

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ РЕКОМБИНАНТНОГО ГРАНУЛОЦИТАРНО-МАКРОФАГАЛЬНОГО КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА ЧЕЛОВЕКА В СРЕДСТВЕ ДОСТАВКИ

Т.И. Есина*, Г.Г. Шими́на, Е.А. Волосникова, С.Г. Гамалей, Е.Д. Даниленко

Институт медицинской биотехнологии Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор», 633010, Новосибирская область, Бердск, ул. Химзаводская, 9; *e-mail: esina_ti@vector.nsc.ru

Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ) – цитокин, стимулирующий рост и дифференцировку клеток-предшественников гранулоцитов и моноцитов/макрофагов, повышающий активность зрелых нейтрофилов, моноцитов и эозинофилов. Препараты рекомбинантного гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека (рчГМ-КСФ) применяются при заболеваниях, сопровождающихся миелосупрессией (нейтропении различной этиологии, хронические инфекции и др.). Одной из проблем широкого использования ГМ-КСФ в клинической практике является нестабильность белка в биологических жидкостях и, как следствие, короткий период полужизни и биологического эффекта. Для решения этой проблемы разработан способ включения рчГМ-КСФ в средство доставки на основе полисахарида полиглюкина. Установлено, что конъюгирование рчГМ-КСФ с полиглюкином приводило к повышению устойчивости белка к деградирующему действию трипсина. Лекарственная форма рчГМ-КСФ в средстве доставки повышала число сегментоядерных нейтрофилов в крови мышей СВА с цитостатической миелосупрессией в той же степени, что и препарат исходного рчГМ-КСФ (300% и 350% соответственно по сравнению с контрольным уровнем, 5 сутки после введения циклофосфана), и способствовала более быстрому восстановлению общего числа кариоцитов костного мозга. Следовательно, лекарственный препарат, содержащий конъюгат рчГМ-КСФ с полиглюкином, демонстрировал более выраженный эффект в отношении процессов активации миелопоэза костного мозга по сравнению с немодифицированным белком.

Ключевые слова: рекомбинантный гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор человека; средство доставки; полиглюкин; гемостимулирующая активность

DOI: 10.18097/BMCRM00240

ВВЕДЕНИЕ

Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ) – белок-цитокин, член семейства колониестимулирующих факторов, который стимулирует рост и дифференцировку клеток-предшественников гранулоцитов и моноцитов/макрофагов, обеспечивает активацию зрелых нейтрофилов, моноцитов и эозинофилов [1]. Препараты рекомбинантного аналога ГМ-КСФ человека применяются при заболеваниях, сопровождающихся миелосупрессией: последствиях химио- и радиотерапии онкологических заболеваний, СПИД, тяжелой хронической нейтропении, а также при трансплантации костного мозга и мобилизации клеток периферической крови для трансплантации [2-4].

Известно, что введение колониестимулирующих факторов позволяет не только восстановить в крови количество лейкоцитов и их морфологических форм, но и усилить противомикробные свойства клеток крови. Применение этих факторов целесообразно при вакцинации лиц с иммунологической недостаточностью, возникшей вследствие старения, хронических инфекций, перенесенных стрессов или обусловленной наследственными причинами [5]. Адьювантные свойства колониестимулирующих факторов зарегистрированы при вакцинации против вирусов гепатита В, гриппа, герпеса, ВИЧ и ряда других вирусов [5-7]. Эти данные позволяют говорить о том, что лекарственные препараты КСФ, в частности, ГМ-КСФ, могут быть использованы не только для гемостимулирующей, но и иммуномодулирующей терапии.

Однако существует ряд проблем, которые ограничивают возможность широкого применения препаратов ГМ-КСФ в клинической практике. Помимо технологических проблем, связанных с низкой продуктивностью и стабильностью штаммов-продуцентов, можно выделить общую для белковых препаратов проблему недостаточной стабильности белков в биологических средах, короткий период полувыведения из биологических жидкостей. Для решения данной проблемы используются различные методические подходы, в частности, включение белков в средства доставки на основе полимерных носителей. Как было показано авторами работ [8, 9], результатом конъюгирования цитокинов, таких как гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, эритропоэтин или интерферон альфа-2b, с дендримером полиэтиленгликоля является повышение их стабильности *in vitro* и *in vivo*. Конъюгирование рекомбинантного интерферона гамма с полимером олигосахаридной природы D3000-7 (Sa-Sp)-(Sp-M), где D3000 – диальдегид декстран, (Sa-Sp) – Neu5Ac-Lactose-N(CH)-CH(2)-CH(2)-NH(2), (Sp-M) – Маленид-CH(2)-NH(2), приводит к стабилизации молекулы при сохранении высокого уровня противовирусной активности [10].

