

УДК 001.891.53:577.112.85



ГЕМОСТИМУЛИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА КОНЪЮГАТОВ ГРАНУЛОЦИТАРНО-МАКРОФАГАЛЬНОГО КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА С АЛЕНДРОНОВОЙ КИСЛОТОЙ

Г.Г. Шими́на, А.В. Батенева, Е.С. Цыпленкова, С.Г. Гамалей,
Т.И. Есина, Е.А. Волосникова, Е.Д. Даниленко

Институт медицинской биотехнологии федерального бюджетного учреждения науки
«Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека,
633004, Россия, г. Бердск, ул. Химзаводская, д. 9

E-mail: shimina_gg@vector.nsc.ru

Получена 04.08.2022

После рецензирования 20.10.2022

Принята к печати 30.10.2022

Цель. Оценка гемостимулирующей активности конъюгатов рекомбинантного гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека (рчГМ-КСФ) с алендроновой кислотой (АЛН) на модели цитостатической миелосупрессии и динамики накопления рчГМ-КСФ в составе конъюгата в костной ткани и костном мозге мышей.

Материалы и методы. В работе использовали конъюгаты, полученные методом твердофазного синтеза с помощью 1-этил-3-[3-диметиламинопропил]карбодиимида или реакции периодатного окисления. Гемостимулирующую активность оценивали на модели цитостатической миелосупрессии, вызванной введением мышам СВА/Calас циклофосфана. Препараты рчГМ-КСФ вводили подкожно в течение 4–5 дней в дозе 90 мкг/кг. По окончании курса инъекций в образцах крови подсчитывали общее количество лейкоцитов, сегментоядерных нейтрофилов, в образцах костного мозга – общее число кариоцитов. Оценку распределения препаратов рчГМ-КСФ по тканям проводили на аутбредных мышах CD-1 после однократного внутривенного введения в эффективной дозе. Содержание рчГМ-КСФ в крови, ткани бедренной кости и костном мозге определяли иммуноферментным методом.

Результаты. Показано, что конъюгаты рчГМ-КСФ с АЛН сохраняли присущую исходному белку способность повышать число лейкоцитов, сегментоядерных нейтрофилов крови и кариоцитов костного мозга. Стимуляция продукции нейтрофилов под действием конъюгатов наблюдалась в более ранние сроки, чем в случае рчГМ-КСФ. Увеличение общего числа клеток костного мозга после введения всех трех конъюгатов было более выраженным по сравнению с исходным белком (на 34%). Повышенный гемостимулирующий эффект конъюгата АЕГ сопровождался более интенсивным накоплением рчГМ-КСФ в костной ткани и костном мозге мышей. Введенный в состав конъюгата рчГМ-КСФ обнаруживался в костной ткани в течение 24 ч и более длительно циркулировал в кровеносном русле по сравнению с исходным белком.

Заключение. Полученные данные позволяют сделать вывод о перспективности дальнейших работ по созданию эффективных гемостимулирующих препаратов на основе конъюгатов рчГМ-КСФ с АЛН.

Ключевые слова: рекомбинантный гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор человека; алендроновая кислота; конъюгат; гемостимулирующая активность; накопление в костной ткани и костном мозге

Список сокращений: АЛН – алендроновая кислота; ГМ-КСФ – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор; рчГМ-КСФ – рекомбинантный гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор человека; ГАП – гидроксилпатит; EDC – 1-этил-3-[3-диметиламинопропил] карбодиимид; ЦФ – циклофосфан; ИФА – иммуноферментный анализ; ОКК – общее количество кариоцитов.

Для цитирования: Г.Г. Шими́на, А.В. Батенева, Е.С. Цыпленкова, С.Г. Гамалей, Т.И. Есина, Е.А. Волосникова, Е.Д. Даниленко. Гемостимулирующие свойства конъюгатов гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора с алендроновой кислотой. *Фармация и фармакология*. 2022;10(5):472-482. DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-5-472-482

© Г.Г. Шими́на, А.В. Батенева, Е.С. Цыпленкова, С.Г. Гамалей, Т.И. Есина, Е.А. Волосникова, Е.Д. Даниленко, 2022

