

**Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и  
благополучия человека**  
**Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный  
центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора**

*На правах рукописи*

**Иванова Ольга Сергеевна**

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

**03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)**

**Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук**

**Научный руководитель  
кандидат биологических наук  
Левагина Галина Михайловна**

**Кольцово - 2016**

## СОДЕРЖАНИЕ

	Стр.
Перечень сокращений и условных обозначений.....	4
Введение.....	5
Глава 1. Обзор литературы.....	17
1.1 Основные типы интерферонов. Особенности биологического действия интерферона гамма .....	17
1.2 Биотехнологические способы получения интерферонов.....	22
1.3 Лекарственные препараты интерферонов. Виды лекарственных форм.....	25
1.4 Современные подходы к разработке средств доставки терапевтических белков .....	30
1.5 Технологические аспекты получения препаратов интерферонов для непарентерального применения .....	34
1.6 Препараты интерферонов для противоопухолевой терапии .....	39
Глава 2. Материалы и методы.....	44
Глава 3. Результаты и обсуждение.....	56
3.1. Разработка технологии получения препаратов на основе аналога интерферона гамма Дельтаферона для противовирусной терапии.....	56
3.1.1. Разработка технологии получения препарата на основе аналога интерферона гамма в составе молекулярной конструкции для системного применения.....	56
3.1.1.1 Выбор соотношения компонентов конъюгата Дельтаферона с декстраном и условий проведения реакции конъюгирования.....	58
3.1.1.2 Влияние количественного соотношения компонентов конструкции дсРНК и Дельтаферон на образование частиц.....	64
3.1.1.3 Влияние технологических параметров – скорости перемешивания и внесения дсРНК на размер частиц молекулярной конструкции.....	66
3.1.1.4 Исследование физико-химических свойств препарата молекулярной конструкции, содержащей Дельтаферон .....	69
3.1.1.5 Исследование биологических свойств молекулярной конструкции, содержащей Дельтаферон.....	79
3.1.1.5.1 Исследование иммуномодулирующей активности препарата молекулярной конструкции.....	79
3.1.1.5.2 Исследование противовирусной активности препарата молекулярной конструкции.....	81
3.1.2 Разработка интраназальной формы противовирусного препарата на основе аналога интерферона гамма в составе молекулярной конструкции.....	83
3.1.2.1 Выбор рецептуры и условий получения интраназальной формы Дельтаферона в составе конструкции.....	83

3.1.2.2 Исследование биологических свойств интраназальной формы Дельтаферона в составе конструкции.....	87
3.1.2.2.1 Исследование иммуномодулирующих свойств интраназальной формы препарата.....	87
3.1.2.2.2 Исследование противовирусной активности интраназальной формы препарата на модели гриппозной инфекции.....	89
3.2. Разработка технологии получения препарата на основе аналога интерферона-гамма Дельтаферона и алендроновой кислоты в составе молекулярной конструкции для лечения костных метастазов опухолей	91
3.2.1 Отработка условий получения конъюгата Дельтаферона и алендроновой кислоты с декстраном и сборки молекулярной конструкции.....	91
3.2.2 Исследование физико-химических свойств препарата молекулярной конструкции, содержащей Дельтаферон и алендроновую кислоту.....	93
3.2.3 Исследование способности молекулярной конструкции, несущей Дельтаферон и алендроновую кислоту, связываться с костной тканью <i>in vitro</i> .....	97
3.2.4 Исследование противоопухолевой активности конструкции, содержащей Дельтаферон и алендроновую кислоту, на экспериментальной модели костных метастазов.....	100
Заключение.....	103
Выводы.....	105
Список использованной литературы.....	108
Список опубликованных работ по теме диссертации.....	128
Приложения.....	131

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

ВРs	– 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- $\alpha$	– интерферон альфа
ИФН- $\gamma$	– 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	– полиэтиленглиокин
ПЭМ	– просвечивающая электронная микроскопия
УФ-спектроскопия	– ультрафиолетовая спектроскопия
ФСБ	– фосфатно-солевой буфер

## ВВЕДЕНИЕ

Разработка препаратов для борьбы с инфекционными и онкологическими заболеваниями является актуальной задачей здравоохранения. Это связано, прежде всего, с высокой степенью распространенности этих заболеваний. По данным ВОЗ, грипп и вирусные ОРЗ ежегодно поражают до 25% населения земного шара. Кроме того, по мнению экспертов Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ), существует реальная опасность того, что мутация вирусов животных и птиц приведет к появлению штаммов, способных поражать людей, что в конечном итоге, может привести к гибели около 150 миллионов жителей Земли [90]. Согласно статистическим данным, число заболевших гриппом и другими острыми респираторными вирусными инфекциями (ОРВИ) в России в 2015 году составило более 30 млн. человек, что превышает 90% общей инфекционной заболеваемости населения.

Основными средствами профилактики и лечения гриппа и ОРВИ в настоящее время являются вакцинация и специфическая противовирусная терапия. Однако известно, что вакцинопрофилактика не всегда способствует формированию выраженного вакцинального ответа и как следствие, не обеспечивает эффективную защиту от заражения. Применение специфических противовирусных препаратов нередко приводит к формированию к ним невосприимчивости вирусов, что существенно ограничивает продолжительность их применения [60, 76].

Еще более серьезной проблемой являются онкологические заболевания. В большинстве стран мира наблюдается стабильный рост распространенности злокачественных новообразований и смертности от них. Аналитики прогнозируют, что к 2030 г. уровень смертности от онкологических заболеваний в мире составит до 13 млн. человек, то есть, увеличится за два десятилетия более, чем на 70 % [22,23].

Россия входит в первую десятку стран мира по заболеваемости раком. Причем, по данным статистики, до 60% из впервые выявленных случаев злокачественных новообразований в нашей стране представляют собой запущенные формы заболевания с очагами метастазирования [11]. Скелет является третьей по частоте локализацией метастатического поражения после легких и печени. Лечение метастазов опухолей в костную систему в настоящее время основано на использовании цитостатиков, эффективность которых невелика в силу особенностей локализации очагов и их труднодоступности. Кроме того, серьезной проблемой цитостатической терапии является выраженная токсичность препаратов вследствие невысокой селективности, развитие миело- и иммуносупрессии при длительном применении, возникновение вторичных опухолей.

Отсутствие выраженного защитного эффекта вакцинопрофилактики против вирусных заболеваний, возникающая резистентность к химиопрепаратам, а также недостаточная эффективность противовирусных и противоопухолевых лекарственных средств, в частности, препаратов для лечения метастазирующих злокачественных опухолей, обуславливают необходимость развития исследований, направленных на создание новых лекарственных средств для противовирусной и противоопухолевой терапии.

В связи с этим, все большую актуальность приобретают способы лечения с помощью стимуляторов системы неспецифической резистентности, к которым относятся интерфероны и их индукторы. Использование интерферонов для лечения заболеваний различной этиологии имеет существенные преимущества по сравнению с традиционными антибиотиками и химиотерапевтическими препаратами за счет широкого спектра действия, обусловленного многосторонней активацией иммунной системы [7].

Среди разных типов интерферонов особый интерес представляет интерферон гамма (ИФН-гамма, ИФН- $\gamma$ ), который в настоящее время рассматривается в качестве перспективного эффективного компонента

лекарственных средств, предназначенных для лечения вирусных, онкологических и аутоиммунных заболеваний [146, 111, 118, 94, 119, 152, 147]. Известно, что ИФН-  $\gamma$  обладает наиболее мощным среди интерферонов иммунорегуляторным действием, является индуктором и регулятором защитных реакций организма в отношении внутриклеточных бактерий, паразитов и вирусов [111]. Интерес к данному цитокину как противоопухолевому средству связан с его способностью подавлять рост опухолевых клеток, усиливать противоопухолевое действие цитотоксических лимфоцитов, ингибировать ангиогенез. Учитывая, что ИФН-  $\gamma$  принимает участие в регуляции процессов ремоделирования кости, обеспечивая поддержание баланса между активностью остеобластов и остеокластов [130, 28, 36, 92, 37, 82, 83] и, следовательно, может снижать вызванную опухолью резорбцию костной ткани, этот белок привлекателен как активный компонент противоопухолевых средств лечения костных метастазов.

В настоящее время существует несколько препаратов рекомбинантного интерферона гамма, прошедших клиническую апробацию и разрешенных к применению в медицинской практике: Актиммьюн (США), Имукин (Германия), Мега-Д-гамма-интерферон (Германия-Ирландия), Гаммаферон (Россия), Ингарон (Россия) для системного и интраназального введения.

Однако наряду с достоинствами этих препаратов, которыми являются высокая терапевтическая эффективность и хорошая переносимость, можно выделить и ряд недостатков. Так, известно, что препараты рекомбинантного ИФН-  $\gamma$  быстро разрушаются в организме под действием протеолитических ферментов [152], что требует многократных повторных инъекций для поддержания эффективных доз. Кроме того, получение генно-инженерного ИФН-  $\gamma$  отличается сложной технологией. Это связано с тем, что биосинтез белка в бактериальных клетках-продуцентах происходит в форме нерастворимых агрегатов, так называемых «тельцах включения», что приводит к существенному снижению выхода целевого продукта,

увеличению себестоимости препарата из-за значительных временных и материальных затрат.

Для решения проблемы протеолитической лабильности ИФН-  $\gamma$  и улучшения продуктивности технологии его получения в ГНЦ ВБ «Вектор» были проведены работы по конструированию аналогов ИФН-  $\gamma$  методами точечного мутагенеза. В результате этих работ был получен мутантный аналог интерферона гамма 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 [128]. Был создан штамм-продуцент Дельтаферона, технология получения высокоочищенного белка, обеспечивающая повышение выхода целевого продукта в четыре раза в сравнении с ИФН-  $\gamma$  [129].

Среди иных подходов повышения стабильности и эффективности препаратов интерферонов можно выделить разработку систем доставки с использованием носителей различной природы, в виде композиций, наноконструкций различного типа, сочетанное применение препаратов синергидного действия, изменение системного пути доставки на непарентеральный (накожный, интраназальный, аэрозольный) [48, 14, 49, 97, 63, 50, 121, 143, 147, 28, 91, 21, 79, 78].

В качестве систем доставки при разработке новых лекарственных препаратов широко используются неорганические частицы (нанокристаллы, наномагнитные частицы и их конъюгаты) [70]. Однако при несомненных достоинствах применения этих носителей главным их недостатком является отсутствие в организме систем биodeградации и возможность их кумуляции с развитием отсроченных токсических эффектов. С этой точки зрения более перспективны биodeградируемые полимерные наночастицы: липосомы, мицеллы, дендримеры, виросомы и другие молекулярные наноконструкции [28, 79, 78, 91, 21].



В ГНЦ ВБ «Вектор» разработана уникальная транспортная система, представляющая собой молекулярную конструкцию, компонентами которой являются природные полимеры (нуклеиновые кислоты, полисахариды, полиамин) [142]. Конструкция представляет собой наночастицу, которая содержит в центральной части двуспиральную дрожжевую РНК (дсРНК), покрытую оболочкой из спермидина и декстрана, удерживаемого за счет ионного взаимодействия между положительно заряженным спермидином и отрицательно заряженной дсРНК, а на поверхности-молекулы белка. Преимуществом данной конструкции перед известными средствами доставки является биodeградируемость, наноразмерность, наличие у компонентов конструкции самостоятельной биологической активности для обеспечения синергидного эффекта [122].

Как было показано ранее, введение в состав данной конструкции белка-цитокина (фактор некроза опухоли альфа человека) приводит к повышению накопления белка в ткани опухоли и усилению его противоопухолевой активности [107]. Достоинством конструкции является возможность введения в оболочку факторов тропности с целью повышения накопления белков в патологическом очаге.

В настоящее время технология получения молекулярной конструкции для транспортировки терапевтических белков разработана только в отношении кислых белков (ФНО- $\alpha$ ). Учитывая достоинства ИФН- $\gamma$  как универсального средства лечения вирусных заболеваний и возможность стабилизации его свойств в составе средства доставки, представляется целесообразной разработка процесса получения молекулярной конструкции, содержащей аналог ИФН-  $\gamma$  Дельтаферон.

Наряду с инъекционной формой противовирусного препарата, предназначенной для стимуляции системной противовирусной реакции, несомненный интерес представляют лекарственные формы для непарентерального применения. В случае препаратов для лечения гриппа и ОРВИ - интраназальные формы, способные обеспечить повышенную

концентрацию действующего начала в «воротах инфекции» и как следствие, его высокую эффективность при минимальном воздействии на организм. В связи с этим, наряду с разработкой инъекционной формы, актуальна разработка технологии получения интраназальной формы аналога ИФН- $\gamma$  Дельтаферона в средстве доставки.

Учитывая остроту проблемы, которая заключается в способности злокачественных новообразований к метастазированию, актуальным является решение задач, связанных с доставкой противоопухолевых агентов не только к первичной опухоли, но и метастазам, где достигнут существенно меньший прогресс.

В последнее время в качестве средства направленной доставки в кость лекарственных веществ, все больший интерес вызывают бифосфонаты (бисфосфонаты, BPs), синтетические соединения, структурно относящиеся к пирофосфатам [10]. Учитывая противоопухолевые свойства ИФН- $\gamma$  и его способность активировать процессы ремоделирования кости, представлялось обоснованным разработать технологию получения молекулярной конструкции, содержащей Дельтаферон в качестве действующего начала и бифосфонат в качестве векторной молекулы, для лечения костных метастазов.

### **Цель и задачи 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 практическая значимость работы**

1. 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.

2. 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.

3. 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.

4. 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.

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

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

8. 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- $\alpha$  в тканях носоглотки, легких и крови мышей и

выживаемость животных, инфицированных вирусом гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2).

9. 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.

10. 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.

### **Теоретическая и практическая значимость**

На примере аналога ИФН- $\gamma$  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.

### **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**

Материалы и результаты исследований по теме диссертации были представлены на следующих российских и международных конференциях и конкурсах: Международный форум по нанотехнологиям «Rusnanotech-09» и 2-й международный конкурс научных работ молодых учёных в области нанотехнологий, 6-8 октября 2009 г., г. Москва; 6-я международная конференция «Молекулярная медицина и биобезопасность», 10-11 ноября 2009 г. г.Москва; 14-ый Международный конгресс по реабилитации в медицине и иммунореабилитации, г.Тель-Авив, Израиль, 17-20 октября 2009 г.; Третья Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Биомедицинская инженерия и биотехнология», 7–8 июня 2010 г., г. Курск; VI Московский международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития», 21 – 25 марта 2011 г., г. Москва; Российский научный форум на Урале, 23-25 октября 2014 г., г.Екатеринбург; Научно–практическая конференция «Диагностика и профилактика инфекционных болезней», 26–28 сент. 2013 г., г. Новосибирск; Объединённый иммунологический форум, 30 июня- 5 июля 2013 г., г. Н.Новгород; Конференция молодых ученых и специалистов ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор», 10 октября 2011 г., р.п. Кольцово (лауреат конкурса молодых ученых и специалистов им. Н.К. Кольцова за лучшую научную работу); Научно–практическая конференция «Диагностика и профилактика инфекционных болезней на современном этапе», 26-27 сентября 2016 г., г.Новосибирск.

### **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*.

### **Публикации результатов исследования**

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

### **Структура и объем работы**

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

### **Автор выражает благодарность**

к.б.н. Е.Д. Даниленко, к.б.н. Г.М. Левагиной, с.н.с. С.Г. Гамалей, с.н.с. Г.М. Сысоевой, д.б.н. Л.Н. Шишкиной, д.б.н. Е.И. Рябчиковой, к.б.н. М.П. Богрянцевой, Б.Н. Зайцеву, Д.В. Корнееву, А.А. Ломзову за методическое руководство, огромную помощь в практической работе и изучении биологических свойств исследуемых объектов; д.м.н. Л.Р. Лебедеву за теоретическую поддержку ряда проводимых исследований.



## Глава I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### ИНТЕРФЕРОН ГАММА: ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ПОЛУЧЕНИЮ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ И ПЕРСПЕКТИВЫ КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

#### 1.1 Основные типы интерферонов. Особенности биологического действия интерферона гамма

Интерфероны (ИФН) - мультигенное семейство индуцибельных белков-цитокинов, открытых в конце 50-х годов английским вирусологом Аликом Айзексом и его швейцарским аспирантом Джином Линденманном в связи со способностью интерферонов ингибировать размножение вирусов и защищать организм от вирусной инфекции. За время, прошедшее со времени открытия интерферонов, существенно расширились представления как о белках, входящих в состав данного семейства, так и их биологических свойствах.

На начальном этапе изучения были выделены два типа интерферонов [75]. Интерфероны I типа или «вирусные» интерфероны - гетерогенное подсемейство, отличительной чертой которого является выраженная противовирусная активность и способность к экспрессии под действием индуцирующего стимула в процессе вирусной инфекции. До недавнего времени к первому типу относили три вида интерферонов: ИФН- $\alpha$  (лейкоцитарный) с многочисленными (более 20) субтипами, ИФН- $\beta$  (фибробластный) и ИФН- $\omega$ . В последние десять лет семейство ИФН I типа значительно расширилось и сейчас включает еще и вновь открытые виды ИФН ( $\kappa$ -,  $\varepsilon$ -,  $\tau$ -,  $\delta$ -) [29, 67, 43]. Интерфероны II типа представлены одним белком, ИФН- $\gamma$ , известным как «иммунный». В отличие от ИФН I типа, ИФН- $\gamma$  индуцируется митогенными или антигенными стимулами [46]. Не так давно открытое семейство ИФН III типа или ИФН-подобных белков включает ИФН- $\lambda$  человека и мышинный ИФН лимитин. Эти белки имеют структурное сходство как с ИФН I типа, так и белками семейства IL-10, и

также обладают противовирусными свойствами [2]. Структурные характеристики разных типов интерферонов и их рецепторов, особенности структуры и локализации кодирующих их генов, особенности продукции разными типами клеток и биологического действия подробно описаны в ряде обзорных статей [30, 72, 16].

Многообразие биологического действия интерферонов послужило основанием для разработки на их основе целого ряда противовирусных и иммуномодулирующих лекарственных препаратов. Особое внимание среди белков семейства в силу широты и многообразия биологических свойств привлекает иммунный интерферон ИФН- $\gamma$ . Помимо присущей всем интерферонам противовирусной активности, ИФН- $\gamma$  отличается мощным иммуномодулирующим действием, обладает антипролиферативными и апоптогенными свойствами, что определяет его привлекательность как противовирусного и противоопухолевого средства.

#### *Имуномодулирующие свойства ИФН- $\gamma$*

Наиболее важное отличие от других интерферонов ИФН- $\gamma$  заключается в иммуномодулирующих свойствах этой молекулы. ИФН- $\gamma$  является одним из ключевых звеньев, связывающих факторы врожденного и приобретенного иммунитета, поскольку вырабатывается НК-клетками во всем их многообразии (легочными НК-клетками, несущими рецептор хемокина CXCR3 и CD56bright НК-клетками) и дифференцированными Т-клетками адаптивного иммунного ответа CD4+ и CD8+ [27, 80, 35, 5].

ИФН- $\gamma$  отличается самым мощным среди интерферонов стимулирующим действием на клетки-фагоциты: активирует фагоцитарную функцию макрофагов [80], повышает секрецию активных соединений кислорода и азота моноцитами периферической крови [101], участвует в запуске экспрессии антигенов I и II классов главного комплекса гистосовместимости [8, 93] и Fc-рецептора иммуноглобулинов на моноцитах [40, 33]. ИФН- $\gamma$  воздействует на процессинг и представление антигенных пептидов, модулируя экспрессию клеточных компонентов протеасом,

которые производят пептиды для взаимодействия с молекулами I класса ГКГС [8].

Введение ИФН- $\gamma$  приводит к усилению экспрессии на клетках рецепторов (FeR, ConAR, цитокинов, гормонов), синтеза цитокинов и хемокинов [61, 100], увеличению концентрации бета-2 микроглобулина в сыворотке крови [53, 19, 3]. Этот цитокин повышает активность натуральных киллеров, важного компонента противовирусной защиты [110].

ИФН- $\gamma$  модулирует как клеточный, так и гуморальный иммунный ответ, опосредованный, соответственно, Th1-клетками и Th2-клетками, через активирующее воздействие на дифференциацию наивных Т-лимфоцитов в Th1 или в Th2 клетки [7]. Есть данные о способности ИФН- $\gamma$  к активации Т-хелперов и Т-цитотоксических лимфоцитов [47, 34], а также стимуляции дифференцировки В-клеток для продукции IgG [120].

Описанные иммуномодулирующие свойства ИФН- $\gamma$  позволяют заключить, что этот цитокин является ключевым медиатором вирус-специфичного клеточного иммунитета [32, 64].

### ***Противовирусные свойства ИФН- $\gamma$***

Механизмы противовирусного действия ИФН- $\gamma$  до конца не изучены, однако подтверждена его способность вызывать изменение поверхности клеточных мембран, что приводит к блокированию прикрепления и внедрения вирусной частицы; повышать экспрессию и активировать 2',5'-олигоденилатсинтазу, РНКазу L и протеинкиназу, результатом чего является ингибирование репликации вирусных РНК и ДНК, транскрипции и трансляции вирусных белков [15].

Несмотря на то, что в отношении ряда вирусов ИФН- $\gamma$  уступает по эффективности ИФН- $\alpha$  или  $\beta$ , имеются сведения о вирусных инфекциях, где эффект ИФН- $\gamma$  был более выраженным. Так, например, ИФН- $\gamma$  оказался эффективнее ИФН- $\alpha$  в отношении вируса простого герпеса (HSV) на клетках роговицы человека или клетках Vero [85].

Спектр вирусных инфекций, подверженных воздействию ИФН- $\gamma$ , довольно обширен. Противовирусная эффективность белка продемонстрирована в отношении вирусов генитального герпеса [126], цитомегаловируса [69], вируса гриппа и ряда других вирусов.

Существуют данные о важной роли ИФН- $\gamma$  в формировании противоинфекционной устойчивости к ортопоксвирусам. Так, авторами работы [12] было показано, что мыши C57Bl/6, отличающиеся высоким уровнем продукции ИФН- $\gamma$ , ФНО и интерлейкина 2 в процессе активации цитотоксических Т- лимфоцитов при заражении вирусом экстремелии, более устойчивы к вирусному воздействию, по сравнению с мышами линии BALB/c или A/J, которым свойственно развитие иммунного ответа по второму типу и слабый ответ цитотоксических лимфоцитов на заражение. Это позволило авторам сделать заключение о том, что существует выраженная связь между ранней продукцией цитокинов, особенно ИФН- $\gamma$ , типом клеточного иммунного ответа и тяжестью инфекции, вызванной вирусом экстремелии. Корреляция между типом ответа Т-клеточного звена (CD4+ и CD8+) и степенью защиты животных от вируса оспы коров (*vaccinia virus*) была отмечена в работе [96].

Защитный эффект ИФН- $\gamma$  у мышей, инфицированных интраназально вирусом оспы коров, проявлялся при введении препарата за сутки до заражения и в течение 3 суток после заражения и состоял в 90% выживаемости при полной гибели мышей контрольной группы в течение 21 дня. Применение ИФН- $\gamma$  через сутки после заражения снижало титры вируса в легких мышей в 1000 – 10000 раз, по сравнению с контролем, при этом действие ИФН- $\gamma$  проявлялось даже при введении препарата через 2-3 дня после инфицирования [52].

Показано, что препарат рекомбинантного ИФН- $\gamma$  в культуре клеток линии Vero проявлял выраженную противовирусную активность в отношении высокопатогенных штаммов вируса гриппа А/ H5N1 и А/Н5N2 [152].

Существующие литературные данные о противовирусной активности ИФН- $\gamma$  позволяют рассматривать этот белок как перспективное средство для лечения и экстренной профилактики инфекций, включая особо опасные.

### ***Противоопухолевые свойства ИФН- $\gamma$***

Помимо сведений о противовирусной активности ИФН- $\gamma$ , в литературных источниках встречаются данные о наличии у данного белка противоопухолевых свойств. Механизмы, лежащие в основе противоопухолевой активности цитокина, многообразны и включают как прямое воздействие на опухолевые клетки (антипролиферативное действие, индукция апоптоза злокачественных клеток) [120], так и опосредованное, в частности, ингибирование ангиогенеза опухолей и как следствие, замедление роста опухоли [6, 31].

Одним из ключевых механизмов противоопухолевого действия ИФН- $\gamma$  является стимуляция противоопухолевого иммунного ответа. Белок повышает фагоцитарную и метаболическую активность макрофагов [42], усиливает антитело - зависимую клеточную цитотоксичность макрофагов, натуральных киллеров и цитотоксических лимфоцитов [51, 71].

Интересно то, что наряду с иммуномодулирующими эффектами, лежащими в основе противовирусных и противоопухолевых свойств белка, ИФН- $\gamma$  принимает активное участие в регуляции физиологических процессов неинфекционной природы. Так, показано, что ИФН- $\gamma$  является одним из ключевых медиаторов ремоделирования кости, обеспечивая поддержание баланса между активностью остеобластов и остеокластов. Есть данные о том, что ИФН- $\gamma$  усиливает дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток в остеобласты [92], является ингибитором остеокластогенеза, снижает костную резорбцию [37]. В связи с этим, ИФН- $\gamma$  представляет интерес с точки зрения его использования в качестве активного компонента препаратов для лечения не только первичных опухолей, но и метастатических очагов, в частности, костных метастазов.

Таким образом, представленные выше данные позволяют заключить, что благодаря многообразию биологических эффектов ИФН- $\gamma$  может рассматриваться как перспективное действующее начало лекарственных препаратов для противовирусной и противоопухолевой терапии.

## **1.2 Биотехнологические способы получения интерферонов**

Следует отметить, что исторически первыми среди лекарственных препаратов интерферонов были препараты на основе интерферонов I типа. По технологии получения препараты ИФН можно разделить на природные (ИФН первого поколения) и рекомбинантные (ИФН второго поколения). Препараты интерферонов первого поколения получали выделением из лейкоцитов донорской крови путем обработки вирусами Сендай или ложной чумы кур (болезни Ньюкастла). Несмотря на высокую эффективность лейкоцитарного интерферона при лечении инфекций, вызванных вирусами гепатита, гриппа, неоплазий и др., широкое применение этих препаратов было ограничено из-за дефицитности сырья (донорская кровь) и высокой стоимости курсов лечения. Кроме того, серьезным ограничением использования природных ИФН является возможность их контаминации известными (вирусные гепатиты, ВИЧ) и неизвестными (прионами) инфекционными агентами, а также нестандартный состав, примеси неконтролируемых биологически активных веществ и балластных белков [86].

Разработка технологий получения рекомбинантных интерферонов, в частности, интерферонов альфа, с использованием методов генной инженерии была начата в конце 70-х годов. Исследования структуры интерферонов, их генов, клонирование генов интерферона в бактериальных клетках *Escherichia coli*, дрожжевых клетках *Saccharomyces cerevisiae* были проведены за очень короткий промежуток времени. В 1980 году была опубликована нуклеотидная последовательность генов лейкоцитарного ИФН

и появилось первое сообщение о синтезе ИФН- $\alpha$  человека в рекомбинантных клетках [62, 81, 95].

В марте 1981 года группы исследователей из Университета Вашингтона в Сиетле и компании Genentech получили лейкоцитарный интерферон, используя генетически измененные клетки дрожжей [109].

Важный шаг на пути к производству интерферона в достаточных количествах был сделан в 1982 году группой английских исследователей фармацевтического отделения компании «Империал кемикал индастрнз». На основании нуклеотидной последовательности кДНК-копий лейкоцитарного интерферона, опубликованной Вейсманном в 1980 г., ими был химически синтезирован фрагмент ДНК, кодирующий ИФН- $\alpha$ . Ген в составе плазмиды был введен в клетки двух видов бактерий, *Escherichia coli* и *Methylophilus methylotrophus*, в результате чего была получена экспрессия синтетического гена [106].

Две ведущие американские биотехнологические компании - фирмы “Biogen Inc.” и “Genentech Inc.” почти одновременно закончили разработку и получили патенты на препараты рекомбинантного интерферона альфа на основе *E.coli*, которые различались лишь по одной аминокислоте. Первые препараты рекомбинантного интерферона получены фирмами “Schering – Plough Corp.” (США) по лицензии “Biogen Inc.” (Интрон А) и “Hoffman – La Roche” (Швейцария) по лицензии “Genentech Inc” (Роферон А). В 1981 году эти препараты были переданы на клинические испытания, а в 1986 г. получили разрешение на применение в США и ФРГ.

Первые лабораторные бактериальные штаммы, экспрессирующие ИФН- $\alpha_2$ , были сконструированы в СССР в 1982 году с использованием двух различных подходов. Один из них был основан на получении кДНК гена ИФН- $\alpha_2$  человека и создании рекомбинантных ДНК-плазмид, которые содержали искусственные опероны, обеспечивающие экспрессию в бактериях полипептида, аналогичного природному лейкоцитарному. Второй подход состоял в создании искусственного гена ИФН- $\alpha_2$  путем химического

синтеза ДНК–фрагмента, кодирующего этот полипептид с последующим конструированием генетических оперонов, обеспечивающих его экспрессию в бактериальных клетках *E. coli* [115,116,117,154].

В 1984 году был получен еще один вариант штамма–продуцента на основе *Pseudomonas putida* VG – 84, обеспечивающий достаточно высокий уровень экспрессии ИФН- $\alpha$ 2 человека [87, 133].