Интересным вариантом с точки зрения выбора полимера как средства доставки является полисахарид декстран (полиглюкин). Помимо технических преимуществ, таких как наличие функциональных групп, пригодных для получения конъюгатов, возможность выбора в зависимости от поставленной задачи длины полисахаридной цепи, полиглюкин является биологически активным соединением. В частности, описана его способность активировать клетки



иммунной системы, прежде всего, макрофаги [11]. Есть данные о влиянии полисахаридов разной природы (олигосахариды, выделенные из бурых водорослей *Chordaria flagelliformis* [12], бета-глюканы из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [13] и др.) на уровень экспансии клеток-предшественников и интенсивность гранулоцитопоза. Эти данные позволяют говорить не только о возможности стабилизации структуры белка-цитокина в составе конъюгата с полиглюкином, но и о вероятности развития синергидного эффекта его компонентов. Немаловажным является также наличие в организме естественных систем метаболизма полисахаридов – факт, позволяющий предполагать, что конъюгирование не приведет к появлению у препарата токсических свойств.

В Государственном научном центре вирусологии и биотехнологии «Вектор» (ГНЦ ВБ «Вектор») разработан штамм-продуцент *E. coli* SG 20050/p280_2GM, отработана опытно-промышленная технология получения рекомбинантного ГМ-КСФ человека (рчГМ-КСФ). В ходе экспериментальных исследований в культуре ГМ-КСФ-зависимых клеток линии TF-1 и на мышах с цитостатической миелосупрессией продемонстрирована гемостимулирующая активность рчГМ-КСФ и его лекарственных форм разного состава [14, 15].

Целью данной работы было получение препарата рекомбинантного ГМ-КСФ человека в средстве доставки на основе полимера полиглюкина, исследование его стабильности и биологических свойств.

МЕТОДИКА

Реактивы

В работе были использованы: рекомбинантный ГМ-КСФ человека, субстанция, полученная в Институте медицинской биотехнологии ГНЦ ВБ «Вектор», с концентрацией 11.18 мг/мл; декстран (полиглюкин) с молекулярной массой 40000 Да («MP Biomedicals», Франция); сефадекс G-25 («Cytiva», Швеция); маркер молекулярной массы белков PageRuler™ Plus 10-250 кДа, («Thermo Fisher Scientific», США); фенилметил-сульфонидфторид, («Gerbu», Германия); мембраны для стерилизующей фильтрации, размер пор 0.22 мкм («Corning», Бельгия). Акриламид, N, N'- метилен-бис-акриламид, 2-меркаптоэтанол, боргидрид натрия, глицин, додецилсульфат натрия, Кумасси R-250, натриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты, персульфат аммония, полиэтиленгликоль 6000, D-маннит приобретены у компании «Applichem» (Германия); N,N,N',N'-тетраметил-1,2-диамин, периодат натрия, трис-(оксиметил)-аминометан, циклофосфан моногидрат закуплены в компании «Sigma», США. Все остальные реактивы (альбумин человека, раствор для инфузий 20%, ЛС-002333 (НПО «Микроген»), вода для инъекций, стерильная ЛПП-002529 («Гротеск»), пероксид водорода, кислоты, соли) были российского производства квалификацией не ниже хч.

Метод получения конъюгата рчГМ-КСФ с полиглюкином

Активацию декстрана (полиглюкина) с молекулярной массой 40000 Да осуществляли в водном растворе добавлением периодата натрия в соотношении 1:40 (моль

декстрана / моль периодата). Реакцию проводили в течение 1 ч с последующей гель-фильтрацией для отделения непрореагировавших компонентов на сефадексе G-25 (хроматограф Akta Pure 150, «Cytiva», колонка объемом 15 мл, уравновешенная в фосфатно-солевом буфере, pH 7.4, «Gibco», Великобритания). В процессе окисления декстрана происходит формирование свободных альдегидных групп, которые вступают в реакцию с аминогруппами рчГМ-КСФ при добавлении его к активированному декстрану в соотношении 1:1 (моль декстрана / моль рчГМ-КСФ). Смесь инкубировали в течение 2 ч, оставшиеся свободными альдегидные группы восстанавливали избытком боргидрида натрия в соотношении 1:80 (моль декстрана / моль боргидрида), после чего инкубировали полученную смесь 2 ч и удаляли непрореагировавшие компоненты гель-фильтрацией на сефадексе G-25 при температуре 2-8°C [16].

Метод получения образцов лекарственной формы

Препарат лекарственной формы получали путем смешения конъюгата рчГМ-КСФ с полиглюкином и вспомогательных компонентов в ламинарном боксе с соблюдением правил асептики. В качестве препарата сравнения аналогичным образом готовили образец лекарственной формы, содержащий субстанцию рчГМ-КСФ. В стеклянный стакан объемом 50 мл с помощью автоматической пипетки вносили растворы вспомогательных веществ (30 мл), затем добавляли конъюгат рчГМ-КСФ с полиглюкином (либо рчГМ-КСФ) в количестве 400 мкл. Смесь перемешивали на магнитной мешалке в течение 5 минут при скорости вращения 250 об/мин, после чего стерильно фильтровали и разливали по 1 мл в стеклянные флаконы. Полученные образцы хранили при температуре 2-8°C.

