

С.Г. Гамалей, А.В. Батенева, З.Ф. Урманцева, Г.М. Сысоева, Я.В. Маркус, Е.Д. Даниленко,  
В.К. Михайлова, Е.А. Волосникова, Г.М. Левагина, В.И. Масычева

## ЛЕКАРСТВЕННАЯ ФОРМА ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛИ АЛЬФА ДЛЯ МЕСТНОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Институт медицинской биотехнологии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (Бердск)

Получен композиционный препарат фактора некроза опухолей альфа с реополиглюкином и полиэтиленгликолем (ФНО- $\alpha$ +ПГ+ПЭГ). Удельная активность образца составляла  $4,13 \times 10^7$  МЕ/мг. Цитолитическая активность препарата ФНО- $\alpha$ +ПГ+ПЭГ и рчФНО- $\alpha$  не изменялась в течение 4 месяцев при температуре хранения  $6^\circ\text{C}$ .

Композиционный препарат в отличие от ФНО- $\alpha$  при накожном применении у мышей обеспечивал умеренно выраженное и длительное повышение ФНО-альфа в крови. В экспериментах на лабораторных животных не обнаружено токсического, аллергенного и местно-раздражающего действия препарата ФНО- $\alpha$ +ПГ+ПЭГ.

**Ключевые слова:** фактор некроза опухоли альфа, ФНО- $\alpha$ , реополиглюкин, полиэтиленгликоль

## MEDICINAL FORM OF TNF- $\alpha$ FOR LOCAL ADMINISTRATION

S.G. Gamaley, A.V. Bateneva, Z.F. Urmantseva, G.M. Sisoyeva, Ya.V. Markus, E.D. Danilenko,  
V.K. Mikhaylova, E.A. Volosnikova, G.M. Levagina, V.I. Masicheva

Institute of Medical Biotechnology of State Scientific Center of virology and biotechnology "Vektor"  
(Berdsk)

Composite preparation of tumor necrosis factor alpha and rheopolyglukin and polyethylene glycol (TNF- $\alpha$ +PG+PEG) was obtained. The specific activity of the samples was  $4,13 \times 10^7$  IU/mg. The cytolytic activity of drugs TNF- $\alpha$ +PG+PEG and rhTNF- $\alpha$  did not change after 4 months when stored at  $6^\circ\text{C}$ . Preparation TNF- $\alpha$ +PG+PEG provided a moderately prolonged elevation of TNF-alpha in blood of laboratory mice in contrast to TNF- $\alpha$  when they applied to the skin. The composite preparation did not have toxic, allergic and locally irritating action in experiments on laboratory animals.

**Key words:** tumor necrosis factor alpha, TNF- $\alpha$ , rheopolyglukin, polyethylene glycol

По прогнозам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), в период с 1999 по 2020 г. распространенность онкологических заболеваний в мире возрастет в 2 раза (с 10 до 20 млн. новых случаев заболеваний и с 6 до 12 млн. регистрируемых смертей). Россия входит в первую десятку стран по заболеваемости. Среди онкологических болезней быстрыми темпами распространяется рак кожи. В 2009 г. в РФ диагноз «рак кожи» был впервые установлен у 68132 человек. Поэтому поиск эффективных способов лечения этих онкологических заболеваний остается актуальной задачей медицины. Особое значение необходимо уделять поиску лекарственных форм противоопухолевых препаратов для накожного применения (мази, гели).

В ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» разработан противоопухолевый препарат на основе фактора некроза опухолей человека альфа (Альнорин) для инъекционного применения. Показано, что включение Альнорина в схему лечения диссеминированной меланомы кожи повышает эффективность цитостатической терапии, оказывает иммуностимулирующее действие. Наряду с этим, препарат снижает резистентность меланомы к цитостатикам [2, 6]. Эти данные могут служить основанием для создания препаратов на основе ФНО- $\alpha$  для местного применения. В качестве компонентов новой лекарственной формы ФНО- $\alpha$  для местного применения могут быть использованы водорастворимые

неионогенные полимеры [3]. К ним относятся полиглюкин и полиэтиленгликоль, которые обладают хорошей растворяющей способностью, являются стабилизаторами для различных биологически активных веществ, обладают способностью к биодеструкции и практически безвредны.

Целью данной работы являлось получение и характеристика композиционного препарата ФНО- $\alpha$  с реополиглюкином и полиэтиленгликолем (ФНО- $\alpha$  + ПГ + ПЭГ).

### МЕТОДЫ

Получение и анализ ФНО- $\alpha$ +ПГ+ПЭГ

Рекомбинантный человеческий ФНО- $\alpha$  (рчФНО- $\alpha$ ) получали в соответствии с патентами РФ [см. 3, 4]. Для приготовления композиционного препарата к раствору рчФНО- $\alpha$  в калий-фосфатном буфере (рН 6,5-7,2) добавляли 10%-ный раствор реополиглюкина, доводили объем раствора апиrogenной водой. Стабилизированный раствор подвергали стерилизующей фильтрации, после чего добавляли стерильный ПЭГ (м.м. 400) до концентрации 20 %.

