

На правах рукописи

**ГУБАЙДУЛЛИНА Альфия Азаматовна**

**ПОЛУЧЕНИЕ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ФОРМ  
ИНТЕРФЕРОНА, ОБЛАДАЮЩИХ ПРОЛОНГИРОВАННЫМ  
ДЕЙСТВИЕМ**

03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Работа выполнена в Учреждении Российской академии наук Институт биологии Уфимского Научного Центра РАН и Федеральном Государственном Унитарном предприятии Научно-Производственного Отделения «Микроген» филиала «Иммунопрепарат».

**Научный руководитель:** доктор биологических наук,  
профессор  
**Мелентьев Александр Иванович**

**Официальные оппоненты:** доктор биологических наук,  
профессор  
**Мавзютов Айрат Радикович**


доктор биологических наук  
**Габдрахманова Лейла Асхатовна**

**Ведущая организация:** ВНИТИ БП РАСХН, Московская  
область, г.Щелково

Защита состоится «24» декабря 2010 года в «14» часов на заседании Регионального Диссертационного совета ДМ 002.136.01 при Учреждении Российской академии наук Институте биологии Уфимского научного центра Российской академии наук по адресу: 450054, г.Уфа, пр.Октября, 69, к.217.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Уфимского научного центра Российской академии наук и на официальном сайте <http://www.anrb.ru/inbio/dissovet/index/htm>

Автореферат разослан «23» ноября 2010 г.

Ученый секретарь Объединенного диссертационного совета, к.б.н., доц.		Уразгильдин Р.В.
---	---	------------------

**Актуальность проблемы.** Известно, что интерфероны (ИФН) принадлежат к наиболее сильнодействующим биологическим агентам и обладают широким спектром фармакологической активности [Под ред. Р.Е. Спиера, 1989].

Наибольшее применение в практической медицине из всего семейства ИФН получил лейкоцитарный альфа-интерферон ( $\alpha$ -ИФН). Действие его неспецифично, так как он обладает различными функциями – стимулирует деятельность Т-клеток и макрофагов, влияет непосредственно на ДНК - и РНК-содержащие вирусы, подавляя их рост и активность, задерживает рост и разрушает злокачественные клетки. [Под ред. В. М. Покровского, 1997]. Кроме того препараты  $\alpha$ -ИФН используют в качестве иммуностимулятора совместно с основной терапией при заболеваниях, сопровождающихся значительным снижением иммунитета.

Однако фармакологическое действие в организме ИФН вообще и  $\alpha$ -ИФН в частности весьма ограничено и составляет порядка 8 часов [Ф.И. Ершов, 1996]. Вследствие чего для продолжения лечения необходимо получать новую дозу препарата, что весьма проблематично из-за высокой стоимости лекарственного средства, особенно это касается инъекционных препаратов [В.Ф. Попов, 2002].

Увеличение сроков фармакологического действия  $\alpha$ -ИФН в организме является актуальной задачей.

Медицинская биотехнология для создания современных лекарственных форм широко использует природные полимерные материалы, сочетающие высокую технологичность производства с безвредностью, а зачастую и лечебным действием [Park H.J., 2005]. Поиск таких биополимеров и изучение возможности их применения для приготовления лекарственных препаратов пролонгированного действия также является актуальной задачей.

Так в последнее время большое внимание уделяется разработке новых материалов из природного полисахарида хитозана, что обусловлено его низкой токсичностью, биосовместимостью и биоразрушаемостью [К.Д. Жоголев, 2001].

Одним из методов получения лекарственных форм на основе этих полимеров является микрокапсулирование — заключение лекарственного средства в полимерную оболочку. Микрокапсулирование представляет собой сложный физико-химический процесс, в результате которого должно быть обеспечено сохранение активности лекарственного средства, заданная скорость его выделения и определенный размер частиц [Hildebrand G.E. et al., 2000].

Решение этих задач возможно на основе комплексного изучения взаимосвязи состава и свойств композиций, используемых для микрокапсулирования, а также физико-химических и биологических свойств микрокапсулированных форм лекарственных средств.

Наибольшие сложности вызывает микрокапсулирование белков — водорастворимых полиэлектролитов, структура и биологические свойства

которых чувствительны к незначительным изменениям внешних условий (рН, температуры, присутствия растворителей и др.) [В.Д. Солодовник, 1980]. Изучение закономерностей процесса микрокапсулирования белков, ферментов и других полиэлектролитов в оболочки из биосовместимых и биodeградируемых полимеров позволит решить актуальную проблему получения эффективных лекарственных форм с регулируемыми медико-биологическими свойствами.

**Цель исследования.** Получение микрочастиц хитозана, обратимо связываемых с  $\alpha$ -ИФН с высокой сорбционной емкостью, и оценка динамики высвобождения интерферона из микрокапсул в модельном опыте на животных.

**Задачи исследования:**

1. Получить экспериментальные микрочастицы на основе хитозана определенной молекулярной массы и оценить их физические параметры.
2. Определить оптимальные условия получения стабильных микрочастиц для создания пролонгированной формы рекомбинантного  $\alpha$ -ИФН.
3. Определить сорбционную способность в отношении  $\alpha$ -ИФН экспериментальных образцов микрочастиц.
4. Исследовать способность микрочастиц хитозана, нагруженных белком, дозировать высвобождать интерферон *in vitro*.
5. Исследовать динамику высвобождения микрокапсулированного  $\alpha$ -ИФН в модельном опыте на животных.

**Научная новизна.**

Показана возможность получения микрочастиц из водорастворимого хитозана различной молекулярной массы (М.м.), пригодных для инкапсулирования  $\alpha$ -ИФН.

Установлена обратимость сорбции рекомбинантного  $\alpha$ -ИФН на водорастворимый хитозан и изучена динамика высвобождения  $\alpha$ -ИФН из микрочастиц в модельном опыте на животных.

Подобраны условия получения микрочастиц хитозана, обладающих высокой сорбционной емкостью и дозированной десорбцией в крови лабораторных животных. Показано, что микрочастицы хитозана с М.м 100 кДа, полученные методом осадительной коацервации могут сорбировать до 484,80 мг белка на 1 мл суспензии микрочастиц.

Обоснована возможность практического использования хитозана с М.м. 100 кДа для разработки новой лекарственной формы рекомбинантного  $\alpha$ -ИФН пролонгированного действия для внутримышечного введения.

**Практическая значимость.** Установлено, что для получения пролонгированного лекарственного препарата  $\alpha$ -ИФН можно использовать водорастворимый хитозан с М.м. 100 кДа. Обоснована возможность использования полученных микрочастиц хитозана для разработки микрокапсулированных форм других белковых препаратов пролонгированного действия. Разработаны биотехнологические основы

получения лекарственной формы рекомбинантного  $\alpha$ -ИФН пролонгированного действия для внутримышечного введения.