Определение концентрации белка рчГМ-КСФ в конъюгате осуществляли методом Лоури по ГФ XIV, ОФС.1.2.3.0012.15 «Определение белка».

Оценку сохранности структуры и молекулярной массы белка проводили методом электрофореза в 15% полиакриламидном геле при силе тока 25 мА в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН-ПААГ) в восстанавливающих условиях с использованием денатурирующего раствора с 2-меркаптоэтанолом при нагрузке на лунку 10 мкг белка рчГМ-КСФ, с окрашиванием Кумасси R-250 по ГФ XIV, том 1, ОФС.1.2.1.0023.15 «Электрофорез в полиакриламидном геле»).

Метод оценки протеолитической устойчивости конъюгата рчГМ-КСФ-ПГ

Для оценки устойчивости препаратов рчГМ-КСФ к действию трипсина в раствор исследуемого препарата (субстанции нативного белка или белка в составе конъюгата), содержащего белок в количестве 10 мкг, 20 мкг или 50 мкг, вносили свежеприготовленный раствор трипсина («Самсон Мед», Россия) в количестве 0.5 мкг, из расчета трипсин: белок – 1:20, 1:40, 1:100. Смесь инкубировали в термостате (ТС-1/80 СПУ, Смоленское СКТБ СПУ, Россия) при 37°C в течение 10 мин, реакцию останавливали раствором, содержащим додецилсульфат натрия, 2-меркаптоэтанол и бромфеноловый синий в 20% растворе глицерина.

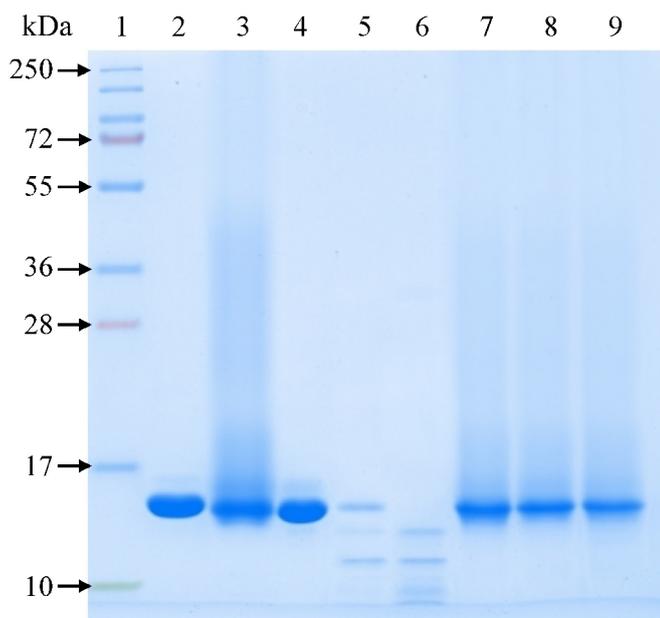


Рисунок 1. Электрофореграмма продуктов трипсинолиза препаратов рГМ-КСФ. Электрофорез в 15% ПААГ в нередуцирующих условиях, окрашивание Кумасси R-250. Дорожки: 1 – маркер молекулярной массы белков (10 - 250 кДа); 2 – рГМ-КСФ, 5 мкг; 3 – конъюгат рГМ-КСФ, 5 мкг; 4 – рГМ-КСФ + трипсин (100:1); 5 – рГМ-КСФ + трипсин (40:1); 6 – рГМ-КСФ + трипсин (20:1); 7 – конъюгат рГМ-КСФ + трипсин (100:1); 8 – конъюгат рГМ-КСФ + трипсин (40:1); 9 – конъюгат рГМ-КСФ + трипсин (20:1).

После прогревания (5 мин при 90°C) продукты реакции анализировали электрофорезом в 15% ПААГ.

Метод определения гемостимулирующей активности препаратов рГМ-КСФ

Гемостимулирующую активность препаратов оценивали на модели метастатической миелосупрессии мышей, вызванной введением циклофосфана. В экспериментах использовали самцов мышей линии СВА возрастом 2.5-3 месяца, с массой тела 19-24 г, полученных из питомника ГНЦ ВБ «Вектор» (р.п. Кольцово, Новосибирской области). До эксперимента и в ходе исследования животных содержали в стандартных условиях вивария при естественном освещении на сбалансированном пищевом рационе.