Содержание белка в композиционном препарате ФНО- $\alpha$  + ПГ + ПЭГ определяли методом Лоури [8], наличие нативного ФНО- $\alpha$  в препарате оценивали электрофорезом в 12% ПААГ в денатурирующих условиях, как описано в [7]. Цитолитическую активность препаратов оценивали в

тесте на культуре мышинных фибробластов L929 в присутствии актиномицина D.

Стабильность ФНО- $\alpha$  в составе композиции при хранении в различных температурных режимах (6 °С, 20 °С, 37 °С) в течение суток и при 6 °С в течение 4 месяцев. Сохранность структуры и активности препаратов оценивали методами, использованными для характеристики композиционного препарата.

*Исследование фармакокинетики препаратов ФНО альфа* проводили на 45 половозрелых белых беспородных мышцах ICR, самцах, массой 19–21 г, полученных из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Животные были разбиты на 3 экспериментальные группы по 15 голов в каждой.

Препараты ФНО- $\alpha$  и ФНО- $\alpha$  + ПГ + ПЭГ наносили на выстриженный участок кожи однократно в дозе  $5 \times 10^5$  МЕ на мышшь массой 20 г (доза, соответствующая максимально переносимой для внутрибрюшинного введения). Через 15 мин, 3 и 24 часа после нанесения препаратов оценивали уровень ФНО- $\alpha$  в образцах сыворотки крови иммуноферментным методом с использованием набора реагентов «альфа-ФНО – ИФА-БЕСТ», ЗАО «Вектор-БЕСТ» (г. Новосибирск).

*Исследование токсических, аллергенных свойств и местно-раздражающего действия* проводили в соответствии с методами, описанными в [5].

«Острую» токсичность композиционного препарата в сравнении с рчФНО- $\alpha$  изучали на 70 беспородных мышцах (самцах) с массой тела 20–22 г при двух способах введения: внутрибрюшинном и накожном. При оценке местно-раздражающего действия композиционного препарата забирали образцы кожи и регионарных лимфатических узлов мышшей в области накожного нанесения препарата. Изучение аллергизирующих свойств выполняли на 16 морских свинках обоего пола с массой тела 200–270 г и 32 белых беспородных мышцах ICR, самцах, с массой тела 25–28 г.

Все экспериментальные животные были получены из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Эксперименты проводили с соблюдением принципов гуманности в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 г. N 755).

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

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Изучение физико-химических свойств композиции ФНО- $\alpha$  + ПГ + ПЭГ методами электрофореза и спектрометрии показало наличие в образцах белка с молекулярной массой 16,7 кДа, соответствующей молекулярной массе ФНО- $\alpha$ . Удельная активность ФНО- $\alpha$  в композиционном препарате составляла  $4,13 \times 10^7$  МЕ/мг.

Оценка специфической активности образцов композиционного и монопрепарата ФНО- $\alpha$  при инкубации образцов при 6 °С, 20 °С и 37 °С в течение суток показала, что только при температуре 6 °С она сохранялась. При более высоких температурах (20 °С и 37 °С) наблюдалось резкое снижение активности ФНО- $\alpha$  как в составе композиций ФНО- $\alpha$  + ПГ + ПЭГ, так и препарата индивидуального рчФНО- $\alpha$ . В дальнейшем было показано сохранение специфической активности ФНО- $\alpha$  в комбинации с полимерами в течение 4 месяцев при хранении при 6 °С.

При определении уровня ФНО- $\alpha$  в сыворотке крови мышшей после нанесения препаратов на кожу продемонстрирована зависимость этого показателя от лекарственной формы ФНО альфа. Значения ФНО- $\alpha$ , обнаруженного в крови мышшей после накожного нанесения раствора препарата рчФНО- $\alpha$ , составляли всего лишь 2,3–2,5 % от дозы, которую использовали для аппликации, что может свидетельствовать о низкой способности белка к проникновению через неповрежденную кожу. В противоположность этому содержание ФНО- $\alpha$  в крови мышшей, которым на кожу наносили ФНО- $\alpha$  в композиции с ПГ и ПЭГ, через 15 мин после аппликации составляло 27 % от нанесенной дозы, через 5 часов – 19 % и лишь через сутки после воздействия снижалось до контрольного уровня (0,8 пкг/мл). Ранее было показано, что после внутривенного введения препарат рчФНО- $\alpha$  элиминировался из кровеносного русла мышшей через 4 часа [1].