В конце 90-х годов сотрудниками Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» был предложен способ получения и очистки рекомбинантного интерферона гамма (иммунного) человека, образующего в клетках *E. coli* нерастворимые тела включения. Технология получения рекомбинантного ИФН- $\gamma$  человека состояла из нескольких последовательных этапов.

1. Клетки штамма-продуцента разрушают обработкой ультразвуком в буфере, содержащем соли меди и цинка, которые ингибируют мембраносвязанную протеазу, способную деградировать интерферон. В качестве продуцента белка использовали штамм *E. coli* МН1 [pIFN- $\gamma$ -trp2], в котором экспрессия гена ИФН- $\gamma$  контролируется промотором триптофанового оперона *E.coli*. Уровень биосинтеза иммунного интерферона при конститутивном синтезе составлял порядка 10% от общего белка клетки и около 50% - при индукции триптофанового промотора.

2. Удаление примесных белков 4М раствором мочевины.

3. Извлечение ИФН- $\gamma$  из телец включения и ренатурация (солюбилизация в 8М мочеvine, содержащей хлористый литий).

4. Обессоливание растворенного рекомбинантного белка гель-фильтрацией.

5. Очистка ИФН- $\gamma$  ионообменной хроматографией с высокой ионообменной емкостью и высокой сорбционной способностью по белку, концентрирование диализом.

Однако внедрение в клиническую практику препаратов ИФН- $\gamma$ , полученных по вышеописанным технологиям, было значительно ограничено



их низкой производительностью. Накопление рекомбинантного белка при микробном синтезе в виде нерастворимых агрегатов, так называемых «телец включения», необходимость введения в схемы очистки стадий денатурации и ренатурации белка приводило к существенному снижению выхода целевого продукта, а также увеличению себестоимости препарата из-за значительных временных затрат.

Для того, чтобы избежать подобных проблем, в ГНЦ ВБ «Вектор» был создан аналог рекомбинантного ИФН- $\gamma$  человека – Дельтаферон, белок с улучшенными физико-химическими и биологическими свойствами. Дельтаферон имеет делецию 10 аминокислотных остатков на С – конце молекулы и замену кластера KRKR на KGSA [148]. Помимо способности к биосинтезу в прокариотических клетках в растворимой форме, в результате данной модификации молекула белка приобрела и дополнительное терапевтическое преимущество в виде повышенной устойчивости к протеолизу, обусловленное тем, что точечные мутации были введены в сайтах протеолиза. Данные структурные изменения позволили существенно повысить выход целевого продукта [137, 145, 149].

Технологические разработки конца 80-90 годов послужили основой для разработки лекарственных препаратов интерферонов, которые в настоящее время применяются в клинической практике либо находятся на стадии разработки.

### **1.3 Современные лекарственные препараты интерферонов. Лекарственные формы.**

Лекарственные препараты ИФН, применяемые в клинической практике, можно подразделить по типу действующего начала на две группы: природные и рекомбинантные. К первой группе относятся: Интерферон человеческий лейкоцитарный в жидком, сухом виде и в свечах (Россия), Лейкинферон (инъекции, свечи, мазь) (Россия), Лаферон (интраназальные капли) (Украина). Вторая, более представительная, группа включает:

Реаферон (Россия), интерферон человеческий рекомбинантный альфа-2, (инъекции) (Россия), Генферон, Виферон (интерферон человеческий рекомбинантный альфа-2 в виде интраназальной мази и свечей) (Россия), Реколин (интерферон человеческий рекомбинантный в виде интраназальной мази и инъекций) (Россия), Гриппферон (интраназальные капли) (Россия), Альфаферон (Италия), Вэллферон (Великобритания), Роферон (Швейцария) и др.

Данные по области применения препаратов интерферонов, составу и роли вспомогательных компонентов в составе лекарственных форм приведены в таблице 1.

Таблица 1 - Лекарственные препараты интерферонов, разрешенные для клинического применения

Наименование препарата, лекарственная форма	Состав	Характеристика компонентов	Область применения препарата
1	2	3	4
Виферон (мазь), свечи-виферон, Россия	В 1 г мази содержится: интерферона человеческого рекомбинантного альфа-2b 40000 МЕ; токоферола ацетат 0,002 г; ланолин безводный 0,34г; вазелин медицинский 0,45г.	действующее вещество  потенцирование действия ИФН формообразующие субстанции	Вирусные (в том числе, герпетические) поражения кожи и слизистых оболочек различной локализации.
Инфагель (мазь), Россия	В 1 г мази содержится: интерферона альфа рекомбинантного 10000 МЕ; алюминий (в виде гидроокиси) -14 мг; поливиниловый спирт - 75 мг; вода очищенная до 1 г	действующее вещество  компонент, для обеспечения мягкости, дисперсности, легкой отдачи ЛВ стабилизатор  дисперсная среда	Герпетические поражения кожи и слизистых - простой и опоясывающий герпес, рецидивирующий герпес лица, гениталий, гингивит, герпетический стоматит

Продолжение Таблицы 1

1	2	3	4
Реаферон (лиофилизированный порошок), Россия	Интерферона $\alpha$ -2 человеческого рекомбинантного 3000000 МЕ; альбумин человеческий донорский - 4,5 мг; натрия хлорид - от 8,09 до 9,07 мг; натрия гидрофосфата додекагидрат - от 2,74 до 3,82 мг; натрия дигидрофосфата дигидрат - от 0,37 до 0,58 мг	действующее вещество  стабилизатор  буферная смесь (стабилизатор)	Вирусные гепатиты В, С, D, вирусные, вирусно- бактериальные и микоплазменные менингоэнцефалиты, вирусные конъюнктивиты, кератоконъюнктивиты, кератиты, кератоувеиты, рак почки IV стадии, волосатоклеточный лейкоз, злокачественные лимфомы кожи, саркома Капоши, рак кожи (базальноклеточный и плоскоклеточный), кератоакантома, рассеянный склероз, лимфобластный лейкоз у детей, респираторный папилломатоз гортани.
Интрон А (лиофилизированный порошок), Бельгия	Интерферон альфа 2b человека рекомбинантный -10 млн. МЕ глицин натрия фосфат двухосновный и одноосновный -5,7 мг человеческий альбумин-4,5 мг	действующее вещество  буферная смесь  стабилизатор	Хронический гепатит В у взрослых пациентов без признаков декомпенсации функции печени; хронический гепатит С; хронический гепатит дельта; ларингопапилломатоз; волосатоклеточный лейкоз; хронический миелолейкоз; тромбоцитоз, обусловленный хроническим миелолейкозом и др.

Продолжение Таблицы 1

1	2	3	4
Гриппферон (раствор, капли в нос), Россия	В 1 мл раствора в виде капель для интраназального применения: интерферон человеческий рекомбинантный альфа - не менее 10000 МЕ; трилон Б - 0,5 мг; натрия фосфат двузамещённый -11,94 мг; калия фосфат однозамещённый -4,54 мг; натрия хлорид -4,1 мг; поливинилпирролидон -10 мг; полиэтиленгликоль 4000 -100 мг; вода для инъекций до 1 мл.	действующее вещество  стабилизатор буферная смесь  стабилизатор  пролонгатор стабилизатор  дисперсная среда	Профилактика и лечение гриппа и ОРВИ у детей и взрослых.
Локферон (лиофилизированный порошок), Украина	Интерферон человеческий, лейкоцитарный очищенный концентрированный- $1 \cdot 10^6$ МЕ; лактоза-80г; сахароза-18г	действующее вещество  наполнитель стабилизатор	Герпетические язвы роговицы; эпидемические и геморрагические кератоконъюнктивиты и другие поражения глаз; вирусные респираторные инфекции
Авонекс (лиофилизированный порошок), Франция	Интерферон бета-1а рекомбинантный – 6 000 000 МЕ; человеческий сывороточный альбумин-15 мг натрия хлорид -5,8 мг натрия дифосфат-5,7 мг натрия монофосфат-1,2 мг	действующее вещество  стабилизатор  стабилизатор буферная смесь	Для лечения рецидивирующего рассеянного склероза
Вэллферон (раствор для инъекций), Великобритания	Интерферона альфа- $n_1$ - 3 млн. МЕ; человеческий альбумин в трис-глициновом буфере до конечной концентрации протеина 1,5 мг/мл	действующее вещество стабилизатор стабилизатор	Волосатоклеточный лейкоз, хронический гепатит В или С, рак почки (с метастазами), миелолейкоз (хроническая фаза), рефрактерная форма остроконечной кондиломы

Продолжение Таблицы 1

1	2	3	4
Роферон (раствор для инъекций), Швейцария	Интерферона альфа-2а-3 млн.МЕ;  аммония ацетат-1,8 г; натрия хлорид-7,5 г; бензиловый спирт-1,5 г; полисорбат 80-0,01 г; натрия гидроксид-0,0001 г; вода для инъекций до 1 мл	действующее вещество  стабилизатор стабилизатор стабилизатор солюбилизатор стабилизатор дисперсная среда	Хронический активный гепатит В и С у взрослых, волосатоклеточный лейкоз, миеломная болезнь, кожная Т-клеточная лимфома, саркома Капоши у больных СПИД без анамнестических указаний на оппортунистические инфекции
Генферон, суппозитории вагинальные/ректальные, Россия	Интерферон альфа-2b-250000/500000/1000000МЕ; таурин – 0,01 г; бензокаин-0,055 г; декстран 60000- 0,015 г; макрогол 1500 -0,124 г; полисорбат 80- 0,033 г; эмульгатор Т2- 0,132 г; натрия гидроцитрат – 0,0001 г; кислота лимонная – 0,0015 г; вода очищенная- 0,066 г; твердый жир- до 1 г	действующее вещество стабилизатор стабилизатор стабилизатор стабилизатор стабилизатор солюбилизатор стабилизатор  стабилизатор  дисперсная среда формообразующая	Инфекционно-воспалительные заболевания урогенитального тракта — генитальный герпес, хламидиоз, уреаплазмоз, микоплазмоз, гарднереллез, трихомоноз, папилломавирусная инфекция, бактериальный вагиноз, эрозия шейки матки, цервицит, вульвовагинит, простатит, уретрит, баланит, баланопостит; острый бронхит.
Альфатрон, лиофилизат для приготовления раствора для интраназального применения	Интерферон альфа-2b человеческий рекомбинантный-6 млн МЕ полиглюкин – 0,015 мг натрия хлорид-5,8мг натрия фосфат однозамещенный и двузамещенный-5,7 мг	действующее вещество  стабилизатор буферная смесь	Противовирусное, противоопухолевое средство
Ингарон, лиофилизат для приготовления раствора для внутримышечного и подкожного введения, Россия	Интерферон гамма - 100000 МЕ; маннит -0,05 г.	действующее вещество наполнитель	Лечение хронического вирусного гепатита С, хронического вирусного гепатита В, ВИЧ/СПИД инфекции, туберкулеза легких в комплексной терапии

Как видно из приведенной таблицы, препараты ИФН представлены разными типами лекарственных форм, применяются для лечения широкого спектра вирусных инфекций и стимуляции иммунитета при опухолевых процессах. Единственным лекарственным препаратом ИФН- $\gamma$ , зарегистрированным в России, является Ингарон® (ИФН- $\gamma$  человеческий рекомбинантный), производитель ООО «НПП «Фармаклон». В связи с этим, можно заключить, что разработка новых лекарственных препаратов на основе ИФН- $\gamma$  по-прежнему актуальна.

#### **1.4 Современные подходы к разработке средств доставки терапевтических белков**

Проблема деградации интерферонов, и в частности, ИФН- $\gamma$ , в крови и межтканевых жидкостях по-прежнему до конца не решена. В связи с этим, поиск средств доставки ИФН- $\gamma$  к тканям-мишеням, защиты его от протеолиза и удлинение периода циркуляции в биологически активной форме в «воротах» инфекции чрезвычайно актуален. Одним из подходов к решению данной проблемы является разработка способа получения средства доставки, способного обеспечить транспортировку белка и повышение его устойчивости к протеолизу.

Важнейший аспект нанобиотехнологии – использование специфических наноносителей, способных доставлять лекарственные препараты к тканям и органам – мишеням для обеспечения более эффективной терапии. При использовании медикаментозных препаратов, заключенных в наночастицы, минимизируется их разрушение и инактивация при применении, предотвращается возникновение побочных эффектов, увеличивается биодоступность за счет доставки лекарства непосредственно в патологический очаг. В качестве наноносителей наиболее широко исследуются липосомы, мицеллы и полимерные наночастицы, так как они обладают наилучшими для инкапсулирования многих лекарственных средств свойствами.

*Нанокapsулы и наносферы.* В зависимости от метода приготовления удается получать наночастицы, наносферы или нанокapsулы с различными свойствами и способностью выделять, высвобождать терапевтическое средство. Нанокapsулы являются везикулярными системами, в которых лекарство, сконцентрированное в центральной части, окружено уникальной полимерной мембраной, в то время как наносферы – матриксные системы с дисперсионным распределением лекарства [44].

*Липосомы.* Липосомы – искусственные частицы сферической формы, которые получают из природных нетоксичных фосфолипидов и холестерина (рис.1). Вследствие их величины, гидрофобного и гидрофильного характера, биосовместимости, липосомы являются наиболее распространенной системой доставки лекарств. Свойства липосом варьируют в зависимости от состава липидов, размеров, пространственного заряда и методов приготовления. Лекарства, связанные с липосомами, имеют измененную фармакокинетику, в сравнении с лекарством в растворе, сниженную системную токсичность и деградацию в организме. Однако липосомы, как и другие наночастицы, довольно быстро захватываются клетками ретикуло-эндотелиальной системы вследствие «мечения» белками плазмы – опсонинами. Помимо этого, характерной особенностью липосом является их относительно невысокая стабильность при хранении, недостаток, которого лишены полимерные наночастицы [17].

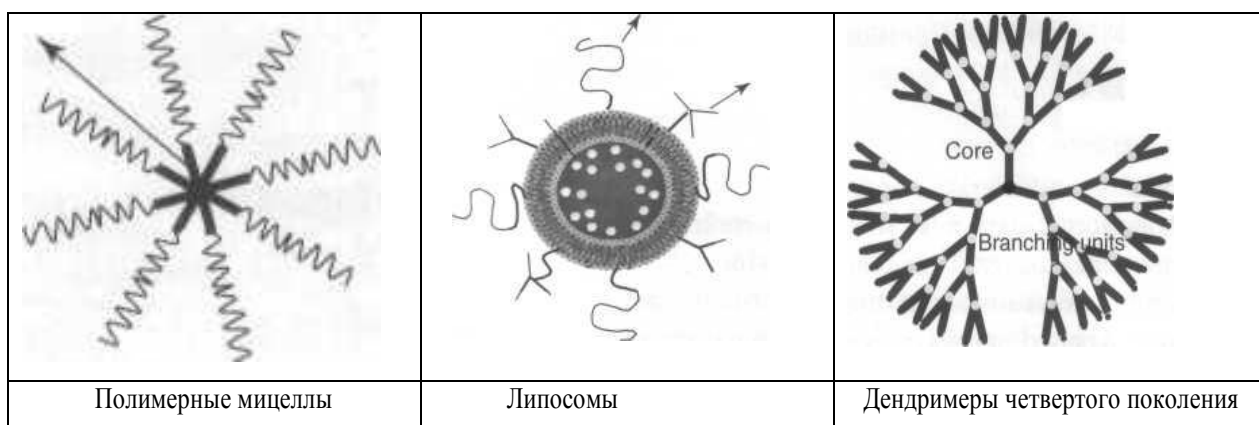


Рисунок 1 - Схемы различных систем доставки лекарств, получаемых методами нанотехнологии [74]

*Полимерные мицеллы.* В последнее время внимание исследователей привлекают различные амфифильные сополимерные блоки, которые могут самоассоциироваться с образованием мицелл в водных растворах. Полимерные мицеллы имеют ряд преимуществ по сравнению с сурфактантными мицеллами. Они отличаются лучшей термодинамической стабильностью в физиологических растворах, что предотвращает их быструю диссоциацию *in vivo*. Мицеллы имеют узкий предел распределения в нанометровом диапазоне и характеризуются архитектурой «ядро-оболочка», в которой гидрофобный сегмент отделен от водного окружения. Мицеллярная система удобна для доставки водонерастворимых лекарств. Распределение заряженных лекарством полимерных мицелл в организме определяется величиной и поверхностными свойствами. Величина полимерных мицелл не только делает их идеальным средством доставки, но и обеспечивает увеличение их поглощения клетками эндотелия солидных опухолей в результате пассивной диффузии. Показано, что внутривенное введение полимерных мицелл увеличивает время их циркуляции, поскольку малые размеры и гидрофильность минимизируют их поглощение фагоцитами [26, 43, 20].

*Дендримеры.* Дендримеры – макромолекулярные соединения, которые представляют собой разветвление молекул вокруг внутреннего ядра (рис.1). Дендримеры пригодны в качестве системы доставки лекарств из-за их нанометровой величины, легкости приготовления, способности к множественности копирования пространственных групп и биологической реорганизации процессов. Дендримеры имеют формулу глобулы и имеют внутренние поры, в которые может инкапсулироваться лекарство, лекарство может также присоединяться к находящимся на поверхности группам.

В литературных источниках встречаются данные, касающиеся разработки подходов по включению ИФН- $\gamma$  в состав наночастиц. Так, авторами работ [78,79] показано, что введение ИФН- $\gamma$  в состав альбуминовых наночастиц способствует повышению праймирующего



эффекта цитокина на продукцию NO макрофагами. Адсорбированный ИФН- $\gamma$  приводит к более значительному снижению количества бактерий в селезенке мышей BALB/c, инфицированных *Brucella abortis*, чем свободный цитокин. Использование фотосшитого биodeградируемого эластомера poly( $\epsilon$ -caprolactone-co-D,L-lactide) как средства депонирования и доставки ИФН- $\gamma$  обеспечивает длительное, в течение 21 дня, высвобождение биологически активного пептида из полимера с постоянной скоростью [28].

Ранее в ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» были получены двухслойные молекулярные конструкции, содержащие в центральной части нуклеотидный материал (двухспиральные РНК), а на поверхности – различные молекулы: белки, антитела, нуклеиновые кислоты, антигены инфекционного агента [142]. Созданные конструкции в физиологических условиях имели сферическую вирусоподобную форму, в связи с чем получили название «вирусоподобная частица» (ВПЧ, рис.2).

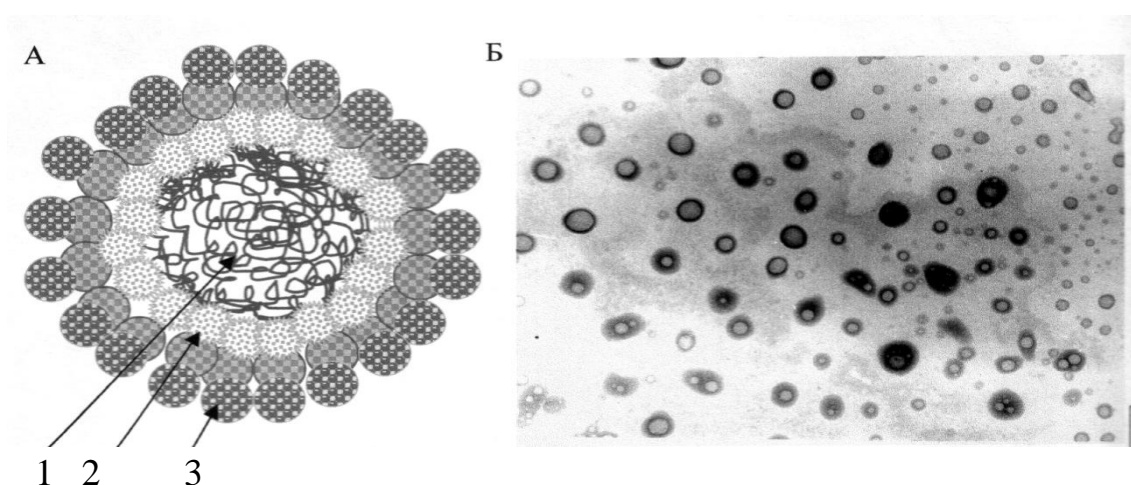


Рисунок 2 - Теоретическая модель молекулярной конструкции (А) и вид частиц под электронным микроскопом (Б, увеличение x88 000).

1- нуклеотидный материал; 2-конъюгат: спермидин-полиглюкин; 3- белковый компонент

Использование предложенной молекулярной конструкции позволяет:

- экспонировать на поверхности конструкции любые эпитопы инфекционных агентов либо терапевтические белки длиной от десятков до тысяч аминокислот;

- использовать двуспиральную РНК в молекулярной конструкции в качестве неспецифического стимулятора иммунного ответа;
- использовать в качестве стимулятора иммунного ответа входящий в состав конъюгата полиглюкин.

Данная молекулярная конструкция была использована для разработки различных вакцин. Были получены экспериментальные образцы кандидатных вакцин против ВИЧ, туберкулеза, клещевого энцефалита, показана их высокая эффективность при иммунизации на лабораторных животных [132,134,135, 136, 138]. Пригодность конструкции как средства доставки терапевтических белков была продемонстрирована на примере фактора некроза опухоли альфа [140]. В результате этих исследований было показано, что экспонирование ФНО- $\alpha$  на поверхности ВПЧ приводило к повышению протеолитической стабильности белка, его накопления в области опухолевого узла и усилению противоопухолевой активности [107]. Эти данные позволяют предположить, что данная конструкция может быть пригодна в качестве средства доставки и стабилизации и других белков, в частности, интерферона гамма.

### **1.5 Технологические аспекты получения препаратов интерферонов для непарентерального применения**

В настоящее время основным способом введения препаратов интерферона, в частности, интерферона гамма в организм является парентеральный (инъекционный) способ. Очевидно, что альтернативой ему могут быть непарентеральные способы для местного применения (интраназальный, интаректальный, интравагинальный и др.). Достоинством непарентеральных способов применения противовирусных средств является то, что высокий уровень действующего начала создается в «воротах» инфекции, что может приводить к повышению эффективности терапевтического агента, снижению дозы, ослаблению токсических свойств.

В настоящее время известен ряд препаратов интерферонов для локального, в частности, интраназального применения для лечения

инфекций верхних дыхательных путей, гриппа и ОРВИ. В проанализированных обзорах литературы показано, что интерфероны для интраназального применения обладают высокой противовирусной активностью [153, 9, 123, 98]. Установлено, что интраназальные формы интерферона обладают профилактическим действием в отношении экспериментального насморка (профилактическое действие в 46-54% случаев), несколько меньшей эффективностью при простуде, возникающей в естественных условиях (24-27%), и существенно превосходят плацебо в лечении экспериментальных простудных заболеваний [103, 104].

Основными преимуществами интраназального применения интерферонов являются:

- наличие центрального действия (за счет того, что оболочки обонятельных нервов лишены гематоэнцефалического барьера, ИФН из носовой полости может поступать в головной мозг);
- высокая биодоступность;
- отсутствие эффекта первого прохождения через печень и связанных с этим неблагоприятных реакций;
- удобство и легкость применения, что ведет к улучшению комплаентности пациентов;
- быстрота развития системного эффекта.

В клинической практике широкое применение уже нашли следующие препараты на основе интерферонов для интраназального применения при заболеваниях ОРВИ и гриппом: интерферон человеческий лейкоцитарный сухой, генферон (интерферон человеческий рекомбинантный альфа-2а), вифероновая мазь (интерферон человеческий рекомбинантный альфа-2), гриппферон (смесь человеческого рекомбинантного альфа-2-интерферона с поливинилпирролидоном, полиэтиленоксидом и трилоном Б).

В Российской Федерации налажен промышленный выпуск «Набора для профилактики и лечения гриппа», в который входят препараты интерферонов I- и II-го типов. Сочетание препаратов интерферонов (альфа-интерферона –

«Альфарона» и гамма-интерферона – «Ингарон») при интраназальном или назофарингеальном применении позволяет обеспечить высокую защиту от инфекции гриппом, в том числе А/Н1N1 сезона 2009 года. При лечении наблюдается быстрое купирование симптомов, связанных с поражением верхних дыхательных путей, что препятствует генерализации инфекционного процесса. Препараты включены во временные методические рекомендации МЗ РФ «Схемы лечения и профилактики гриппа, вызванного вирусом типа А/ Н1N1 для взрослых» №24-0/10/1-4053 от 30.06.2009 года и в письмо МЗ РФ «Схемы лечения и профилактики гриппа, вызванного вирусом типа А/Н1N1 для взрослого и детского населения» №24-0/10/1-5039 от 25.08.2009 года.

Для создания интраназальной формы препаратов, как правило, осуществляется подбор ингредиентов, исходя из теоретических предпосылок, с сохранением комбинации трех различных по механизму действия компонентов: состав буфера, хелатообразователь, стабилизатор [108]. В таблице 2 приведен перечень вспомогательных веществ, применяемых при изготовлении лекарственных форм интерферонов для интраназального применения.

Таблица 2 - Вспомогательные вещества, которые могут быть использованы для создания интраназальных лекарственных форм интерферонов

Функциональная роль вспомогательного вещества	Наименование вспомогательных веществ
Стабилизатор структуры белка	Глутатион, твин – 80, поливинилпирролидон
Хелатные агенты	Трилон Б, лимонная кислота
Компоненты буферного раствора	Цитраты, фосфаты
Вещества, обеспечивающие физико – химические характеристики раствора	Соли натрия

1. *Стабилизаторы.* Стабилизаторы в составе интраназальной лекарственной формы обеспечивают поддержание пространственной конформации молекул и растворителя. Основным стабилизатором жидких и лиофилизированных препаратов является человеческий альбумин, полученный из донорской крови. Однако этот компонент имеет свои недостатки, он дорог и небезопасен. Кроме этого, полагают, что альбумин образует комплекс с молекулой ИФН в растворе, вследствие чего повышается иммуногенность препарата [78].

Подходящими стабилизаторами для интраназальных форм белков являются твины и поливинилпирролидон. Твины - это класс неионогенных детергентов, которые, не вступая во взаимодействие, «помогают» поддерживать конформацию белка в растворе. Поливинилпирролидон - биологически совместимый полимер - относится к полимерным поверхностно-активным веществам и находит наиболее широкое применение в медицине, т.к. не обладает антигенными свойствами, улучшает растворимость лекарственных веществ, пролонгирует их действие при высвобождении из лекарственных форм.

Нередко в состав готовых форм вводят дополнительные компоненты, действующие в паре со стабилизатором. Например, окисленный глутатион - небольшая молекула, содержащая две дисульфидные связи, обеспечивает дополнительную стабилизацию молекулы ИФН за счет того, что препятствует размыканию и окислению связей в белке.

2. *Буфер.* Выбор буферной системы имеет важное значение, так как от состава буфера и рН среды зависит постоянство среды и стабильность белка при хранении. Наиболее часто используется натрий фосфатный буфер, рН 6-7, 23-25 мМ, отличающийся хорошей переносимостью. Показано, что в указанном диапазоне рН минимальны процессы окисления, протеолитического расщепления, щелочного гидролиза большинства белков.

Буфер цитратный, рН 6-7, 10 мМ (натрий лимоннокислый - лимонная кислота) разрешен для клинического применения, хотя переносится хуже.

Применение лимонной кислоты обосновано тем, что она является важным продуктом обмена в живых организмах, участвует в цикле трикарбоновых кислот и глиоксилатном цикле.

Буфер ацетатный, рН 4 – 5, 10 мМ также разрешен для клинического применения. Теоретически при рН 4-5 минимальны процессы протеолитического расщепления и гидролиза, однако возможна физическая нестабильность белка: образование димеров, потеря белка при адсорбции на стекле.

3. *Хелатообразователь.* Роль хелатообразователя заключается в связывании следовых количеств ионов двухвалентных металлов, в присутствии которых ускоряются процессы окисления. Наиболее часто в качестве хелатообразователя используют трилон Б.

Для предотвращения нарушения физиологического водно-солевого гомеостаза интраназальная лекарственная форма должна обладать осмотической силой, соответствующей осмотической силе плазмы крови, то есть, должна быть изотонична. С этой целью количество солей (чаще всего, NaCl) в растворе лекарственной интраназальной формы должно быть такое, чтобы осмотическая сила раствора соответствовала таковой физиологического раствора NaCl в концентрации 0,9%.

К сожалению, в литературных источниках мы не нашли данных, касающихся влияния состава вспомогательных компонентов препаратов интерферонов для интраназального применения, в том числе, ИФН- $\gamma$ , на стабильность действующего начала. В связи с этим, представляет интерес получение интраназальной лекарственной формы аналога ИФН- $\gamma$  Дельтаферона в составе молекулярной конструкции для использования в качестве противовирусного препарата, анализ физико-химических и биологических свойств для характеристики активности и стабильности действующего начала.

## 1.6 Препараты интерферонов для противоопухолевой терапии

Как уже упоминалось выше, помимо противовирусной активности, интерфероны обладают способностью тормозить рост опухолевых клеток и стимулировать противоопухолевый иммунный ответ. Из данных таблицы 1 видно, что препараты интерферонов, преимущественно, ИФН- $\alpha$  (Реаферон, Вэллферон, Альфатрон) активно используются в клинической практике как в моно-, так и комплексной терапии онкологических заболеваний, таких как рак почки, волосатоклеточный лейкоз, миеломная болезнь, кожная Т-клеточная лимфома, саркома Капоши и др.