### **Апробация работы.**

Основные результаты исследований были представлены на ежегодной научно-практической конференции «Инновации РАН» (Казань, 2010), X-ой международной конференции «Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана» (Нижний-Новгород, 2010), международной научной конференции «Биотехнология начала III тысячелетия» (Саранск, 2010), XVII-ой международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2010» (Москва, 2010).

### **Публикации.**

По материалам диссертации опубликовано 6 работ, в том числе 2 статьи из списка ВАК.

### **Объем и структура диссертации.**

Диссертация изложена на 96 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы (часть 1), описания объектов, материалов и методов исследования (часть 2), обсуждения результатов (часть 3), выводов и списка цитируемой литературы. Литература включает 127 источников, в том числе 75 иностранных. Диссертация содержит 7 таблиц, 13 рисунков.

**Благодарности.** Автор выражает благодарность д.х.н., профессору В.П.Варламову и сотруднику Центра «Биоинженерия» РАН Ильиной А.В. за предоставленные образцы хитозана, а также за определение зета-потенциала и гидродинамического диаметра микрочастиц хитозана методом динамического светорассеяния на приборе Zetasizer-2 (“Malvern Instr.”, Великобритания).

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **1. Материалы и методы исследований**

Образцы хитозана, используемые для приготовления микрочастиц с М.м. 100 кДа, степенью дезацетилирования (СДА)  $85\pm 0,03\%$ , с М.м 42 кДа (СДА  $89\pm 0,03\%$ ), с М.м. 340 кДа (СДА  $85\pm 0,03\%$ ) и М.м 300 кДа со СДА  $96\pm 0,03\%$  были любезно предоставлены проф. Варламовым В.П. (Центр «Биоинженерия» РАН, Москва). Рекомбинантный интерферон альфа-2 (Реаферон ЕС), с активностью 1000000 МЕ (ЗАО «Вектор-Медика», Новосибирск) использовали в экспериментах без дополнительной очистки. Применяли набор реагентов для иммуноферментного определения концентрации альфа-интерферона в биологических жидкостях человека и культуральных средах (ЗАО «Вектор-Бест-Агидель», Уфа). Предел определения 0-1000 пг/мл.

**Получение микрочастиц** хитозана с различной молекулярной массой осуществляли двумя методами: методом осадительной коацервации,

при помощи  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  [Lubben I.M. et al., 2001] и методом ионного гелеобразования, при помощи гексаметафосфата натрия (ГМФ) [Gupta K.C. et al., 2006]. Микрочастицы хранили в виде 1%-ой суспензии при температуре  $+4$ - $+8^\circ\text{C}$ . Стерильные образцы микрочастиц хитозана получали с соблюдением правил асептики. Для этого использовали стерильные растворы хитозана, полученные фильтрованием растворов через мембрану  $0,2$  мкм (Millipore).

**Размер микрочастиц.** Препараты просматривали на микроскопе проходящего света Axio Imager.A1 (Carl Zeiss, Jena; страна производитель - Германия), снимки микрочастиц получали с помощью цифровой камеры Axio Cam MRc 5.

**Гидродинамический диаметр** микрочастиц хитозана с М.м. 340 кДа, полученных методом ионного гелеобразования, определяли методом динамического светорассеяния в течение 30 суток на приборе Zetasizer-2 ("Malvern Instr.", Великобритания). Измерения проводили в  $10$  мМ фосфатном буфере (pH 7.5), при длине волны  $532$  нм, при температуре  $25^\circ\text{C}$ .

**Определение зета-потенциала.** Электрофоретическую подвижность микрочастиц, полученных из образцов хитозана с М.м. 42 и 340 кДа, определяли методом динамического квазиупругого светорассеяния (рассеяние света на частицах в процессе броуновского движения) на основе оптической схемы коммерческого прибора Zetasizer-2 ("Malvern Instr.", Великобритания). Для регистрации света, рассеянного в суспензии микрочастиц, использовался коррелятор "PhotoCorpFP" (США). Последующая обработка данных, включая Фурье-анализ автокорреляционной функции, осуществляли в соответствии с алгоритмом, использованном в исходном коммерческом обеспечении к прибору. Для оценки  $\zeta$ -потенциала частиц использовали формулу Смолуховского  $+\zeta = \eta * \mu / \epsilon_0 * \epsilon_w$ , где  $\eta$  и  $\epsilon_w$  - соответственно вязкость и диэлектрическая проницаемость раствора,  $\epsilon_0$  - электрическая постоянная. Измерения осуществлялись в растворах  $10$  мМ KCl (pH 7.0) при  $22^\circ\text{C}$ .

**Определение токсичности** проводили на здоровых белых беспородных мышах массой  $20$ - $26$  г (самцы, достигшие половой зрелости), на которых ранее не проводили никаких испытаний. Внутривенно вводили по  $1$  мл  $1\%$  суспензии. Наблюдение вели в течение  $48$  часов.

**Исследование сорбции альфа-интерферона на микрочастицы.** Взаимодействие альфа-интерферона с микрочастицами исследовали в зависимости от концентрации белка, от времени сорбции.

**Десорбция интерферона.** Нагруженные белком микрочастицы с предыдущей стадии ресуспендировали в дистиллированной воде до  $1\%$ -ной концентрации. Далее инкубировали при  $37^\circ\text{C}$  на шейкере ( $170$  об/мин) в течение  $24$  ч. Первые образцы были отобраны сразу после ресуспендирования, а последующие отбирали через  $1$  ч,  $2$ ,  $4$ ,  $6$ ,  $8$  и  $24$  часа. Образцы суспензии центрифугировали  $30$  мин при  $1500$  об/мин. Количество

десорбированного белка в супернатанте определяли методом Бредфорда [Bradford M.M., 1976].

**Динамику высвобождения интерферона из микрокапсул** определяли на модельном опыте на кроликах породы Шиншилла массой (2,2±0,2) кг, после их недельной адаптации в условиях вивария [Государственная Фармакопея СССР, 1990]. Животные содержались на общевиварийном рационе. Иммунизацию кроликов проводили внутримышечным введением препарата в заднюю лапу. Все работы с животными проводили в соответствии с «Правилами использования лабораторных экспериментальных животных» (1984, приложение 4).

Испытание на пролонгированное действие препаратов альфа-интерферона основано на сопоставлении длительности эффекта испытуемого препарата и стандартного образца альфа-интерферона.