Следовательно, введение рчФНО- $\alpha$  в состав композиционной формы приводило к повышению его способности преодолевать кожный барьер и проникать в кровь животных. Умеренно повышенный уровень ФНО- $\alpha$  (118–163 пкг/мл) сохранялся в крови в течение 5 часов наблюдения.

Проведенное токсикологическое исследование показало, что однократное внутрибрюшинное введение препарата ФНО- $\alpha$  в составе лекарственной формы с полимерами ПГ и ПЭГ и препарата сравнения в широком диапазоне доз не приводило к гибели лабораторных животных. Однократная аппликация композиционного препарата не оказывала влияния на интегральные физиологические, гематологические, биохимические показатели крови и морфологию внутренних органов мышшей. Эти данные свидетельствуют о том, что новая лекарственная форма ФНО- $\alpha$  при однократном применении в указанной дозе не проявляет токсических свойств.

Препарат ФНО- $\alpha$  + ПГ + ПЭГ не оказывал кожно-сенсibilизирующего воздействия в опытах на морских свинках и не индуцировал развития реакции гиперчувствительности замедленного типа у мышшей, что свидетельствует об отсутствии у препарата аллергизирующих свойств.

Светооптическое исследование гистологического материала (кожа в месте нанесения и регионарный лимфоузел), полученного через 1 сутки после однократного нанесения на кожу мышам препарата ФНО- $\alpha$  + ПГ + ПЭГ, также как препарата сравне-

ния, патологических изменений в исследованных органах экспериментальных животных не выявило.

Таким образом, композиционный препарат ФНО- $\alpha$  + ПГ + ПЭГ не обладает местно-раздражающим действием.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Установлено, что цитолитическая активность ФНО- $\alpha$  в композиционном препарате сохранялась в течение 4 месяцев при температуре 6 °С.

2. Композиционный препарат в отличие от ФНО- $\alpha$  при накожном применении обеспечивал умеренно выраженное и длительное повышение ФНО- $\alpha$  в крови лабораторных животных.

3. Не выявлено токсических, аллергенных и местно-раздражающих эффектов композиционного препарата ФНО- $\alpha$  + ПГ + ПЭГ у лабораторных животных.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Гамалей С.Г., Батенева А.В., Сысоева Г.М., Даниленко Е.Д. и др. Фармакокинетика и противоопухолевые свойства препарата, содержащего ФНО- $\alpha$  в составе наночастиц // Бюл. экспер. биол. — 2010. — Т. 149, № 3. — С. 296–299.

2. Гуторов С.Л., Абрамов М.Е., Черноглазова Е.В. Химиотерапия с предварительным введением Альнорина при диссеминированной меланоме кожи // Профилактика и лечение злокачественных новообразований в современных условиях. — Барнаул, 2007. — С. 102–103.

3. Патент РФ 2067866, МПК А61К35/26, опубл. 20.10.1996.

4. Патент РФ 2144958, МПК С12N 15/28, опубл. 27.01.2000.

5. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. — М., 2005. — 398 с.

6. Gutorov S.L., Slavina E.G., Chertkova A.I., Korotkova O.V. et al. Modulation of melanoma cell sensitivity to the cytotoxicity of antitumor drugs by TNF- $\alpha$  and IFN- $\alpha$  // European Cytokine Network. — 2006. — Suppl., Vol. 17. — P. 94.

7. Laemmli W.H. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacterial fage T 4 // Nature. — 1970. — Vol. 227. — P. 680–685.

8. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. — 1951. — Vol. 193, N 1. — P. 265–725.

#### Сведения об авторах

**Гамалей Светлана Георгиевна** – старший научный сотрудник отдела биологических исследований ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (633010, Новосибирской область, г. Бердск–10, а/я 112, ул. Химзаводская, 9. Факс (383–41) 5–80–88; тел. (383–41) 5–80–91; E-mail: gamalei58@mail.ru)

**Батенева Алена Владимировна** – научный сотрудник отдела биологических исследований ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»  
**Урманцева Зульфия Фаиковна** – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела биологических исследований ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»

**Сысоева Галина Михайловна** – старший научный сотрудник отдела биологических исследований ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»

**Маркус Яна Владимировна** – младший научный сотрудник отдела биологических исследований ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»

**Даниленко Елена Дмитриевна** – кандидат биологических наук, заместитель директора ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»  
**Михайлова Валентина Кузьминична** – научный сотрудник отдела разработки технологий и пилотного производства биопрепаратов ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»

**Волосникова Екатерина Александровна** – зав. лабораторией получения и анализа биосубстанций отдела разработки технологий и пилотного производства биопрепаратов ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»

**Левагина Галина Михайловна** – кандидат биологических наук, заведующий отделом разработки технологий и пилотного производства биопрепаратов ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»

**Масычева Валентина Ивановна** – доктор биологических наук, профессор, директор ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»