Мышам всех экспериментальных групп однократно внутрибрюшинно вводили циклофосфан (ЦФ) в максимально переносимой дозе (250 мг/кг) в объеме 0.25 мл на 20 г массы тела. Через сутки после введения ЦФ животным опытных групп начинали курс подкожных инъекций препаратов лекарственной формы (ЛФ) конъюгата рГМ-КСФ либо рГМ-КСФ, которые вводили в дозе 90 мкг белка/кг массы тела 1 раз в день в течение 4 суток. Доза и схема введения были определены как эффективные в предварительных экспериментах. Мыши контрольной группы получали подкожно физиологический раствор по той же схеме, что и опытные; интактные мыши – без введения препаратов.

Через сутки после окончания курса инъекций препаратов (5 сутки после первого введения ЦФ) у животных всех групп забирали на анализ образцы крови из кончика хвоста, а после

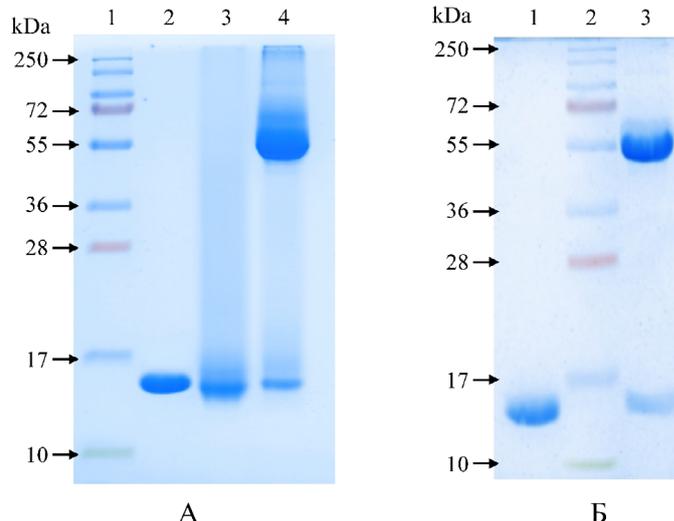


Рисунок 2. Электрофореграмма лекарственных форм рГМ-КСФ и его конъюгата с полиглютамином. Электрофорез в 15% ПААГ в нередуцирующих условиях, окрашивание Кумасси R-250. Дорожки: А: 1 – субстанция рГМ-КСФ, 10 мкг; 2 – конъюгат белка рГМ-КСФ, 10 мкг; 3 – маркер молекулярной массы белков (10 - 250 кДа); 4 – ЛФ конъюгата рГМ-КСФ, 20 мкл (3 мкг целевого белка); Б: 1 – субстанция рГМ-КСФ, 10 мкг; 2 – маркер молекулярной массы белков (10-250 кДа); 3 - ЛФ рГМ-КСФ, 20 мкл (3 мкг целевого белка).

эвтаназии мгновенной дислокацией шейных позвонков – образцы костного мозга. В образцах крови методом световой микроскопии (микроскоп МИКМЕД-6, «ЛМО», Россия) определяли общее количество лейкоцитов (кровь разводили в 20 раз 3% раствором (масса/объем) уксусной кислоты, считали в камере Горяева), относительное и абсолютное содержание нейтрофилов и других морфологических форм лейкоцитов. В образцах костного мозга подсчитывали общее количество кариоцитов (ОКК), рассчитывали количество клеток на бедро. Для получения костного мозга выделяли бедренную кость мыши, очищали ее от мягких тканей бедра и тщательно промывали костномозговой канал 3% раствором уксусной кислоты в объеме 1 мл. Подсчет ОКК осуществляли с помощью камеры Горяева.

Данные эксперимента обрабатывали методами вариационной статистики с помощью пакета программ Statgraphics V5.0 («Statistical Graphics Corp.», США). Рассчитывали групповые показатели суммарной статистики – среднюю арифметическую и стандартную ошибку. Для оценки значимости межгрупповых различий применяли непараметрические критерии – Н-критерий множественных сравнений Краскела-Уоллиса и двухвыборочный U-критерий Манна-Уитни с критическим уровнем статистической значимости $p=0.0170$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунке 1 представлена электрофореграмма препарата рГМ-КСФ и его конъюгата с полиглютамином после гидролиза трипсином. В эксперименте использовали разные соотношения фермента и препаратов рГМ-КСФ (1:20, 1:40 и 1:100). Как показал анализ, образцы нативного белка подвергались практически полному гидролизу после инкубации в течение 10 мин с трипсином при соотношениях белок:трипсин 40:1 и 20:1. Препарат конъюгата рГМ-КСФ

Таблица 1. Влияние лекарственной формы конъюгата рчГМ-КСФ либо рчГМ-КСФ на показатели периферической крови мышей линии СВА на фоне введения циклофосфана (5 сутки после введения цитостатика)