Животные, использованные в экспериментах, были разделены на 5 групп:

1-й группе вводили раствор рекомбинантного альфа-интерферона содержащего 800 мкг (контрольная группа);

2-й – микрокапсулированный альфа-интерферон (введение суспензии микрочастиц хитозана 100 кДа, полученной методом солевого высаживания, содержащей альфа-интерферон 800 мкг);

3-й – микрокапсулированный альфа-интерферон (введение суспензии микрочастиц хитозана 100 кДа, полученной методом ионотропного гелеобразования, содержащей альфа-интерферон 800 мкг);

4-й – микрокапсулированный альфа-интерферон (введение суспензии микрочастиц хитозана 300 кДа, полученной методом ионотропного гелеобразования, содержащей альфа-интерферон 800 мкг);

5-й – микрочастицы хитозана (введение суспензии в дозе 0,5 мл/кг массы кролика без загрузки белка).

Животных содержали в отдельных клетках. В начале опыта у кроликов определяли фоновое содержание альфа-интерферона в крови.

В ходе эксперимента проводился забор крови и выделение сыворотки для анализа альфа-интерферона. Содержание интерферона в сыворотках крови кроликов определяли иммуноферментным анализом, с помощью набора реагентов для иммуноферментного определения концентрации альфа-интерферона в биологических жидкостях человека и культуральных средах. Выделенные сыворотки крови кроликов до проведения анализа хранились при температуре -20°C.

#### **Математическая обработка результатов**

Результаты экспериментов обрабатывали с помощью программы STATGRAPHICS 2.1 для персональных компьютеров, позволяющей выводить на экран уравнение регрессии, степень достоверности модели и графические изображения поверхности отклика.

Математическую обработку результатов проводили с помощью программы Microsoft Excel путем расчета среднеквадратичного отклонения

( $\sigma$ ). Результаты считали достоверными при среднеквадратичном отклонении  $\sigma \leq 10\%$ . В качестве критерия достоверности получаемых разностей использовали критерий Стьюдента, принимая  $P \leq 0,05$  за достоверный уровень значимости.

## 2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 2.1 Получение микрочастиц хитозана методом солевого высаживания и ионотропного гелеобразования

С целью получения микрочастиц хитозана, отличающихся высокой сорбиционной емкостью к белкам, нами были испробованы два известных метода их образования — осадительной коацервации и ионного гелеобразования. Всего в работу было включено 6 образцов микрочастиц хитозана. Образцы микрочастиц хитозана А и В получены по методу коацервации на основе хитозана М.м. 100 кДа и М.м. 300 кДа соответственно. Образцы микрочастиц хитозана С, D, E, F получены методом ионного гелеобразования.

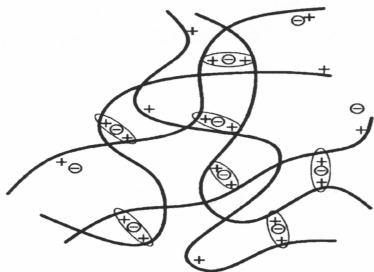


Рис. 1. Комплексообразование между противоположными ионами макромолекул хитозана и гексаметафосфата натрия

Для получения образцов С, Е использовался хитозан М.м. 100 кДа, а для образцов D, F был взят хитозан с М.м. 300 кДа. Образцы Е и F отличаются тем, что в процессе получения микрочастиц хитозана не использовали ПЭГ 6000, а добавляли его только после получения микрочастиц в качестве стабилизатора.

Во втором методе, благодаря комплексообразованию между противоположными ионами макромолекул (рис.1), хитозан подвергается ионному гелеобразованию, и происходит образование суспензии частиц [Agnihotri S.A. et al., 2004].

Эти соединения – полиэлектролитные комплексы, образующиеся при взаимодействии макромолекул противоположно заряженных полиэлектролитов, характеризуются высокой гидрофильностью, что позволяет их использовать и в медицине. Использование в качестве компонента полиэлектролитного комплекса хитозана, способного благодаря наличию ионогенных групп к образованию межмолекулярных ион-ионных и ион-дипольных связей, обеспечивает возможность улучшения физико-механических свойств получаемых микрочастиц.



## 2.2 Определение размера микрочастиц световым микроскопом

Все полученные образцы микрочастиц хитозана представляли собой суспензию, состоящую из гранул разного размера (1-2 мкм), агрегированных в более крупные частицы неправильной формы, размером 20 — 50 мкм (рис. 2-3). Вероятно, это обусловлено тем, что в процессе образования микрокапсул возникают ассоциаты между макромолекулами хитозана и образуется пространственная структура, определяемая наличием водородных связей и дисперсионного взаимодействия между макромолекулами. Этот процесс в итоге приводит к объединению микрочастиц, развитию пространственной сетки и структурированию. Видимо поэтому, мы не наблюдаем картину из отдельных микрочастиц, а визуально оцениваем ассоциированные участки микрочастиц хитозана.

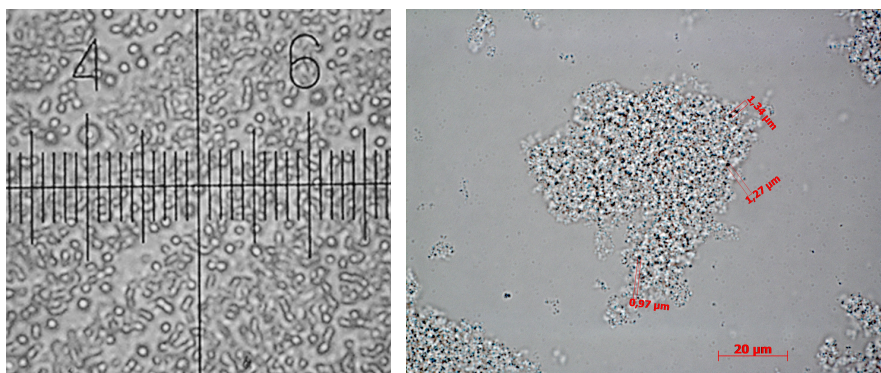


Рис. 2-3 Микрочастицы хитозана и их ассоциаты в водной суспензии

При оценке полученных снимков микрочастиц можно отметить, что в большинстве своем они близки к сферической форме, но также присутствовали частицы в виде вытянутых восьмерок, являющиеся вероятнее всего результатом агрегации двух сферических частиц (рис. 2-3)

Следует отметить, что М.м. 100-300 кДа используемых образцов хитозана и метод получения микрочастиц (коцервации или ионотропного гелеобразования) не оказывали существенного влияния на размер и форму полученных микрочастиц.

