследования молекулярных конструкций, содержащих Дельтаферон, полученные методом просвечивающей электронной микроскопии показали, что молекулярные конструкции представляют собой частицы, имеющие форму, близкую к сферической, с размером 200 нм.

Анализ гранулометрического состава молекулярной конструкции показал, что лиофилизированный образец конструкции после восстановления до раствора основной сигнал соответствовал частицам размером 200 нм - 94,8%, доля сравнительно небольших частиц (около 20 нм) составляла 5,2%.

Анализ структурных характеристик молекулярной конструкции, содержащей Дельтаферон, методом УФ-спектроскопии показал, что УФ-спектр молекулярной конструкции представляет собой аддитивную сумму спектров Дельтаферона и дсРНК с незначительными отличиями, которые могут быть связаны с погрешностью метода (рис. 4).

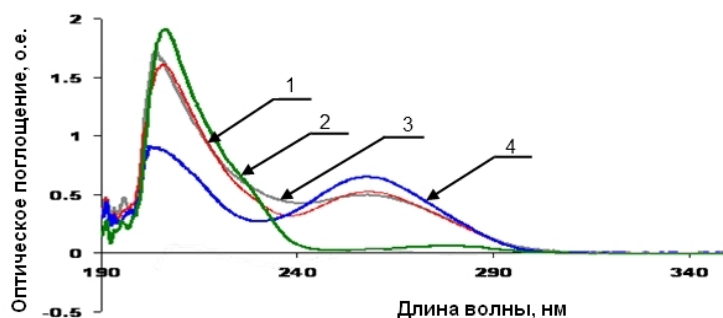


Рисунок 4. УФ-спектры молекулярной конструкции и ее компонентов.
1 - спектр смеси компонентов молекулярной конструкции;
2- Дельтаферон,
3 – молекулярная конструкция,
4 - дсРНК

Анализ компонентов конструкции методом кругового дихроизма показал, что КД-спектр дсРНК имеет форму, характерную для А-формы нуклеиновых кислот, с максимумом поглощения нуклеиновых кислот (261 нм и 257 нм, соответственно) и локальным минимумом при 235 нм. Спектры КД Дельтаферона характерны для α -спиралей белков: отрицательная полоса в области спектра от 200 до 350 нм, имеющая два локальных минимума в районе 210 и 220 нм. Спектр кругового дихроизма молекулярной конструкции являлся аддитивной суммой спектров Дельтаферона и дсРНК (рис.5). Таким образом, результаты спектрометрического исследования свидетельствуют об отсутствии значительных конформационных перестроек во вторичной структуре как белкового, так и нуклеинового компонентов молекулярной конструкции.

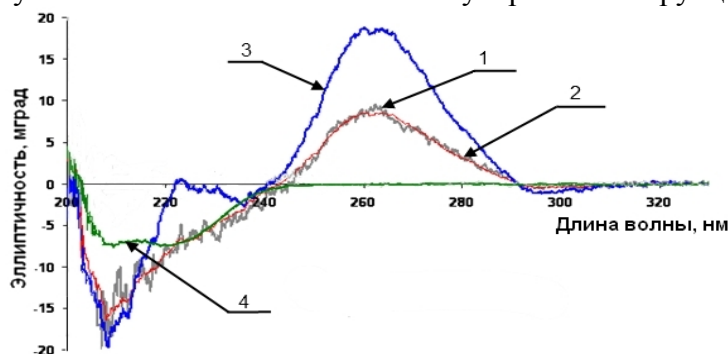


Рисунок 5. КД-спектры молекулярной конструкции и ее компонентов (Дельтаферон, дсРНК)

1 - спектр смеси компонентов молекулярной конструкции, 2 - молекулярная конструкция, 3 - дсРНК, 4 - Дельтаферон

Оценка устойчивости к ферментативным воздействиям. Важным моментом при оценке стабильности молекулярной конструкции является исследование устойчивости ее активных компонентов к ферментативной деградации, от уровня которой зависит как стабильность препарата при хранении, так и длительность циркуляции в биологически активной форме при введении в организм.

Анализ показал, что Дельтаферон в составе конструкции более устойчив к воздействию протеаз, чем свободный Дельтаферон (рис.20). Аналогичные закономерности были обнаружены в ходе исследования протеолитической устойчивости образцов конструкции в жидкой форме, хранившейся при +6⁰С в течение 6 месяцев.