В монографии О.И. Киселева с соавторами [120] описаны области клинического применения препарата рекомбинантного ИФН- $\gamma$ , среди которых широкий спектр онкологических заболеваний (рак шейки матки, рак молочной железы, почечная карцинома, меланома, колоректальный рак, лейкомия, мелкоклеточный рак легких и др. злокачественные новообразования).

Однако следует отметить, что во всех описанных случаях препараты ИФН применяются в виде инъекционных форм, содержащих рекомбинантные белки в смеси со вспомогательными компонентами, и используются для лечения первичных опухолей. Упоминаний относительно получения препаратов ИФН и в частности, ИФН- $\gamma$ , в составе средств доставки для лечения опухолей в доступной литературе не обнаружено. Нет данных и относительно возможности использования ИФН- $\gamma$  для лечения вторичных опухолей, метастазов опухолей разной локализации, в том числе, в кости скелета. В то же время, учитывая сведения относительно выраженной противоопухолевой активности ИФН- $\gamma$  [88] и его биологической роли регулятора активности остеобластов/остеокластов [37, 92], можно предположить, что данный белок может быть эффективным средством лечения костных метастазов.

Одной из главных проблем с точки зрения лечения метастазов костей является способ эффективной доставки лекарства в опухоль. Очевидно, что

для этого лекарственное вещество должно быть включено в средство доставки и иметь в своем составе так называемое «нацеливающее» вещество. В случае костных метастазов для выполнения функции средства направленной доставки в костную ткань вещества-переносчики должны обладать высоким аффинитетом к гидроксиапатиту костного матрикса. В качестве одного из таких перспективных векторов сейчас рассматриваются бифосфонаты (бифосфонаты).

Бифосфонаты- производные фосфоновых кислот, синтетические аналоги эндогенных пирофосфатов, участвующих в остеогенезе (рис.3).

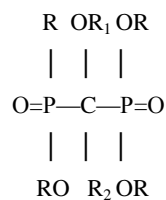


Рисунок 3 - Структура бифосфонатов, где R, R1 и R2 = H или органические боковые радикалы

Механизм действия этих препаратов связан со сходством их структуры со структурой пирофосфатов. Однако в отличие от пирофосфатов, бифосфонаты, имеющие связи P-C-P, устойчивы к действию гидролитических ферментов. Молекулы бифосфонатов соединяются с кальцием и накапливаются только в костях, что объясняет их высокую селективность к костной ткани. Доказанным свойством бифосфонатов является быстрое и массивное накопление в кости (около 55% от введенной дозы после однократного внутривенного введения) [10].

Бифосфонаты обладают способностью тормозить процесс резорбции кости путем ингибирования остеокластов. В процессе остеолизиса остеокласты поглощают фиксированные на поверхности кости бифосфонаты, что приводит к нарушению их функции. Кроме того, бифосфонаты могут



влиять на функцию остеокластов путем нарушения кооперации и ингибирования передачи сигнала от остеобластов к остеокластам [25].

Применение бифосфонатов, ингибирующих резорбцию кости, прогрессию костных метастазов и снижающих риск развития осложнений, обусловленных метастатическим поражением костей, в течение последних десятилетий стало общепринятым компонентом лечения [54, 68, 113].

Преимуществом бифосфонатов перед другими известными веществами, отличающимися сродством к гидроксиапатиту, такими как октапептид D-аспарагиновой кислоты, полималоновая кислота, тетрациклин и др., является то, что помимо способности к аккумуляции в костной ткани, бифосфонаты обладают самостоятельной фармакологической активностью. Показано, что при лечении бифосфонатами в адьювантном режиме наблюдается снижение уровня костного метастазирования и/или значимое увеличение выживаемости, что дало основание предположить наличие у них собственного противоопухолевого эффекта [58, 13]. Противоопухолевая активность бифосфонатов была продемонстрирована в культурах клеток рака молочной железы, простаты и миеломы [55, 56, 84].

Среди бифосфонатов различных поколений особый интерес представляет алендроновая кислота ((4-амино-1-гидроксибутилиден)-дифосфоновая кислота) – бифосфонат, в котором заместитель  $R_1$  представляет собой гидроксильную группу, а боковой радикал  $R_2$  содержит первичную аминогруппу ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ ) (рисунок 4).

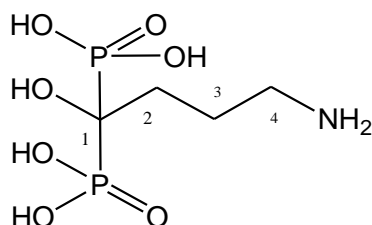


Рисунок 4 - Структура алендроновой кислоты (4-амино-1-гидроксибутилиден)-дифосфоновая кислота,  $\text{C}_4\text{H}_{12}\text{NNaO}_7\text{P}_2$ , М.м. 325,1)

Подобно пирофосфатам, бифосфонаты имеют структуру, способную связывать ионы металлов (II) бидентатно, предоставляя двузарядному

катиону металла по одному координационному месту за счет атомов кислорода в каждой фосфонатной группе. Введение гидроксила в положение  $R_1$  делает бифосфонат тридентантным, в результате чего усиливается связывание ионов кальция и увеличивается тропность к костной ткани [39].

Сравнение эффективности связывания бифосфонатов с гидроксиапатитом, проведенное различными методами, показало, что все аминоалкилбифосфонаты, такие как паминдронат, алендронат и неридронат имеют наибольшую связывающую способность [18]. Помимо повышенной тропности к костной ткани, алендроновая кислота привлекательна наличием первичной аминогруппы, что позволяет достаточно просто получать ее конъюгаты с белками. При этом не затрагиваются фосфонатные группы, определяющие эффективность связывания бифосфоната с костным матриксом [65].

В связи с этим, можно предположить, что введение алендроновой кислоты вместе с аналогом ИФН- $\gamma$  в состав полисахаридной оболочки молекулярной конструкции позволит получить средство, отличающее повышенной тропностью к костной ткани и противоопухолевой активностью в отношении костных метастазов опухолей. Не исключено, что данное средство, помимо противоопухолевого действия, будет проявлять и антирезорбтивные свойства.

Таким образом, в литературном обзоре рассмотрены особенности биологического действия интерферона гамма, включая его иммуномодулирующие, противовирусные и противоопухолевые свойства. Обсуждены современные подходы по разработке средств доставки терапевтических белков, технологические аспекты получения препаратов интерферонов для непарентерального применения, а также подходы к созданию лекарственных препаратов для противоопухолевой терапии, в частности, лечения костных метастазов.

На основании представленных в литературе данных можно заключить, что особенности биологического действия интерферона гамма позволяют

рассматривать его как перспективное действующее начало для создания средств противовирусной и противоопухолевой терапии. Однако для реализации терапевтических свойств ИФН- $\gamma$  необходимо решить проблему лабильности белка для повышения его эффективности, что может быть достигнуто включением ИФН- $\gamma$  в состав средства доставки. В качестве средства доставки особый интерес представляет биodeградируемая молекулярная конструкция, позволяющая экспонировать на поверхности терапевтический белок и векторные молекулы. Включение в состав конструкции в качестве «направляющих» молекул бифосфоната алендроновой кислоты, вероятно, способно обеспечить адресную доставку ИФН- $\gamma$  в область костных метастазов для реализации его противоопухолевой активности.

Однако данные относительно способов получения лекарственных форм ИФН- $\gamma$  в составе биodeградируемого средства доставки для системного или локального (интраназального) применения и возможности его использования в этих транспортных формах для лечения вирусных инфекций в доступной литературе отсутствуют. Нам не встретилось также сведений относительно получения препаратов ИФН- $\gamma$  в средствах адресной доставки к метастатическим опухолевым очагам в костях скелета.

В связи с этим, целью данной работы являлась разработка способа и технологических параметров получения новых лекарственных форм аналога интерферона гамма для противоиnфекционной и противоопухолевой терапии на основе двухслойной молекулярной конструкции.

## Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1 Оборудование

В работе использовали следующее оборудование: магнитная мешалка Magnetic Stirrer MSH 300, коллектор фракций LKB Ultrac 7000, хроматографическая система Bio-Rad Biologic LP, микровесы Perkin Elmer AM-2, весы лабораторные Casbee, регистратор оптической плотности LKB 2238, спектрофотометр Bio-Rad Smart Spec plus, вортекс Biosan BioVortex V1, pH-метр Экотест-2000, камера для акриламидного и агарозного электрофореза Helicon, ультразвуковой дезинтегратор УЗДН-2Т, центрифуга Beckman J2-21, холодильная установка Minicoldlab 2203, ламинарная система для стерильного розлива КОЧ «Ламинар-С», установка для получения воды для инъекций УВОИ-«М-Ф», лиофильная сушка «FreeZone», спектрофотометр Shimadzu UV-2100, спектрополяриметр Jasco J-600, анализатор Z-потенциала Zeta Plus, микроскоп электронный просвечивающего типа Jem 1400, световой микроскоп Leica DM 2500, комплекс оборудования для чистых и особо чистых помещений КОЧ Ламинар-С.

### 2.2 Материалы

- аналог интерферона-гамма рекомбинантный человеческий Дельтаферон со специфической активностью  $6,4 \cdot 10^5$  МЕ/мг, производства ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», полученный в соответствии с «Инструкцией по изготовлению и контролю Дельтаферона (субстанция)» ИК-15/02-2013, по показателям качества соответствующий требованиям данной Инструкции;
- препарат натриевой соли двуспиральной рибонуклеиновой кислоты производства ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», полученный из киллерного штамма дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* по методу [141].
- алендроновая кислота, TCI, Япония;
- декстран 40000 Да, AppliChem, США;

- боргидрид натрия ( $\text{NaBH}_4$ ), Sigma, США;
- натрия периодат ( $\text{NaJO}_4$ ), Sigma-Aldrich, США;
- спермидин, MP Biomedicals;
- сефадекс G-25, Pharmacia, Швеция;
- сефароза 6B, Pharmacia, Швеция;
- акриламид, Gerbu, Германия;
- агароза, Bio-Rad, США;
- Кумасси ярко голубой R-250, AppliChem, Германия;
- этидиум бромид, Sigma, США;
- маркеры молекулярных масс нуклеиновых кислот (250-10000 п.н.), СибЭнзим, Россия;
- трис-(гидроксиметил)-аминометан, Bio-Rad, США;
- 2,3,5-трифенилтетразолия хлорид (ХТТ), Fluka, Германия;
- натрий хлористый по ГОСТ 4233-77, х.ч., Россия;
- персульфат аммония, AppliChem, Германия;
- гидроксилапатит, Bio-Rad, США;
- вода очищенная по ФС 42-2619-99;
- сетки медные диаметром 0,3 см, JEOL, Япония;
- уранилацетат х.ч., SPI, США;
- отечественные реактивы (натрий углекислый, натрий фосфорнокислый, натрия гидроокись и др.) квалификации не ниже «х.ч.».

### **2.3 Методы**

*Метод получения конъюгата декстрана с рекомбинантным аналогом интерферона гамма человека Дельтафероном и спермидином, конъюгата декстрана с Дельтафероном, спермидином и алендроновой кислотой.* В качестве основы для отработки методов синтеза использовали методику, ранее разработанную для получения конъюгата декстрана с ФНО- $\alpha$  и спермидином [140]. Активированный декстран, содержащий альдегидные группы, получали с использованием реакции Малапрада [89]. Процесс

активации декстрана контролировали по количеству образовавшихся альдегидных групп, которые определяли фотоколориметрическим методом по Саболксу [131]. Метод основан на восстановлении альдегидными группами хлорида 2,3,5-трифенилтетразолия с образованием красного красителя формазана, который определяют фотоколориметрически при 546 нм.

Содержание альдегидных групп –СНО определяли по градуировочному графику, построенному с использованием в качестве стандарта декстрана, и их количество рассчитывали по формуле:

$$N = \frac{n \times V_{исх}}{V_{пр} \times D},$$

где N – количество СНО-групп в пробе, n – количество альдегидных групп по градуировочному графику (нМ),  $V_{исх}$  – исходный объем раствора декстрана и периодата натрия;  $V_{пр}$  – объем пробы раствора декстрана и периодата натрия; D – количество декстрана (нМ).

*Метод получения молекулярных конструкций, содержащих Дельтаферон либо Дельтаферон и алендроновую кислоту.* Для получения молекулярных конструкций синтезированные конъюгаты декстрана с Дельтафероном (Дельтафероном и алендроновой кислотой) и спермидином смешивали с препаратом натриевой соли двуспиральной рибонуклеиновой кислоты (дсРНК), тщательно перемешивали и инкубировали при температуре  $(6 \pm 2)^{\circ} \text{C}$  [140].

*Для анализа процесса получения конъюгатов декстрана с Дельтафероном (Дельтафероном и алендроновой кислотой) и спермидином* при отработке методов получения использовали метод вертикального гелевого электрофореза в 15% полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях с последующим окрашиванием красителем Кумасси R-250 [45]. Электрофореграммы анализировали с помощью компьютерных программ GelPro 3.1 и GelPro 3.2.

*Способность конъюгатов к взаимодействию с дсРНК* оценивали электрофорезом в 1%-ном геле агарозы с визуализацией нуклеиновых кислот этидиум бромидом.

*Определение концентрации белка в конъюгатах декстрана и конструкциях* осуществляли методом Лоури [66] или Варбурга [144].

*Метод количественного определения нуклеотидного материала в образцах конструкций.* Определение содержания нуклеиновых кислот в конструкции проводили по методу А.С. Спирина, измеряя светопоглощение растворов нуклеиновых кислот после их гидролиза при 270 и 290 нм [150].

*Метод определения концентрации алендроновой кислоты в конъюгатах с декстраном.* Содержание алендроновой кислоты в конъюгатах определяли с помощью набора реагентов «Фосфор-Ново» (ЗАО «Вектор-Бест», р.п. Кольцово, Новосибирская обл. в собственной модификации. Метод основан на спектрофотометрическом определении фосфорно-молибденового комплекса, образующегося в результате связывания ортофосфата с молибдатом аммония в кислой среде [151]. Для анализа навеску конъюгата (1 мг) растворяли в 5 мл 0,25 Н раствора персульфата аммония, кипятили на водяной бане в течение 15 минут для гидролиза алендроновой кислоты до ортофосфата. В качестве препаратов сравнения использовали алендроновую кислоту. Содержание неорганического фосфора в растворах после завершения гидролиза проводили с помощью набора «Фосфор - Ново» в соответствии с инструкцией изготовителя. Аликвоту растворов в объеме 10 мкл добавляли к 1 мл Реагента (раствор серной кислоты, содержащий аммоний молибденовокислый и детергент) набора, инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин и измеряли оптическую плотность раствора при 360 нм. Содержание алендроновой кислоты в образце определяли по формуле:

$$C_{\text{алендр.}} = \frac{\lambda}{0,058 * V},$$

где  $C$  – концентрация алендроновой кислоты (мг/мл),  $\lambda$  – оптическая плотность пробы при длине волны 360 нм,  $V$  – объем добавленного раствора алендроновой кислоты (мкл), 0,058 – оптическая плотность раствора алендроновой кислоты концентрацией 1 мкг/мл.

*Лиофилизацию* растворов образцов проводили в камере лиофильной сушки «FreeZone» в автоматическом режиме с опцией пневматической укупорки. Раствор разливали во флаконы по 1 мл и после предварительной заморозки до температуры минус 72°C, высушивали в течение 16 часов при температуре 22±2 °C.

*Визуализацию молекулярных конструкций* проводили методом просвечивающей электронной микроскопии с использованием негативного контрастирования (1% водный раствор уранилацетата). Образцы исследовали при ускоряющем напряжении 80 кВ. Анализ электронных снимков (определение размеров частиц) осуществляли при помощи программного пакета iTEM (Olympus, Германия).

*Спектры поглощения образцов в ультрафиолетовой области (УФ-спектры)* исследовали с помощью спектрофотометра Shimadzu UV-2100 в диапазоне длин волн 190-350 нм с разрешением 0,1 нм, шириной щели 1 нм. Для измерений применяли кварцевую кювету с длиной оптического пути 1 см и объемом 1 мл. В качестве контроля использовали спектры исходных компонентов дсРНК и белка Дельтаферон.

*Спектры кругового дихроизма (КД-спектры)* были записаны с использованием спектрополяриметра Jasco J-600. Исследование оптической активности образцов проводили 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. Измерение проводили в кювете с длиной оптического пути 1 см и объемом 800 мкл.

*Анализ гранулометрического состава* образцов молекулярной конструкции осуществляли на анализаторе Z-потенциала Zeta Plus в соответствии с инструкцией производителя. Измерение проводили в



условиях термостатирования при 25 °С. Анализ каждого образца проводили три раза, усредняя величину измерения.

*Стабильность Дельтаферона в составе молекулярной конструкции при хранении в течение суток при различных температурных режимах (минус 4°С, +37°С) и в условиях воздействия протеаз (26\*10<sup>-7</sup>-26\*10<sup>-6</sup> е.а. трипсина) оценивали электрофорезом в 12% ПААГ в денатурирующих условиях, как описано в [45].*

*Сохранность структуры дсРНК в составе молекулярной конструкции при инкубации с рибонуклеазой E.coli (0,1 – 10 е.а. рибонуклеазы) оценивали электрофорезом в 1%-ном геле агарозы, окрашенном бромистым этидием.*

*Метод определения молекулярной массы Дельтаферона в составе конъюгатов и конструкций. Молекулярную массу Дельтаферона в конъюгатах с декстраном и в конструкциях определяли методом электрофореза в 12%-ном ПААГ в денатурирующих редуцирующих и нередуцирующих условиях в соответствии с [45].*

*Методы оценки устойчивости Дельтаферона в составе конъюгатов и конструкций к ферментативным воздействиям. Для оценки устойчивости Дельтаферона в составе конъюгатов или конструкций к действию трипсина в раствор исследуемого образца, содержащего белок в количестве 10 мкг в 15-25 мкл, вносили свежеприготовленный раствор трипсина с активностью 26,8 е.а./г в количествах 0,3 и 1 мкг, из расчета трипсин: белок – 1:10 и 1:30 (по массе). После инкубации (при 20-25° С) в течение 10 мин добавляли «стоп-раствор» (додецилсульфат натрия, 2-меркаптоэтанол и бромфеноловый синий в 20%-ом растворе глицерина). После прогревания (5 мин при 90° С) продукты реакции анализировали электрофорезом в 15% ПААГ по [45].*

*Метод изучения накопления частиц, содержащих Дельтаферон и алендроновую кислоту, в костной ткани в условиях in vitro. Связывание конструкций, содержащих Дельтаферон и алендроновую кислоту, с гидроксилпатитом оценивали методом хроматографии, как описано в [144]. Десорбцию проводили линейным градиентом хлорида натрия от 0,1 до 1,0*

(1,5) M, рН 7,0. Для анализа хроматографических фракций использовали метод электрофореза в 15%-ом ПААГ и 1% геле агарозы [45].

*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 ЦПД<sub>50</sub> относительно референс-препарата Interferon- $\gamma$  Human Recombinant expressed in E.coli, Cat. №13265, Sigma [99].

*Метод исследования интерферониндуцирующей активности препарата Дельтаферон в составе молекулярной конструкции при внутрибрюшинном введении.* В экспериментах использовали препарат Дельтаферон с концентрацией белка 0,9 мг/мл и активностью  $1 \cdot 10^6$  МЕ/мл; препарат молекулярной конструкции, содержащей Дельтаферон, с концентрацией белка 0,9 мг/мл и активностью  $5 \cdot 10^5$  МЕ/мл. Эксперименты проведены на белых беспородных мышах ICR, самцах, с массой тела 18-22 г, полученных из питомника ГНЦ ВБ «Вектор». До начала и в ходе эксперимента животные содержались в стандартных условиях вивария при естественном освещении, на сбалансированном пищевом рационе.

Препараты Дельтаферона вводили в дозе 50 тыс. МЕ однократно внутрибрюшинно. Содержание ИФН- $\alpha$  и ИФН- $\gamma$  в сыворотке крови мышей определяли через 3 и 24 часа после введения иммуноферментным методом с помощью наборов VeriKine Mouse Interferon Alpha ELISA Kit (PBL Interferon Source) и Mouse IFN- $\gamma$  Immunoassay (R&D Systems).

Статистическую обработку данных всех экспериментов проводили с помощью пакета статистических программ “Statgraphics, Vers.5.0” (Statistical Graphics Corp., USA). Достоверность обнаруженных межгрупповых различий оценивали с использованием t-критерия Стьюдента.

*Метод исследования интерферониндуцирующей активности интраназальной формы препарата Дельтаферон в составе молекулярной конструкции.* В экспериментах использовали интраназальную форму препарата молекулярной конструкции, содержащей Дельтаферон

(лиофилизат), со специфической активностью  $2,0 \cdot 10^6$  МЕ/флакон. Исследования проведены на 50 половозрелых белых беспородных мышах ICR, самках, массой 22-26 г, полученных из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор».

Животные были разделены на 3 экспериментальные группы, по 10 особей в каждой. Мышам опытных групп вводили интраназальную форму молекулярной конструкции, содержащей Дельтаферон (МК Дельтаферон), однократно в дозах  $10^3$  МЕ или  $10^5$  МЕ на мышь в объеме 10 мкл на 20 г массы тела. Животным контрольной группы интраназально вводили физиологический раствор в эквивалентном объеме. Интактную (без введений) группу составляли 5 животных.

Через 3 ч после введения препаратов мышей всех экспериментальных групп подвергали эвтаназии двуокисью углерода, забирали образцы сыворотки крови, ткани носоглотки и легких для определения противовирусной активности в культуре клеток.

Титры интерферона в сыворотке крови, супернатантах гомогенатов тканей носоглотки и легких мышей определяли в биологическом тесте на культуре клеток мышинных фибробластов L68. В качестве тест-вируса использовали вирус энцефаломиокардита (ЕМС), штамм «Колумбия» в дозе 100 ЦПД 50, полученный из Института эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН. Об активности экспериментальных образцов судили по подавлению цитопатического действия тест-вируса в культуре клеток, которое оценивали микрометодом в 96-луночных полистироловых планшетах с плоским дном. За титр интерферона (ИФН) принимали величину, обратную наибольшему разведению сыворотки, обеспечивающему 50% защиту клеточных культур от цитопатического действия 100 ЦПД50 тест-вируса.

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета статистических программ “Statgraphics, Vers.5.0” (Statistical Graphics Corp., USA). Рассчитывали групповые показатели суммарной статистики –

среднюю арифметическую и ошибку средней ( $M \pm SEM$ ). Для оценки значимости парных межгрупповых различий использовали W-критерий (Mann-Whitney (Wilcoxon) W-test) с критическим уровнем значимости ( $p$ ), равным 0,05.

*Изучение противовирусной активности препарата молекулярной конструкции, содержащей Дельтаферон, и его интраназальной формы.*

В исследованиях использовали препарат молекулярной конструкции (МК), содержащей Дельтаферон (субстанция), с активностью  $4 \cdot 10^6$  МЕ/мл; интраназальную форму препарата МК Дельтаферон (лиофилизат) с активностью  $2 \cdot 10^6$  МЕ/флакон; штамм вируса гриппа (ВГ) А/Аichi/2/68 (H3N2). Исследования проводили на мышах линии Balb/c, самках, массой 16-18 г, полученных из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Животные содержались при естественном освещении на стандартном рационе питания со свободным доступом к воде.

Животные были разделены на 6 экспериментальных групп, по 10 особей в каждой. Инфицирование мышей штаммом вируса гриппа А/Аichi/2/68 (H3N2) проводили интраназально в дозе 10 ЛД<sub>50</sub> в объеме 40 мкл суммарно в оба носовых хода. Мышам первой и второй опытных групп вводили внутрибрюшинно (в/бр) препарат МК Дельтаферон в дозах  $10^3$  МЕ и  $10^5$  МЕ на мышь, соответственно. Препарат лиофильно высушенной интраназальной формы МК Дельтаферон растворяли в воде для инъекций и вводили мышам третьей и четвертой опытных групп в дозах  $10^3$  МЕ и  $10^5$  МЕ на мышь, соответственно. Препарат вводили интраназально (и/н) в объеме 50 мкл на мышь суммарно в обе ноздри трехкратно, за 3 ч до заражения (д/з) ВГ, через 1 и 2 сут после заражения (п/з) ВГ А/Аichi/2/68. Пятой группе мышей вводили препарат сравнения Тамифлю (Хоффманн - Ля Рош Лтд. Швейцария) перорально в дозе 10 мг/кг через 1 ч после заражения ВГ и далее дважды в сутки в течение 4 сут после заражения. Контролем служили инфицированные ВГ А/Аichi/2/68 (H3N2) мыши без введения препаратов. Противовирусную активность препаратов тестировали по следующим

показателям: динамика гибели мышей, продолжительность жизни, количество выживших.

Статистическую обработку и сравнение результатов осуществляли стандартными методами с помощью пакета компьютерных программ «Statistica 6,0» (StatSoft Inc. 1984-2001). Сравнение доли выживших или инфицированных животных в группах проводили по критерию  $\chi^2$ . СПЖ мышей представляли как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение ( $M \pm S_M$ ). Для сравнения этих показателей в опыте и контроле применяли непараметрический U-критерий Манна-Уитни. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез ( $p$ ) принимали равным 0,05.

*Метод изучения противоопухолевой и антирезорбтивной активности препарата молекулярной конструкции, содержащей Дельтаферон и алендроновую кислоту.* В исследовании использовали препарат молекулярной конструкции, содержащей Дельтаферон и алендроновую кислоту, с концентрацией белка 0,75 мг/мл, концентрацией алендроновой кислоты 230 мкг/мл, нуклеиновой кислоты – 1,1 мг/мл и специфической активностью  $2,8 \cdot 10^6$  МЕ/мг; клетки меланомы мышей В16 клон F10, полученные из коллекции опухолевых штаммов Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина» Российской академии медицинских наук (г. Москва).

Эксперименты проведены на мышах С57BL/6, самцах и самках, массой 18-22 г, полученных из отдела экспериментальных биологических моделей ФГБУ «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга» (НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга РАМН, г. Томск).

Клетки меланомы В16-F10 до перевивки культивировали в среде DMEM с L-глутамином, содержащей 10 % фетальной сыворотки телят с добавлением раствора антибиотиков (пенициллина G 100 ед/мл,

стрептомицина сульфата 100 мг/мл), при температуре 37 °С в атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>. Клетки поддерживали в логарифмической фазе роста постоянным пересевом культуры через 3–4 дня во флаконах объемом 50 мл. Перед перевивкой клетки прошли 9-14 пассажей.

Для перевивки животным суспензию клеток промывали дважды культуральной средой при комнатной температуре с последующим центрифугированием (1500 оборотов/мин, 5 минут). Концентрацию опухолевых клеток подсчитали в камере Горяева и готовили суспензию клеток с концентрацией  $1 \cdot 10^6$  клеток/мл в среде без сыворотки (4 °С).

Опухолевую модель воспроизводили следующим образом. На передней стенке грудной клетки мыши удаляли шерсть с помощью крема для депиляции, депилированную поверхность протирали 70% спиртом. Животных анестезировали путем внутрибрюшинной инъекции 0,3 мл раствора авертина на 25 г массы тела мыши.

Суспензию клеток непосредственно перед инъекцией перемешивали пипетированием и набирали в туберкулиновый шприц по 0,1 мл ( $10^5$  клеток) суспензии на одну мышь. Иглу вводили во второе межреберье (2 мм левее от середины грудины). Спонтанный, пульсирующий выход ярко-красной, насыщенной кислородом крови в прозрачную втулку иглы указывал на правильное позиционирование иглы. Суспензию клеток вводили в течение 1 мин.

Инъекции препарата молекулярной конструкции, содержащей Дельтаферон и алендроновую кислоту, начинали на 13 сутки после перевивки опухоли. Препараты вводили внутривенно трехкратно с интервалом в один день в дозе  $5 \cdot 10^4$  МЕ или 2 мкг белка на животное. Контрольным мышам вводили физиологический раствор. Через сутки после последней инъекции животных выводили из эксперимента мгновенной дислокацией шейных позвонков, выделяли кости скелета. Кости подвергали макроскопическому обследованию на наличие метастазов (пигментных метастатических колоний).

Для гистологического исследования брали бедренные кости задних конечностей с костными метастазами в эпифизе, фиксировали в 10% параформальдегиде. Через 48 ч фиксации костей образцы извлекали из раствора и помещали в декальцинирующий раствор «Биодек» на 6 - 8 ч. Вырезанные из декальцинированной кости кусочки проводили по стандартной методике, заливали в специальную среду Гистомикс. С блоков с помощью микротомы готовили гистологические срезы толщиной 3-5 мкм, которые монтировали на предметные стекла. Срезы депарафинировали, окрашивали гематоксилином и эозином, обезвоживали и заключали в BioMount под покровные стекла. Исследование гистологических срезов бедренных костей проводили с помощью светового микроскопа Leica DM 2500 (Лейка, Германия) при 10-, 20- и 40-кратном увеличении объектива, фотосъемку - с помощью цифровой камеры Leica DFC420 C (Лейка, Германия). Морфометрические параметры измеряли с помощью программ Axio Vision SE64 Rel. 4.9.1. и Image J.

Для оценки влияния препарата на рост опухолевых метастазов на гистологических срезах бедренных костей измеряли относительную площадь костномозговой полости, занятой опухолевыми клетками, и площадь некроза. Антирезорбтивную активность оценивали по морфологии костной ткани, средней толщине компактного костного вещества и костных трабекул эпифизов, толщине кости в области диафиза.