### Определение гидродинамического диаметра микрочастиц

Размер микрочастиц рассчитывался исходя из предположения о его сферической форме, а также по величине коэффициента диффузии в жидкости. Для нахождения коэффициента диффузии коллоидных частиц можно использовать метод динамического светорассеяния. В некоторых случаях точность метода позволяет определить появление молекулярных адсорбционных слоев на поверхности частиц по изменению их среднего гидродинамического радиуса.

На рис. 4 представлены распределения гидродинамического диаметра образцов микрочастиц, полученных из хитозана М.м. 340 кДа, СДА 85% методом ионотропного гелеобразования в динамике (в течение 30 суток).

Используемый в нашей работе прибор Zetasizer-2, определяющий гидродинамический диаметр методом динамического светорассеяния, дает возможность измерения в диапазоне от 10 нм до 10 мкм. Измерения проводили в 10 мМ фосфатном буфере (pH 7.5), при длине волны 532 нм, при 25° С.

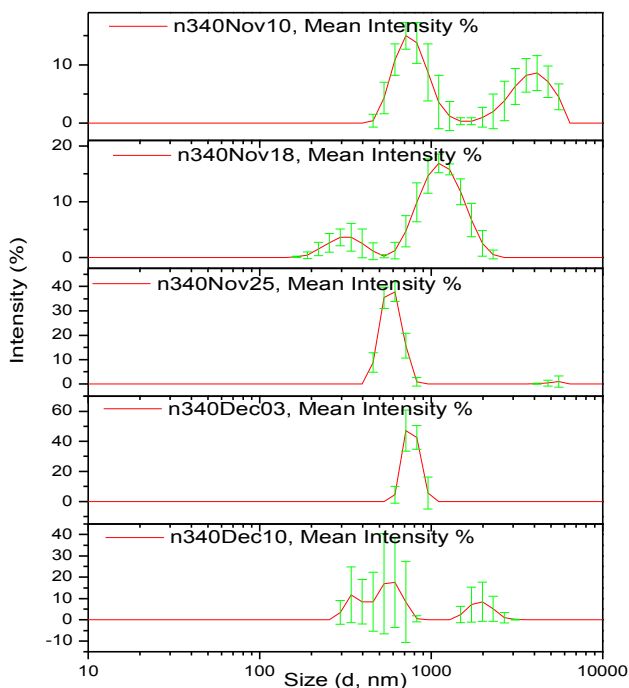


Рис.4. Гидродинамический диаметр микрочастиц (М.м. хитозана 340 кДа)

Анализируя данные по распределению частиц по размерам, можно сказать, что диаметр микрочастиц колеблется в пределах 600 – 1050 нм. Так как раствор содержит частицы разного размера, то гистограмма распределения частиц по размеру имеет вид волны, в некоторых случаях определяются две волнообразные колебания распределения размера микрочастиц.

Дополнительные пики, возникшие при первом и последнем измерениях, вероятнее всего являются результатом агрегирования двух микрочастиц. Об этом свидетельствует величина гидродинамического

диаметра, превышающая в два раза размеры микрочастиц, отображенных на первом пике, а также меньшая интенсивность дополнительных пиков.

В последующих определениях наблюдается однородное уширение спектра рассеяния, целиком определяемое полидисперсностью суспензии микрочастиц хитозана.

### 2.3 Определение зета потенциала

Зета потенциал микрочастиц, полученных из хитозана с М.м 42 и 340 кДа, был положительным и составил  $30,7$  и  $38,6 \pm 0,1$  мВ соответственно (рис. 5).

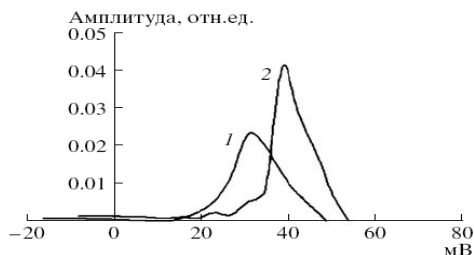


Рис. 5. Зета-потенциал микрочастиц хитозана М.м. 42 кДа (1) и 340 кДа (2)

Поверхностный заряд микрочастиц является критическим параметром стабильности суспензии, позволяющий определить силу взаимодействия между частицами. Благодаря одноименному заряду на поверхности, частицы отталкиваются друг от друга, что препятствует их агрегации. Зета потенциал возникает в результате накопления электрических зарядов на границе раздела твердой и жидкой фаз. В результате этого на фазовой границе образуется двойной электрический слой. На величину зета потенциала оказывают влияние свойства поверхности твердого вещества и окружающей его жидкости. Поэтому его значение является индикатором поверхностного заряда твердой фазы и характеристикой поверхности раздела фаз.

Известно, что зета потенциал микрочастиц может зависеть от М.м. хитозана [Ильина А.В. и др., 2008]. Чем больше М.м. хитозана, тем больше в молекуле полимера протонированных аминогрупп, доступных для комплексообразования, тем больше величина заряда на поверхности частиц.

Зета потенциал, т.е. заряд на поверхности частиц влияет на их распределение в теле и степень их поглощения внутрь клетки. Поскольку клеточная мембрана несет отрицательный заряд, то она обладает большой электростатической аффинностью к положительно заряженным микрочастицам.

### 2.4 Определение токсичности

Препарат считают выдержавшим испытание, если в течение предусмотренного срока наблюдения не погибнет ни одна из подопытных мышей [ГФ СССР. 11 изд., 1990]. В нашем случае определения токсичности суспензии микрочастиц хитозана, полученных методом коацервации либо

ионного гелеобразования, на здоровых белых беспородных мышах, которым внутривентриально вводили по 1 мл 1 % суспензии микрочастиц, гибели животных не наблюдалось. Наблюдение вели в течение 48 часов. Таким образом, растворы микрочастиц, полученные методами коацервации и ионотропного гелеобразования, не оказывают токсического влияния при введении 1%-ной суспензии количеством 1 мл.

## 2.5 Исследование сорбции белка на микрочастицы в зависимости от концентрации загружаемого белка

Сорбционная способность носителя в отношении действующего начала является важнейшим параметром при разработке инкапсулированных препаратов. Полагают, что за процесс ответственные ионные взаимодействия, водородные связи, вандерваальсовы силы и гидрофобно-гидрофильные взаимодействия. На рис. 6 представлены результаты измерения количества альфа-интерферона, сорбированного испытуемыми образцами за 4 часа экспозиции.