For citation: G.G. Shimina, A.V. Bateneva, E.S. Tsyplenkova, S.G. Gamaley, T.I. Esina, E.A. Volosnikova, E.D. Danilenko. Hemostimulating properties of the conjugates of granulocyte-macrophage colony stimulating factor with alendronic acid. *Pharmacy & Pharmacology*. 2022;10(5): 472-482. DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-5-472-482

HEMOSTIMULATING PROPERTIES OF THE CONJUGATES OF GRANULOCYTE-MACROPHAGE COLONY STIMULATING FACTOR WITH ALENDRONIC ACID

G.G. Shimina, A.V. Bateneva, E.S. Tsyplenkova, S.G. Gamaley,
T.I. Esina, E.A. Volosnikova, E.D. Danilenko

Institute of Medical Biotechnology of State Research Center of Virology and Biotechnology "VECTOR",
Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Well-being,
9, Khimzavodskaya St., Berdsk, Russia, 633004

E-mail: shimina_gg@vector.nsc.ru

Received 04 Aug 2022

After peer review 20 Oct 2022

Accepted 30 Oct 2022

The aim of the work is to evaluate the hemostimulating activity of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rhGM-CSF) conjugates with alendronic acid (ALN) in the model of cytostatic myelosuppression and the dynamics of rhGM-CSF accumulation as a part of the conjugate in the bone tissue and bone marrow of mice.

Materials and methods. The conjugates obtained by a solid-phase synthesis using 1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] carbodiimide or periodate oxidation, were used. A hemostimulating activity was evaluated in a model of a cytostatic myelosuppression induced by the administration of cyclophosphamide to CBA/Calac mice. RhGM-CSF preparations were injected subcutaneously for 4-5 days at the dose of 90 µg/kg. After the injections cycle had been completed, the total leukocyte and segmented neutrophil counts were carried out in the blood samples, and the total karyocyte count was carried out in the bone marrow samples.

The tissue distribution of rhGM-CSF preparations was assessed in outbred CD-1 mice after a single intravenous administration at the effective dose. The content of rhGM-CSF in blood, femoral tissue and bone marrow was determined by enzyme immunoassay.

Results. RhGM-CSF conjugates with ALN have been shown to retain the ability of the original protein to increase the number of leukocytes, segmented blood neutrophils, and bone marrow karyocytes under the action of conjugates. The stimulation of the neutrophil production used to be observed at earlier times than in the case of rhGM-CSF. The increase in the total number of bone marrow cells after the introduction of all three conjugates was more pronounced compared to the original protein (by 34%). The increased hemostimulatory effect of the AEG conjugate was accompanied by a more intense accumulation of rhGM-CSF in the bone tissue and bone marrow of mice. The rhGM-CSF introduced into the conjugate was detected in the bone tissue for 24 h and it circulated in the bloodstream for a longer time compared to the original protein.

Conclusion. The data obtained make it possible to conclude that further work on the development of effective hemostimulating drugs based on rhGM-CSF conjugates with ALN, is promising.

Keywords: recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; alendronic acid; conjugate; hemostimulating activity; accumulation in bone tissue and bone marrow.

Abbreviations: ALN – alendronic acid; GM-CSF – granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; rhGM-CSF – recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; HAP – hydroxylapatite; EDC – 1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] carbodiimide; CP – cyclophosphan; ELISA – electronic intelligence search and analysis; TKC – total karyocyte count.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность поиска новых средств и способов лечения нейтропений различной этиологии, возникающих, в частности, в результате химио- и радиотерапии онкологических больных, чрезвычайно высока. Индуцированные химиотерапией нарушения гемопоэза и прежде всего, подавление продукции лейкоцитов, в ряде случаев становятся основными показателями для прерывания лечения, несмотря на отчетливый онколитический эффект терапии [1].

Природный белок-цитокин – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ), который регулирует пролиферацию и дифференцировку стволовых клеток с образованием колоний нейтрофильных, эозинофильных лейкоцитов и макрофагов [2–4]. Способность ГМ-

КСФ усиливать гемопоэз послужила основанием для разработки и введения в клиническую практику лекарственных препаратов на его основе, Leukine и Leucotax (США), для снижения побочных эффектов противоопухолевой терапии, усиления устойчивости к инфекциям, при трансплантации костного мозга. Однако, несмотря на высокий уровень безопасности препаратов ГМ-КСФ, их применение приводит к развитию побочных реакций, таких как лихорадка, озноб, летаргия, миалгия, костные боли, повышение температуры, колебания массы тела, генерализованный кожный зуд, покраснение и эритематозная реакция вокруг места подкожной инъекции [5–8]. В связи с этим, несомненный интерес представляет усовершенствование препаратов ГМ-КСФ в части повышения их тропности к тканям-

мишеням, снижения терапевтической дозы и, как следствие, побочных эффектов лечения.