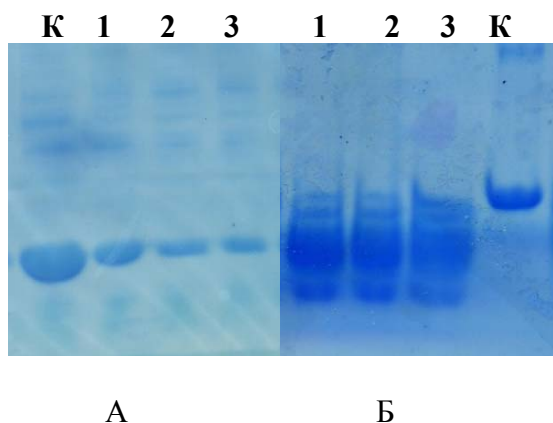


Рисунок 6. Электрофоретический анализ протеолитической устойчивости Дельтаферона в составе молекулярной конструкции (А) в сравнении с Дельтафероном (Б) после 5-минутной инкубации с трипсином в концентрации: 1- $26 \cdot 10^{-7}$ е.а трипсина; 2 – $13 \cdot 10^{-7}$ е.а. трипсина; 3 – $26 \cdot 10^{-6}$ е.а. трипсина; К – без добавления трипсина (контроль). Электрофорез в 12% ПААГ, окрашивание Кумасси G-250.

Анализ устойчивости дсРНК в составе конструкции к воздействию нуклеаз показал, что сохранность структуры дсРНК в конструкции после инкубации с добавлением рибонуклеазы в количестве 10 ед.акт., тогда как несвязанная дсРНК подвергалась полной деградации при добавлении фермента в дозе, в два раза меньшей.

Таким образом, как белок, так и дсРНК в составе молекулярной конструкции приобретали устойчивость к воздействию ферментов, близких по своим свойствам к содержащимся в биологических средах организма. Повышенная ферментативная (антитрипсиновая) устойчивость в препарате сохранялась, по меньшей мере, в течение 6 месяцев хранения при +6⁰С.

Исследование биологических свойств молекулярной конструкции, содержащей Дельтаферон, для системного введения

Иммуномодулирующие свойства. Оценка интерферониндуцирующей активности препаратов молекулярной конструкции, несущей Дельтаферон, показала, что однократное внутрибрюшинное введение препарата в дозе 50 тыс. МЕ на мышь приводило к достоверному повышению уровня ИФН- γ в сыворотке крови (до 111 ± 35 пг/мл через 3 часа после инъекции) при нулевом уровне показателя в контроле и в группе сравнения. В отличие от несвязанного Дельтаферона, препарат молекулярной конструкции обладал способностью повышать и уровень ИФН- α крови, что, по-видимому, связано с присутствием в его составе интерферогена дрожжевой двуспиральной РНК. Через 3 часа после введения препарата значения показателя в опытной группе мышей увеличивались в 16 раз, по сравнению с показателем контроля (различия статистически значимы, $p \leq 0,05$), повышенный уровень показателя сохранялся через сутки после введения.

Исследование противовирусной активности молекулярной конструкции, содержащей Дельтаферон (МК Дельтаферон), проводили на экспериментальной модели гриппозной инфекции, вызванной вирусом гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2). Результаты, представленные в таблице 1, подтверждают наличие у препарата умеренно выраженной противовирусной активности, выразившейся в повышении числа выживших мышей и увеличении средней продолжительности их жизни.

Таблица 1 - Противовирусная активность препарата молекулярной конструкции, содержащей Дельтаферон, на мышах, инфицированных вирусом гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2)

Группа		Количество (%) выживших	Количество (%) погибших	Коэффициент защиты (КЗ)*	СПЖ (сут., $M \pm Sm$)
1.	МК Дельтаферон, 10^3 МЕ, n=10	3 (30%)	7 ^{&} (70%)	21,7	$10,90 \pm 3,60$ * [£]
2.	МК Дельтаферон, 10^5 МЕ, n=10	1 (10%)	9 ^{&} (90%)	1,7	$9,50 \pm 2,51$ [£]
3.	Тамифлю, n=12	12 (100%)	0 [#] (0%)	91,7	$16,00 \pm 0,00$ *
4.	Контроль ВГ A/Aichi/2/68 (H3N2), n=12	1 (8,3%)	11 (91,7%)	-	$8,42 \pm 2,50$

Примечание. Коэффициент защиты (КЗ) по формуле: % гибели в контроле - % гибели в опыте; СПЖ рассчитывали на 16 сутки.