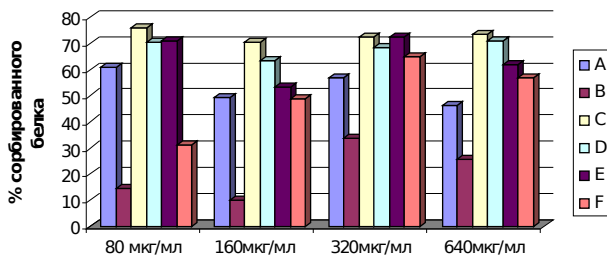


Рис. 6. Сорбция белка в зависимости от концентрации загружаемого белка

По полученным результатам можно судить о преимуществах методов получения микрочастиц хитозана. Так, образцы микрочастиц хитозана C, D, E, F, полученные методом ионного гелеобразования показали лучшую сорбционную активность по сравнению с образцами A и B, полученными методом солевого высаживания.

Анализ количества сорбированного белка показал, что образец C сорбирует от 2,2 до 6,9 раз больше белка, чем образец B.

Анализ эффективности сорбции и емкости микрочастиц показал, что эти параметры зависят от продолжительности взаимодействия с белком. Исследование динамики сорбции интерферона свидетельствовало, что увеличение интервала времени с 1 до 2 часов не приводило к ощутимому росту значений. Максимальные значения обоих параметров были получены через 4 часа.

При исследовании емкости микрочастиц было установлено, что процент включения альфа-интерферона статистически значимо нарастал с увеличением концентрации альфа-интерферона, используемого для сорбции белка. Это характерно для обоих методов получения микрочастиц, использованных нами. Молекулярная масса используемого хитозана также

оказывает влияние на сорбционную способность микрочастиц: образец А, полученный с использованием хитозана 100 кДа, сорбирует от 1,7 до 4,8 раз больше белка по сравнению с образцом В, полученным на основе хитозана 300 кДа. Подобная тенденция наблюдается при исследовании сорбционной способности образцов, полученных методом ионного гелеобразования. Т.е. чем больше молекулярная масса хитозана, тем больше протонированных аминогрупп в растворе хитозана. В соответствии с этим он содержит большое количество положительных зарядов, которые могут взаимодействовать с отрицательными зарядами гексаметафосфата, который является полианионом. Поэтому чем больше степень деацетилирования хитозана, тем больше образуется ионных связей и эффективность инкапсулирования становится выше. Целесообразно предположить, что хитозаны со средней или высокой степенью деацетилирования являются предпочтительными, потому что они лучше растворяются. Скорее всего, с хитозанами с высокой степенью деацетилирования легче достичь большей эффективности инкапсулирования. Наконец, образцы Е и F, при получении которых ПЭГ 6000 использовался после формирования микрочастиц, показали меньшую сорбционную емкость по сравнению с образцами С, D.

На основании полученных результатов для дальнейших исследований были отобраны образцы с наилучшей сорбционной способностью, т.е. образцы микрочастиц хитозана А, С, D.

Изучение продолжительности времени взаимодействия белка с микрочастицами хитозана показало незначительное влияние данного фактора на количество сорбируемого белка.

Основная часть загружаемого интерферона сорбируется уже в первые 4 часа, а в последующие часы от 4 до 24 часов сорбируется от 0 до 2,9% основного количества альфа-интерферона. Исключением, наверное, является образец С при загрузке белка с концентрацией 160 мкг/мл частиц, который в дальнейшем времени сорбирует до 12,8% белка.

Сорбционная способность анализируемых образцов С и D значительно выше образца А.

## **2.6 Десорбция интерферона с микрочастиц *in vitro***

В большинстве своем надмолекулярные образования, получаемые методом коацервации гидрофильных ионогенных полимеров, не имеют, очерченного стенками, внутреннего объема. Для них свойственна пористая структура, и нагружаемый белок распределяется по всему объему. Для обеспечения пролонгированного действия препаративной формы интерферонов определяющую роль играет динамика десорбции белка из носителя. При изучении десорбции белка во времени в течение 24 часов (рис. 7), было установлено, что основная часть десорбируемого белка высвобождается в первый же час инкубирования образцов при 37°C.

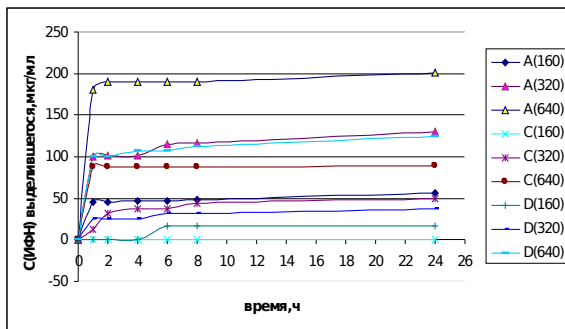


Рис. 7. Десорбция белка во времени (n=3)

Вероятнее всего это обусловлено высвобождением интерферона сорбированного на поверхности микрочастиц. После 1 часа десорбции количество десорбируемого интерферона значительно падает. Так, образцы С и D, показавшие хорошую сорбционную способность в предыдущем опыте, десорбируют от 0 до 21,87% сорбированного белка, по сравнению с образцом А, который десорбирует значительно больше – от 54,98% до 59,55% сорбированного белка. Увеличение времени десорбции до 24 часов не приводило к существенной реализации белка.

Таким образом, мы определили оптимальные параметры максимальной обратимой сорбции интерферона на микрочастицы хитозана. Мы полагаем, что целесообразно сорбировать альфа-интерферон на микрочастицы хитозана не более 4 часов. При меньшем времени сорбции рассчитанное количество интерферона будет сорбироваться не полностью, а увеличение времени сорбции незначительно повлияет на количество сорбированного белка.

### 2.7 Оценка динамики высвобождения интерферона с микрочастиц

Поскольку альфа-интерферон является биологически активной субстанцией, представляющей собой белок, это в свою очередь, означает, что данная группа препаратов имеет свои особенности не только фармакокинетики, но и фармакодинамики (короткий период полужизни, быстрая потеря биологической активности, высокая иммуногенность). Конечно, как следствие, определенный лимит своей клинической эффективности при практическом использовании.

Когда альфа-интерферон вводят внутримышечно, то он быстро всасывается тканями, окружающими место инъекций, и передается кровотоку, который его распространяет по всему телу. Таким образом, концентрация альфа-интерферона в крови непрерывно увеличивается до максимального значения, которое зависит от его химической структуры и растворимости, а затем постепенно снижается по мере его распространения по организму. Каждый фармацевтический препарат имеет свой терапевтический предел, выше которого происходят вторичные явления и

интоксикация, и ниже которого он оказывается неэффективным, т.е. дозирование всегда должно находиться между этими двумя пределами

Полученные данные по фармакодинамике и фармакокинетики альфа-интерферона для человека, мы не можем использовать в опытах с кроликами из-за разности скорости выведения препарата.