В литературных источниках описаны примеры использования различных векторных молекул для адресной доставки иммунорегуляторных лигандов, в частности, цитокинов [9–11]. В качестве средств доставки биологически активных веществ в костную ткань и костный мозг используют бисфосфонаты, отличающиеся высоким сродством к ионам кальция и способностью к быстрому накоплению в кости [12–17]. Одним из методических приемов при получении таргетных лекарственных средств на основе бисфосфонатов является их конъюгирование с лекарственными веществами [12, 13].

Принимая во внимание все вышесказанное, нами были получены конъюгаты человеческого фактора некроза опухоли альфа с аминобисфосфонатом алендроновой кислотой (АЛН), которые продемонстрировали способность накапливаться в очагах костного метастазирования опухоли, проявляя тем самым противоопухолевую активность [18, 19]. Эти данные стали основанием для использования АЛН в качестве векторной молекулы для доставки к клеткам костного мозга рекомбинантного гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека (рчГМ-КСФ).

В ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора разработана технология получения рчГМ-КСФ в прокариотической системе экспрессии (рекомбинантный штамм *E. coli* SG20050/p280_2GM) [20], а также способы конъюгирования рчГМ-КСФ с АЛН с использованием разных типов сшивающих агентов [21]. Показано, что полученные конъюгаты обладают повышенным, по сравнению с рчГМ-КСФ, сродством к гидроксипатиту – аналогу минерального матрикса костной ткани. Оценка специфической активности конъюгатов *in vitro* подтвердила сохранность биологической активности рчГМ-КСФ в их составе [21].

ЦЕЛЬ. Оценка гемостимулирующей активности конъюгатов рчГМ-КСФ с алендроновой кислотой на модели цитостатической миелосупрессии, а также изучение динамики накопления рчГМ-КСФ в составе конъюгата в костной ткани и костном мозге мышей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследуемые препараты

Экспериментальные препараты представляли собой конъюгаты рчГМ-КСФ с АЛН, полученные описанными способами [21]. Ключевым моментом в процессе синтеза был выбор условий, позволяющих минимизировать конформационные изменения молекул белка с целью сохранения его биологической активности. Для этого использовались эквимольные количества белка рчГМ-КСФ и

АЛН. В качестве сшивающего агента был выбран 1-этил-3-[3-диметиламинопропил]карбодиимид (EDC); декстран с молекулярной массой 40000 Да, активированный периодатом, применяли в качестве линкера. Конъюгацию с помощью EDC осуществляли двумя способами: методом прямой (рчГМ-КСФ → EDC → АЛН) и обратной (АЛН → EDC → рчГМ-КСФ) последовательности нанесения компонентов на твердую фазу (сорбент гидроксипатит, ГАП). При конъюгировании методом прямой последовательности хроматографическую колонку с ГАП уравнивали 2 мМ калий-фосфатным буфером, pH 7,0. На уравновешенную колонку наносили раствор белка рчГМ-КСФ, после сорбции которого также на колонку подавали раствор EDC. Выход раствора из колонки перекрывали на 2 ч для связывания компонентов, затем колонку промывали 2 мМ калий-фосфатным буфером (pH 7,0) и наносили раствор АЛН. Для освобождения от несвязавшихся компонентов колонку повторно промывали фосфатным буфером. Элюцию полученного конъюгата с колонки проводили 0,2 М калий-фосфатным буфером, pH 7,0. Синтезированный конъюгат переводили в физиологический раствор диализом.

При использовании декстрана в качестве линкера при конъюгировании его вносили в раствор, содержащий периодат натрия, с целью образования реакционноспособных альдегидных групп в соотношении 1:40 (моль/моль), перемешивали и инкубировали при 20°C в течение часа. Активированный декстран отделяли гелефильтрацией на колонке с сефадексом G-25. В раствор декстрана вносили растворы белка и АЛН в эквимольных соотношениях: на 1 моль декстрана 1 моль белка и 1 моль АЛН. Полученную смесь инкубировали 3 ч при 20°C. Для удаления непрореагировавших компонентов проводили гелефильтрацию на колонке с сефадексом G-25. Синтезированный конъюгат переводили в физиологический раствор диализом.