Данные экспериментов подвергали статистической обработке с использованием пакета программ “Statgraphics 5.0” (Statistical Graphics Corp., USA). В качестве критерия достоверности обнаруженных межгрупповых различий был выбран t-критерий Стьюдента. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез ( $p$ ) принимали равным 0,05.

### Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

#### 3.1. Разработка технологии получения препаратов на основе аналога интерферона гамма Дельтаферона для противовирусной терапии

3.1.1. Разработка технологии получения препарата на основе аналога интерферона гамма в составе молекулярной конструкции для системного применения

Как уже упоминалось, ранее в ГНЦ ВБ «Вектор» была разработана молекулярная конструкция для депонирования и транспортировки белков. Конструкция 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. Методы конъюгирования декстрана с белком, рекомбинантным фактором некроза опухоли альфа человека, и сборки конструкции на его основе были описаны ранее [140]. Данный метод был адаптирован для получения молекулярной конструкции, несущей аналог интерферона гамма Дельтаферон.

При получении конъюгатов декстрана с Дельтафероном для активации декстрана использовали реакцию Малапрада, селективное окисление периодатом натрия  $\text{NaIO}_4$  (при значениях  $\text{pH} \approx 3,5-4,0$ ) органических соединений с винициальными  $\text{OH}$ -группами. Реакция протекает с разрывом связи между соседними гидроксилсодержащими атомами  $\text{C}$  и образованием альдегидов и карбоновых кислот [89] (рис.5).



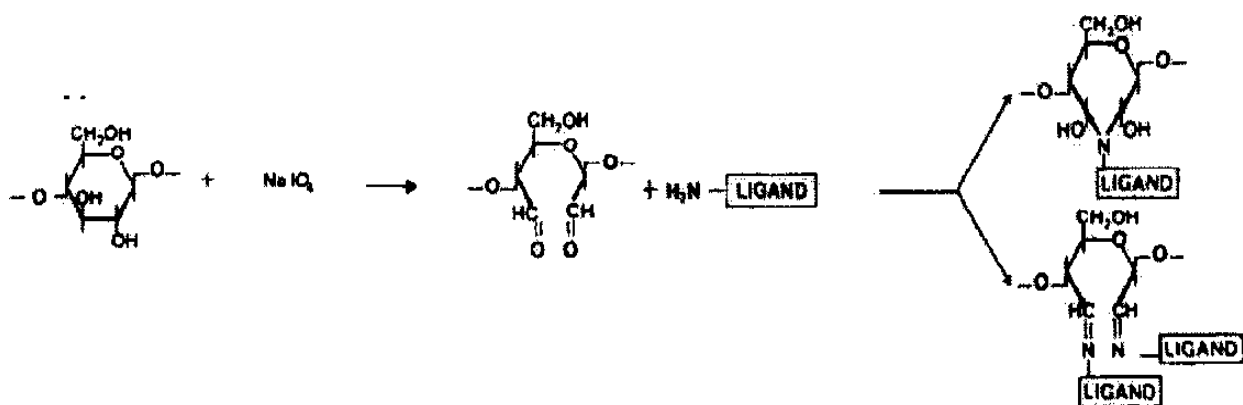


Рисунок 5 - Схема реакции Малапрада [89]

Реакцию конъюгирования проводили по схеме, приведенной ниже.

1.Активация декстрана (окисление периодатом натрия)
↓
2.Очистка активированного декстрана гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-25
↓
3.Внесение в раствор активированного декстрана белка Дельтаферона, инкубация
↓
4. Внесение спермидина, инкубация
↓
5.Внесение боргидрида натрия, инкубация
↓
6.Очистка синтезированного конъюгата гель-фильтрацией на колонке с сефарозой 6В

В процессе оптимизации метода конъюгирования были уточнены:

- условия активации (окисления) полисахарида декстрана, количественные соотношения полисахарида и окислителя периодата натрия;
- количественные соотношения декстрана, окислителя и спермидина, условия проведения реакции;
- условия проведения реакции конъюгирования декстрана с Дельтафероном и спермидином.

### 3.1.1.1 Выбор соотношения компонентов конъюгата и условий проведения реакции конъюгирования

Работа проводилась при теоретической поддержке автора молекулярной конструкции д.м.н. Лебедева Л.Р.

#### *Выбор условий активации полисахарида*

Как известно, в молекуле декстрана с молекулярной массой 40000 Да содержится около 200 молекул глюкозы (молекулярная масса 180 Да), что при исчерпывающем окислении позволяет получить до 400 активных альдегидных групп. В таблице 3 приведены экспериментальные данные, полученные при исследовании влияния концентрации окислителя на образование альдегидных групп в молекуле декстрана после 60-минутной инкубации при комнатной температуре.

Таблица 3 - Исследование влияния количества периодата, внесенного в реакцию (моль/моль декстрана), на количество альдегидных групп в молекуле декстрана

Количество периодата, вносимого в реакцию, моль/моль декстрана	Количество экспериментально определенных альдегидных групп на молекулу декстрана
10	6±2
25	20±3
50	36±5
75	56±5
150	83±8
200	103±10
250	110±10

Как видно из таблицы, в диапазоне соотношений концентраций от 10/1 до 75/1 (периодат/ декстран, моль/моль) число альдегидных групп возрастало пропорционально количеству добавленного окислителя. При увеличении количества окислителя до 200/1 и выше существенного прироста числа образовавшихся альдегидных групп не наблюдалось.

Результаты экспериментов по оценке влияния длительности инкубации декстрана с периодатом натрия на прирост количества реакционно-

способных альдегидных групп декстрана свидетельствуют о том, что выход продукта реакции достигает плато через 60 мин (табл.4). Увеличение времени инкубации с 60 до 180 мин не приводило к существенному приросту альдегидных групп, независимо от температуры реакционной среды. Инкубация реакционной смеси при температуре 6<sup>0</sup> С вызывала снижение количества образовавшихся альдегидных групп, по сравнению с реакцией при комнатной температуре (22<sup>0</sup>С), более заметное при соотношении периодат натрия/декстран 50/1.

Таблица 4 - Влияние времени и температуры инкубации на образование альдегидных групп декстрана при разных соотношениях периодат натрия/декстран

Температура инкубации, °С	Количество экспериментально определенных альдегидных групп при исходном соотношении периодат натрия/декстран (моль/моль) = 25/1	
	Время инкубации 60 мин	Время инкубации 180 мин
+22	20±3	22±3
+6	18±3	21±3
	Количество экспериментально определенных альдегидных групп при исходном соотношении периодат натрия/декстран (моль/моль) = 50/1	
	Время инкубации 60 мин	Время инкубации 180 мин
+22	33±5	36±5
+6	26±5	34±5

В таблице 5 приведена схема эксперимента по подбору оптимальных соотношений компонентов при получении конъюгатов декстрана со спермидином.

Таблица 5 - Схема эксперимента по оценке влияния степени окисления декстрана на эффективность конъюгации декстрана со спермидином (декстран/спермидин 1/10-1/100)

Номер пробы	Соотношение декстран/периодат натрия, моль/моль (1 ч, 22 <sup>0</sup> С)	Соотношение декстран/спермидин, моль/моль (150 мин, 22 <sup>0</sup> С)
1	1/10	1/10
2	1/25	1/25
3	1/100	1/100

Анализ полученных конъюгатов декстран/спермидин методом электрофореза в 15%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) показал, что при относительно низкой степени окисления декстрана (соотношение декстран/периодат натрия 1/10) и концентрации спермидина (соотношение декстран/спермидин 1/10) компонентов, окрашиваемых в ПААГ красителем Кумасси R-250, не обнаруживалось (рис.6).

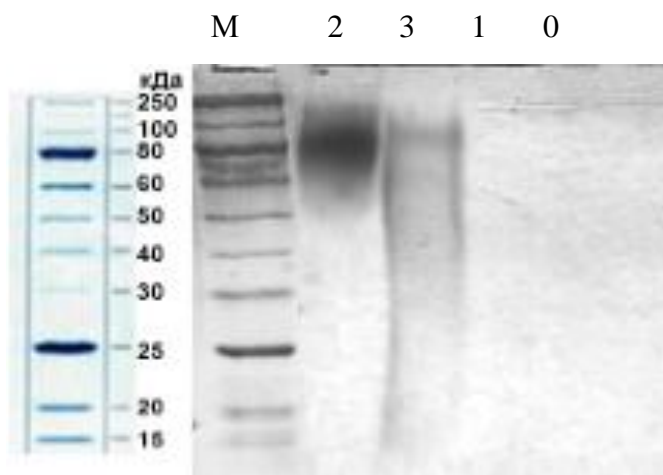


Рисунок 6 - Электрофореграмма конъюгатов декстран/спермидин в 15% ПААГ в денатурирующих условиях. Окраска Кумасси R-250

1-3 – номера проб, описанных в таблице 5;

0 – смесь неактивированного декстрана и спермидина;

М – маркеры молекулярных масс (15-250 кДа)

При повышении степени окисления декстрана и количества спермидина в реакционной смеси (соотношение декстран/периодат натрия и декстран/спермидин в том и другом случае 1/25) на электрофореграмме визуализируется достаточно гомогенный продукт реакции с кажущейся молекулярной массой  $100 \pm 20$  кДа. При высокой степени окисления и соотношении декстран/спермидин 1/100 образуется продукт, гетерогенный по молекулярной массе.

Уточнение оптимальных концентраций компонентов в более узком диапазоне в соответствии со схемой (табл.6) показало, что образование конъюгатов декстрана и спермидина происходит при всех использованных соотношениях, независимо от степени окисления полисахарида (рис.7).

Таблица 6 - Схема эксперимента по оценке влияния степени окисления декстрана на эффективность конъюгации декстрана со спермидином (декстран/спермидин 1/10-1/40)

Номер пробы	Соотношение декстран/периодат натрия, моль/моль (80 мин, 22 <sup>0</sup> С)	Соотношение декстран/спермидин, моль/моль (150 мин, 22 <sup>0</sup> С)
1	1/15	1/10
2	1/25	1/20
3	1/50	1/40

В ходе дальнейших экспериментов было показано, что при увеличении степени окисления декстрана до 75 и выше наблюдался сдвиг молекулярной массы образовавшегося конъюгата декстран/спермидин в низкомолекулярную область, вероятно, вследствие разрывов молекул декстрана. На основании этих данных было сделано заключение о том, что оптимальная степень окисления декстрана достигается при количестве внесенного периодата 25-50 молей на моль декстрана. Эти соотношения были использованы при отработке условий получения конъюгата декстрана с Дельтафероном и спермидином.

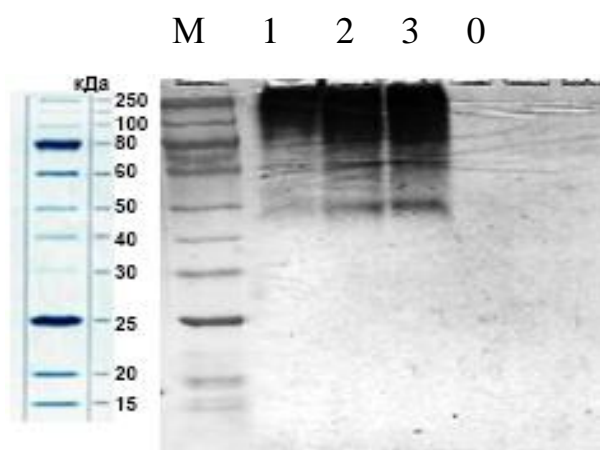


Рисунок 7 - Электрофореграмма образцов конъюгатов декстран/ спермидин в 15% ПААГ в денатурирующих условиях. Окраска Кумасси R-250

1-3 – номера проб, описанных в таблице 6;

0 – смесь неактивированного декстрана и спермидина;

М – маркеры молекулярных масс (15-250 кДа)

При выборе соотношения декстран/белок для получения конъюгата руководствовались следующими соображениями. С одной стороны, внесение в реакционную среду в избытке молекул декстрана может приводить к экранированию активных центров молекулы Дельтаферона и утрате его биологической активности. С другой стороны, следствием значительного избытка молекул белка является кросс-сшивка его молекул, что было показано ранее на примере фактора некроза опухоли альфа [140]. В связи с этим, при получении конъюгата белка с декстраном было использовано соотношение Дельтаферон/декстран 1/1 (моль/моль).

#### ***Определение оптимального содержания в конъюгате спермидина***

Содержание спермидина в конъюгатах декстрана с Дельтафероном, оптимальное для сборки молекулярных конструкций, определяли по эффективности образования комплексов конъюгатов с дсРНК. Образцы полученных конъюгатов смешивали с дсРНК в соотношении 1 мг/ 1 мг. Анализ полученных комплексов проводили электрофорезом в геле агарозы.

На электрофореграмме (рис.8) видно, что комплексы двуспиральной РНК (L- и M-формы), покрытой конъюгатом декстран-спермидин, имеют 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

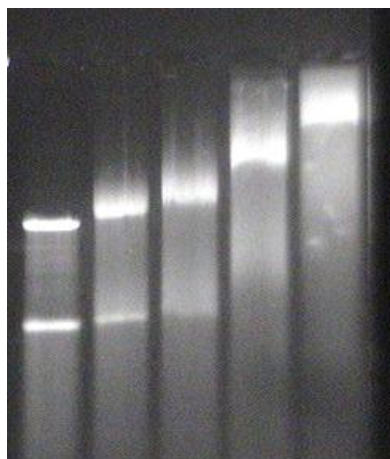


Рисунок 8 - Электрофореграмма (1%-ный гель агарозы, окрашивание этидиум бромидом) образцов, содержащих дсРНК с конъюгатами декстран/спермидин при молярных соотношениях в конъюгатах: 1 – 1/5; 2 - 1/10; 3 - 1/20; 4 - 1/50; И - исходный препарат дсРНК

Для дальнейших экспериментов 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.

### ***Отработка условий получения конъюгатов декстрана с Дельтафероном***

Методом электрофореза в 15%-ом ПААГ было показано, что конъюгаты Дельтаферона с декстраном визуализируются в виде «облаков» с кажущейся молекулярной массой в районе 120-150 кДа (рис.9), что может быть следствием связывания молекулой ИФН-гамма не одной, а нескольких молекул декстрана.

М 1 2

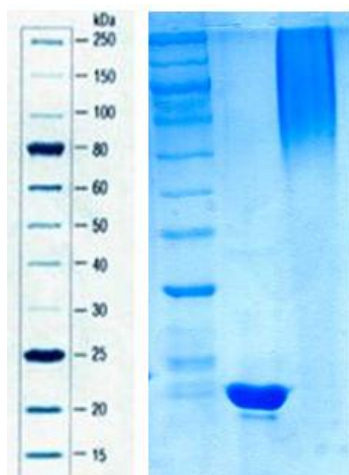


Рисунок 9 - Электрофореграмма конъюгатов декстрана с Дельтафероном. Степень окисления декстрана 50, соотношение белок/декстран 1:1. Электрофорез в 15% ПААГ в денатурирующих условиях, окрашивание Кумасси R-250

1 – Дельтаферон, субстанция;

2 – конъюгат Дельтаферона с декстраном и спермидином;

М – маркеры молекулярных масс (15-250 кДа)

3.1.1.2 Влияние количественного соотношения компонентов конструкции дсРНК и Дельтаферона на сборку молекулярной конструкции

Для уточнения оптимального соотношения компонентов в ходе разработки технологии 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).

Анализ образцов методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) при контрастировании уранил ацетатом показал наличие в препаратах хорошо различимых частиц, имеющих форму, близкую к сферической (рис.10). Размеры частиц, полученных при разном соотношении компонентов, колебались в широком диапазоне от 100 до 1200 нм.

При сравнительно небольших различиях в весовом содержании дсРНК и белка (1:2-1:3) наблюдался значительный (5-10-кратный) разброс в размерах



частиц (рис.10А,Б). Увеличение содержания Дельтаферона до 1:10 по отношению к содержанию дсРНК приводило к уменьшению размеров структур при сохранении их гетерогенности. В образце регистрировали два типа частиц: частицы с диаметром 200-300 нм и более мелкие, 80-150 нм (рис.10Г). 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.10В).

Данные об уровне специфической противовирусной активности, полученные в культуре клеток L-68, подтверждают сохранность биологических свойств Дельтаферона в составе конструкции. Специфическая активность наночастиц с соотношением дсРНК и Дельтаферона 1:2, 1:3, 1:5, 1:10 составила  $6,25 \times 10^3$  МЕ/мг,  $6,25 \times 10^3$  МЕ/мг,  $1,0 \times 10^5$  МЕ/мг и  $0,5 \times 10^5$  МЕ/мг, соответственно. Как видно из приведенных данных, наиболее высокой активностью обладал образец с количественным соотношением дсРНК и дельтаферона 1:5 ( $1 \times 10^5$  МЕ/мг), что близко к активности исходного белка ( $3,2 \times 10^6$  МЕ/мг).

Таким образом, установлено, что введение Дельтаферона в состав наночастицы при количественном соотношении 1 мг дсРНК к 5 мг Дельтаферона приводит к образованию относительно однородных по размеру сферических частиц, отличающихся наибольшей специфической активностью по сравнению с образцами с другим соотношением компонентов. Эти данные позволяют говорить о том, что изменение такого технологического параметра как соотношение компонентов молекулярной конструкции позволяет варьировать размеры частиц и уровень биологической активности экспонированного на поверхности частиц белка.

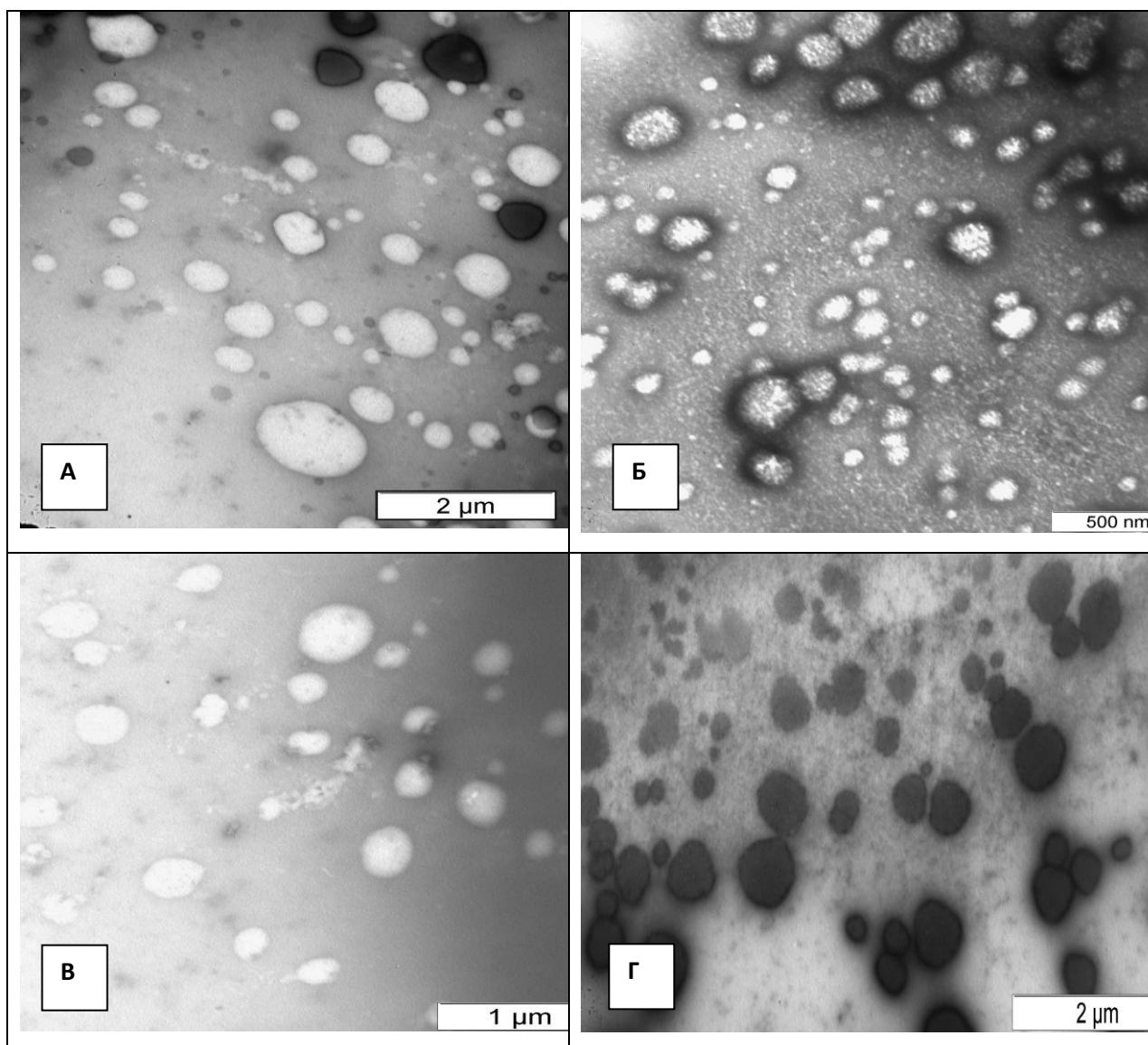


Рисунок 10 - Электронно-микроскопические изображения структур, полученных в результате сборки молекулярных конструкций, при разном соотношении дсРНК и Дельтаферона (по массе): А-1:2; Б-1:3; В-1:5; Г-1:10. Контрастирование уранил ацетатом

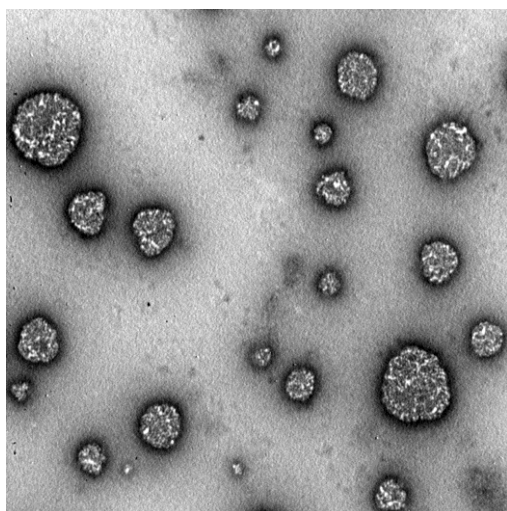
### 3.1.1.3 Влияние технологических параметров – скорости перемешивания и внесения дсРНК на размер частиц молекулярной конструкции

Для оценки влияния на формирование частиц параметров скорости перемешивания и внесения конечного компонента (дсРНК) сборку конструкции проводили в двух вариантах. Получение первого образца молекулярной конструкции, содержащий Дельтаферон, проводили при

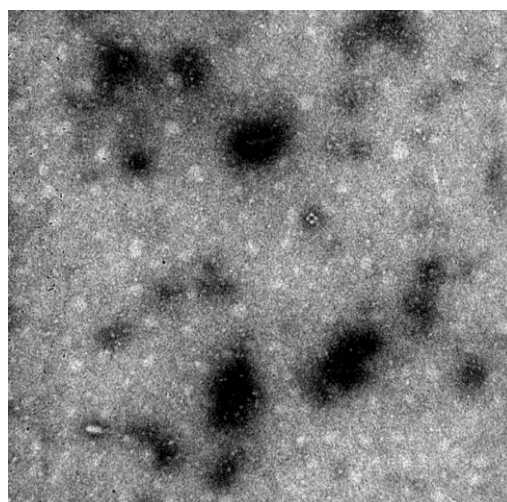
увеличенной скорости перемешивания раствора конъюгата, в 10 раз (500 оборотов в минуту), и медленном, микродозированном по каплям, внесении раствора дсРНК.

Второй образец конструкции, содержащий Дельтаферон, был получен при увеличении скорости перемешивания раствора конъюгата в 10 раз (500 оборотов в мин) и внесении дсРНК быстрым впрыскиванием из шприца.

Исследование данных образцов методом просвечивающей электронной микроскопии показало, что медленное микродозированное (по каплям) внесение дсРНК приводило к образованию частиц размером 50-200 нм (Рис. 11А), при быстром впрыскивании дсРНК образования частиц не происходило (Рис. 11Б).



А



Б

Рисунок 11 - Электронно-микроскопические изображения частиц на основе дсРНК и Дельтаферона при исследовании ПЭМ. А - внесение дсРНК медленно по каплям, Б - внесение дсРНК быстрым впрыскиванием из шприца

Следовательно, установлено, что такие технологические параметры как скорость перемешивания и скорость внесения компонентов оказывают существенное влияние на образование и размер частиц молекулярной конструкции.

Таким образом, отработаны условия получения полисахаридной оболочки молекулярной конструкции, представляющей собой конъюгат

декстрана с Дельтафероном и спермидином, а также условия сборки конструкции на основе двуспиральной РНК в полисахаридной оболочке. Факт образования конструкций подтвержден методом электронной микроскопии.

Полученные данные позволили сформулировать протокол синтеза конъюгатов и сборки молекулярных конструкций, содержащих Дельтаферон, приведенный ниже.

### Протокол синтеза молекулярной конструкции на основе Дельтаферона

100 мг (0,25 мкмоль) декстрана Д40 в 2 мл воды + 1/50 = 12,5 мкмоль = 12,6 мг периодата натрия в 0,6 мл воды 30 мин при 22 <sup>0</sup> С Гель-фильтрация на колонке с G-25 (10 мл) в карбонатном буфере, рН 8,8 (50 мМ), уравновесить заранее V ≈ 4 мл
41 мг (370 нмоль) (25 мл) Дельтаферон Гель-фильтрация на колонке с G-25 (9 мл) в карбонатном буфере, рН 8,8 (50 мМ), уравновесить заранее Наносить на слой сорбента последовательно Элюировать карбонатным буфером, рН 8,8 (50 мМ)
+ 4 мл активированного декстрана
3 ч при 32 <sup>0</sup> С, на качалке
+ спермидин, 19300 нмоль = 2,8 мг 1,5 ч при 22 <sup>0</sup> С + боргидрид натрия, 4 мг 1 ч при 22 <sup>0</sup> С Гель-фильтрация на колонке с сефарозой 6В (10 мл) в фосфатно-солевом буфере, рН 7,4 V ≈ 29
Внесение 4,1 мг дсРНК в 0,9%-ом растворе NaCl. Инкубация 30 мин
V ≈ 40,1 мл Концентрация по Дельтаферону ≈ 1,2 мг/мл Концентрация по дсРНК ≈ 0,25 мг/мл

На основании разработанного протокола была оформлена «Инструкция по изготовлению и контролю препарата Дельтаферон в транспортной системе (ВПЧ-дельтаферон), субстанция ИК – 11/01 - 2012» на 33 стр. (Приложение 1).

### 3.1.1.4 Исследование физико-химических свойств препарата молекулярной конструкции, содержащей Дельтаферон

#### *Электронно-микроскопический и гранулометрический анализ образцов конструкций*

Для исследования были использованы образцы молекулярных конструкций в жидкой и лиофилизированной форме.

На рисунке 12 представлены электронно-микроскопические фотографии молекулярных конструкций, содержащих Дельтаферон, полученные методом просвечивающей электронной микроскопии.

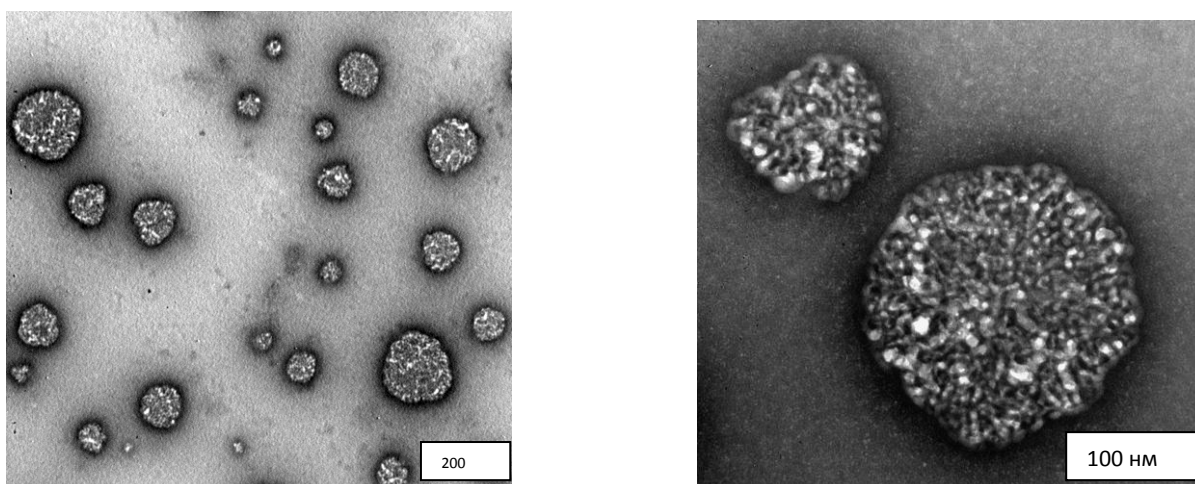


Рисунок 12 - Электронно-микроскопические фотографии частиц в образцах молекулярных конструкций, содержащих Дельтаферон, полученные методом ПЭМ: А-общий вид частиц в препарате; Б- изображение отдельных частиц. Контрастирование уранил ацетатом

Видно, что молекулярные конструкции представляют собой частицы, имеющие форму, близкую к сферической, с размером 50-200 нм.

Похожие результаты были получены методом динамического светорассеяния. На рисунках 13 и 14 представлено распределение частиц по размерам для серий из 3-х измерений.