Группа животных	Лейкоциты, 10 ⁹ /л	Сегментоядерные нейтрофилы, 10 ⁹ /л	Лейкоцитарная формула, %				
			эозинофилы	нейтрофилы		моноциты	лимфоциты
				палочкоядерные	сегментоядерные		
Интактная	10.20±0.47	2.01±0.15	1.67±0.61	1.33±0.42	20.00±1.98	4.50±0.50	72.50±1.65
ЦФ+физ.р-р	1.48±0.20	0.08±0.02	0.00±0.00	8.00±1.71	5.00±0.86	15.33±2.29	71.67±3.16
ЦФ + рчГМ-КСФ	1.56±0.24	0.20±0.04	0.00±0.00	7.33±1.12	12.33±1.96 *p=0.008	16.00±3.43	64.33±4.18
ЦФ + ЛФ рчГМ-КСФ	2.14±0.54	0.28±0.09	0.00±0.00	9.33±3.04	12.33±2.89	18.00±3.72	60.33±5.17
Интактная	9.61±1.11	1.39±0.23	1.00±0.45	0.80±0.20	14.40±1.86	1.20±0.20	82.60±2.11
ЦФ + физ. р-р	2.49±0.14	0.12±0.03	0.00±0.00	7.00±1.91	4.83±1.30	10.50±0.92	77.67±3.43
ЦФ + рчГМ-КСФ	2.38±0.18	0.15±0.03	0.00±0.00	4.17±0.65	6.33±1.33	5.50±1.06 *p=0.016	84.00±1.59
ЦФ + ЛФ конъюгата рчГМ-КСФ	2.63±0.22	0.36±0.06 *p=0.013 **p=0.013	0.00±0.00	6.00±1.32	13.50±1.41 *p=0.008 **p=0.012	9.17±1.01	71.33±2.25 **p=0.005

Примечание. * - различия статистически значимы по сравнению с показателями мышей, которым вводили ЦФ и физиологический раствор, $p \leq 0.0170$; ** - различия статистически значимы по сравнению с показателями мышей, которым вводили ЦФ и субстанцию рчГМ-КСФ, $p \leq 0.0170$.

с полиглобулином в этих условиях был устойчив к ферментативному воздействию.

Таким образом, конъюгирование рчГМ-КСФ с полиглобулином позволило снизить чувствительность белка к трипсинолизу в сравнении с показателями исходного белка. Полученные данные подтверждают тот факт, что конъюгирование рчГМ-КСФ с молекулой полимера способно приводить к получению более стабильных вариантов, отличающихся повышенной устойчивостью к ферментативному разрушению. Можно предположить, что это связано с нарушением пространственной доступности для фермента сайтов протеолиза белковой молекулы. Очевидно, что при этом существует опасность экранирования полимером, помимо протеолитических, активных центров молекулы белка, ответственных за связывание с рецептором, и, как следствие, снижение его биологической активности.

Для выяснения данного вопроса было проведено изучение гемостимулирующей активности рчГМ-КСФ в составе конъюгата в сравнении с исходным белком. Учитывая относительно низкую активность субстанции рчГМ-КСФ в экспериментах *in vivo*, исследования были проведены на его лекарственной форме, содержащей, помимо активного компонента, вспомогательные вещества.

Как было показано нами ранее при сравнении лекарственных форм рчГМ-КСФ с разными вспомогательными веществами [15], наибольшей активностью на модели цитостатической миелосупрессии мышей отличались лекарственные препараты двух составов, один из которых был выбран для данного исследования. Лекарственная форма в качестве вспомогательных веществ содержала Д-маннит, человеческий альбумин и полиэтиленгликоль 6000. Сывороточный альбумин человека в лекарственных формах используется в качестве транспортной молекулы, полиэтиленгликоль – для обеспечения преодоления биологических барьеров и усиления адгезии белка к слизистым, Д-маннит – в качестве наполнителя и стабилизатора.

Были получены образцы двух типов лекарственных форм описанного состава, содержащие рчГМ-КСФ в составе конъюгата либо в виде свободного белка. Электрофоретический анализ образцов подтвердил, что рчГМ-КСФ как в конъюгированном, так и свободном виде сохранял свои структурные характеристики в лекарственной форме. На электрофореграмме видно, что в обоих исследованных образцах содержался рчГМ-КСФ (молекулярная масса в этих условиях (15350±500) Да), а также альбумин с молекулярной массой (55000±500) кДа, который был использован в качестве вспомогательного вещества (рис.2).

Результаты оценки влияния препаратов рчГМ-КСФ разного состава на показатели периферической крови представлены в таблице 1.