Были получены конъюгаты трех типов:

1 – GEA – конъюгат рчГМ-КСФ с АЛН, полученный с помощью синтеза на твердой фазе через карбоксильную группу белка с использованием EDC методом прямой (белок → EDC → АЛН) последовательности нанесения компонентов на сорбент, с концентрацией белка 1,09 мг/мл (рис. 1, дорожка 1);

2 – AEG – конъюгат рчГМ-КСФ с АЛН, полученный с помощью синтеза на твердой фазе через карбоксильную группу белка с использованием EDC методом обратной (АЛН → EDC → белок) последовательности нанесения компонентов на сорбент, с концентрацией белка 1,45 мг/мл (рис. 1, дорожка 2);

3 – DGA – конъюгат рчГМ-КСФ с АЛН, полученный

синтезом через аминокислотную группу белка с использованием в качестве линкера молекулы декстрана с помощью реакции Малапрада [22], с концентрацией белка 0,86 мг/мл (рис. 2, дорожка 1).

Препарат сравнения

Белок рГМ-КСФ, полученный в ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора по описанному методу [23], использовали в качестве препарата сравнения и для получения конъюгатов с АЛН. Субстанция белка была охарактеризована по показателям качества в соответствии с требованиями нормативной документации¹. Концентрация белка в используемой субстанции составляла 1,5 мг/мл, гомогенность препарата 99,2%.

Экспериментальные животные

Исследование проведено на 66 здоровых самцах мышей линии CBA/Calas с массой тела 19–23 г, полученных из питомника НИИФирм им. Е.Д. Гольдберга Томского НИМЦ, и 45 самках белых беспородных мышей CD-1 (ICR) массой 22–25 г из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (р.п. Кольцово, Новосибирской обл.). Возраст животных составлял 2,0–2,5 месяца. Перед началом исследования животные прошли период адаптационного карантина. Мыши содержались в стандартных условиях вивария при постоянной температуре и влажности, корм и питье были доступны в любое время суток. Содержание животных и экспериментальные исследования проводили в соответствии с требованиями Международной конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и научных целей (Страсбург, 1986 год), а также с соблюдением директивы 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях. Исследования были одобрены Биоэтической комиссией ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (протокол № 5 от 01.10.2020 г.).

Метод оценки гемостимулирующей активности конъюгатов

Гемостимулирующую активность препаратов исследовали на модели цитостатической миелосупрессии, вызванной введением мышам CBA/Calas циклофосфана (ЦФ, «Sigma-Aldrich», США) [24].

Животные были разделены на 5 экспериментальных групп (4 опытные и 1 контрольная) по 12 самцов мышей в каждой. Всем экспериментальным животным однократно внутрибрюшинно вводили раствор ЦФ в максимально

переносимой дозе (250 мг/кг) в объеме 0,25 мл на 20 г массы тела.

Через 24 ч после инъекции ЦФ мышам опытных групп в течение 4–5 сут вводили подкожно один из следующих препаратов: 1) рГМ-КСФ; 2) конъюгат GEA; 3) конъюгат AEG; 4) конъюгат DGA. Доза введения, определенная ранее как эффективная гемостимулирующая с использованием препарата рГМ-КСФ [25], составляла 90 мкг/кг, объем введения 0,2 мл на 20 г массы тела животного. Мыши контрольной группы получали подкожно физиологический раствор в эквивалентном объеме по аналогичной схеме. В качестве дополнительной контрольной группы использовали шесть интактных животных (без введения препаратов рГМ-КСФ и ЦФ). Все манипуляции с животными проводились в одно и то же время (в утренние часы).

Через сутки после окончания курса введения препаратов (на 5 сут после введения ЦФ) у половины животных из каждой группы забирали на анализ образцы крови из кончика хвоста, а после цервикальной дислокации шейных позвонков – образцы костного мозга. Вторая половина животных в этот день получала еще одну инъекцию препаратов, биоматериал на анализ забирали через 24 ч после введения.