Поэтому для оценки динамики высвобождения интерферона с микрочастиц необходимо, сначала подобрать оптимальную концентрацию для иммунизации кроликов, которая бы регистрировалась используемыми методами определения концентрации альфа-интерферона и которая не являлась бы токсичной.

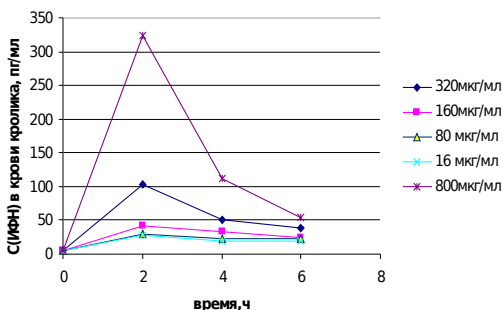


Рис. 8. Подбор оптимальной концентрации для иммунизации кроликов

Так, по полученным результатам, представленным на рис. 8 можно определить фармакокинетику альфа-интерферона у кролика. Максимальное содержание альфа-интерферона при внутримышечном введении наблюдается через 2 часа после введения препарата, хотя у человека он составляет 3,8 ч (данные инструкции по применению). Через 6 часов наблюдается снижение концентрации альфа-интерферона в крови кролика, которая уже не является лечебной. У человека к этому времени выводится лишь половина введенной дозы (период полувыведения альфа-интерферона для человека составляет 6-8 часов). Повышение дозы обеспечивало более высокие уровни содержания альфа-интерферона в крови кроликов. Так, например, увеличение дозы с 16 до 800 мкг/мл соответственно вызвало увеличение максимального уровня содержания альфа-интерферона в 11,9 раз. На основании полученных данных мы полагаем, что предпочтительной дозировкой для регистрации результатов колебания содержания альфа-интерферона является концентрация 800 мкг/мл, обеспечивающая максимальную концентрацию 323,28 пг/мл в крови кролика.

#### **Изучение изменения содержания альфа-интерферона в крови кроликов после воздействия микрокапсулированной формы.**

Для определения пролонгированного действия микрокапсулированного интерферона, в стерильных условиях были приготовлены образцы микрочастиц хитозана с М.м 100 кДа и 300 кДа методами осадительной коацервации и ионотропного гелеобразования. Были

приготовлены образцы А, С и D, которые показали лучшую емкость в предыдущих опытах. Загрузка белка также проводилась с соблюдением правил асептики. Контролем служит рекомбинантный – альфа-интерферон с концентрацией 800 мкг/мл. Т.к. в литературе имелись сообщения об иммуномодулирующих свойствах хитозана [Жоголев К.Д. и др., 1998; Давыдова В.Н. и др., 2008; Gorbach V.I., 1994], мы решили оценить способность микрочастиц хитозана ненагруженных белком вырабатывать альфа-интерферон. Для этого кроликов иммунизировали приготовленными суспензиями микрочастиц хитозана, без сорбции белка.

Динамика изменения содержания интерферона в сыворотке крови кроликов после воздействия его микрокапсулированной формой альфа-интерферона представлена на рисунке 9.

Внутримышечная инъекция интерферона вызвала повышение уровня сывороточного интерферона, концентрация которого через 2 часа после инъекции более чем в 10 раз превышала его фоновый уровень. Количество интерферона в крови в этот период не превышало 5% от общего количества введенного белка, на основании чего можно заключить, что его деградация и выведение осуществляется преимущественно в течение двух часов после введения.

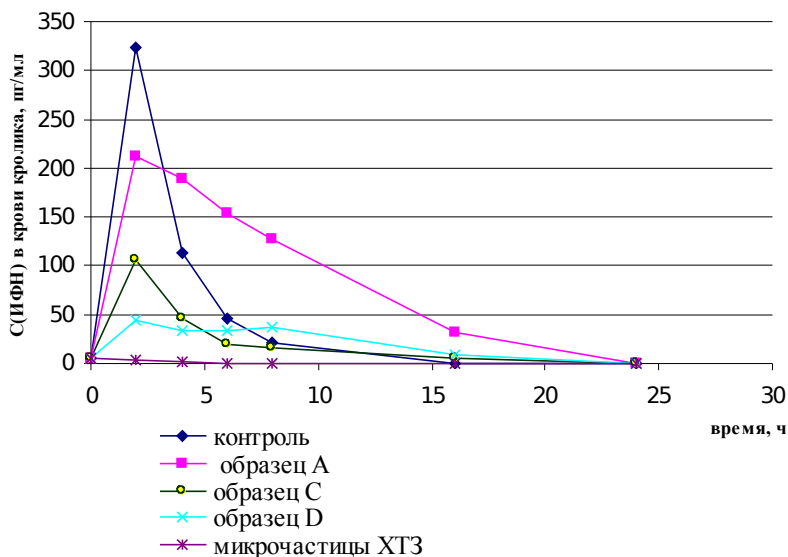


Рис. 9. Динамика высвобождения интерферона (n=3)

Судя по полученным данным (рис. 9), пролонгированное содержание альфа-интерферона в сыворотке крови кроликов обеспечивает образец А, полученный методом коацервации, по сравнению с образцами С и D.



Установлено, что через 2 часа после введения препарата наблюдается максимальная концентрация альфа-интерферона в сыворотке. В течение 4-х последующих часов количество интерферона снижалось экспоненциально, и к 24 часам его обнаружить не удалось. При инъекции Реафероном ЕС в концентрации 800 мкг/мл к 8 часам наблюдается почти полное выведение интерферона, а концентрация интерферона, обнаруживаемая в сыворотке крови кролика после иммунизации образцом А, все еще является лечебной. Хотя образцы С и D, полученные методом ионотропного гелеобразования показывали наилучшую сорбцию белка и наименьшую десорбцию *in vitro*, эффекта пролонгации они не оказывают, вероятнее всего из-за необратимого связывания микрочастиц с интерфероном, который привел к денатурации либо дезактивации.

Внутримышечное введение микрокапсулированного интерферона в виде образцов С и D также приводило к увеличению его содержания в сыворотке крови. Максимальный уровень показателя был отмечен в те же сроки, что и в случае образца А и контроля. Однако, несмотря на то, что препараты вводились в эквивалентных по содержанию белка дозах, значения показателя в этих группах составляло 30 и 53% от уровня, зарегистрированного в группе контроля. В отличие от некапсулированной формы альфа-интерферона, микрокапсулированный альфа-интерферон (образец А) менее интенсивно накапливался в крови и отличался более длительным периодом циркуляции в крови экспериментальных животных, вероятно за счет его медленного высвобождения из микрочастиц. Если свободный интерферон полностью элиминировался из кровеносного русла в течение 10 ч после введения, то уровень сывороточного интерферона после инъекции возвращался к фоновому к концу 20 часа наблюдения.