- отличие от Контроля по критерию χ^2 при $p \leq 0,05$; & - отличие от группы «Тамифлю» по критерию χ^2 при $p \leq 0,05$; *- отличие от Контроля по U-критерию Манна-Уитни при $p \leq 0,05$; [£] - отличие от группы «Тамифлю» по U-критерию Манна-Уитни при $p \leq 0,05$.

Разработка интраназальной формы препарата на основе Дельтаферона в составе молекулярной конструкции

Исходя из теоретических соображений на основании анализа литературных данных были выбраны следующие компоненты интраназальной формы препарата Дельтаферон в составе конструкции: поливинилпирролидон (40000 Да) – биологически совместимый полимер, относится к полимерным поверхностно-активным веществам, улучшает растворимость лекарственных веществ, пролонгирует их действие при высвобождении из

лекарственной формы; трилон Б – антиоксидант; фосфатно-солевая буферная смесь, рН 7,2 – растворитель.

Определение противовирусной активности МК Дельтаферон в культуре клеток L-68 показало, что процедуры получения конструкции и ее лиофилизации не приводили к снижению специфической активности белка. Активность образца возрастала по сравнению с активностью Дельтаферона в эквивалентной дозе на 27% и составляла $6,3 \cdot 10^4$ МЕ/мл, что, вероятно, связано с синергидным эффектом Дельтаферона и дсРНК в составе конструкции.

Установлено, что интраназальная форма препарата молекулярной конструкции, содержащей Дельтаферон, обладала способностью повышать противовирусную активность сыворотки крови, гомогенатов носоглотки и легких мышей (рис.7), что свидетельствует об увеличении в исследованных образцах содержания интерферона.

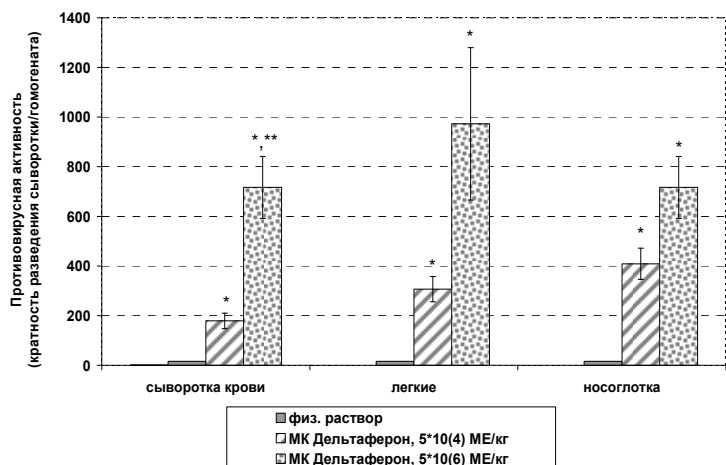


Рисунок 7. Титры интерферона в сыворотке крови мышей через 3 часа после однократного введения интраназальной формы препарата МК Дельтаферон.

* - отличия статистически значимы, по сравнению с контролем и интактной группой ($p < 0,05$); ** - отличия статистически значимы, по сравнению с МК Дельтаферон, 5×10^4 МЕ/кг ($p < 0,05$).

Разработка технологии получения препарата на основе аналога интерферона гамма Дельтаферона и алендроновой кислоты для лечения костных метастазов опухолей

Синтез конъюгата декстрана с Дельтафероном и спермидином вели по отработанной схеме, указанной выше, с модификацией, которая заключалась в том, что после проведения реакции конъюгирования декстрана с белком в реакционную смесь наряду со спермидином добавляли различные количества алендроновой кислоты (от 5 до 40 моль на моль декстрана). В качестве критерия выбора оптимального количества алендроновой кислоты использовали степень сродства полученных конъюгатов к гидроксилатапиту (ГАП). Для оценки сродства раствор конъюгата (1 мг по декстрану) наносили на колонку с сорбентом (0,5 мл), затем промывали 0,02 М натрия хлоридом, рН 7,2 и проводили десорбцию повышающейся концентрацией соли от 0,02 до 2,0 моль/л, ступенями с шагом 0,1 моль/л. Из данных, приведенных в таблице 2, видно, что концентрация натрия хлорида, необходимая для элюции конъюгатов декстрана увеличивается пропорционально количеству связанного бифосфоната, что свидетельствует об увеличении сродства конъюгата к ГАП. Оптимальным, на наш взгляд, оказалось соотношение алендроновая кислота/декстран, равное 10/1.