В образцах крови методом световой микроскопии определяли общее количество лейкоцитов (кровь разводили в 20 раз 3%-ным раствором уксусной кислоты, подсчет проводили в камере Горяева), относительное и абсолютное содержание нейтрофилов и других морфологических форм лейкоцитов. В образцах костного мозга подсчитывали общее количество кариоцитов (ОКК) и 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%-ным раствором уксусной кислоты в объеме 1 мл. Подсчет ОКК осуществляли с помощью камеры Горяева.

Метод изучения динамики накопления рГМ-КСФ

Для изучения динамики накопления рГМ-КСФ в костной ткани и костном мозге самок мышей CD-1 разделили на 3 группы: контрольную (5 особей) и две опытные (по 20 особей). Накануне эксперимента в конце рабочего дня мышей пересаживали в чистые клетки без корма. Корм животным давали через 2 часа после введения препаратов, воду – без ограничений.

Животные первой опытной группы получали внутривенную инъекцию рГМ-КСФ, мышам второй опытной группы вводили конъюгат AEG. Препараты вводили в дозе 90 мкг/кг массы тела, по 0,2 мл на 20 г веса животного. Контрольными животными (третья группа) служили интактные мыши.

¹ ОФС.1.7.1.0007.15 «Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантной ДНК» // Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издание. – Москва, 2018. – Т. 2. – С. 2575–2595. – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://docs.rucml.ru/feml/pharma/v14/vol2/763/>

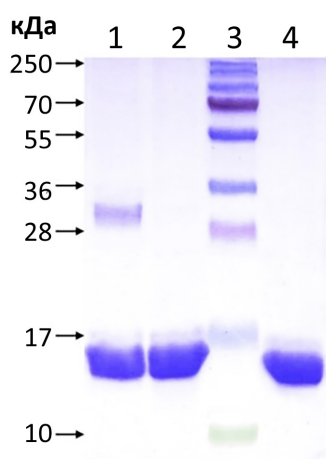


Рисунок 1 – Электрофореграмма конъюгатов, полученных в результате прямой последовательности нанесения GEA (1) и обратной последовательности AEG (2)

Примечание: Электрофорез в 15 % полиакриламидном геле в восстанавливающих условиях, окрашивание Кумасси R-250. Дорожки: 3 – белковый маркер 10–250 кДа; 4 – белок рчГМ-КСФ, 20 мкг.

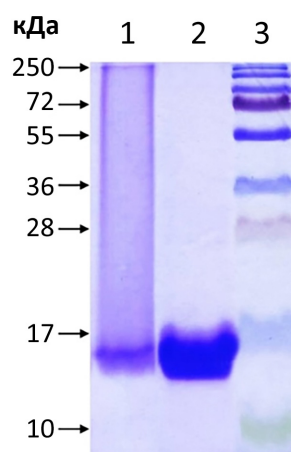


Рисунок 2 – Электрофореграмма конъюгата, полученного с помощью декстрана (1)

Примечание: Электрофорез в 15% полиакриламидном геле в восстанавливающих условиях, окрашивание Кумасси R-250. Дорожки: 2 – белок рчГМ-КСФ, 20 мкг; 3 – белковый маркер 10–250 кДа.