Как видно из представленных данных, субстанция рчГМ-КСФ приводила к повышению на 5 сутки эксперимента количества сегментоядерных нейтрофилов в периферической крови мышей по сравнению с контролем (ЦФ+физиологический раствор), при этом значения показателя в разных экспериментах варьировались в пределах от 125% до 250%. Число сегментоядерных нейтрофилов крови мышей в группе, которой вводили лекарственную форму рчГМ-КСФ, превышало показатели группы с введением субстанции рчГМ-КСФ на 40% (0.28±0.09 10⁹/л и 0.20±0.04 10⁹/л соответственно, табл.1). Введение лекарственной формы конъюгата рчГМ-КСФ приводило к увеличению показателя до 0.36±0.06 10⁹/л, что в 3 раза превышало показатель контроля и в 2.4 раза – его значения в группе мышей после введения субстанции рчГМ-КСФ (табл.1).

Похожие тенденции были обнаружены в ходе оценки влияния препаратов рчГМ-КСФ на клеточность костного мозга мышей, подвергнутых воздействию цитостатика. Если в группах, подвергнутых воздействию рчГМ-КСФ или его лекарственной формы, общее количество кариоцитов в данный временной период повышалось умеренно (на

Таблица 2. Влияние лекарственной формы конъюгата рчГМ-КСФ либо рчГМ-КСФ на клеточность костного мозга мышей линии СВА на фоне введения циклофосфана (5 сутки после введения цитостатика)

Группа животных	Общее количество кариоцитов, 10 ⁶ /бедро, после воздействия препарата, содержащего	
	конъюгат рчГМ-КСФ	рчГМ-КСФ
Интактные	13.76±1.31	
ЦФ + физ.р-р	3.38±0.92	4.62±0.81
ЦФ + субстанция	4.84±0.67	5.52±0.85
ЦФ +ЛФ	6.88±0.64*	3.39±0.63

Примечание.* - различия статистически значимы по сравнению с показателями мышей, которым вводили ЦФ и физиологический раствор, $p \leq 0.0170$

19-43% по сравнению с контрольным уровнем), то введение лекарственной формы конъюгата рчГМ-КСФ вызывало выраженное увеличение клеточности костного мозга. Общее число кариоцитов в этой группе возрастало в 1.4 раза по сравнению с контролем (различия статистически значимы, $p \leq 0.05$) (табл.2).

Иными словами, лекарственная форма, содержащая конъюгат рчГМ-КСФ с полиглобулином, не только не утрачивала гемостимулирующей активности, но и демонстрировала более выраженный эффект в отношении процессов активации миелопоэза костного мозга.

Вопрос о механизмах усиления биологического эффекта колониестимулирующего фактора под действием полисахарида требует отдельного изучения. На наш взгляд, возможно несколько причин эффекта стимуляции. Прежде всего, это может быть связано с повышенной стабильностью белка в кровяном русле и, как результат, более длительным воздействием на костномозговые клетки-предшественники. Кроме того, возможен аддитивный либо синергичный эффект полисахарида и ГМ-КСФ. В настоящее время накоплены многочисленные данные о том, что полисахариды разной природы способны усиливать гемопоэтические процессы в костном мозге и периферической крови на фоне цитостатической миелосупрессии за счет повышения мобилизации клеток-предшественников, их пролиферации и дифференцировки [12, 17], а также усиления продукции цитокинов, участвующих в регуляции гемопоэза, в частности, гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора [13, 18]. Повышенная активация гемопоэтических процессов отмечена в случае совместного применения препаратов полисахаридов, таких как бета-глюканы, Г-КСФ [17], а также конъюгатов Г-КСФ с производными природных полисахаридов, такими как гепарин [19]. И наконец, одной из причин может являться влияние на углеводный обмен, что было описано, например, для бета-глюканов [13], то есть, энергетическая «подпитка» процессов пролиферации и дифференцировки клеток-предшественников, прежде всего, гранулоцитарного ряда.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, получены образцы конъюгата рекомбинантного гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека с полисахаридом полиглобулином. Показано, что конъюгат рчГМ-КСФ в составе лекарственной формы отличался повышенной стабильностью к воздействию трипсина и более выраженной способностью усиливать гемопоэз, что проявлялось в

ускоренном восстановлении клеточности костного мозга и числа нейтрофилов периферической крови мышей в условиях цитостатической миелосупрессии.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Содержание мышей и эксперименты на них осуществляли в соответствии с российскими и международными требованиями по гуманному содержанию и использованию животных в экспериментальных исследованиях (Директива 2010/63/EU Европейского парламента и совета европейского союза по охране животных, используемых в научных целях).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят инженера отдела качества Н.Г. Мотовилову за оказанную помощь в проведении анализов рекомбинантного ГМ-КСФ и его конъюгата.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование проведено в рамках выполнения государственного задания ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, тема Г3-39/21.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов, требующих раскрытия в данной статье.