Таблица 2 - Зависимость молярной концентрации натрия хлорида, необходимого для элюции с гидроксилатапита конъюгатов с различным содержанием алендроновой кислоты, моль/л

Количество алендроновой кислоты, внесенной в реакционную смесь,	0	5	10	20	40

моль/моль декстрана					
Молярность натрия хлорида для элюции, моль/л	0,3±0,1	0,6±0,2	1,0±0,2	1,8±0,3	≥ 2

Электрофоретический анализ препарата конструкции, полученной на основе конъюгатов декстрана с Дельтафероном, алендроновой кислотой и спермидином при выбранных соотношениях, показал, что подвижность дсРНК в оболочке из молекул конъюгата при миграции в геле агарозы снижается по сравнению с подвижностью исходной дсРНК, что свидетельствует об образовании молекулярной конструкции.

Исследование физико-химических свойств молекулярной конструкции, содержащей Дельтаферон и алендроновую кислоту

Электронно-микроскопическое изучение препарата молекулярной конструкции, контрастированного 2% раствором фосфорно-вольфрамовой кислоты (ФВК), выявило наличие в образцах частиц округлой формы размером от 10 до 20 нм (рис. 8А). Характер взаимодействия с отрицательно заряженным контрастирующим веществом (ФВК) свидетельствует о наличии у этих частиц отрицательного заряда. После контрастирования уранилацетатом в препарате были обнаружены округлые наночастицы размером от 20 до 55 нм, окруженные контрастирующим веществом, иногда собранные в группы (рис. 8 Б, В).

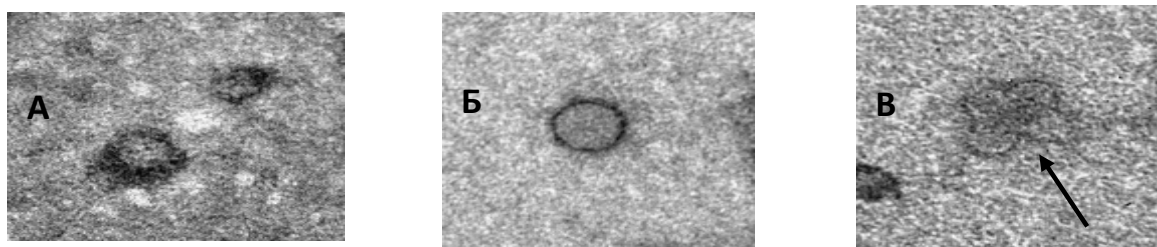


Рисунок 8. Снимки частиц, содержащихся в препарате молекулярной конструкции, несущей Дельтаферон и алендроновую кислоту. Контрастирование 2% раствором ФВК (А) и 0,5% раствором уранилацетата (Б, В). Стрелкой показано скопление нескольких наночастиц.

Экспериментальные данные, полученные в ходе оценки специфической противовирусной активности Дельтаферона в составе конъюгата или конструкции на культуре клеток MRC-5, представлены в таблице 3. Видно, что уровень специфической активности Дельтаферона незначительно снижен в конъюгате и полностью соответствует активности исходного белка в составе конструкции.

Таблица 3 - Показатели специфической активности Дельтаферона в составе конъюгата с декстраном и алендроновой кислотой и молекулярной конструкции на его основе

Препарат	Концентрация белка, мг/мл	Уровень противовирусной активности на клетках MRC-5	
		МЕ/мл	МЕ/мг
Дельтаферон, субстанция	1,02	$2 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^6$
Конъюгат Дельтаферон /декстран/АЛН	1,5	$1,9 \cdot 10^5$	$1,3 \cdot 10^5$
Молекулярная конструкция, содержащая Дельтаферон и АЛН	1,2	$2 \cdot 10^6$	$1,7 \cdot 10^6$

То есть, введение Дельтаферона в состав молекулярной конструкции с алендроновой кислотой не приводит к снижению его биологической активности, что свидетельствует о сохранении структурных свойств белка.