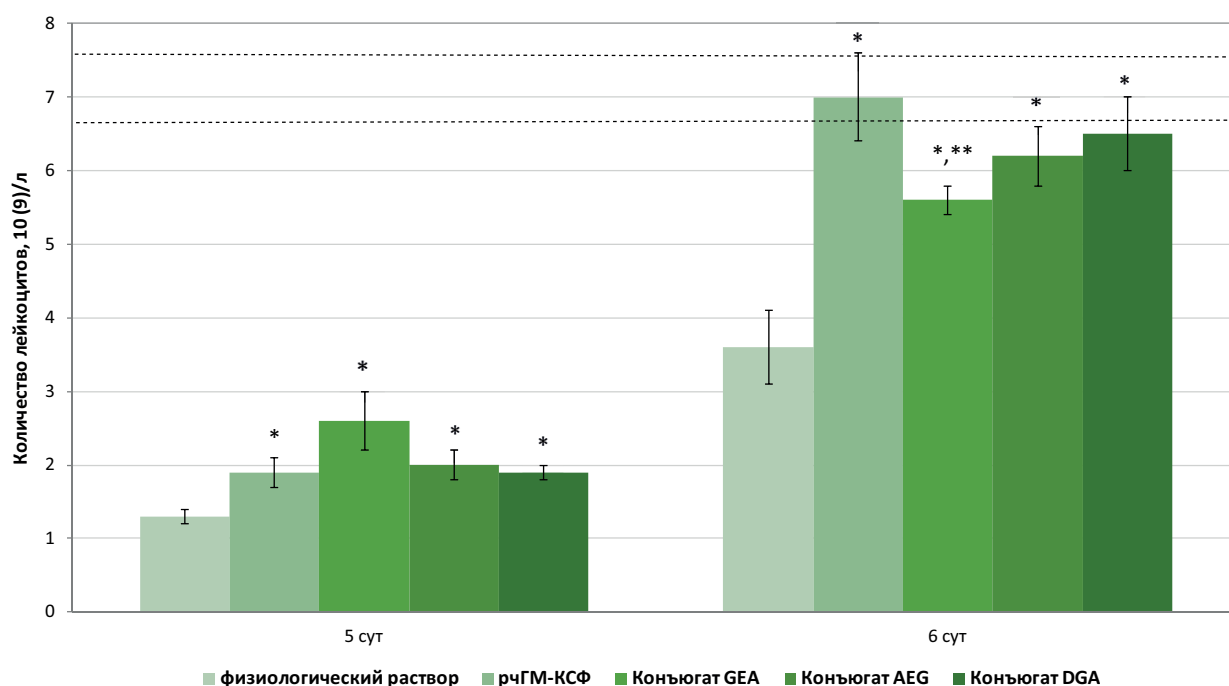


Рисунок 3 – Количество лейкоцитов в периферической крови мышей линии СВА на фоне введения ЦФ, препарата рчГМ-КСФ и его конъюгатов с АЛН

Примечание: по оси абсцисс – сроки исследования (сутки). * – статистически значимое отличие по отношению к контролю (физиологическому раствору); ** – статистически значимое отличие по отношению к рчГМ-КСФ при $p \leq 0,05$. Область между пунктирными прямыми – доверительный интервал показателя у интактных мышей.

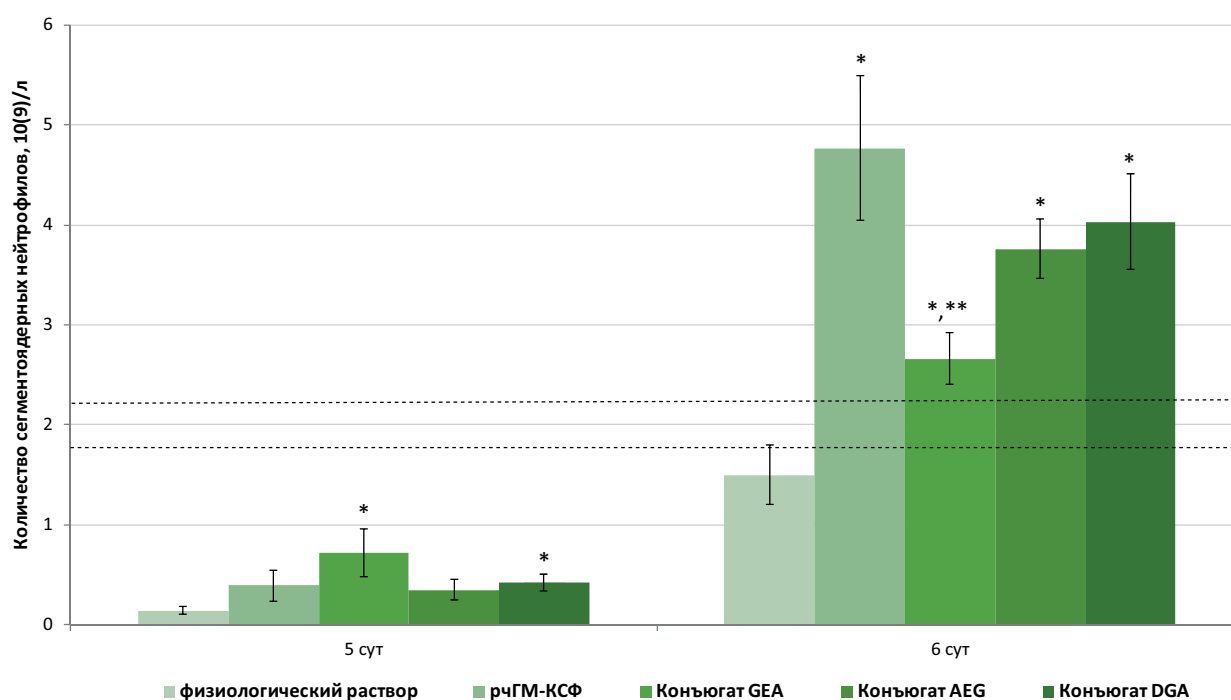


Рисунок 4 – Количество сегментоядерных нейтрофилов в периферической крови мышей линии СВА на фоне введения ЦФ, препарата рчГМ-КСФ и его конъюгатов с АЛН