ЛИТЕРАТУРА

- Hong, W.K., Kufe, D.W., Hait, W., Pollock, R.E. (2010) Holland-free cancer medicine, 8th ed. Shelton CT: PMPH-USA Ltd., 2048 p.
- Dale, D.C., Crawford, J., Klippel, Z., Reiner, M., Osslund, T., Fan, E., Morrow, P.K., Allcott, K., Lyman, G.H. (2018) A systematic literature review of the efficacy, effectiveness, and safety of filgrastim. Support Care Cancer, **26**(1), 7-20. DOI: 10.1007/s00520-017-3854-x
- Rizzo, A. (2021) Use of granulocyte colony-stimulating factor for adult cancer patients: current issues and future directions. Future Oncol., **17**(26), 3411-3413. DOI: 10.2217/fon-2021-0678
- Pershko, V.A., Khalimov, Y.S., Gayduk, S.V. (2017) Effectiveness of colony-stimulating factors in the treatment of bone marrow syndrome of acute radiation sickness. Bulletin of the Russian Military Medical Academy, **19**(3), 195-198.
- Alpatova, N.A., Avdeeva, Zh.I., Nikitina, T.N., Medunicyn, N.V. (2019) Adjuvant properties of cytokines in vaccination. Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal, **53**(11), 3-8. DOI: 10.30906/0023-1134-2019-53-11-3-8
- Lian, J., Kuang, W., Jia, H., Lu, Y., Zhang, X., Ye, C., Gu, J., Lv, Y., Yu, J., Zhang, Y., Lu, X., Zhao, Y., Yang, D., Wang, K., Zhao, P., Yu, Y., Bai, L., Zhang, J., Zhang, X., Yang, Y. (2022) Pegylated interferon- α -2b combined with tenofovir disoproxil fumarate, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and hepatitis B vaccine treatment for naïve HBeAg-positive chronic hepatitis B patients: A prospective, multicenter, randomized controlled study. J.

- Med. Virol., **94**(11), 5475-5483. DOI: 10.1002/jmv.28003
7. Cocker, A.T.H., Greathead, L., Herasimtschuk, A.A., Mandalia, S., Kelleher, P., Imami, N. (2019) Short Communication: Therapeutic Immunization Benefits Mucosal-Associated Invariant T Cell Recovery in Contrast to Interleukin-2, Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor, and Recombinant Human Growth Hormone Addition in HIV-1+ Treated Patients: Individual Case Reports from Phase I Trial. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, **35**(3), 306-309. DOI: 10.1089/AID.2018.0176
8. Ramon Ehrnandes, K.A., Kastro Odio, F.R., Saes Martine, V.M., Paes Mejreles, R., Fernandes Sanches, E. (2011) PEG dendrimer with four branches for conjugation with proteins and peptides, Russian Patent No. 2409389. Retrieved from <https://patentimages.storage.googleapis.com/ef/bf/da/a6a67beb24256c/RU2409389C2.pdf>
9. Puchkov, I.A., Bairamashvili, D.I., Shvec, V.I. (2014) Pegylation, as method of production prolonged forms of biopharmaceutical drugs (pegylated granulocyte colony-stimulating factor as case of study). *Fine Chemical Technologies*, **4**(2), 3-31.
10. Martynov, A.I., Sankov, M.N., Gasanov, V. Ali ogly, Sheval'e, A.F., Vlasov, A.A., Shilovskij I.P. (2018) Method for obtaining a hybrid protein containing a fused protein analogue of an interferon gamma conjugated with oligosaccharide, Russian Patent No. 2656140. Retrieved from https://patents.s3.yandex.net/RU2656140C2_20180531.pdf
11. Pozdnyakova, S.V. (2001) Vliyanie dekstrana i polivinilpirralidona na funktsional'nyu aktivnost' fagocitiruyushhix kletochnyx sistem. Avtoreff. diss. kand. nauk, Novosibirsk State Medical Academy, Novosibirsk.
12. Anisimova, N.Yu., Ustyuzhanina, N.E., Bilan, M.I., Donenko, F.V., Ushakova, N.A., Kiselevskiy, M.V., Nifantiev, N.E. (2019) Influence of modified fucoidan and related sulfated oligosaccharides on hematopoiesis in cyclophosphamide-induced mice. *Mar. Drugs*, **16**(9), 333. DOI: 10.3390/md16090333
13. Mitroulis, I., Ruppova, K., Wang, B., Chen, L-S., Grzybek, M., Grinenko, T., Eugster, A., Troullinaki, M., Palladini, A., Kourtzelis, I., Chatzigeorgionu, A., Schlitzer, A., Beyer, M., Joosten, L.A.B., Isermann, B., Leshe, M., Petzold, A., Simons, K., Henry, I., Dahl, A., Schultze, J.I., Wielockx, B., Zamboni, N., Mirtschink, P., Coskun, U., Hajishengallis, G., Netea, N., Chavakis, T. (2018) Modulation of myelopoiesis progenitors is an integral component of trained immunity. *Cell*, **172**(1-2), 147-161. DOI: 10.1016/j.cell.2017.11.034
14. Shimina, G.G., Bateneva, A.V., Gamaley, S.G., Esina, T.I., Tereshhenko, T.G., Danilenko, E.D. (2020) Study on hemostimulating properties of granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*, **20**(4), 268 – 276.
15. Esina, T.I., Volosnikova, E.A., Shimina, G.G., Gamaley, S.G., Motovilova, N.G., Danilenko, E.D. (2023) Development of a dosage form of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and study of its biological properties. *Russian Journal of Biopharmaceuticals*, **15**(5), 17-23. DOI:10.30906/2073-8099-2023-15-5-27-33
16. Borgoyakova, M.B., Karpenko, L.I., Rudomyotov, A.P., Shan'shin, D.V., Isaeva, A.A., Nesmeyanova, V.S., Volkova, N.V., Belen'kaya, S.V., Murashkin, D.E., Shherbakov, D.N., Volosnikova, E.A., Starostina, E.V., Orlova, L.A., Danil'chenko, N.V., Zajkovskaya, A.V., P'yankov, O.V., Il'ichyov, A.A. (2021) Immunogenic Properties of the DNA Construct Encoding the Receptor-Binding Domain of the SARS-CoV-2 Spike Protein. *Mol. Biol. (Mosk)*, **55**(6), 987-998. DOI: 10.31857/S0026898421060045
17. Patchen, M.L., Liang, J., Vaudrain, T., Martin, T., Medican, D., Zhong, S., Stewart, M., Quesenberry, P.J. (1998) Mobilization of peripheral blood progenitor cells by Betafectin PGG-Glucan alone and in combination with granulocyte colony-stimulating factor. *Stem Cells*, **16**(3), 208-217. DOI: 10.1002/stem.160208
18. Harada, T., Kawaminami, H., Miura, N.N., Adachi, Y., Nakajima, M., Yadomae, T., Ohno, N. (2006) Mechanism of enhanced hematopoietic response by soluble beta-glucan SCG in cyclophosphamide-treated mice. *Microbiol. Immunol.*, **50**(9), 687-700. DOI: 10.1111/j.1348-0421.2006.tb03841.x
19. Jing, W., Roberts, J.W., Green, D.E., Almond, A., DeAngelis, P.L. (2017) Synthesis and characterization of heparosan-granulocyte-colony stimulating factor conjugates: a natural sugar-based drug delivery system to treat neutropenia. *Glycobiology*, **27**(11), 1052-1061. DOI: 10.1093/glycob/cwx072