Анализ образца молекулярной конструкции в растворе показал, что в препарате присутствуют частицы размером около 300 нм – 83,9% и сравнительно небольшие частицы диаметром 10-30 нм – 16,1% (Рис.13).

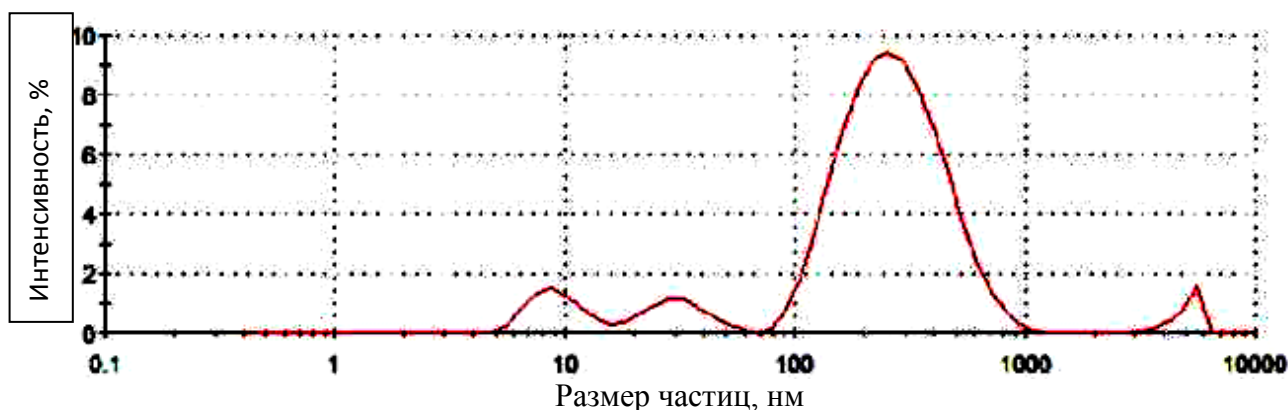


Рисунок 13 - График распределения частиц по размерам, рассчитанный усреднением 3-х измерений для образца молекулярной конструкции в жидком состоянии

При анализе лиофилизированного образца конструкции после восстановления до раствора основной сигнал соответствовал частицам размером 200 нм - 94,8%, доля сравнительно небольших частиц (около 20 нм) составляла 5,2% (Рис.14). То есть, лиофильно высушенные образцы отличались большей однородностью размерных характеристик по сравнению с образцами в растворе. Вероятно, хранение препарата в жидком состоянии приводит к агрегации частиц, чего не наблюдается в лиофилизате, частицы которого отличаются большей стабильностью.

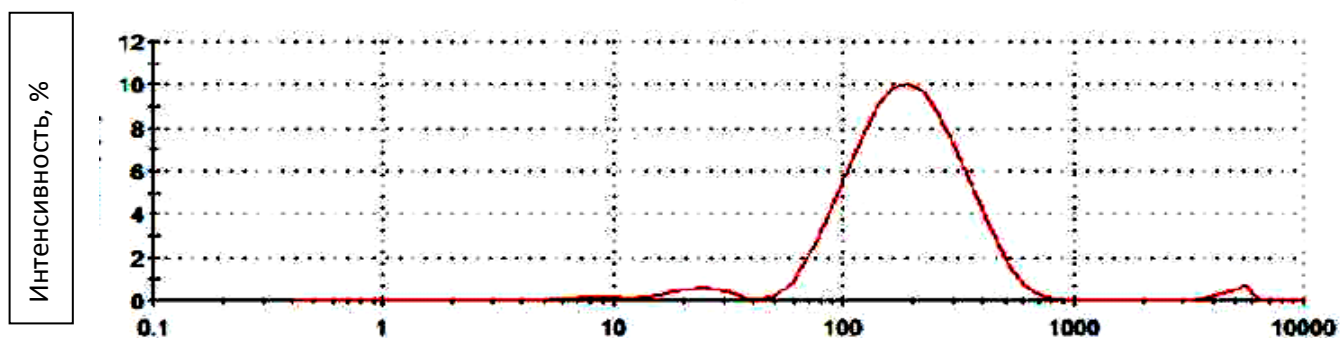


Рисунок 14 - График распределения частиц по размерам, рассчитанный усреднением 3-х измерений для образца молекулярной конструкции в лиофилизированном состоянии

Таким образом, анализ гранулометрического состава образцов молекулярных конструкций, содержащих Дельтаферон и дсРНК, показал, что в результате сборки образуются относительно однородные по размеру сферические наночастицы с диаметром около 200 нм (94% от общего количества частиц), сохраняющие свои характеристики после лиофилизации и хранения в составе лиофилизированных образцов.

Важным условием сохранности биологических свойств активных компонентов композиций или конструкций является сохранение структуры компонентов в составе препаратов. Особенно это актуально для белков в составе многокомпонентных биофармацевтических композиций. Известно, что под влиянием физических или химических воздействий белки быстро теряют нативность. Как правило, это приводит к изменению третичной и частично - вторичной структуры молекулы и не сопровождается какими-либо изменениями первичной структуры. Изменение уникальной структуры нативного белка сопровождается потерей характерных для него свойств: растворимости, биологической активности, электрофоретической подвижности [102]. Сохранение вторичной структуры важно и для реализации биологических свойств полинуклеотидов. Известно, например, что биологическая активность двуспиральных РНК определяется не первичной структурой полинуклеотидных нитей, т.е. составом и последовательностью нуклеотидов, а образуемой полинуклеотидами вторичной структурой [38].

В связи с этим, представлялось целесообразным провести исследование молекулярной конструкции в сравнении с ее компонентами методами ультрафиолетовой спектроскопии (УФ-спектроскопии) и кругового дихроизма (КД) и оценить влияние сборки конструкции на вторичную структуру дельтаферона и дсРНК.

*Исследование структурных характеристик молекулярной конструкции, содержащей Дельтаферон, и ее компонентов*

В ходе анализа в каждом опыте проводилась параллельная запись спектров индивидуальных препаратов, а также модельной смеси компонентов молекулярной конструкции, рассчитанной теоретически, т.е. содержащей эквивалентные количества дсРНК и Дельтаферона, в сравнении со спектрами экспериментальных образцов молекулярной конструкции.

Исследование методом УФ-спектроскопии показало, что образец дсРНК имеет УФ-спектр с максимумом поглощения 260 нм, характерный для нуклеиновых кислот, Дельтаферон - характерный спектр белков с максимумами при 205 и 280 нм. УФ-спектр молекулярной конструкции, содержащей Дельтаферон, представлял собой аддитивную сумму спектров Дельтаферона и дсРНК с незначительными отличиями, которые могут быть связаны с погрешностью метода (рис.15).

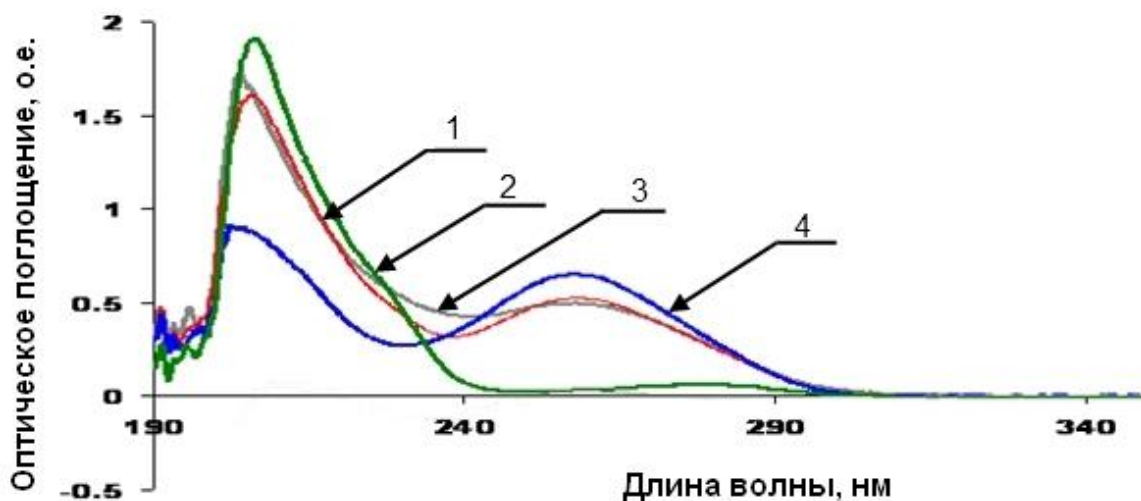


Рисунок 15 - УФ-спектры молекулярной конструкции и ее компонентов (Дельтаферон, дсРНК)

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



Полученные данные согласуются с результатами ранее проведенных исследований [124] и свидетельствуют о сохранности структуры дсРНК и белка в составе молекулярной конструкции.

Анализ молекулярной конструкции и ее компонентов методом кругового дихроизма показал, что КД-спектр дсРНК имеет форму, характерную для А-формы нуклеиновых кислот (рис.16). Максимум КД-спектра образца дсРНК расположен вблизи максимума поглощения нуклеиновых кислот (261 нм и 257 нм, соответственно), а в отрицательной полосе имеется локальный минимум в районе 235 нм [114].

Спектры КД Дельтаферона характерны для  $\alpha$ -спиралей белков: наблюдается отрицательная полоса в области спектра от 200 до 350 нм, имеющая два локальных минимума в районе 210 и 220 нм [77].

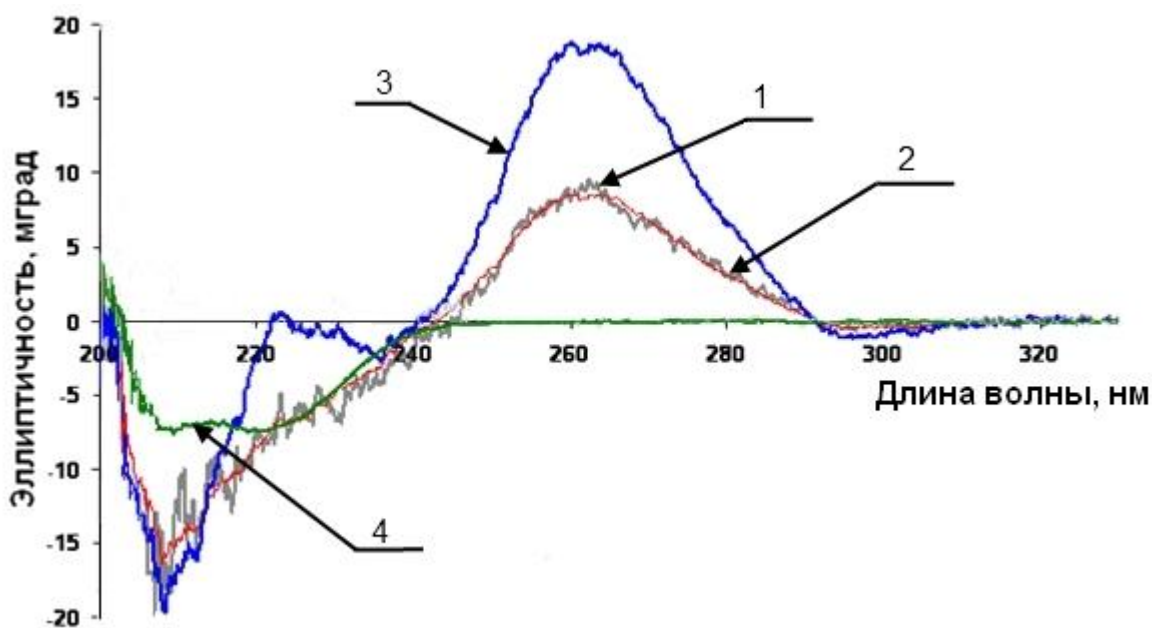


Рисунок 16 - КД-спектры молекулярной конструкции и ее компонентов (дельтаферон, дсРНК)

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

Спектр кругового дихроизма молекулярной конструкции являлся аддитивной суммой спектров Дельтаферона и дсРНК (рис.16). Видно, что спектр модельной смеси компонентов конструкции (линия №1) и

экспериментальный спектры молекулярной конструкции (№2) достаточно хорошо совпадают между собой.

Таким образом, результаты спектрометрического исследования свидетельствуют об отсутствии значительных конформационных перестроек во вторичной структуре как белкового, так и нуклеинового компонентов созданной молекулярной конструкции.

*Оценка наличия и стабильности белкового и нуклеинового компонентов в составе конструкции*

Анализ препаратов молекулярной конструкции методами электрофореза в 1% агарозе и 12% ПААГ подтвердил наличие в полученных образцах белкового и нуклеинового компонентов (рис.17).

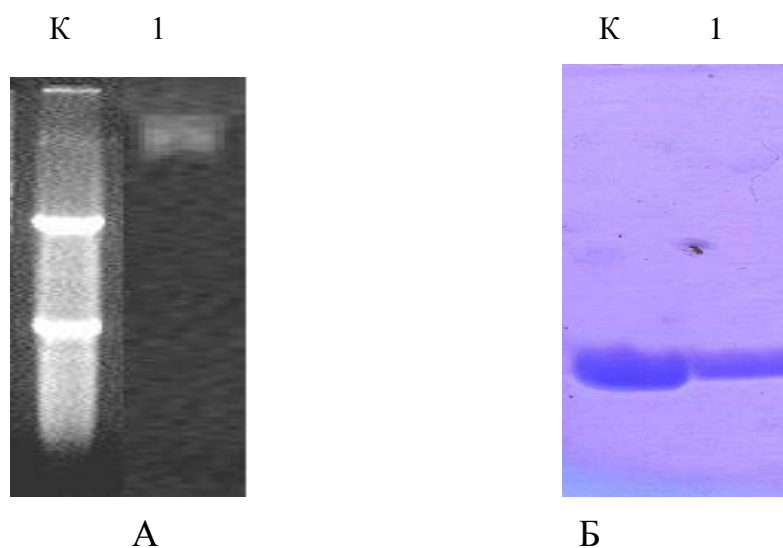


Рисунок 17 - Электрофореграмма образца молекулярной конструкции в 1%-ном геле агарозы (А) и 12% ПААГ (Б). К – исходные препараты (дсРНК, Дельтаферон); 1 – образец молекулярной конструкции

*Оценка устойчивости к температурным воздействиям.* Одной из критических характеристик фармацевтической субстанции является сохранение ее структурно-функциональных свойств при хранении при различных температурных режимах. В связи с этим, был проведен ряд экспериментов по оценке устойчивости белкового компонента молекулярной

конструкции в условиях хранения при различных температурных режимах, результаты одного из которых представлены на рисунке 18.

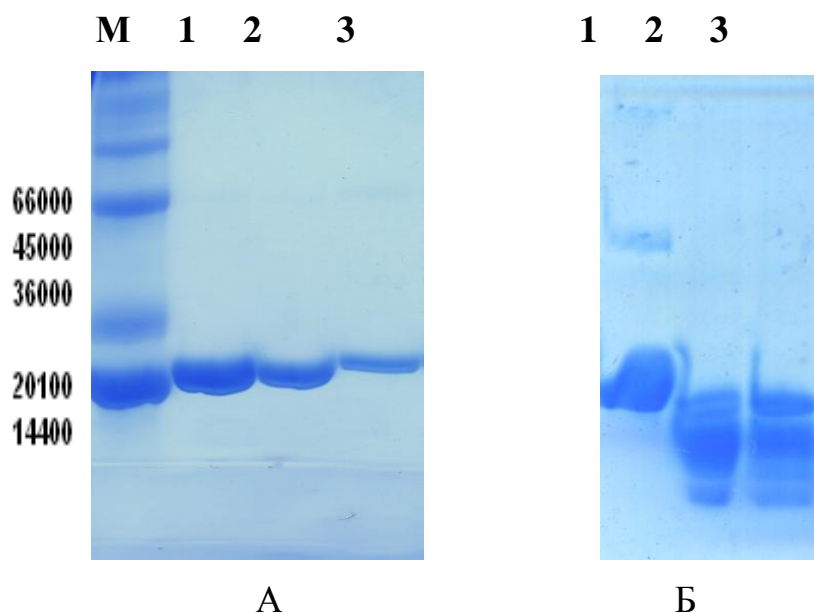


Рисунок 18 - Электрофореграмма препаратов: А- молекулярной конструкции, Б- исходного Дельтаферона, после хранения в течение 24 часов при: (1) +6 °С; (2) +20 °С; (3) - 4 °С. Электрофорез в 12% ПААГ, окрашивание Кумасси G-250. М - маркер молекулярных масс 14400-66000 Да

Анализ препаратов молекулярной конструкции (в жидкой форме) методом электрофореза в 12% ПААГ показал, что белок, экспонированный на поверхности наночастицы, отличался устойчивостью при хранении в течение суток в широком диапазоне температур (от - 4 °С до +20 °С), в отличие от исходного белка Дельтаферон, сохранность которого наблюдается лишь при +6 °С (рис.18).

Электрофореграммы образца молекулярной конструкции, хранившегося в течение 6 месяцев при 6 °С, приведены на рисунке 19.

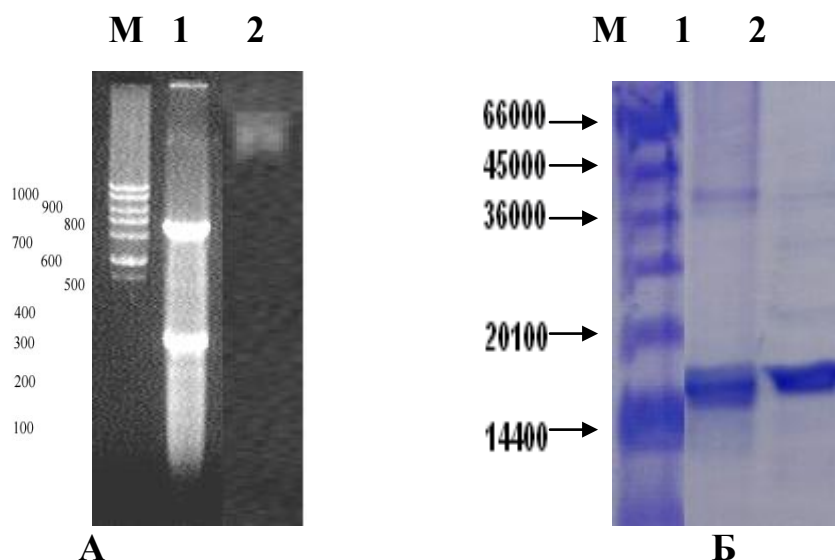


Рисунок 19 - Электрофореграмма образца молекулярной конструкции, содержащей дсРНК и Дельтаферон, при хранении при +6 °С в течение 6 месяцев

А - Электрофореграмма дсРНК в составе молекулярной конструкции. Электрофорез в 1%-ном геле агарозы, окрашивание этидиум бромидом:

М – маркеры молекулярных масс нуклеиновых кислот (100-10000 п.н.);

1 – дсРНК из дрожжей *S. cerevisiae*, препарат сравнения;

2 – молекулярная конструкция;

Б - Электрофореграмма Дельтаферона в составе молекулярной конструкции. Электрофорез в 12% ПААГ, окрашивание Кумасси G-25:

М – маркеры молекулярных масс (14400-66000 Да);

1 – молекулярная конструкция;

2 – Дельтаферон, препарат сравнения.

Наличие белкового компонента на электрофореграмме (рис.19Б, дорожка 1) в составе конструкции и снижение подвижности нуклеинового компонента в 1%-ном геле агарозы (рис.19А, дорожка 2) подтверждают сохранность компонентов конструкции при хранении, аналогичную стабильности дсРНК и Дельтаферона.

*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. В связи с этим, необходимым этапом характеристики полученной конструкции являлось изучение устойчивости ее белкового компонента к воздействию протеаз, нуклеинового компонента - к нуклеазному воздействию.

*Анализ протеолитической устойчивости белка в составе конструкции.*

Анализ протеолитической устойчивости Дельтаферона в составе молекулярной конструкции к действию трипсина показал, что Дельтаферон в составе конструкции более устойчив к ферментативному воздействию, чем свободный Дельтаферон. Если несвязанный Дельтаферон подвергался деградации после добавления в среду трипсина в количестве  $26 \cdot 10^{-7}$  е.а, то структура белка в составе конструкции не менялась при инкубации с ферментом в дозе, 10 раз большей ( $26 \cdot 10^{-6}$  е.а.) (рис.20).

Аналогичные закономерности были обнаружены в ходе исследования протеолитической устойчивости образцов конструкции в жидкой форме, хранившейся при  $+6^{\circ}\text{C}$  в течение 6 месяцев. Было показано, что белок в составе конструкции отличался повышенной устойчивостью к ферментативному воздействию, в сравнении с препаратом Дельтаферон.

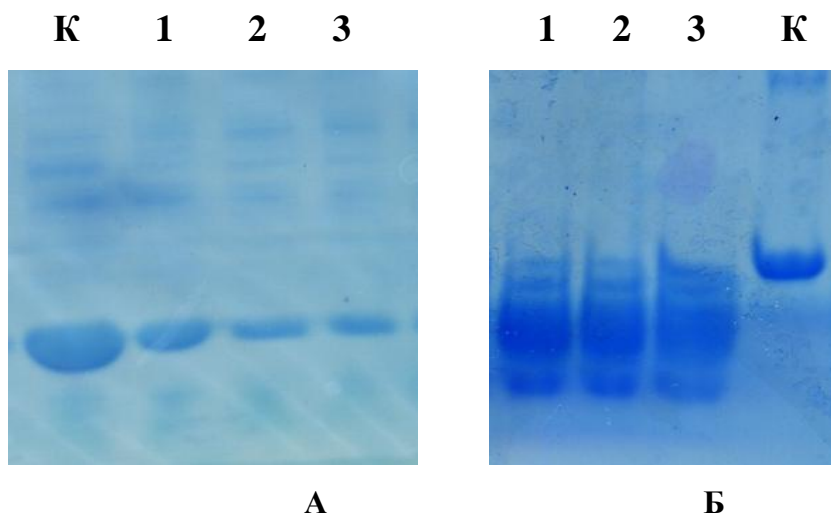


Рисунок 20 - Электрофоретический анализ протеолитической устойчивости Дельтаферона в составе молекулярной конструкции (А) в сравнении с Дельтафероном (Б) после 5-минутной инкубации с трипсином в концентрации: 1-  $26 \cdot 10^{-7}$  е.а трипсина; 2 –  $13 \cdot 10^{-7}$  е.а. трипсина; 3 –  $26 \cdot 10^{-6}$  е.а. трипсина; К –без добавления трипсина (контроль). Электрофорез в 12% ПААГ, окрашивание Кумасси G-250

Полученные данные свидетельствуют о том, что Дельтаферон в составе конструкции отличается повышенной ферментативной устойчивостью, которая сохраняется при хранении образцов препарата, по меньшей мере, в течение 6 месяцев.

*Анализ устойчивости дсРНК в составе конструкции к нуклеазам.*

Анализ показал, что структура дсРНК в составе молекулярной конструкции сохранялась после инкубации в среде с добавлением рибонуклеазы в количестве 10 ед.акт., тогда как несвязанная дсРНК подвергалась полной деградации при добавлении фермента в два раза меньшей дозе (рис.21).

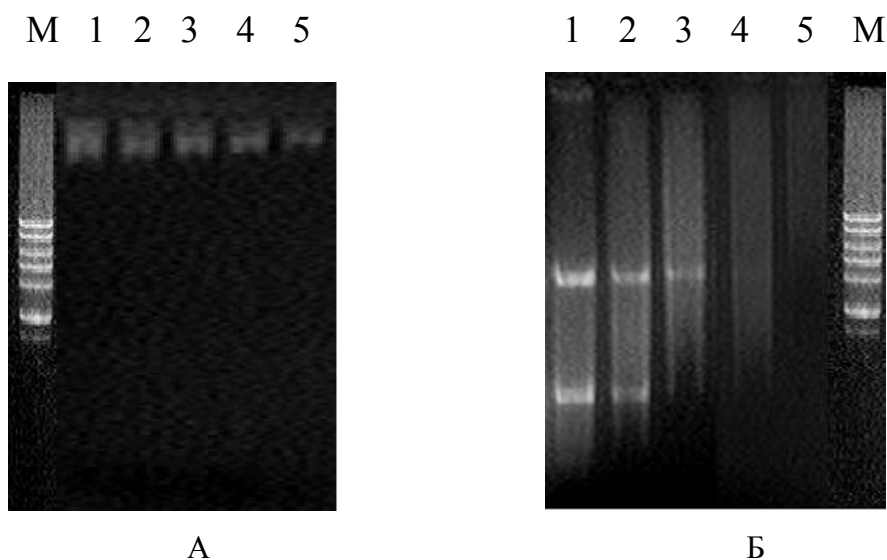


Рисунок 21 - Электрофореграмма дсРНК после инкубации с рибонуклеазой в разных дозах: А - дсРНК в составе молекулярной конструкции, содержащей Дельтаферон; 1- без воздействия фермента; 2 – при инкубации с рибонуклеазой *E.coli*, 0,1 е.а; 3 – при инкубации с рибонуклеазой *E.coli*, 1 е.а; 4 - при инкубации с рибонуклеазой *E.coli*, 5 е.а; 5- при инкубации с рибонуклеазой *E.coli*, 10 е.а; Б - дсРНК в свободной форме: 1 – без воздействия фермента; 2 - при инкубации с рибонуклеазой *E.coli*, 0,1 е.а; 3 – при инкубации с рибонуклеазой *E.coli*, 1 е.а; 4 - при инкубации с рибонуклеазой *E.coli*, 5 е.а; 5- при инкубации с рибонуклеазой *E.coli*, 10 е.а.; М - маркеры молекулярных масс нуклеиновых кислот (250-10000 п.н.). Электрофорез в 1% геле агарозы, окрашивание этидиум бромидом

Эти данные, на наш взгляд, могут свидетельствовать о том, что полисахаридная оболочка, покрывающая дсРНК в структуре частицы, ослабляет воздействие нуклеаз, которое проявляется лишь при достаточно высоких дозах фермента в инкубационной среде.

Таким образом, показано, что как белок, так и дсРНК в составе молекулярной конструкции приобрели 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 +6 °С.

### 3.1.1.5 Исследование биологических свойств молекулярной конструкции, содержащей Дельтаферон

#### 3.1.1.5.1 Исследование иммуномодулирующей активности препарата молекулярной конструкции

Как известно, в основе противовирусного действия неспецифических противовирусных средств лежит их активирующее воздействие на систему неспецифической устойчивости, ключевым фактором которой является система интерферонов. В связи с этим, разработанная молекулярная конструкция, несущая Дельтаферон, была исследована на способность повышать продукцию эндогенных интерферонов.

Оценка интерферониндуцирующей активности препаратов молекулярной конструкции показала, что однократное внутрибрюшинное введение препарата в дозе 50 тыс. МЕ на мышь приводило к достоверному повышению уровня ИФН- $\gamma$  в сыворотке крови. Содержание ИФН- $\gamma$  в крови мышей опытной группы через 3 часа после инъекции повышалось до  $111 \pm 35$  пг/мл при нулевом уровне показателя в контрольной группе мышей.

Следует отметить, что введение препарата сравнения Дельтаферон в той же дозе не приводило к существенному повышению значений данного показателя (данные не представлены). Усиление ИФН-индуцирующей

активности Дельтаферона в составе конструкции, вероятно, связано с синергидным действием дсРНК, обладающей способностью индуцировать синтез интерферонов обоих типов [110].

В отличие от несвязанного Дельтаферона, препарат молекулярной конструкции обладал способностью повышать и уровень ИФН- $\alpha$  крови, что, по-видимому, также обусловлено присутствием в его составе дрожжевой двуспиральной РНК (табл.7). 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 и через сутки после введения (значения показателя в опытной и контрольной группах различались в 4,7 раза).

Таблица 7 - Уровень ИФН- $\alpha$  в сыворотке крови мышей в разные сроки после введения препарата молекулярной конструкции, содержащей Дельтаферон (МК Дельтаферон) (в/бр, однократно, 50 тыс. МЕ)

Препарат, доза	Содержание ИФН- $\alpha$ в сыворотке крови, пг/мл	
	Через 3 часа после инъекции	Через 24 часа после инъекции
Физиологический раствор	18,6 $\pm$ 2,4	23,8 $\pm$ 2,1
МК Дельтаферон, 50 тыс. МЕ	303 $\pm$ 107 *	113 $\pm$ 91
Дельтаферон, 50 тыс. МЕ	16,7 $\pm$ 2,3	21,2 $\pm$ 2,2

\* - различия достоверны, по сравнению с контролем (физиологический раствор),  $p \leq 0,05$

Таким образом, установлено, что препарат молекулярной конструкции, содержащей Дельтаферон, в дозе 50 тыс. МЕ на мышшь вызывает повышение уровня ИФН обоих типов. Дельтаферон в той же дозе ИФН-индуцирующей активности не проявлял. Различия в эффектах препаратов, вероятно, являются результатом проявления активности дсРНК в составе конструкции, которая способна усиливать образование как ИФН- $\gamma$ , так и ИФН- $\alpha$ . Эти



данные свидетельствует о том, что наблюдаемый эффект, скорее всего, обусловлен сочетанным действием дсРНК и Дельтаферона.

### 3.1.1.5.2 Исследование противовирусной активности препарата молекулярной конструкции

Исследование противовирусной активности препарата молекулярной конструкции, содержащей Дельтаферон, проводили на экспериментальной модели гриппозной инфекции, вызванной вирусом гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2).

Результаты оценки динамики гибели мышей, продолжительности жизни, количества выживших инфицированных животных представлены в таблице 8.