Исследование способности молекулярной конструкции, несущей Дельтаферон и алендроновую кислоту, связываться с костной тканью *in vitro*. В качестве модели костной ткани для изучения связывания и накопления конструкций был использован гидроксилapatит (ГАП), по своему составу и свойствам близкий к минеральному матриксу костной ткани.

Исследованию подвергались конъюгаты декстрана с Дельтафероном, алендроновой кислотой и спермидином и молекулярные конструкции, полученные на основе данных конъюгатов и dsРНК.

С целью определения сродства конъюгата декстрана с Дельтафероном, алендроновой кислотой и спермидином к гидроксилapatиту был проведен хроматографический анализ конъюгата, в сравнении со свободным Дельтафероном, на колонке с ГАП. Было установлено, что Дельтаферон в составе конъюгата с алендроновой кислотой обладает способностью сорбироваться на гидроксилapatите, также как Дельтаферон, что согласуется с литературными данными [122].

Существенные различия были обнаружены при исследовании процессов десорбции Дельтаферона в составе конъюгата и свободного белка. Было показано, что количественная десорбция интактного Дельтаферона может быть достигнута с помощью элюирующего раствора натрия хлорида с концентрацией соли $0,1 \pm 0,05$ М. В то же время для конъюгата декстрана с Дельтафероном, алендроновой кислотой и спермидином эта концентрация была в 3 раз выше ($0,3 \pm 0,05$ М натрия хлорида). Анализ кривых десорбции подтверждает факт более прочного удержания гидроксилapatитом конъюгатов декстрана с Дельтафероном, алендроновой кислотой и спермидином в сравнении с исходным белком (рис.10).

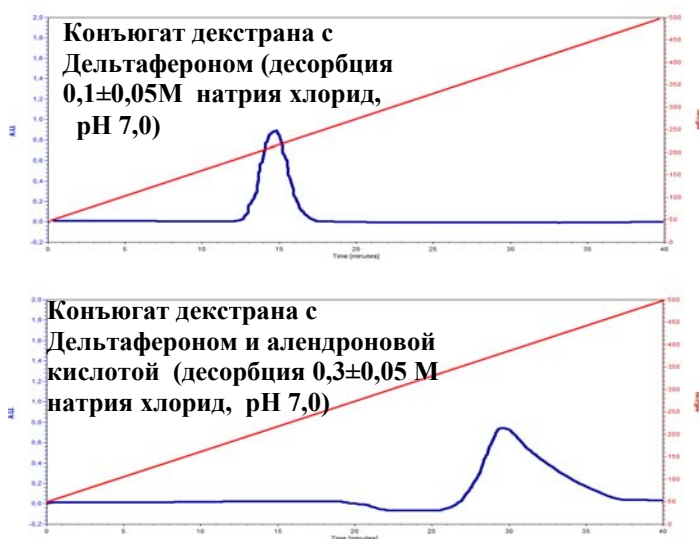


Рисунок 10. Влияние алендроновой кислоты в составе молекулярной конструкции, содержащей Дельтаферон и спермидин, на величину связывания с гидроксилapatитом

Исследование *противоопухолевой активности* конструкции, содержащей Дельтаферон и алендроновую кислоту, на экспериментальной модели костных метастазов, индуцированных введением клеток меланомы В16-F10, показало, что трехкратное введение конструкции в доз $5 \cdot 10^4$ МЕ/кг вызывало обширный некроз опухоли, занимавший до 88% площади метастаза. Полученные данные свидетельствуют о наличии у препарата выраженной противоопухолевой активности в отношении опухолевой ткани костных метастазов.

ВЫВОДЫ

1. Оптимизированы условия получения полисахаридной оболочки молекулярной конструкции. Установлено, что оптимальный диапазон соотношений концентраций периодат натрия/ декстран составляет от 10/1 до 75/1 (моль/моль); оптимальная степень окисления декстрана достигается при количестве внесенного периодата 25-50 молей на моль декстрана; оптимальное время конъюгирования - 60 мин; соотношение спермидин/декстран 10/1-15/1.