Полученные результаты показывают, что использование микрокапсулирования альфа-интерферона (образец А) удлинит период циркуляции в кровеносном русле примерно в 2 раза, по-видимому, благодаря защите белков от быстрого гидролиза протеазами. Содержание альфа-интерферона в сыворотке кроликов, получавших суспензию микрочастиц без альфа-интерферона («пустые»), соответствовало значениям фонового уровня. Это означает, что микрочастицы хитозана, полученные методом коацервации и ионотропного гелеобразования не стимулируют выработку альфа-интерферона.

Деградация микрокапсулированного альфа-интерферона может осуществляться с помощью естественных ферментативных систем организма, прежде всего печени, что подтверждают полученные нами данные о восстановлении фонового уровня интерферона через 20 часов после инъекции микрокапсулированной формы.

В месте введения препарата не было обнаружено визуальных признаков раздражения или уплотнений. Регионарные лимфатические узлы были обычного размера, цвета и консистенции.

В полученных нами микрочастицах хитозана, т.е. в системе с контролируемым высвобождением, альфа-интерферон рассеивается по полимерной матрице хитозана (монокристаллическая система) или существует в форме ядра, окруженного полимерным слоем хитозана. В обоих случаях лимитирующей стадией является скорость диффузии альфа-интерферона через матрицу хитозана [Хитин и хитозан: природа, получение и применение: Пер. с исп./ Под ред. M.Sc. Ana Pastor de Abram]. Проникновение альфа-интерферона может происходить за счет пористости вещества или посредством механизма распределения. В первом случае диффузия происходит через поры матрицы хитозана, а во втором – альфа-интерферон растворяется и распространяется по хитозану. В системах, где альфа-интерферон рассеян в полимерной матрице, он высвобождается по мере того, как окружающая его матрица подвергается биоразложению и растворению (рис. 10). В этом случае продукты разложения хитозана являются биосовместимыми и легко выводятся из организма.

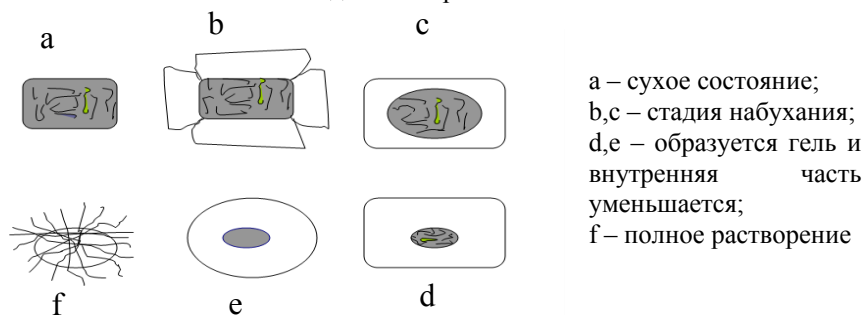


Рис. 10. Процесс набухания-дезинтеграции полимерной матрицы хитозана

Существование в организме ферментативных систем, обеспечивающих биodeградацию препарата, позволяют предположить, что внутримышечное введение микрокапсулированной формы альфа-интерферона не будет вызывать метаболических нарушений и токсических изменений структуры и функции основных систем организма.

При внутримышечном введении альфа-интерферона выявлено, что прежде чем появиться в системе кровообращения препарат должен пройти барьер, снижающий степень его всасывания. При этом не весь препарат, а лишь какая то его часть проникает в кровь и достаточно быстро распределяется в организме, превращаясь в объект распределения и элиминации.

Математическое моделирование позволяет оценить реальные колебания концентрации препарата при дозировании его неравными дозами через неравные промежутки времени, что очень важно для предотвращения дозозависимых побочных эффектов.

Критерием оценки степени влияния отдельных или суммы фармацевтических факторов на активность лекарственного средства является тестомологическая (физиологическая) доступность препаратов. Биологическая доступность фактически характеризует качество лекарства. Обычно степень всасывания лекарственного препарата (F) характеризует ту часть дозы, которая достигает кровотока. В мышечных тканях потери альфа-интерферона связаны с процессами высвобождения действующего вещества из микрокапсулированной лекарственной формы. Часть дозы, прошедшая сквозь мышечную ткань, печеночным кровотоком доставляется к печени, где также становится объектом метаболизма.

Биологическая доступность любого лекарственного препарата определяется скоростью и степенью его всасывания. Эффективность однократной дозы препарата является функцией его биологической доступности.

Для установления биологической фармакокинетической эквивалентности лекарственных препаратов является не только сравнение количества абсорбированного препарата, но и скорость всасывания этого препарата. Кроме того, быстрое всасывание может снизить частоту возникновения и степень тяжести побочных эффектов, связанных с пребыванием препарата в мышечной ткани.

Для расчета биологической доступности препарата и оценки степени его всасывания сравнивают площади под кривой «концентрация-время» после введения эквивалентных доз:

$$F = S_{\text{test}} / S_{\text{standard}}$$

Стандартной лекарственной формой является внутривенная инъекция как обеспечивающая немедленное и полное поступление лекарственного вещества в большой круг кровообращения. Таким путем определяется абсолютная биологическая доступность. Если в качестве стандарта и теста используют один и тот же препарат в разных лекарственных формах, например, для внутримышечного введения, тогда речь идет об оценке относительной биологической доступности (относительно стандарта). Более распространено и, возможно, более целесообразно определение относительной биологической доступности. Для этой цели стандартными лекарственными формами служат раствор или другая лекарственная форма для приема внутрь, которая хорошо охарактеризована и хорошо всасывается. В нашем случае в качестве стандарта будем использовать контроль.

Для наших исследований считаем достаточным и целесообразным определение площади под кривой «концентрация-время» методом трапеций, например по общеизвестным формулам – через полусумму оснований и высоту:

$$S = (a+b)h/2$$

Судя по полученным данным, представленным в таблице, можно сказать, что относительная биологическая доступность микрокапсулированной формы альфа-интерферона в виде образцов С и D

намного ниже, чем у некапсулированной формы. В то же время, у образца А относительная биологическая доступность препарата выше чем у контрольной группы, вероятнее всего из-за предохранения альфа-интерферона оболочкой хитозана. В этом случае можно предположить, что образование полиэлектролитных комплексов в результате ионного гелеобразования не обеспечивают необходимую защиту от протеолитических ферментов. Коацерваты хитозана являются более оптимальными для сохранения активности альфа-интерферона.