Таблица 8 - 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±Sm)
1.	МК Дельтаферон, 10 <sup>3</sup> МЕ, n=10	3 (30%)	7 <sup>&amp;</sup> (70%)	21,7	10,90±3,60* £
2.	МК Дельтаферон, 10 <sup>5</sup> МЕ, n=10	1 (10%)	9 <sup>&amp;</sup> (90%)	1,7	9,50±2,51 <sup>£</sup>
3.	Тамифлю, n=12	12 (100%)	0 <sup>#</sup> (0%)	91,7	16,00±0,00*
4.	Контроль ВГ A/Aichi/2/68 (H3N2), n=12	1 (8,3%)	11 (91,7%)	-	8,42±2,50

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

# - отличие от Контроля по критерию  $\chi^2$  при  $p \leq 0,05$ ; & - отличие от группы «Тамифлю» по критерию  $\chi^2$  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  $p \leq 0,05$ .

Видно, что введение молекулярной конструкции, содержащей Дельтаферон, приводило к увеличению количества выживших инфицированных мышей и повышению продолжительности их жизни по сравнению с показателями в контрольной группе животных. Достоверное увеличение продолжительности жизни инфицированных мышей по сравнению с показателем контроля наблюдалось при введении препарата в дозе  $10^3$  МЕ на мышшь.

Полученные данные подтверждают наличие у препарата молекулярной конструкции, содержащей Дельтаферон, противовирусной активности в отношении вируса гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2).

Таким образом, в результате данного этапа работы отработана технология получения препарата Дельтаферон в составе молекулярной конструкции. Показано, что использованный метод позволяет получать конструкции, представляющие собой однородные по размеру сферические частицы со специфической активностью, близкой к активности исходного белка. Продемонстрировано повышение устойчивости компонентов конструкции (Дельтаферон, дсРНК) к температурным и ферментативным факторам деградации.

Установлено, что включение Дельтаферона в состав конструкции, содержащей индуктор интерферона дсРНК, приводит к снижению дозы белка, индуцирующей синтез ИФН- $\gamma$  и появлению способности усиливать продукцию ИФН- $\alpha$ . В экспериментах *in vivo* продемонстрирована противовирусная активность препарата МК Дельтаферон в отношении вируса гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2).

3.1.2 Разработка интраназальной формы противовирусного препарата на основе аналога интерферона гамма в составе молекулярной конструкции

3.1.2.1 Выбор рецептуры и условий получения интраназальной формы Дельтаферона в составе конструкции

При разработке состава и технологии получения интраназальной лекарственной формы необходимо было выбрать вспомогательные вещества, которые бы обеспечивали :

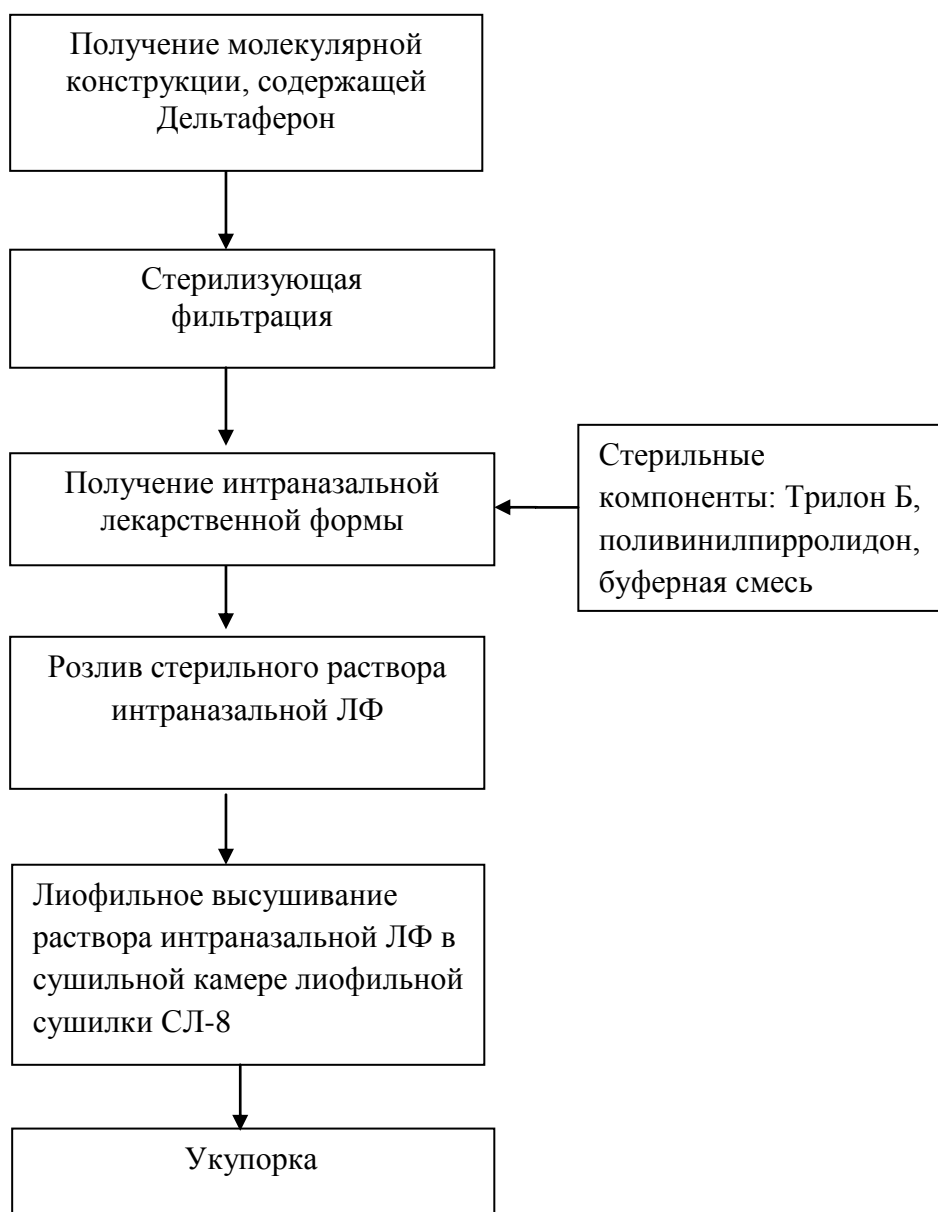
- сохранение биологической активности компонентов молекулярной конструкции;
- предотвращение микробной контаминации;
- обеспечение физико–химической стабильности лекарственной формы.

Исходя из теоретических соображений на основании анализа литературных данных, а также принимая во внимание [139], 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.

Образец препарата Дельтаферона в составе молекулярной конструкции (МК Дельтаферон) был получен по следующей технологической схеме.

### Технологическая схема получения лиофильно – высушенной интраназальной лекарственной формы МК Дельтаферон



Раствор поливинилпирролидона с массовой долей 6% и раствор трилона Б с массовой долей 10% перемешивают 10-15 минут на магнитной мешалке. В полученную смесь дозатором пипеточным вносят раствор МК Дельтаферон (исходя из расчета 50 000 МЕ на 1 мл раствора). Затем добавляют раствор фосфатно-солевого буфера, рН 7,2, содержащего 7 ммоль/л натрия фосфорнокислого двузамещенного 12-ти водного, 3 ммоль/л калия фосфорнокислого однозамещенного, 0,15 моль/л натрия хлористого, раствор перемешивают 25-30 минут на мешалке.

Полученный раствор интраназальной формы МК Дельтаферон передают на стадию стерилизующей фильтрации и розлива с последующей лиофилизацией.

Ниже приведен состав лекарственного средства на 1 мл буферной смеси, полученного по отработанной технологии (содержание компонентов расчетное):

- Дельтаферон в составе молекулярной конструкции – 50000 МЕ;
- Поливинилпирролидон (40000 Да) – 0,05 г;
- Трилон Б – 0,0001 г.

Исследование стабильности Дельтаферона в жидкой и лиофильно высушенной интраназальных лекарственных формах проводили методом электрофореза в 12% ПААГ. При исследовании стабильности Дельтаферона в лиофильно высушенной лекарственной форме образец растворяли в 1 мл стерильной воды. Результаты электрофоретического анализа интраназальных форм Дельтаферона в составе молекулярной конструкции представлены на рисунке 22.

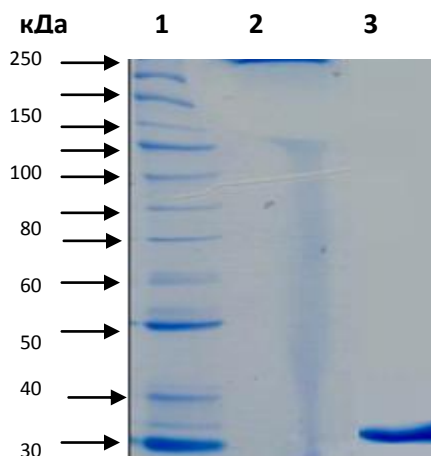


Рисунок 22 - Электрофореграмма интраназальной формы МК Дельтаферон в 12% ПААГ, окрашивание Кумасси G-250

- Дорожки: 1 – белковый маркер М31 (10 -250 кДа) + лизоцим (14,4 кДа);  
 2 – МК Дельтаферон (интраназальная форма);  
 3 - субстанция Дельтаферона (контроль)

Видно, что препарат МК Дельтаферон находится в гетерогенном состоянии: часть композиции при электрофорезе остается в «карманах» геля, другая присутствует в виде растянутой полосы в интервале молекулярных масс от 16,1 кДа (молекулярная масса Дельтаферона) до 80 кДа.

Вероятно, это объясняется гетерогенностью поливинилпирролидона и образованием комплексных соединений белка с разными фракциями полимера. Надо сказать, что аналогичная картина наблюдалась при электрофорезе субстанции Дельтаферона в составе композиции того же состава (результаты не приведены).

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. Вероятно, это связано с синергидным эффектом Дельтаферона и дсРНК в составе конструкции.

Для оценки стабильности экспериментальных образцов препарата МК Дельтаферон при изучении сроков хранения определяли специфическую противовирусную активность образцов в культуре клеток L-68 при хранении препаратов при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С в течение года.

Результаты анализа образцов препарата МК Дельтаферон, лиофилизат для приготовления назального раствора 50000 МЕ, представлены в таблице 9. На основании приведенных данных можно заключить, что срок хранения препарата молекулярной конструкции, содержащей Дельтаферон, лиофилизат для приготовления назального раствора 50000 МЕ, при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С составляет не менее 20 месяцев.

Таблица 9 - Характеристики препарата МК Дельтаферон, лиофилизат для приготовления назального раствора 50000 МЕ, при хранении

Срок хранения	Серия	Дата наработки	Специфическая противовирусная активность, МЕ/мл	
			на дату наработки	на дату анализа при хранении
12 месяцев	010514	29.05.14	$1,25 \cdot 10^6$	$6,25 \cdot 10^6$
	020514	03.07.14	$6,25 \cdot 10^6$	$4,0 \cdot 10^6$
20 месяцев	010514	29.05.14	$1,25 \cdot 10^6$	$2,0 \cdot 10^6$

На основании разработанной технологической схемы была оформлена «Инструкция по изготовлению и контролю препарата ВПЧ-дельтаферон, лиофилизат для интраназального применения 50000 МЕ», ИК-16/01-2013 (Приложение 2).

3.1.2.2 Исследование биологических свойств интраназальной формы Дельтаферона в составе конструкции

3.1.2.2.1 Исследование иммуномодулирующих свойств интраназальной формы препарата

Иммуномодулирующую активность интраназальной формы МК Дельтаферон оценивали на мышах по ее влиянию на интенсивность продукции интерферона, как локальной, в тканях верхних дыхательных путей и легких, так и системной, по уровню интерферона в сыворотке крови.

Из приведенных ниже данных видно, что интраназальное введение препарата в дозах  $5 \times 10^4$  и  $5 \times 10^6$  МЕ/кг приводило к достоверному повышению уровня сывороточного ИФН по сравнению с контролем (табл. 10, рис.23).

Таблица 10 - Титры ИФН в сыворотке крови, супернатантах гомогенатов легких и носоглоток мышей, взятых через 3 часа после интраназального введения МК Дельтаферон

Группа	Титры ИФН		
	Сыворотка крови	Легкие	Носоглотка
Контроль (физ. раствор)	1:16	1:16	1:16
МК Дельтаферон, $5 \times 10^4$ МЕ/кг	1:179 *	1:307 *	1:410 *
МК Дельтаферон, $5 \times 10^6$ МЕ/кг	1:717 *,**	1:973 *	1:717 *
Интактные	1:16		

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

Титры ИФН в сыворотке крови повышались после введения препарата в обеих использованных дозах: в 11 раз при введении дозы  $5 \times 10^4$  МЕ/кг ( $10^3$  МЕ/мышь) и в 45 раз - в дозе  $5 \times 10^6$  МЕ/кг ( $10^5$  МЕ/мышь) (рис.23).

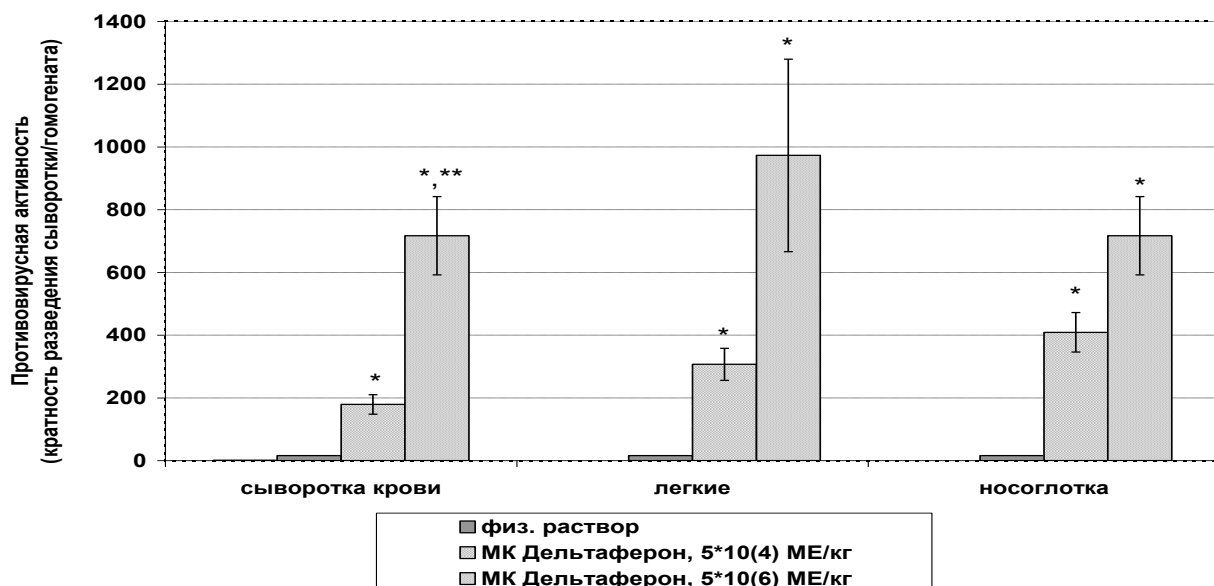


Рисунок 23 - Титры интерферона в сыворотке крови мышей через 3 часа после однократного введения интраназальной формы препарата молекулярной конструкции, содержащей Дельтаферон (МК Дельтаферон).

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



Титры ИФН крови в группе мышей, которым вводили МК Дельтаферон в дозе  $5 \times 10^6$  МЕ/кг, превышали его значения у мышей после введения препарата в дозе  $5 \times 10^4$  МЕ/кг.

Динамика изменения содержания ИФН в ткани легких мышей после введения интраназальной формы МК Дельтаферон была аналогична наблюдаемой в сыворотке крови (табл.10, рис.23). Противовирусная активность гомогенатов легких мышей, которым вводили препарат в низкой дозе ( $5 \times 10^4$  МЕ/кг), превышала контрольный уровень в 19 раз. Более значительное увеличение титра ИФН было отмечено при введении препарата в высокой дозе ( $5 \times 10^6$  МЕ/кг) (в 61 раз по сравнению с контрольным показателем).

Результаты изучения влияния интраназальной формы препарата МК Дельтаферон на содержание ИФН в ткани носоглотки мышей свидетельствуют о многократном повышении противовирусной активности гомогенатов (табл. 10, рис. 23). Введение препарата в дозе  $5 \times 10^4$  МЕ/кг вызывало увеличение титров ИФН более, чем в 20 раз, в дозе  $5 \times 10^6$  МЕ/кг - в 45 раз.

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

#### 3.1.2.2.2 Исследование противовирусной активности интраназальной формы препарата на модели гриппозной инфекции

Результаты оценки динамики гибели мышей, показатели продолжительности жизни, количества выживших инфицированных мышей представлены в таблице 11.

Видно, что интраназальное введение препарата МК Дельтаферон в дозе  $10^5$ МЕ на мышью вызывало увеличение количества выживших

инфицированных мышей по сравнению с показателями в контрольной группе животных (коэффициент защиты 21,7%). Увеличение продолжительности жизни инфицированных мышей по сравнению с контрольным показателем наблюдалось после введения обеих доз препарата, достоверные изменения отмечены в дозе  $10^3$  МЕ на мышь.

Следовательно, на мышах, инфицированных вирусом гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2), интраназальная форма препарата молекулярной конструкции, содержащей Дельтаферон, также как препарат при внутрибрюшинном введении (табл.8), обладала умеренно выраженной противовирусной активностью, которая проявлялась в повышении количества выживших животных и увеличении средней продолжительности жизни.

Таблица 11 - Противовирусная активность интраназальной формы МК 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	2 (20%)	8 <sup>&amp;</sup> (80%)	11,7	10,10 $\pm$ 3,14* £
2.	МК Дельтаферон, $10^5$ МЕ, n=10	3 (30%)	7 <sup>&amp;</sup> (70%)	21,7	10,40 $\pm$ 3,95 <sup>£</sup>
3.	Тамифлю, n=12	12 (100%)	0 <sup>#</sup> (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  $\chi^2$  при  $p \leq 0,05$ ; & - отличие от Тамифлю по критерию  $\chi^2$  при  $p \leq 0,05$ ; \* - отличие от Контроля по U-критерию Манна-Уитни при  $p \leq 0,05$ ; £ - отличие от Тамифлю по U-критерию Манна-Уитни при  $p \leq 0,05$ ;

Таким образом, отработан метод получения интраназальной формы молекулярной конструкции, содержащей Дельтаферон. Продемонстрировано повышение устойчивости Дельтаферона в составе интраназальной формы при хранении. Показано, что интраназальная лекарственная форма препарата обладает противовирусной активностью в отношении вируса гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2), что обусловлено ее способностью повышать продукцию ИФН в тканях верхних и нижних дыхательных путей и сыворотке крови.

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

3.2.1 Отработка условий получения конъюгата полисахарида с Дельтафероном и алендроновой кислотой и сборки молекулярной конструкции

Синтез конъюгата декстрана с Дельтафероном и спермидином вели по отработанной схеме, указанной выше (стр.57) со следующей модификацией. На стадии 4 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). Последующие стадии проводили в соответствии с описанием.

В качестве критерия выбора оптимального количества алендроновой кислоты использовали степень сродства полученных конъюгатов к гидроксилпатиту (ГАП). Для оценки сродства раствор конъюгата (1 мг по декстрану) наносили на колонку с сорбентом (0,5 мл), затем промывали 0,02 М калий-фосфатным буфером, рН 7,2 и проводили десорбцию повышающейся концентрацией соли от 0,02 до 2,0 моль/л, ступенями с шагом 0,1 моль/л. Результаты исследований представлены в таблице 12.

Таблица 12 - Зависимость молярной концентрации калий-фосфатного буфера, необходимого для элюции с гидроксилпатита конъюгатов с различным содержанием алендроновой кислоты, моль/л

Количество алендроновой кислоты, внесенной в реакцию смесь, моль/моль декстрана	0	5	10	20	40
Молярность калий-фосфатного буфера для элюции, моль/л	0,3±0,1	0,6±0,2	1,0±0,2	1,8±0,3	≥ 2

Из приведенных данных видно, что концентрация фосфатного буфера, необходимая для элюции конъюгатов декстрана, полученных при постоянной концентрации в среде спермидина и варьируемых концентрациях алендроновой кислоты, увеличивается пропорционально количеству связанного бифосфоната, что свидетельствует об увеличении сродства конъюгата к ГАП. В связи с этим, было выбрано соотношение алендроновая кислота/декстран, равное 10/1.

На рисунке 24 приведена электрофореграмма конструкции, полученной на основе конъюгатов декстрана с Дельтафероном, алендроновой кислотой и спермидином при выбранных соотношениях.

М 1 2



Рисунок 24 - Электрофореграмма образцов молекулярной конструкции на основе дсРНК и конъюгатов декстрана с Дельтафероном, алендроновой кислотой и спермидином. 1%-ный гель агарозы, окрашивание этидиум бромидом

М – маркеры молекулярных масс (250-10000 п.н.)

1 - дсРНК; 2 – молекулярная конструкция, содержащая Дельтаферон.

Анализ электрофореграммы показывает, 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 (комплексов конъюгата с нуклеиновой кислотой).

Таким образом, отработаны условия получения конъюгата декстрана с Дельтаферон, алендроновой кислотой и спермидином и сборки молекулярной конструкции, содержащей Дельтаферон.

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

#### *Данные электронно-микроскопического исследования*

Электронно-микроскопическое изучение препарата молекулярной конструкции, контрастированного 2% раствором фосфорно-вольфрамовой кислоты (ФВК), выявило наличие в образцах частиц округлой формы, имеющих низкую электронную плотность. Размер частиц варьировал от 10 до 20 нм (рис. 25А).

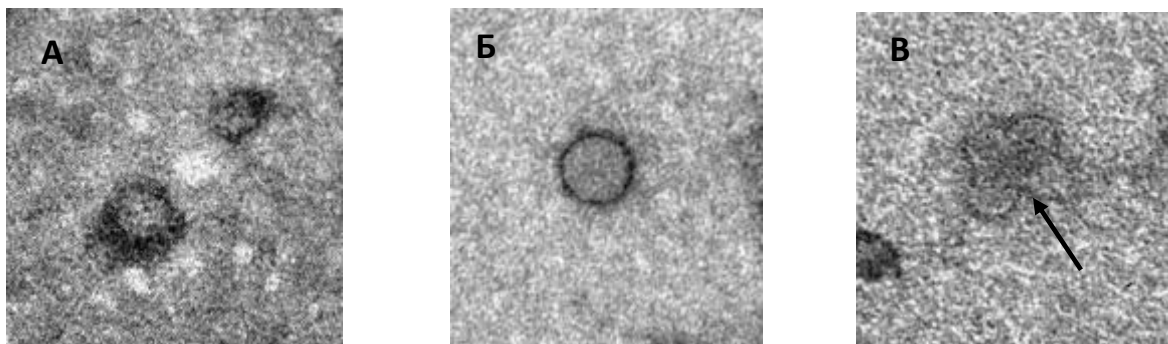


Рисунок 25 – Электронно-микроскопические фотографии частиц, содержащихся в препарате молекулярной конструкции, несущей Дельтаферон и алендроновую кислоту. Контрастирование 2% раствором ФВК (А) и 0,5% раствором уранилацетата (Б, В). Стрелкой показано скопление нескольких наночастиц

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. 25 Б, В).

*Данные о молекулярной массе конъюгатов Дельтаферона с декстраном и алендроновой кислотой*

На электрофореграмме, представленной на рисунке 26, конъюгат декстрана с Дельтафероном, алендроновой кислотой и спермидином визуализируется в виде «облака» с кажущейся молекулярной массой в районе 120-150 кДа. Присутствия в препарате несвязанного белка или продуктов его деградации не обнаружено.

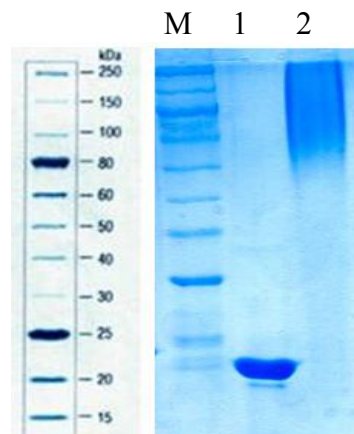


Рисунок 26 - Электрофореграмма конъюгата декстрана с Дельтафероном, алендроновой кислотой и спермидином. Электрофорез в 15% ПААГ в денатурирующих условиях, окрашивание Кумасси R-250

1 – Дельтаферон, субстанция;

2 – конъюгат Дельтаферона с декстраном, спермидином и алендроновой кислотой;

М – маркеры молекулярных масс (15-250 кДа)

*Данные об устойчивости Дельтаферона в составе конъюгата и конструкции к ферментативным воздействиям*

На рисунке 30 представлена электрофореграмма конъюгатов декстрана с Дельтафероном и алендроновой кислотой и конструкции на его основе после инкубации образцов с трипсином.

Видно, что интактный Дельтаферон подвергается ограниченному протеолизу в течение 10 мин при комнатной температуре (рис. 27, дорожка 2). Наряду с полосами, расположенными выше интактного цитокина, которые можно отнести к препарату трипсина (молекулярная масса 24 кДа), в геле обнаруживается, по меньшей мере, четыре продукта частичного гидролиза Дельтаферона. В тех же условиях аналогичных продуктов протеолиза Дельтаферона в составе конъюгата либо нет, либо заметно меньше.

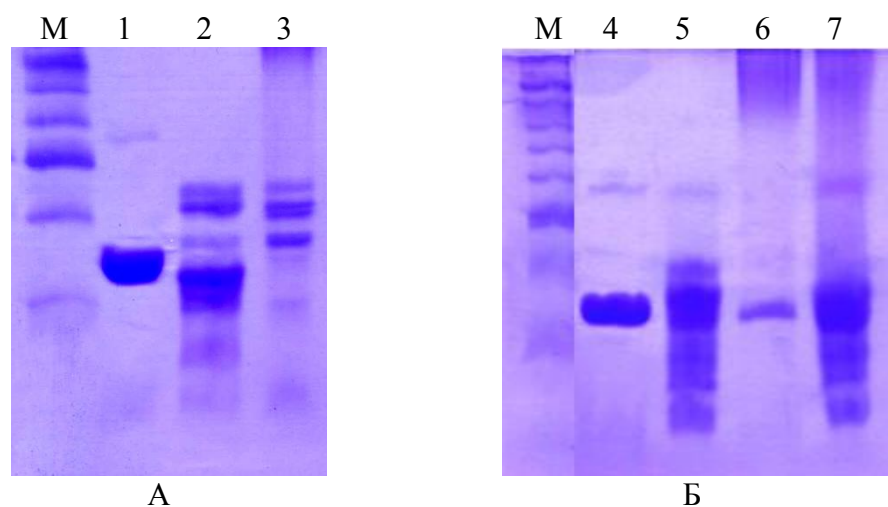


Рисунок 27 - Электрофореграмма конъюгата декстрана с Дельтафероном и алендроновой кислотой (А) и конструкций на его основе (Б) после инкубации образцов с трипсином (10 мин, комнатная температура). Электрофорез в 12% ПААГ, окрашивание Кумасси R-250

Дорожки:

М - маркеры молекулярных масс, 14,4-250 кДа;

1- Дельтаферон, субстанция;

2- Дельтаферон, субстанция + трипсин (10:1);

3- Конъюгат Дельтаферона + трипсин (10:1);

4- Дельтаферон, субстанция;

5- Дельтаферон, субстанция + трипсин (10:1);

6- Молекулярная конструкция с Дельтафероном;

7- Молекулярная конструкция с Дельтафероном + трипсин (10:1).

Это можно интерпретировать как экранирование компонентами конъюгата (декстраном, спермидином, алендроновой кислотой) мест гидролиза белка и, соответственно, уменьшением скорости протеолиза.

Устойчивость к протеолизу конъюгированного Дельтаферона, находящегося в составе молекулярной конструкции, существенно

отличается от таковой в свободном конъюгате и аналогична устойчивости интактного белка (рис. 27, дорожка 7). Эти данные позволяют говорить о возможности различного конформационного состояния белка в свободном конъюгате и в молекулярной конструкции.

*Результаты определения специфической активности Дельтаферона в составе конъюгатов с декстраном и алендроновой кислотой и конструкции на основе конъюгата*

Экспериментальные данные, полученные в ходе оценки специфической противовирусной активности Дельтаферона в составе конъюгата или конструкции на культуре клеток MRC-5, представлены в таблице 13. Видно, что уровень активности Дельтаферона незначительно снижен в конъюгате и полностью соответствует активности исходного белка в составе конструкции.

Таблица 13 - Показатели специфической активности Дельтаферона в составе конъюгата с декстраном и алендроновой кислотой (АЛН) и молекулярной конструкции на его основе

Препарат, серия	Концентрация белка, мг/мл	Уровень противовирусной активности на клетках MRC-5	
		МЕ/мл	МЕ/мг
Дельтаферон, субстанция, с.050615	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.

Полученные данные свидетельствуют о том, что основным компонентом препарата молекулярной конструкции, содержащей Дельтаферон и алендроновую кислоту, являются наночастицы округлой формы размером



10-20 нм и 20-55 нм. Конъюгирование Дельтаферона с декстраном и алендроновой кислотой не приводило к серьезным нарушениям структурно-конформационных свойств белка, о чем свидетельствует сохранение его специфической противовирусной активности. В то же время конъюгирование приводило к повышению протеолитической устойчивости, обусловленному, скорее всего, наличием молекулы-спейсера. Эти изменения являются более выраженными у конъюгата белка с декстраном, чем конструкции, что позволяет предполагать возможность структурирования конъюгата при взаимодействии с дсРНК.