2. Установлено влияние количественного соотношения компонентов дсРНК и Дельтаферона, а также технологических параметров сборки на размер частиц молекулярной конструкции. Показано, что наиболее однородные сферические частицы размером порядка 200 нм формируются при соотношении дсРНК и Дельтаферона 1:120-150 (моль/моль) при медленном микродозированном внесении дсРНК в реакционную среду, содержащую конъюгат декстрана с Дельтафероном и спермидином.

3. Методом УФ и КД-спектрометрии доказано отсутствие конформационных перестроек во вторичной структуре белка и нуклеиновой кислоты в составе конструкции.

4. Дельтаферон в составе конструкции проявлял противовирусные свойства в культуре клеток L-68, обладал способностью повышать уровень интерферонов альфа и гамма крови, выживаемость и среднюю продолжительность жизни мышей, инфицированных вирусом гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2).

5. Выбран состав и технологическая схема получения интраназальной формы Дельтаферона в составе молекулярной конструкции, которые обеспечивают сохранность Дельтаферона в составе конструкции при температуре от 2 до 8 °С в течение не менее 20 месяцев.

6. Показано, что интраназальная форма Дельтаферона в составе молекулярной конструкции обладает повышенной специфической противовирусной активностью в культуре клеток L-68, способностью повышать уровень ИФН в ткани носоглотки, легких и сыворотке крови мышей и проявляет умеренно выраженные защитные свойства в отношении вируса гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2).

7. Разработан метод получения препарата Дельтаферона в составе молекулярной конструкции, содержащей в качестве векторной молекулы бифосфонат алендроновую кислоту. Выбрано соотношение алендроновая кислота/декстран (10/1), оптимальное для повышения тропности конструкции к костной ткани.

8. Методом электронной микроскопии подтверждено наличие в препарате округлых наночастиц размером 20-55 нм. Установлено, что включение Дельтаферона в состав конструкции не отражается на его структурных свойствах и специфической активности.

9. На экспериментальной модели костных метастазов, индуцированных введением клеток меланомы мышей B16-F10, показано, что Дельтаферон в составе конструкции с алендроновой кислотой, в дозе $5 \cdot 10^4$ МЕ обладал высокой противоопухолевой активностью, выразившейся в индукции обширного (до 88% площади) некроза ткани опухолевого метастаза.

Полученные результаты свидетельствуют о перспективности дальнейшей разработки новых лекарственных препаратов на основе аналога интерферона гамма Дельтаферона в составе средства доставки- молекулярной конструкции, обладающих противовирусным, иммуномодулирующим и противоопухолевым действием.

Разработанный методический подход может быть пригоден для получения препаратов и других терапевтических белков, экспонированных на поверхности молекулярной конструкции в сочетании с векторными молекулами, обеспечивающими их адресную доставку в патологический очаг.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

VPs	– бифосфонаты
ВПЧ	– вирусоподобная частица
ВПЧ–Дельтаферон	– Дельтаферон в составе вирусоподобной частицы
Дельтаферон	– аналог интерферона гамма
дсРНК	– двуспиральная рибонуклеиновая кислота
ед. акт.	– единицы активности
ИФН	– интерферон
ИФН- α	– интерферон альфа
ИФН- γ	– интерферон гамма
КД	– круговой дихроизм
МЕ	– международные единицы активности
мРНК	– матричная рибонуклеиновая кислота
Нм	– нанометры
ОП	– оптическая плотность
ОРВИ	– острые респираторные вирусные инфекции
ОРЗ	– острые респираторные заболевания
ПААГ	– полиакриламидный гель
ПВП	– поливинилпирролидон
ПЭГ	– полиэтиленгликолин
ПЭМ	– просвечивающая электронная микроскопия
УФ-спектроскопия	– ультрафиолетовая спектроскопия
ФСБ	– фосфатно-солевой буфер

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИММЕРТАЦИИ

Статьи в реферируемых научных журналах ВАК РФ:

1. **Иванова, О.С.** Исследование структурных характеристик, гранулометрического состава и биологических свойств молекулярной конструкции, содержащей аналог интерферона гамма. / **О.С. Иванова**, А.А. Ломзов, Г.М. Левагина, А.В. Батенева, М.О. Скарнович, М.А. Скарнович, Л.Н. Шишкина, В.И. Масычева, Е.Д. Даниленко // **Вестн. Биотехнол. и Физ.-Хим. Биол. им. Ю.А. Овчинникова**. - 2015. - Т.11, - № 4. - С. 15-20. Импакт - фактор РИНЦ 0,075.
2. **Коровина, О.С.** Исследование физико-химических свойств нового препарата дельтаферона в составе молекулярной конструкции. / **О.С. Коровина**, Д.В. Корнеев, Г.М. Левагина, М.П. Богрянцева, В.И. Масычева // **Биотехнология**. – 2012. - №2. – С. 73-77. Импакт- фактор РИНЦ 0,404.
3. **Коровина, О.С.** Иммуномодулирующие свойства наноконструкции, несущей аналог интерферона гамма. / **О.С.Коровина**, С.Г. Гамалей, А.В. Батенева, Д.В. Корнеев, Л.Д. Медикова, Г.М. Левагина, Е.Д. Даниленко, М.П. Богрянцева // **Вест. Урал. мед. академ. науки**. -2010. - №2\1 (29). – С.40. – (Тематич. вып. по аллергологии и иммунологии). Импакт - фактор РИНЦ 0,146.

4. Гамалей, С.Г. Влияние структурного аналога интерферона- гамма на уровень эндогенных интерферонов и пролиферацию спленоцитов мышей. / С.Г. Гамалей, Г.М. Сысоева, А.В. Батенева, Е.Д. Даниленко, **О.С. Коровина**, В.И. Масычева // **Вестн. Урал. мед. академ. науки.** – 2011. - №2/1(35). – Темат. вып. по аллергологии и иммунологии. - С. 20-21. Импакт - фактор РИНЦ 0,146.

5. Сысоева, Г.М. Исследование иммуномоделирующей активности аналога интерферона гамма на экспериментальной модели адьювантного артрита. / Г.М. Сысоева, Е.Д. Даниленко, **О.С. Иванова**, **В.И. Масычева** // «Рос. науч. форум на Урале», 23-25 окт. 2014г., Екатеринбург // **Рос. иммунол. журн.** [электрон. ресурс]. - 2014. - Т.8(17), №3. - С.737- 740. – 1 электрон. диск. Импакт - фактор РИНЦ 0,447.

6. Сысоева, Г.М. Сравнительное изучение влияния препаратов интерферона-гамма на функциональную активность макрофагов. / Г.М. Сысоева, Е.Д. Даниленко, Т.Б. Медведева, **О.С.Коровина**, Г.М. Левагина, В.И. Масычева // **Вестн. Урал. мед. академ. науки.** – 2011. - №2/2(35). – Темат. вып. по аллергологии и иммунологии. - С. 68-69. Импакт - фактор РИНЦ 0,146.

Статьи, опубликованные в других изданиях:

1. **Korovina, O.S.** Studies on the physicochemical properties of the new preparation deltaferon as a component of a molecular construct / **O.S. Korovina**, D.V. Korneev, G.M. Levagina, M.P. Bogryantseva, V.I. Masycheva // *Applied Biochemistry and Microbiology.* - 2013. – V 49, N 7. – P.660-663.

2. **Коровина, О.С.** Разработка и исследование свойств препарата на основе аналога интерферона-гамма. [Электронный ресурс]. / **О.С.Коровина**, Д.В. Корнеев, Г.М. Левагина, Л.Д. Медикова, М.П. Богрянцева, В.И. Масычева /Биотехнология и биомедицинская инженерия: Сб. тр. 3-й Всерос. науч.- практич. конф. с междунар. участием, посвящённой 75- летию Курского мед. ун-та/под ред. проф. В.А. Лазаренко [и др.] – Курск, 2010. - С. 95- 97.

Тезисы конференций

1. **Коровина, О.С.** Создание молекулярной конструкции, содержащей аналог интерферона гамма и двуспиральную РНК, как средства стимуляции иммунитета. / **О.С. Коровина**, А.А. Марышева, Л.Р. Лебедев, Г.М. Сысоева, С.Г. Гамалей, Г.М. Левагина, Е.Д. Даниленко, В.И. Масычева // Междунар. конгресс по реабилитации в медицине и иммунореабилитации, 14-й, Тель-Авив, Израиль, 17-20 окт. 2009г.: Тез. докл. // Междунар. ж. по иммунореабилитации = *International journal on immunorehabilitation.* – 2009. - Т.11, №1.- С. 49.