Поступила: 10.07.2024
 После доработки: 18.08.2024
 Принята к публикации: 18.08.2024

OBTAINING AND PROPERTIES STUDY OF HUMAN GRANULOCYTE-MACROPHAGE COLONY-STIMULATING FACTOR IN A VEHICLE FOR DRUG DELIVERY

T.I. Esina, G.G. Shimina, E.A. Volosnikova, S.G. Gamaley, E.D. Danilenko*

Institute of Medical Biotechnology of the State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector",
 9 Khimzavodskaya str., Berdsk, Novosibirsk region, 633010 Russia; e-mail: *esina_ti@vector.nsc.ru

Granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) is a cytokine that stimulates the growth and development of granulocyte and macrophage progenitor cells. It also increases the activity of mature neutrophils, monocytes, and eosinophils. The preparations of recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (rhGM-CSF) are used to treat the diseases associated with myelosuppression, such as neutropenia of different etiologies, chronic infections, etc. One problem in the widespread use of GM-CSF is its instability in biological fluids, which leads to a short half-life and reduced biological activity. To solve this problem, a method has been developed to incorporate rhGM-CSF into a drug delivery vehicle based on polyglucin. It has been found that the conjugation of rhGM-CSF and polyglucin enhances the resistance of the protein against degradation by trypsin. The dosage form of rhGM-CSF incorporated into the drug delivery vehicle increased the number of segmented neutrophils in CBA mice with cyclophosphamide-induced myelosuppression to a similar extent as the initial rhGM-CSF preparation (300% and 350%, respectively, compared with the control level, 5 days after cyclophosphamide administration). Additionally, it contributed to a more rapid recovery of the total number of bone marrow karyocytes. Thus, a preparation containing a conjugate of rhGM-CSF and polyglucin exerts a more significant effect on activating bone marrow myelopoiesis than the unmodified protein.

Key words: recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor; drug delivery vehicle; polyglucin; hemostimulatory activity

FUNDING

The study was carried out as part of the State Assignment 39/21 of the State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector".

Received: 10.07.2024, revised: 18.08.2024, accepted: 18.08.2024