3.2.3 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 дсРНК.

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) (рис.28).

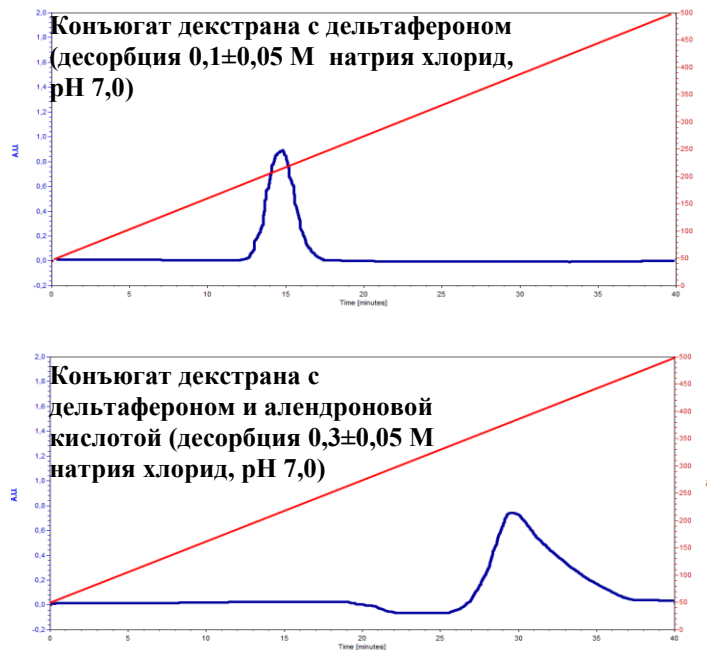


Рисунок 28 - Исследование влияния алендроновой кислоты в составе конъюгатов декстрана с Дельтафероном и спермидином на величину связывания с гидроксилпатитом

Таким образом, анализ кривых десорбции подтверждает факт более прочного удержания гидроксилпатитом конъюгатов декстрана с Дельтафероном, алендроновой кислотой и спермидином в сравнении с исходным белком.

С целью определения средства молекулярных конструкций, полученных с использованием конъюгата декстрана с Дельтафероном, алендроновой кислотой и спермидином, к гидроксилпатиту была проведена их хроматография в сравнении с конструкциями, содержащими соответствующие конъюгаты без алендроновой кислоты. Образцы молекулярных конструкций, содержащих Дельтаферон с алендроновой кислотой и без нее сорбировали на ГАП и элюировали ступенчатым градиентом соли (NaCl, от 0,1 до 1,5 М). Анализ хроматографических фракций проводили методом электрофореза в 15%-ом ПААГ и 1% геле агарозы.

Результаты представлены в таблице 14. Видно, что элюция белкового материала конструкции, несущей Дельтаферон с алендроновой кислотой и без нее, происходила при использовании хлорида натрия с концентрацией 0,5-0,6 М и 0,1-0,2 М, соответственно.

Таблица 14 - Молярная концентрация NaCl, необходимая для элюции с гидроксилапатита компонентов молекулярных конструкций

Препарат	Концентрация NaCl, моль/л															
	0	0,	0,	0,	0,	0,	0,	0,	0,	0,	1,	1,	1,	1,	1,	1,
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	
	Номер фракции															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
МК Дельтаферон		+	+													
МК/ Дельтаферон-АЛН						+	+									
дсРНК			+	+												

+ фракции, содержащие компонент молекулярной конструкции

Таким образом, исследования, проведенные на модели костной ткани *in vitro*, свидетельствуют о более высоком сродстве конструкции, содержащей Дельтаферон и алендроновую кислоту, к гидроксилапатиту, аналогу минерального матрикса костной ткани, по сравнению с исходным белком. Эти данные подтверждают возможность использования алендроновой кислоты в качестве векторной молекулы для адресной доставки конструкции, несущей Дельтаферон, в область метастатических узлов костей.

3.2.4 Исследование противоопухолевой активности конструкции, содержащей Дельтаферон и алендроновую кислоту, на экспериментальной модели костных метастазов

Для исследования противоопухолевой активности конструкции, несущей Дельтаферон и алендроновую кислоту была использована экспериментальная

модель костных метастазов, индуцированных введением клеток меланомы мышей B16 клон F10 [59]. Особенность данной модели - ее высокая метастатическая активность с колонизацией костей после внутрисердечного введения опухолевых клеток. Достоинством модели является возможность количественной оценки пигментированных метастазов, локализованных во внутреннем пространстве кости, воспроизводимый характер метастазирования.

Изучение гистологических срезов эпифизов бедренных костей контрольных мышей с меланомой B16-F10 показало, что на срезах эпифизов бедренной кости отчетливо видны резорбция костной ткани и трабекул и заполнение костномозговой полости и слоя надкостницы метастазами (рис. 29). В костномозговой полости метастаз полностью замещает красный костный мозг в 3-х образцах из 4-х, и практически полностью - в оставшемся образце (метастаз составляет 95% от площади клеток в костномозговой полости).

В группе мышей, которым вводили молекулярную конструкцию, несущую Дельтаферон и алендроновую кислоту (МК Дельтаферон), наблюдался обширный некроз опухоли, занимавший до 88% площади метастаза (рис.30). Существенных отличий от контроля в толщине и форме костных трабекул эпифизов мышей опытной группы не обнаружено.

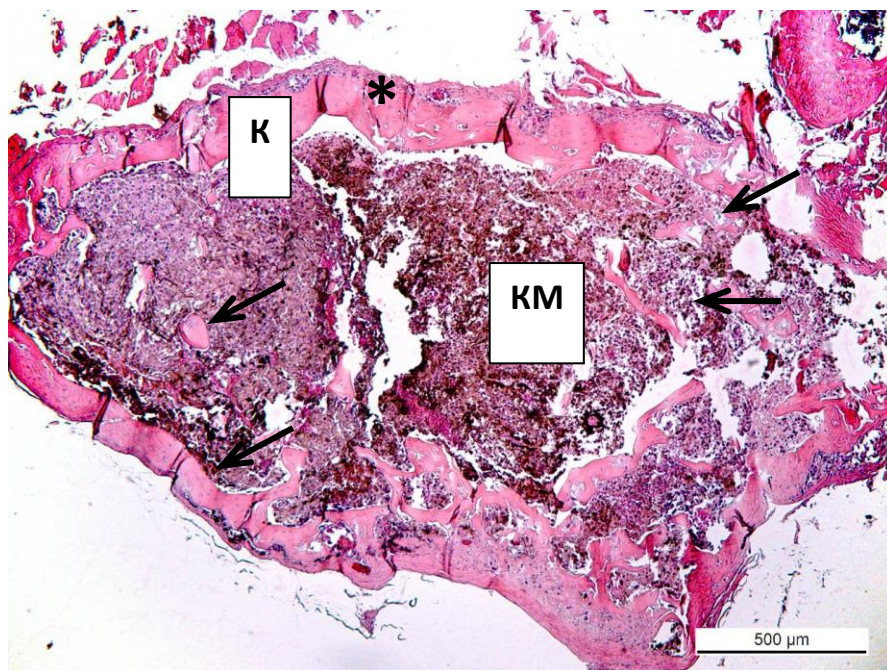


Рисунок 29 - Срез эпифиза бедренной кости контрольной мыши с привитой меланомой V16-F10. К - компактное костное вещество, КМ - костномозговая полость, заполненная опухолевыми клетками. Стрелками показаны костные трабекулы, звездочкой - надкостница с метастазом. Окраска гематоксилином и эозином

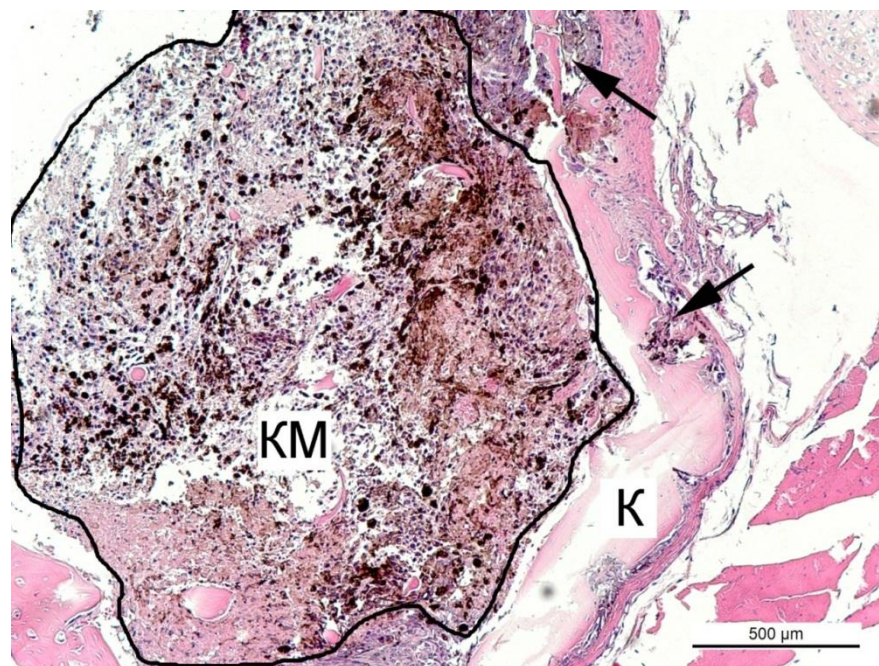


Рисунок 30 - Срез эпифиза бедренной кости мыши, трехкратное введение МК Дельтаферон после прививки меланомы V16-F10. Условные обозначения: КМ – костный мозг; К – кость; стрелками показаны расширенные лакуны кости, содержащие опухолевые клетки, зона некроза опухоли выделена линией. Окраска гематоксилином и эозином

Полученные данные свидетельствуют о наличии у препарата молекулярной конструкции, несущей Дельтаферон и алендроновую кислоту, противоопухолевой активности в отношении опухолевой ткани костных метастазов. Препарат не оказывал существенного влияния на состояние костной ткани в области развития метастаза.

Таким образом, отработаны условия получения конструкции, содержащей в центральной части двуспиральную РНК из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, покрытую оболочкой из конъюгата полисахарида декстрана с Дельтафероном, алендроновой кислотой и спермидином, удерживаемых в результате электростатического взаимодействия. Показано, что введение Дельтаферона в структуру конструкции в сочетании с алендроновой кислотой не приводит к существенным нарушениям структуры и физико-химических свойств белка, потере его биологической активности.

На модели костной ткани *in vitro* показано, что разработанная конструкция, содержащая Дельтаферон и алендроновую кислоту, обладает высоким сродством к гидроксилapatиту, аналогу минерального матрикса костной ткани. На мышях с трансплантированной меланомой В16-F10 установлено, что препарат отличался выраженной противоопухолевой активностью в отношении экспериментальных метастазов костей, антирезорбтивной активностью не обладал.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана технология получения препарата аналога интерферона гамма Дельтаферона в составе двухслойной молекулярной конструкции, содержащей в центральной части двуспиральные РНК. Разработана технология получения лекарственной формы конструкции, содержащей Дельтаферон в средстве доставки, для интраназального применения.

Методами электронной микроскопии, спектрометрии и электрофоретического анализа продемонстрировано наличие в препаратах молекулярной конструкции частиц размером от 50 до 200 нм, имеющих форму, близкую к сферической, наличие в составе конструкций основных компонентов (Дельтаферон, дсРНК), сохранность их структурных характеристик и специфической активности. Установлено, что Дельтаферон и дсРНК в составе конструкции отличались повышенной устойчивостью к ферментативной деградации и стабильностью при хранении.

Установлено, что использованный подход позволил получить препараты Дельтаферона в средстве доставки, отличающиеся иммуномодулирующими (интерферониндуцирующими) и противовирусными свойствами в отношении вируса гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2), не только сравнимыми с активностью исходного белка, но и по ряду показателей более выраженными.

Разработана технология получения препарата аналога интерферона гамма Дельтаферона в составе средства доставки - двухслойной молекулярной конструкции, содержащей на поверхности в качестве векторной молекулы бифосфонат алендроновую кислоту. Продемонстрирована сохранность структурных свойств и биологической активности Дельтаферона в составе конструкции. Установлено повышенное сродство конструкции, содержащей Дельтаферон и алендроновую кислоту, к гидроксилпатиту, аналогу минерального матрикса костной ткани, по

сравнению с исходным белком. На экспериментальной модели костных метастазов, вызванных введением клеток меланомы B16-F10, продемонстрирована выраженная противоопухолевая активность Дельтаферона в составе конструкции, содержащей алендроновую кислоту.

Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использованного подхода для создания новых лекарственных препаратов на основе аналога интерферона гамма Дельтаферон в средстве доставки, обладающих противовирусным, иммуномодулирующим и противоопухолевым действием.



## 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.

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 Б. Н. Зайцев), 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), в группе микроскопических исследований Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (зав. группой д.б.н. Е.И. Рябчикова).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Almeida, A.J. Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for peptides and proteins / A.J. Almeida, E. Souto // *Adv. Drug Delivery Rev.* – 2007. – Vol. 59. – No. 6. – P. 478-490.
2. Ank, N. An important role for type III interferon (IFN-lambda/IL-28) in TLR-induced antiviral activity / N. Ank, M.B. Iversen, C. Bartholdy, P. Staeheli, R. Hartmann, U.B. Jensen, F. Dagnaes-Hansen, A.R. Thomsen, Z. Chen, H. Haugen, K. Klucher, S.R. Paludan // *J Immunol.* – 2008. – Vol. 180. – No. 4. – P. 2474-85.
3. Antonelli, G. Mechanism of human interferon-gamma production: involvement of beta-2-microglobulin / G. Antonelli, P. Amicucci, A. Cefaro, C. Ausiello, F. Malavasi, F. Dianzani // *Cell. Immunol.* – 1988. – Vol. 115. – No. 1. – P.156-164.
4. Arguello, F. A Murine Model of Experimental Metastasis to Bone and Bone Marrow / F. Arguello, R.B. Baggs, C.N. Frantz // *Cancer Res.* – 1988. – Vol. 48. – No.23. – P.6876-6881.
5. Avau, A. Therapeutic Potential of Interferon- $\gamma$  and Its Antagonists in Autoinflammation: Lessons from Murine Models of Systemic Juvenile Idiopathic Arthritis and Macrophage Activation Syndrome / A. Avau, P. Matthys // *Pharmaceuticals (Basel)*. – 2015. – Vol. 25. – No. 8(4). – P.793-815.- doi: 10.3390/ph8040793. Review.
6. Balachandran, S. Interferon- $\gamma$ -induced necrosis: an antitumor biotherapeutic perspective / S. Balachandran, GP. Adams // *J. Interferon Cytokine Res.* – 2013. – Vol. 33(4). – P.171-180. - doi: 10.1089/jir.2012.0087. Review.
7. Biron, C. A. Interferons and other cytokines / C. A. Biron, G. C. Sen // *In D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin et al. (ed.). Fields virology.* - 4th ed. – Lippincott: Williams & Wilkins, 2001. - P.321-351.

8. Boehm, U. Cellular responses to interferon-gamma / U. Boehm, T. Klamp, M. Groot, J. C.Howard // *Annu. Rev. Immunol.* – 1997. – Vol.15. – P.749-795.
9. Cantell, U K. Development of antiviral therapy with alpha interferons: promises, false hopes and accomplishments // *Ann. Med.* – 1995. – Vol. 27, N.I. – P. 23-28.
10. Caraglia, M. Zoledronic acid: an unending tale for an antiresorptive agent / M. Caraglia, M. Marra, S. Naviglio, G. Botti, R. Addeo, A. Abbruzzese // *Expert. Opin. Pharmacother.* - 2010. - Vol.11. – No.1. – P.141-54.
11. Cenni, E. The Effect of poly (d,l-lactide-co-glycolide)-alendronate conjugate nanoparticles on human osteoclast precursors / E. Cenni , S. Avnet, D. Granchi, C. Fotia, M. Salerno, D. Micieli, M.G. Sarpietro, R. Pignatello, F. Castelli, N. Baldini // *J.Biomater.Sci.Polym. E.* – 2012. – Vol.23. – No.10. – P.1285-1300.
12. Chaudhri, G. Polarized type 1 cytokine response and cell-mediated immunity determine genetic resistance to mousepox / G. Chaudhri, V. Panchanathan, R.M. Buller // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2004. – Vol. 101. – No.24. – P.9057-9062.
13. Coleman, R.E. Zoledronic acid ameliorates the effects of endocrine therapy on bone health in women with early-stage breast cancer // *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* – 2009. – Vol. 5. – No.2. – P. 72-73.
14. Condos, R. Regional deposition of aerosolized interferon-gamma in pulmonary tuberculosis / R. Condos, F.P. Hull, N.W. Schluger et al. // *CHEST Journal.* – 2004. – P. 2146-2155.
15. Costa-Pereira, A.P. The antiviral response to gamma interferon / A.P. Costa-Pereira, T.M. Williams, B. Strobl, D. Watling, J. Briscoe, I.M. Kerr // *J. Virol.* – 2002. – Vol.76. – No.18. – P.9060-9068.
16. Deczkowska, A. Type I/II Interferon Balance in the Regulation of Brain Physiology and Pathology / A. Deczkowska, K. Baruch, M. Schwartz //

- Trends Immunol. – 2016. – Vol.37. – No.3. – P.181-192. - doi: 10.1016/j.it.2016.01.006. Epub 2016 Feb 11. Review.
17. D'Souza, S. Improved tuberculosis DNA vaccines by formulation in cationic lipids / S. D'Souza, V. Rosseels, O. Denis, A.Tanghe, N. De Smet, F. Jurion, K. Palfliet, N. Castiglioni, A. Vanonckelen, C. Wheeler, K. Huygen // *Infect. Immun.* – 2002. – V.70. – P.3681-3688.
  18. Ebetino, F.H. The relationship between the chemistry and biological activity of the bisphosphonates / F.H. Ebetino, A.M. Hogan, S. Sun // *Bone.* – 2011. – Vol.49. – P.20-33.
  19. Emoto, M. Influence of beta 2-microglobulin expression on gamma interferon secretion and target cell lysis by intraepithelial lymphocytes during intestinal *Listeria monocytogenes* infection / M. Emoto, O. Neuhaus, Y. Emoto, SH. Kaufmann // *Infect. Immun.* – 1996. - Vol.64. – No. 2. – P.569-575.
  20. Fahmy, TM. Nanosystems for simultaneous imaging and drug delivery to T cells / TM Fahmy, PM Fong, J Park // *AAPS J.* – 2007. – Vol .9. – P. E171-E 180.
  21. Faulkner, L. Influenza hemagglutinin peptides fused to interferon gamma and encapsulated in liposomes protects mice against influenza infection / L. Faulkner , G.Buchan , L.Slobbe, E. Lockhart, J.Wales, M.Wilson , M. Baird // *Vaccine.* – 2003. – Vol.21. – No. 9-10. – P.932-939.
  22. Ferlay, J. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008 / J. Ferlay, H.R. Shin, F. Bray, D. Forman, C. Mathers, D.M. Parkin // *Int. J. Cancer.* - 2010. – Vol.127. – No.12. – P. 2893-2917. - doi: 10.1002/ijc.25516.
  23. Ferlay, J. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012/ J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, D.M. Parkin, D. Forman, F. Bray // *International journal of cancer.* – 2015. – T. 136. – No. 5. – C. E359-E386.

24. Gardner, RV. Interferon-gamma (IFN-gamma) as a potential radio- and chemo-protectant // *Am. J. Hematol.* - 1998. - Vol.58, №3. – P.218-223.
25. Garnero, P. Markers of bone turnover for the management of patients with bone metastases from prostate cancer / P. Garnero, N. Buchs, J. Zekri, R. Rizzoli, R.E. Coleman, P.D. Delmas // *Br. J. Cancer.* – 2000. – Vol.82. – No. 4. – P.858-64.
26. Gaucher, G. Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery / G. Gaucher, MH. Dufresne, VP. Sant // *J. Control. Release.* – 2005. - Vol.109. – P.169-188.
27. Goldszmid, RS. NK cell-derived interferon- $\gamma$  orchestrates cellular dynamics and the differentiation of monocytes into dendritic cells at the site of infection / RS. Goldszmid, P. Caspar, A. Rivollier, S. White, A. Dzutsev, S. Hieny, B. Kelsall, G. Trinchieri, A. Sher // *Immunity.* – 2012. – Vol.36. – No. 6. – P.1047-1059. - doi: 10.1016/j.immuni.2012.03.026.
28. Gu, F. Sustained interferon-gamma delivery from a photocrosslinked biodegradable elastomer / F. Gu, H.M. Younes, A.O. El-Kadi, R.J. Neufeld, B.G. Amsden // *J. Control. Release.* - 2005. –Vol.102. – No. 3. – P.607-617.
29. Harrison, G. Type 1 interferon genes from the egg-laying mammal, *Tachyglossus aculeatus* (short-beaked echidna) / G. Harrison, K.A. McNicol, E.M. Deane // *Immunology and Cell Biology.* – 2004. – Vol.82. – P.112-118.
30. Hayes, CN. Interferon stimulated genes and innate immune activation following infection with hepatitis B and C viruses / CN. Hayes, K. Chayama // *J. Med. Virol.* – 2016. - doi: 10.1002/jmv.24659. [Epub ahead of print] Review.]
31. He, T. Interferon gamma stimulates cellular maturation of dendritic cell line DC2.4 leading to induction of efficient cytotoxic T cell responses and antitumor immunity / T. He, C. Tang, S. Xu, T. Moyana, J. Xiang // *Cell. Mol. Immunol.* – 2007. – Vol.4. – No. 2. – P. 105-111.

32. Huang, S. Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor. / S. Huang, W. Hendricks, A. Althage, S. Hemmi, H. Bluethmann, R. Kamojo, J. Vilcek, R.M. Zinkernagel, M. Aguet // *Science*. – 1993. – Vol.259. – P. 1742-1745.
33. Huizinga, TW. Induction of neutrophil FC-gamma receptor I expression can be used as a marker for biologic activity of recombinant interferon-gamma in vivo / TW. Huizinga, CE. Van der Schoot, D. Roos, RS. Weening // *Blood*. – 1991. – Vol.77. – No. 9. – P.2088-2090.
34. Ike, K. Induction of interferon-gamma (IFN-gamma) and T helper 1 (Th1) immune response by bitter melon extract / K. Ike, Y. Uchida, T. Nakamura, S. Imai // *J. Vet. Med. Sci.* – 2005. – Vol.67. – No. 5. – P.521-524.
35. Inada, T. Promotion of interferon-gamma production by natural killer cells via suppression of murine peritoneal macrophage prostaglandin E<sub>2</sub> production using intravenous anesthetic propofol / T. Inada, K. Kubo, K. Shingu // *Int. Immunopharmacol.* – 2010. – Vol.10. – No.10. – P.1200-1208. doi: 10.1016/j.intimp.2010.06.027. Epub 2010 Jul 13.
36. Ishizuka, S. 1-alpha,25-Dihydroxyvitamin D(3)-26,23-lactam analogues function as vitamin D receptor antagonists in human and rodent cells / S. Ishizuka, N. Kurihara, Y. Hiruma, D. Miura, J. Namekawa, A. Tamura, Y. Kato-Nakamura, Y. Nakano, K. Takenouchi, Y. Hashimoto, K. Nagasawa, G.D. Roodman // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* – 2008. – Vol.110. – No. 3-5. – P. 269-277. - doi: 10.1016/j.jsbmb.2007.11.007.
37. Ji, J.D. Inhibition of RANK expression and osteoclastogenesis by TLRs and IFN-gamma in human osteoclast precursors / J.D. Ji, K.H. Park-Min, Z. Shen, R.J. Fajardo, S.R. Goldring, K.P. McHugh, L.B. Ivashkiv // *J. Immunol.* – 2009. – Vol.183. – No.11. – P.7223-7233.
38. Johnston, M.I. Structural features of double-stranded polyribonucleotides required for immunological specificity and interferon induction / M.I. Johnston, B.D. Stollar, P.F. Torrence, B. Witkop // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. – 1975. – Vol.72. – P.4564-4568.



39. Jung, A. The binding of pyrophosphate and two diphosphonates by hydroxyapatite crystals / A. Jung, S. Bisaz, H. Fleisch // *Calcif. Tissue Res.* – 1973. – Vol.11. – No. 4. – P.269-80.
40. Jungi, TW. Interferon-gamma treatment impairs Fc receptor type II-mediated phagocytosis of human macrophages by a post-receptor-binding mechanism / TW. Jungi, M. Brcic, C. Leutwyler, H. Pfister, MO. Spycher // *Immunology.* – 1991. – Vol.74. – No.3. – P.439-445.
41. Khan, TA. Interferon-Gamma Improves Macrophages Function against M. tuberculosis in Multidrug-Resistant Tuberculosis Patients / TA. Khan, H. Mazhar, S. Saleha, HN. Tipu, N. Muhammad, MN. Abbas // *Chemother. Res. Pract.* – 2016. - 7295390. - doi: 10.1155/2016/7295390. Epub 2016 Jul 12.
42. Kontsek, P. Forty years of interferon / P. Kontsek, E. Kontsekova // *Acta virologica.* – 1997. – Vol. 41. – P.349-353.
43. Kwon, GS. Polymeric micelles for delivery of poorly water—soluble compounds // *Crit. Rev. Drug Carrier Syst.* – 2003. – Vol. 20. – P. 403.
44. Kumar, R. Stochastic models for the web graph // *Foundations of Computer Science, 2000. Proceedings. 41st Annual Symposium on.* – IEEE, 2000. – C.57-65.
45. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* – 1970. - Vol. 227. – P.680-685
46. Lambrecht, B. Assessment of the cell-mediated immune response in chickens by detection of chicken interferon-gamma in response to mitogen and recall Newcastle disease viral antigen stimulation / B. Lambrecht, M. Gonze, G. Meulemans, TP. van den Berg // *Avian Pathol.* – 2004. - Vol.33. – No. 3. – P.343-350.
47. Laouar, Y. Transforming growth factor-beta controls T helper type 1 cell development through regulation of natural killer cell interferon-gamma / Y. Laouar, FS. Sutterwala, L. Gorelik, RA. Flavell // *Nature Immunology.* – 2005. – Vol.6. – No. 6. – P.600-607.

48. Lee, J. Transdermal delivery of interferon-gamma (IFN-gamma) mediated by penetratin, a cell-permeable peptide / J. Lee, E. Jung, J. Park, D. Park // *Biotechnol. Appl. Biochem.* – 2005. – Vol.42. - Pt 2. – P.169-173.
49. Li, Q. Effects of intranasal interferon gamma on transforming growth factor- $\beta$ 1/Smadin rats with allergic rhinitis / Q. Li, P. Kong, CX. Wu, CW. Sun, YL. Chen, XQ. Xu, DL. Zhang // *Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi.*-2011. – Vol. 46. – No.1. – P.59-62.
50. Li, XM. Mucosal IFN-gamma gene transfer inhibits pulmonary allergic responses in mice / XM. Li, RK. Chopra, TY. Chou, BH. Schofield, M. Wills-Karp, SK. Huang // *J. Immunol.* -1996. – Vol.157. – No.8. – P.3216-3219.
51. Ligocki, AJ. Role of interferon- $\gamma$  and cytotoxic T lymphocytes in intraocular tumor rejection / AJ. Ligocki, JR. Brown, JY. Niederkorn // *J. Leukoc. Biol.* – 2016. – Vol.99. – No.5. – P.735-747. - doi: 10.1189/jlb.3A0315-093RRR. Epub 2015 Nov 17.
52. Liu, G. Prevention of lethal respiratory vaccinia infections in mice with interferon-alpha and interferon-gamma / G. Liu, Q. Zhai, D.J. Schaffner, A. Wu, A. Yohannes, T.M. Robinson, M. Maland, J. Wells, T.G. Voss, C. Bailey, K. Alibek // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* –2004. –Vol.40. – No.3. –P.201-206.
53. Lonnemann, G. Low-flux hemodialysis suppresses interferon-gamma production: the possible role of beta2-microglobulin / G. Lonnemann, FH. Bahlmann, J. Freise, B. Hertel, CA. Dinarello // *Clin. Nephrol.* – 2009. – Vol.72. – No.3. – P.170-176.
54. Lumachi, F. Medical treatment of malignancy-associated hypercalcemia / F. Lumachi, A. Brunello, A. Roma, U. Basso // *Curr. Med. Chem.* - 2008. – Vol.15. – No.4. – P.415-421.
55. Marra, M. New self-assembly nanoparticles and stealth liposomes for the delivery of zoledronic acid: a comparative study / M. Marra, G. Salzano, C. Leonetti, M. Porru, R. Franco, S. Zappavigna, G. Liguori, G. Botti, P.