Таблица. Относительная биологическая доступность микрокапсулированных форм альфа-интерферона

Образец	Площадь <sub>(0-24)</sub>	Относительная биологическая доступность, %
Контроль	11,27±0,23	-
А	18,30±0,09	>100,00
С	4,48±0,12	39,75±2,45
Д	5,53±0,21	49,07±4,10

Под всасыванием или абсорбцией понимают восприятие альфа-интерферона кровью или лимфой от пограничных поверхностей тела после его высвобождения из микрокапсул. Таким образом, для осуществления процесса всасывания вещества, если оно вводится не внутрисосудисто, необходимы два условия:

- 1) действующий ингредиент лекарства (альфа-интерферон) должен высвобождаться из микрокапсулированной формы,
- 2) высвобожденный альфа-интерферон должен достигнуть поверхности всасывания (диффузия к месту абсорбции).

Дальнейший транспорт альфа-интерферона осуществляется пассивным (диффузия и конвекция) и активным путем (функция тканей и клеток организма). Если кинетика высвобождения действующего вещества из микрокапсулированной лекарственной формы в полной мере зависит от избранного комплекса фармацевтических факторов, то дальнейший транспорт его зависит от вида, строения, физиологического состояния слизистых оболочек, кожных покровов, мышечной ткани и т. д.

Если  $D$  - введенная доза альфа-интерферона,  $F$  - биологическая доступность,  $C(t)$  – концентрация препарата в крови,  $CL$  – объем крови, очищающийся от препарата за единицу времени, то  $CL \cdot C(t)dt$  – количество альфа-интерферона, введенного за интервал времени от  $t$  до  $t+dt$ . Предположив, что альфа-интерферон, присутствующий в крови будет

выведен полностью с течением времени, можно записать следующее выражение:

$$F \cdot D = \int CL \cdot C(t) dt$$

Последнюю формулу часто называют принципом Стьюарта-Гамильтона. Если клиренс (CL) – величина постоянная, не зависящая от времени, то приходим к следующему соотношению:

$$S/D = F/CL$$

В этом случае следующее базовое уравнение фармакокинетики позволяет связать основные фармакокинетические параметры:

$$S = D \cdot F / CL = D \cdot F / k_{el} \cdot V$$

Это значит, что площадь (S) под кривой «концентрация-время» пропорциональна дозе альфа-интерферона, попавшей в кровоток ( $D \cdot F$ ), и обратно пропорциональна общему клиренсу препарата (CL) или произведению кажущегося объема распределения (V) и константе скорости элиминации ( $k_{el}$ ).

По вопросу выбора адекватного показателя для оценки и сравнения скорости всасывания препарата среди исследователей до сих пор нет единодушия. Скорость всасывания оценивается по значениям таких параметров, как  $C_{max}$ ,  $T_{max}$ ,  $C_{max}/S$ . Оценивая максимальные концентрации  $C_{max}$  и время достижения максимальной концентрации  $T_{max}$  можно сказать, что скорость всасывания альфа-интерферона меньше у микрокапсулированной формы, что является достоинством систем с пролонгированным действием.

В проведенных нами экспериментах обнаружено пролонгированное действие микрокапсулированного интерферона, полученного методом коацервации (образец А). Кроме того, полученные нами данные свидетельствуют о том, что наиболее пригодным для работы с рефероном является метод коацервации. Он достаточно прост, мягок и позволяет заключить внутри микрочастиц до  $32,95 \pm 1,86$  мкг белка на мг микрочастиц.

### Выводы

1. Оценены методы осадительной коацервации и ионотропного гелеобразования для получения микрокапсулированного альфа-интерферона. Установлено, что метод осадительной коацервации является перспективным для создания систем пролонгированного действия. Способ отличается простотой методики аппаратного оформления, проведением процесса в мягких условиях при комнатной температуре.
2. Показана принципиальная возможность использования в качестве исходного материала биосовместимого, биоадгезивного, биodeградируемого хитозана для микрокапсулирования альфа-интерферона, а также других белковых препаратов.
3. Установлено, что полученные нами образцы хитозана позволяют обратимо сорбировать до  $484,80$  мкг белка на 1 мл суспензии микрочастиц.

4. Исследована динамика высвобождения альфа-интерферона из микрокапсул в модельном опыте на кроликах. Выявлено, что микрокапсулированная форма альфа-интерферона, полученная из хитозана с М.м. 100 кДа методом коацервации, обладает пролонгированным действием. Наблюдается увеличение времени циркуляции в крови препарата в два раза.
5. На основании исследований физико-химических свойств и биологической активности показано, что микрочастицы хитозана с М.м. 100 кДа, полученные методом солевого высаживания являются оптимальными для создания пролонгированной формы альфа-интерферона и, вероятнее всего, для многих других белковых препаратов.

#### Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Ильина А.В., **Губайдуллина А.А.**, Мелентьев А.И., Варламов В.П. Получение микрочастиц на основе хитозана и исследование их взаимодействия с интерфероном // Прикладная биохимия и микробиология. – 2008. – Т.44. - №2. – С.250-254.
2. **Губайдуллина А.А.**, Бобкова Е.В., Мелентьев А.И. Метод ускоренного старения для прогнозирования срока годности стабилизированной формы альфа-интерферона // Труды БГУ 2009, Т.4, ч. 2, С.82-87.
3. **Губайдуллина А.А.** Микроинкапсулирование альфа-интерферона на водорастворимом хитозане // Сборник матер. Междунар. научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2010» - Москва, 12-15 апреля, 2010. – Москва, 2010. С.19-20.
4. **Губайдуллина А.А.** Хитозановые микрочастицы для получения пролонгированной формы альфа-интерферона // Сборник матер. Междунар. научной конференции «Биотехнология начала III тысячелетия» - Саранск, 26-28 мая, 2010. – Саранск, 2010. С. 113.
5. **Губайдуллина А.А.**, Смагина Г.И., Мелентьев А.И., Алсынбаев М.М., Варламов В.П. Получение пролонгированной формы альфа-интерферона на основе хитозана // Материалы ежегодной научно-практической конференции «Инновации РАН», - Казань, 1-3 июня, 2010. Казань-Слово. С.209-212.
6. **Губайдуллина А.А.**, Смагина Г.И., Мелентьев А.И., Алсынбаев М.М. Микрочастицы хитозана для получения пролонгированной формы альфа-интерферона // Биотехнология – 2010. - №5. – С. 37-45.