2. Марышева, А.А. Получение и характеристика нанопрепарата - аналога интерферона-гамма. / А.А. Марышева, **О.С.Коровина** // *Rusnanotech-09: междунар. форум по нанотехнологиям*, 6-8 окт. 2009 г.: Сб. тез. докл. 2-го междунар. конкурса науч. работ молодых учёных в области нанотехнологий. – [М., 2009]. – С.865 – 866.

3. Марышева, А.А. Создание и характеристика наночастицы, содержащей мутантный интерферон-γ. / А.А. Марышева, **О.С.Коровина** // «Молекулярная медицина и биобезопасность». 6-я междунар. конф., 10-11 нояб. 2009г., Москва: Сб. материалов, науч. программа, тез.- М., 2009. - С.155-156.

4. **Коровина, О.С.** Характеристика показателей устойчивости компонентов нанобиопрепарата, содержащего аналог интерферона – гамма. / **О.С. Коровина**, А.А. Назарова, Г.М. Левагина, В.И. Масычева // «Биотехнология: состояние и перспективы развития: VI Московский междунар. конгресс, 21 – 25 марта 2011г.:Материалы конгресса – М., 2011. – Ч.1. – С.427-428. – То же на англ. языке. – С 428.

5. Масычева, В.И. Разработка нового противовирусного средства на основе стимуляторов неспецифической резистентности. / В.И. Масычева, Е.Д. Даниленко, Г.М. Левагина, М.П. Богрянцева, **О.С. Иванова**, Д.В. Корнеев, Г.М. Сысоева, С.Г. Гамалей, А.В. Батенева // *Диагностика и профилактика инфекционных болезней: Науч. – практич. конф. (Новосибирск, 26 – 28 сент. 2013г.): Материалы конф.* – Новосибирск, 2013. – С. 194 – 195.

6. Сысоева, Г.М. Иммуномодулирующие эффекты аналога интерферона гамма при интраназальном применении. / Г.М. Сысоева, В.И. Масычева, Е.Д. Даниленко, **О.С.Иванова**, Г.М. Левагина // Объединённый иммунологический форум, Н.Новгород, 30 июня- 5 июля 2013г.: Тез. докл. // Рос. иммунол. журн. – 2013. –Т.7(16), №2/3. – С.146.
7. Иванова, О.С. Разработка и исследование свойств интраназальной формы аналога интерферона гамма. / **О.С. Иванова**, Г.М. Левагина, С.Г. Гамалей, А.В. Батенева., М.П. Богрянцева, Е.Д. Даниленко // Диагностика и профилактика инфекционных болезней на современном этапе: материалы науч.-практ. Конф., Новосибирск, Россия, 26-27 сент. 2016 г. – Новосибирск, 2016. - С.198-199.

Работа выполнена в отделе разработки технологии и пилотного производства биопрепаратов Института медицинской биотехнологии филиала ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора (зав. отделом к.б.н. Г.М. Левагина) в рамках отраслевой программы «Научные исследования и разработки с целью обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия и снижения инфекционной заболеваемости в Российской Федерации» (на 2011-2015 гг.) и Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014 - 2020 годы», Соглашение о предоставлении субсидии № 14.604.21.0061 от 27.06.2014 по теме «Разработка адресного терапевтического средства для лечения костных метастазов опухолей на основе бифосфонатов и белков-цитокинов» (уникальный идентификатор прикладных научных исследований (проекта) RFMEFI60414X0061). Электронно-микроскопические исследования проведены в отделе микроскопических исследований ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (зав. отделом О.С. Таранов), исследование биологических свойств препаратов - в отделе биологических исследований ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (зав. отделом С.Г. Гамалей), отделе профилактики и лечения особо опасных инфекций ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (зав. отделом д.б.н. Л.Н. Шишкина), отделе биологического и технологического контроля (зав. отделом к.б.н. М.П. Богрянцева. Работа по оптимизации условий активации декстрана и образования его конъюгатов со спермидином проводилась при теоретической поддержке автора молекулярной конструкции д.м.н. Лебедева Л.Р.

Автор выражает благодарность коллегам, принимавших участие в проведении данных исследований и внедрении их результатов.