- Chieffi, M. Lamberti, G. Vitale, A. Abbruzzese, M.I. La Rotonda, G. De Rosa, M. Caraglia // *Biotechnol. Adv.* – 2012. – Vol.30. – No.1. – P. 302-309.
56. Marra, M. Nanotechnologies to use bisphosphonates as potent anticancer agents: the effects of zoledronic acid encapsulated into liposomes / M. Marra, G. Salzano, C. Leonetti, P. Tassone, M. Scarsella, S. Zappavigna, T. Calimeri, R. Franco, G. Liguori, G. Cigliana, R. Ascani, M.I. La Rotonda, A. Abbruzzese, P. Tagliaferri, M. Caraglia, G. De Rosa // *Nanomedicine.* – 2011. – Vol.7. – No.6. – P.955-964.
57. Martín-Fontecha, A. Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming / A. Martín-Fontecha, L.L. Thomsen, S. Brett, C. Gerard, M. Lipp, A. Lanzavecchia, F. Sallusto // *Nature Immunology* – 2004. – Vol.5. – No.12. – P.1260-1265.
58. Melillo, G. Meeting report: exploiting the tumor microenvironment for therapeutics / G. Melillo, G.L. Semenza // *Cancer Res.* – 2006. – Vol. 66. – No.9. – P. 4558-4560.
59. Messerschmidt, S.K. Targeted lipid-coated nanoparticles: delivery of tumor necrosis factor-functionalized particles to tumor cells / S.K. Messerschmidt, A. Musyanovych, M. Altvater, P. Scheurich, K. Pfizenmaier, K. Landfester, R.E. Kontermann // *J. Control. Release.* – 2009. – Vol.137. – No.1. – P. 69-77. - doi: 10.1016/j.jconrel.2009.03.010.
60. Mibayashi, M. Inhibition of retinoic acid-inducible gene I mediated induction of beta interferon by the NS1 protein of influenza A virus / M. Mibayashi, L. Martínez-Sobrido, Y.M. Loo, W.B. Cárdenas, M.Jr. Gale, A. García-Sastre // *J. Virol.* – 2007. – Vol. 81. – P. 514-524.
61. Mikulecký, P. Crystal structure of human interferon- $\gamma$  receptor 2 reveals the structural basis for receptor specificity / P. Mikulecký, J. Zahradník, P. Kolenko, J. Černý, T. Charnavets, L. Kolářová, I. Nečasová, PN. Pham, B. Schneider // *Acta Crystallogr. D. Struct. Biol.* – 2016. – Vol. 72. - Pt 9. – P.1017-1025. - doi: 10.1107/S2059798316012237. Epub 2016 Aug 18.

62. Mory, Y. Synthesis of human interferon beta 1 in *Escherichia coli* infected by a lambda phage recombinant containing a human genomic fragment / Y. Mory, Y. Chernajovsky, SI. Feinstein, L. Chen, U. Nir, J. Weissenbach, Y. Malpiece, P. Tiollais, D. Marks, M. Ladner, C. Colby, M. Revel // *Eur. J. Biochem.* – 1981. – Vol.120. – No.1. – P.197-202.
63. Moss, RB. Randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalating study of aerosolized interferon gamma-1b in patients with mild to moderate cystic fibrosis lung disease / RB. Moss, N. Mayer-Hamblett, J. Wagener, C. Daines, K. Hale, R. Ahrens, RL. Gibson, P. Anderson, G. Retsch-Bogart, SZ. Nasr, I. Noth, D. Waltz , P. Zeitlin, B. Ramsey, K. Starko // *Pediatr. Pulmonol.* – 2005. – Vol.39. – No.3. –P.209-218.
64. Muller U. Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense / U. Steinhoff, LF. Reis, S. Hemmi, J. Pavlovic, RM. Zinkernagel, MM Aguet // *Science.* – 1994. –Vol. 26. – No.4. – P. 1918-1921.
65. Ora, M. Bisphosphonate derivatives of nucleoside antimetabolites: hydrolytic stability and hydroxyapatite adsorption of 5'-beta,gamma-methylene and 5'-beta,gamma-(1-hydroxyethylidene) triphosphates of 5-fluorouridine and ara-cytidine / M. Ora, T. Lönnberg, D. Florea-Wang, S. Zinnen, A. Karpeisky, H. Lönnberg // *J. Org. Chem.* – 2008. – Vol. 73. – No.11. – P. 4123-4130.
66. Paterson, G.L. Review of the folin phenol protein quantitation method of Lowry // *Anal.Biochem.* – 1979. – Vol.100. – P.201-220.
67. Piehler, J. Mutational and structural analysis of the binding interface between type I interferons and receptor Ifnar2.J / J. Piehler, G. Schreiber // *Journal of molecular biology.* – 1999. – Vol.294. – P.223-237.
68. Polascik, T.J. Bisphosphonates in oncology: evidence for the prevention of skeletal events in patients with bone metastases// *Drug Des. Devel. Ther.* – 2009. – Vol.3. – P.27-40.

69. Presti, R.M. Novel cell type-specific antiviral mechanism of interferon gamma action in macrophages / R.M. Presti, D.L. Popkin, M. Connie et al. // *J. Exp. Med.* – 2001. – Vol.193. – No.4. – P.483-496.
70. Raghuvanshi, R.S. Formulation and characterization of immunoreactive tetanus toxoid biodegradable polymer particles / R.S.Raghuvanshi, O.Singh, A.K.Panda // *Drug.Deliv.* – 2001. – Vol.82. – P. 99–106.
71. Revelli, S. Macrophage activity, IL-6 levels, antibody response and heart histology in rats undergoing an attenuated *Trypanosoma cruzi* acute infection upon treatment with recombinant interferon gamma / S. Revelli, G. Didoli, E. Roggero, H. Moreno, J. Bernabo, J. Wietzerbin, O. Bottasso // *Cytokines Cell. Mol. Ther.* – 1998. – Vol. 4. – No.3. – P.153-159.
72. Rönnblom, L. The importance of the type I interferon system in autoimmunity // *Clin. Exp. Rheumatol.* – 2016. - Vol. 34. – P. 21-24.
73. Rook, G.A. A simple method for the solubilisation of reduced NBT, and its use as a colorimetric assay for activation of human macrophages by gamma-interferon / G.A. Rook, J. Steel, S. Umar, H.M. Dockrell // *J. Immunol. Meth.* – 1985. – Vol.82. – No.1. – P.161-167. - 3. [http://www.molbiol.ru/protocol/10\\_01.html](http://www.molbiol.ru/protocol/10_01.html).
74. Sahoo, S. K. Nanotech approaches to drug delivery and imaging / S. K. Sahoo, V. Labhasetwar // *Drug discovery today.* – 2003. – Vol. 8. – No.24. – C. 1112-1120.
75. Samuel, CE. Antiviral actions of interferon. Interferon-regulated cellular proteins and their surprisingly selective antiviral activities // *Virology.* – 1991. – Vol. 183. – No.1. – P.1-11. Review.
76. Saravolac, E.G. Immunoprophylactic strategies against respiratory influenza virus infection / E.G. Saravolac, D. Sabuda, C. Crist, K. Blasetti, G. Schnell, H. Yang, M. Kende, H.B. Levy, J.P. Wong // *Vaccine.*- 2001. - Vol. 19. - P. 2227-2232.

77. Saxena, V.P. A new basis for interpreting the circular dichroic spectra of proteins / V.P. Saxena, D.B. Wetlaufer // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1971. – Vol.68. – No.5. – P.969-972.
78. Segura, S. Potential of albumin nanoparticles as carriers for interferon gamma / S. Segura, S. Espuelas, M.J.Renedo, J.M. Irache // Drug Dev. Ind. Pharmacol. – 2005. – Vol.31. – No.3. – P.271-280.
79. Segura, S. Gamma interferon loaded onto albumin nanoparticles: in vitro and in vivo activities against *Brucella abortus* / S. Segura, C. Gamazo, J.M. Irache, S.Espuelas // Antimicrob. Agents Chemother. – 2007. – Vol.51. – No.4. – P.1310-1314.
80. Su, X. Interferon- $\gamma$  regulates cellular metabolism and mRNA translation to potentiate macrophage activation / X. Su, Y. Yu, Y. Zhong, EG. Giannopoulou, X. Hu, H. Liu, JR. Cross, G. Rättsch, CM. Rice, LB. Ivashkiv // Nature. Immunology. – 2015. – Vol. 16. – No.8. – P.838-849. - doi: 10.1038/ni.3205. Epub 2015 Jun 29.
81. Staehelin, T. Purification and characterization of recombinant human leukocyte interferon (IFLrA) with monoclonal antibodies / T. Staehelin, DS. Hobbs, H. Kung, CY. Lai, S. Pestka // J. Biol. Chem. – 1981. – Vol. 256. – No.18. – P.9750-9754.
82. Takayanagi, H. Mechanistic insight into osteoclast differentiation in osteoimmunology // Mol.Med. – 2005. – Vol. 83. – No.3. – P. 170–179.
83. Takayanagi, H. Interplay between interferon and other cytokine systems in bone metabolism / H. Takayanagi, K. Sato, A. Takaoka, T. Taniguchi // Immunol. Rev. – 2005. – Vol. 208. – P. 181–193.
84. Tang, X. Bisphosphonates suppress insulin-like growth factor 1-induced angiogenesis via the HIF-1 $\alpha$ /VEGF signaling pathways in human breast cancer cells / X. Tang, Q. Zhang, S. Shi, Y. Yen, X. Li, Y. Zhang, K. Zhou, A.D. Le // Int. J. Cancer. – 2010. – Vol.126. – No.1. – P.90-103.

85. Taylor. Molecular cloning and functional analysis of the Arabidopsis thaliana DNA ligase I homologue // Plant. J. – 1998. – Vol.14. – No.1. – P.75-81.
86. URL : <http://www.interferons.ru/works>
87. URL : [http://medservices.info/the\\_study\\_of\\_structural\\_and\\_physico\\_chemical\\_properties](http://medservices.info/the_study_of_structural_and_physico_chemical_properties)
88. URL : [http://maxwellusa.com.ua/art/Dr. K. Alibek 27s\\_lecture-Interferon-gamma.ppt](http://maxwellusa.com.ua/art/Dr._K._Alibek_27s_lecture-Interferon-gamma.ppt)
89. URL : <http://www.ximicat.com/info.php?id=3292>
90. URL : <http://www.who.int/gho/ru/>
91. Van Slooten, M.L. Immunoadjuvant activity of interferon-gamma-liposomes co-administered with influenza vaccines / M.L. van Slooten, I.Hayon, I. Babai, Z. Zakay-Rones, E.Wagner, G. Storm, E. Kedar // Biochim. Biophys. Acta. – 2001. – Vol.1531. – No.1-2. – P.99-110.
92. Vidal, C. Interferon gamma inhibits adipogenesis in vitro and prevents marrow fat infiltration in oophorectomized mice / C. Vidal, S. Bermeo, W. Li, D. Huang, R. Kremer, G. Duque // Stem. Cells. – 2012. – Vol. 30. – No.5. – P.1042-1048.
93. Waldburger, J.M. Lessons from the bare lymphocyte syndrome:molecular mechanisms regulating MHC class II expression / J.M. Waldburger, K. Masternak, A.M. Mottet, J. Villard, M. Peretti, M. Landmann, W. Reith // Immunological reviews. – 2000. – Vol.178. – P.148-165.
94. Wall, L. IFN-gamma induces apoptosis in ovarian cancer cells in vivo and in vitro // Clin. Cancer Res. – 2003. – Vol. 9. – P. 2487–2496.
95. Weissbach, H. In vitro synthesis of biologically active human leukocyte interferon directed by recombinant plasmid DNA / H. Weissbach, DV. Goeddel, R. McCandliss, S. Maeda, PC. Familletti, B. Redfield, T. Staehelin, S. Pestka // Arch. Biochem. Biophys. – 1981. – Vol.210. – No.1. – P. 417-419.

96. Xu, R. Cellular and humoral immunity against vaccinia virus infection of mice / R. Xu, A.J. Johnson, D. Liggitt, M.J. Bevan // *J. Immunol.*-2004.- Vol.172. – No.10. - P. 6265-6271.
97. Yamamoto, N. Effects of intranasal administration of recombinant murine interferon-gamma on murine acute myocarditis caused by encephalomyocarditis virus / N. Yamamoto, M. Shibamori, M. Ogura, Y. Seko, M. Kikuchi // *Circulation.* – 1998. – Vol.97. – No.10. –P.1017-1023.
98. Young, H.A. Role of interferon-gamma in immune cell regulation / H.A. Young, R.f. Hardy // *J.Leukocytes Biol.* - 1995. - Vol. 58. – No.4. - P. 373-381.
99. Yousefi, S. A practical cytopathic effect/dye-uptake interferon assay for routine use in the clinical laboratory / S.Yousefi, M.R. Escobar, C.W. Gouldin // *Am.J.Clin. Pathol.* –1985. – Vol.83. – P.735-740.
100. Zhang, C. Lack of interferon- $\gamma$  receptor results in a microenvironment favorable for intestinal tumorigenesis / C. Zhang, D. Hou, H. Wei, M. Zhao, L. Yang, Q. Liu, X. Zhang, Y. Gong, C. Shao // *Oncotarget.* – 2016. Jun 7. -doi: 10.18632/oncotarget.9867. [Epub ahead of print]
101. Zhu, LM. Monocyte-derived CD40 expression is regulated by interferon- $\gamma$ /interferon- $\gamma$  receptor-1 pathway when acting as a bridge during their interaction with T cells and allogeneic endothelial cells / LM. Zhu, YS. Fang, ZG. Sun, LZ. Yu, H. Xu // *Transplant .Proc.* – 2012. – Vol.44. – No.4. – P.996-998. - doi: 10.1016/j.transproceed.2012.01.096.
102. Ашмарин, И.П. Химия белка / И.П. Ашмарин, А.А. Мюльберг, Н.В. Садикова, И.А. Сытинский. – Л.: Изд-во Ленингр. Ун-та, 1968. – С. 77.
103. Варпаховская, И. Лекарственные препараты для интраназального применения. / И. Варпаховская // *Медлайн Экспресс.* – 2001. – № 15(137). – С. 16-19.



104. Варпаховская, И. Лекарственные препараты для интраназального введения. / И. Варпаховская // Ремедиум. – 1999. – № 9. – С. 56-59.
105. Веревкина, К.Н. Изменение показателей неспецифической защиты организма мышей при введении двуспиральной РНК из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. / К.Н. Веревкина, Е.Д. Даниленко, А.Н. Костомаха, Ю.Н. Зарвина, В.С. Сазонов, В.А. Фадина // Вопр. вирусологии. – 1989. – №1. – С. 69-72.
106. Волова, Т.Г. Биотехнология / Т.Г. Долгова. – Новосибирск: Изд-во Сиб. отд. Рос. Акад. наук, 1999. – 252 с.
107. Гамалей, С.Г. Фармакокинетика и противоопухолевые свойства препарата, содержащего ФНО- $\alpha$  в составе наночастицы / С.Г. Гамалей, А.В. Батенева, Г.М. Сысоева, Е.Д. Даниленко, Л.Р. Лебедев, В.И. Масычева // Бюл. Эксперим. биологии и медицины. – 2010. – Т. 149, № 3. – С.296 – 299.
108. Гуревич, К.Г. Разработка систем интраназальной доставки лекарственных средств // Качеств. клин. практика. –2002.– №1.– С. 2–5.
109. Егорова, Т.А. Основы биотехнологии / Т.А. Егорова, С.М. Клунова, Е.А. Живухина. – М.: Изд. центр «Академия», 2003. – 208 с.
110. Ершов, Ф.И. Интерфероны и их индукторы (от молекул до лекарств) / Ф.И. Ершов, О.И. Киселев. – М, 2005. –356 с.
111. Ершов, Ф.И. Система интерферона в норме и при патологии. – М.: Медицина, 1996. – 240с.
112. Ершов, Ф.И. Интерферон и его индукторы / Ф.И. Ершов, А.С. Новохатский. – М., 1980.
113. Жабина, А.С. Особенности экспрессии предиктивных маркеров у больных различными солидными опухолями / А.С. Жабина, С.А. Проценко, В.М. Моисеенко, Е.Н. Имянитов // Паллиативная медицина и реабилитация. – 2011. – № 3. – С.27-30.
114. Иванов, В.И. Круговой дихроизм и структура комплементарных нуклеиновых кислот // Молекуляр.биология. – 1973. – Т.7. – С.105-140.

115. Ильичев, А.А. Конструирование рекомбинантной плазмиды, обеспечивающей подбор оптимального промотора для гена интерферона  $\alpha 2$  человека / А.А. Ильичев, С.И. Беликов, В.Г. Пугачев, И.В. Тимофеев, В.В. Зорин, С.Г. Попов, С.Н. Щелкунов, Л.С. Сандахчиев // Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология – 1986. – N7. – С.23-26.
116. Ильичев, А.А. Экспрессия искусственного гена лейкоцитарного интерферона- $\alpha 2$  человека, клонированного в фаге M13mp8 / А.А. Ильичев, О.О. Миненкова, С.И. Беликов, И.В. Тимофеев, В.Г. Пугачев, В.А. Каргинов, С.Г. Попов, С.Н. Щелкунов, В.В. Зорин, Л.С. Сандахчиев // Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология – 1986. – N8. – С.19-23.
117. Ильичев, А.А. Влияние дупликации промоторов в искусственном гене интерферона на уровень его экспрессии / А.А. Ильичев, Н.В. Тикунова, О.И. Серпинский, И.В. Тимофеев, С.Н. Щелкунов // Генетика. – 1987. – Т.23, N2. – С.197-201.
118. Кадагидзе, З. Г. Интерферон-гамма в онкологии. / З.Г. Кадагидзе, Е.Г. Славина, А.И. Черткова // Фарматека.– 2013. – № 17. – С. 40-44.
119. Кетлинский, С. А. Цитокины / С.А. Кетлинский, А.С. Симбирцев //СПб.: Фолиант. – 2008.
120. Киселев, О.И. Интерферон-гамма: новый цитокин в клинической практике Ингарон. / О.И. Киселев, Ф.И. Ершов, Э.Г. Деева. – М.; Спб., 2007.
121. Лахтин, В.М. Нанотехнологии и перспективы их использования в медицине и биотехнологии / В.М. Лахтин, С.С. Афанасьев, М.В. Лахтин, В.А. Алешкин, Ю.В. Несвижский, В.В. Поспелова // Вест. РАМН. – 2008. – №4. – С. 50-55.
122. Лебедев, Л.Р. Конструирование вирусоподобных частиц, экспонирующих эпитопы ВИЧ-1 / Л.Р. Лебедев, Л.И. Карпенко, В.А.

- Порываева, М.Ш. Азаев, Е.И. Рябчикова, И.П. Гилева, А.А. Ильичев // Молекуляр. биология. – 2000. – Т.34, № 3. – С.480-485.
123. Лютоев, Н.Г. Иммуноterapia рецидивирующих респираторных заболеваний // Рос. мед. журн. – 2001. – Т. 9, № 3-4. – С. 136-138.
124. Марышева, А.А. Получение и характеристика нанопрепарата - аналога интерферона-гамма / А.А. Марышева, О.С. Коровина // Rusnanotech – 09: Междунар. форум по нанотехнологиям, 6-9 окт.2009 г.: Сб. тез. докл. 2-го междунар. Конкурса науч. Работ молодых ученых в области нанотехнологий. [М., 2009]. – С.865 – 866.
125. Масычева, В.И. Создание средств стимуляции системы неспецифической резистентности. / В.И. Масычева, Е.Д. Даниленко, Н.М. Пустошилова, В.А. Белявская // Вест. РАМН. – 1998. – №4. – С. 13-17.
126. Мезенцева, М.В. Интерферон-гамма в лечении генитального герпеса. / М.В. Мезенцева, М.Р. Рахматуллина, А.А. Гиндис, Н.В. Кашина // Фарматека. – 2007. – № 14. – С. 73-77.
127. Мельников, О.А. Современные препараты для лечения ОРВИ и гриппа. / О.А. Мельников, Л. В. Аверкиева // Лечащий врач. – 2004. – №8.
128. Мирошников, П.Н. Разработка лекарственного препарата Дельтаферон на основе аналога рекомбинантного гамма-интерферона человека. / П.Н. Мирошников, Л.Р. Лебедев // Вестн. Биотехнологии и физ.- хим. биологии им. Ю.А.Овчинникова. – 2006. – Т.2, № 2. – С. 5-10.
129. Мирошников, П.Н. Получение рекомбинантного гамма-интерферона и его аналога дельтаферона / П.Н. Мирошников, Л.Р. Лебедев, Т.А. Терещенко // Биотехнология. – 2005. – №1. – С. 11-18.
130. Насонов Е.Л. Проблема остеопороза в ревматологии. / Е.Л. Насонов, И.А. Скрипникова, В.А. Насонова. - М.: Стин. – 1997.

131. Оболенская, А.В. Лабораторные работы по химии древесины и целлюлозы / А.В. Оболенская, З.П. Ельницкая, А.А. Леонович: Учеб. пособие для вузов. - М.: «Экология», 1991. – 320 с.
132. Патент РФ № 2242245. Искусственные микобактериальные частицы и противотуберкулезная вакцинная композиция на их основе / Азаев М.Ш., Лебедев Л.Р., Кузьмичева Г.А., Татьков С.И.; заявитель и патентообладатель ФБУН ГНЦ ВБ Вектор. - Заявка 2003100864 от 10.01.2003; опубл.. 20.12.2004.
133. Патент РФ 2142508. Способ промышленного получения полипептида с биологической активностью лейкоцитарного интерферона альфа-2 человека / Пикалова М.И., Доманова З.М., Хайбуллина И.И., Еникеева Р.В., Наумова Н.В., Колокольцов А.А.; заявитель и патентообладатель ФБУН ГНЦ ВБ Вектор. – Заявка 97112593 от 23.07.1997; опубл. 10.12.1999.
134. Патент РФ № 2317107. Рекомбинантная вакцина против вируса иммунодефицита человека 1 типа / Карпенко Л.И., Лебедев Л.Р., Бажан С.И., Некрасова Н.А., Белавин П.А., Серегин С.В., Данилюк Н.К., Ерошкин А.М., Ильичев А.А.; заявитель и патентообладатель ФБУН ГНЦ ВБ Вектор. - Заявка 2006100808 от 10.01.2006; опубл. 20.02 2008.
135. Патент РФ № 2046144. Фрагмент ДНК S54, кодирующий полипептид с активностью гамма-интерферона, рекомбинантная плазмидная ДНК, обеспечивающая синтез полипептида с активностью гамма-интерферона и штамм *Escherichia coli* – продуцент полипептида с активностью гамма-интерферона / Татьков С.И., Смирнова О.Ю., Кищенко Г.П., Петренко В.А.; заявитель и патентообладатель ФБУН ГНЦ ВБ Вектор. - Заявка 5067904 от 20.08.1992; опубл. 20.10.1995.
136. Патент РФ № 2132386. Способ получения рекомбинантного интерферона-гамма человека / Закабунин А.И., Барановская Г.А., Пустошилова Н.М., Майстренко В.Ф., Гаврюченкова Л.П., Громова

- О.А.; заявитель и патентообладатель ФБУН ГНЦ ВБ Вектор. - Заявка 97110634 от 20.06.1997; опубл. 27.06.1999.
137. Патент РФ N 2105813. Мутантный ген IFN 10, кодирующий полипептид с активностью гамма-интерферона человека, рекомбинантная плазмида рIF 10, обеспечивающая экспрессию гена IFN 10 в *E.coli* и штамм *E.coli* - продуцент полипептида, обладающего активностью гамма-интерферона / Татьков С. И., Ильичев А. А., Смирнова О. Ю., Закабунин А. И.; заявитель и патентообладатель ФБУН ГНЦ ВБ Вектор. - Заявка 95117471 от 12.10.1995; опубл. 27.02.1998.
138. Патент РФ № 2326944. Способ получения и препарат аналога рекомбинантного интерферона гамма человека / Мирошников П.Н., Лебедев Л.Р., Масычева В.И.; заявитель и патентообладатель ФБУН ГНЦ ВБ Вектор. - Заявка 2006129453 от 14.08.2006; опубл. 20.06.2008.
139. Патент РФ № 2140285. Противовирусное средство- капли в нос "ГРИППФЕРОН" / Гапонюк П. Я.; Маркова Е.А.; Марков И.А. Заявка 99100666/14 от 25.01.1999; опубл. 27.10.1999
140. Патент РФ № 2386447. Противоопухолевое средство на основе наночастицы, несущей рекомбинантный фактор некроза опухолей альфа / Масычева В.И., Лебедев Л.Р., Даниленко Е.Д., Сысоева Г.М., Гамалей С.Г. Заявка 2008140246 от 13.10.2008; опубл. 20.04.2010
141. Патент РФ № 2558256. Способ получения двуспиральной рибонуклеиновой кислоты (дсРНК) из клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* / Аликин Ю.С., Подгорный В.Ф., Лебедев Л.Р., Азаев М.Ш. Заявка 2014119351/10 (030572) от 13.05.2014 ; опубл. 27.07.2015.
142. Патент РФ №2190018. Молекулярный вектор для доставки генов в клетки-мишени /Сизов А.А., Лебедев Л.Р., Масычева В.И., Даниленко Е.Д. Заявка 2000121671 от 14.08.2000; опубл. 27.09.2002.
143. Решетилов, А.Н. Нанобиотехнология и биосенсорные исследования. / А.Н. Решетилов, А.М. Безбородов // Прикл. Биохимия и микробиология. – 2008. – Т.44, №1. – С. 3-8.

144. Скоупс, Р. Методы очистки белков. - М: Мир.- 1985.
145. Смирнова, О.Ю. Мутантные гамма интерфероны человека с измененным С-концом и их свойства / О.Ю.Смирнова, С.И. Татьков, В.А.Петренко, А.А.Ильичев, Л.С. Сандахчиев. // Докл.РАН – 1994. – т.337, N 3. – С.405-406.
146. Сологуб, Т.В. Гамма-интерферон: обоснование и перспективы применения в инфекционной практике / Т.В.Сологуб, Э.Г. Деева, И. Йолла // Медлайн. – 2006. – №2 – 3. – С.21-23.
147. Сысоева, Г.М. Влияние композиционного препарата интерферона-гамма с его индуктором на пролиферативную активность лимфоцитов. / Г.М. Сысоева, Е.Д. Даниленко, Г.М. Левагина, В.И. Масычева // Вестн. Урал.мед. акад. науки. – 2009. – №2/1(24).- (Темат. вып. по аллергологии и иммунологии). – С.228-229.
148. Татьков, С.И. Мутантный  $\gamma$ -интерферон человека с укороченным С-концом и его свойства / С.И. Татьков, О.Ю.Смирнова, Р.Ю.Цивковский и др. // Докл. РАН. – 2000. – Т.372, №6. – С.833-835.
149. Татьков, С.И. Мутантные гамма-интерфероны человека с измененным С-концом и их свойства / С.И.Татьков, О.Ю.Смирнова, Р.Ю.Цивковский, А.А.Ильичев //Молекуляр. биология. – 1995. – Т.29, N 5. – С.1095-1100.
150. Филиппович, Ю.Б. Практикум по общей биохимии. / Ю.Б. Филиппович, Т.А. Егорова, Г.А. Севастьянова. - М.: Просвещение, 1982.
151. Франке, З. Химия отравляющих веществ. / З. Франке, П. Франц, В. Варнке: Т. 2.- М.: Химия. – 1973.
152. Шмелев, В.А. Интерферон-гамма, фактор некроза опухолей, тимозин-альфа1 – противоиnфекционные и противоопухолевые цитокины и препараты. - М: ИД «Медпрактика-М». – 2008. - 536 с.

153. Шумилов, В. И. Грипп и ОРВИ: неспецифическая профилактика с использованием геноинженерного  $\alpha$ -2 интерферона и его новых форм. / В.И. Шумилов, В.А. Шевцов, С.П. Лобов // Лечащий врач. – 2000. – № 4. – С. 20-21.
154. Щелкунов, С.Н. Изучение экспрессии искусственного гена интерферона человека в клетках *Escherichia coli* / С.Н. Щелкунов, А.А. Ильичев // Биотехнология. – 1988. – Т.4. – №6. – С.706-713.

### Список опубликованных работ по теме диссертации:

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. 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.
3. 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.
4. 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. Vogryantseva, V.I. Masycheva // Applied Biochemistry and Microbiology. - 2013. – V 49, N 7. – P.660-663.
5. 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.
6. Коровина О.С., Корнеев Д.В., Левагина Г.М., Медикова Л.Д., Богрянцева М.П., Масычева В.И. 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.
7. 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.

8. 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.

### 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 // Международ. конгресс по реабилитации в медицине и иммунореабилитации, 14-й, Тель-Авив, Израиль, 17-20 окт. 2009г.: Тез. докл. // Международ. 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  $\gamma$ . / 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.

**Приложения****ПРИЛОЖЕНИЕ 1**

Инструкция по изготовлению и контролю препарата дельтаферон в транспортной системе (ВПЧ-дельтаферон), субстанция ИК-11/01-2012.

Инструкция по изготовлению и контролю препарата ВПЧ-дельтаферон лиофилизат для приготовления раствора для интраназального применения, 50000 МЕ ИК-16/01-2013.

Федеральное бюджетное учреждение науки  
«Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «ВЕКТОР»  
Институт медицинской биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ  
Директор ИМБТ  
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»  
Е.Д.Даниленко  
«24» октября 2013 г.



**Инструкция по изготовлению и контролю препарата  
ВПЧ-дельтаферон лиофилизат для приготовления раствора  
для интраназального применения,  
50 000 МЕ**

**ИК-16/01-2013**

**Бердск 2013**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»  
Институт медицинской биотехнологии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»

УТВЕРЖДАЮ

Директор ИМБТ

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»,

д.б.н., профессор

 Масычева В.И.

19 октября 2012 г.



### ИНСТРУКЦИЯ

по изготовлению и контролю препарата дельтаферон в транспортной  
системе (ВПЧ-дельтаферон), субстанция

ИК – 11/01 - 2012

Инв. № 1844 от 19.10.2012г.

Бердск 2012