Примечание: по оси абсцисс – сроки исследования (сутки). * – статистически значимое отличие по отношению к контролю (физиологическому раствору); ** – статистически значимое отличие по отношению к рчГМ-КСФ при $p \leq 0,05$. Область между пунктирными прямыми – доверительный интервал показателя у интактных мышей.

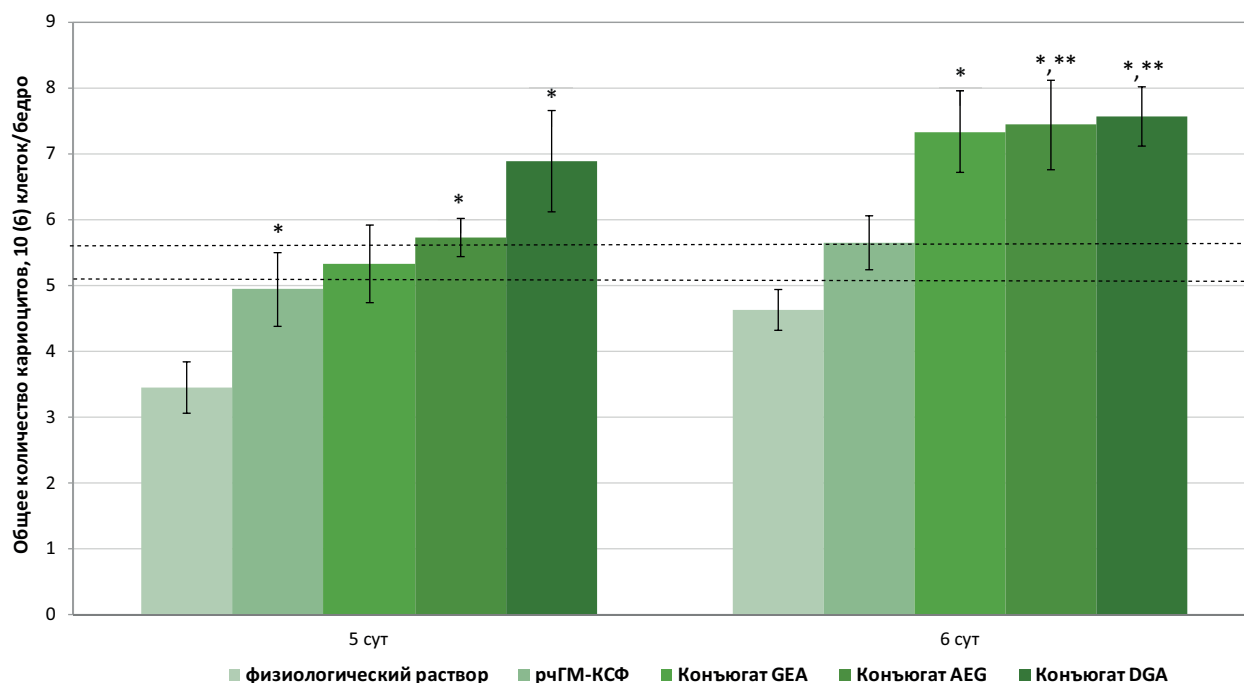


Рисунок 5 – Количество кариоцитов в костном мозге мышей линии СВА на фоне введения ЦФ, препарата рчГМ-КСФ и его конъюгатов с АЛН

Примечание: по оси абсцисс – сроки исследования (сутки). * – статистически значимое отличие по отношению к контролю (физиологическому раствору); ** – статистически значимое отличие по отношению к рчГМ-КСФ при $p \leq 0,05$. Область между пунктирными прямыми – доверительный интервал показателя у интактных мышей.

Таблица 1 – Динамика изменения уровня рЧГМ-КСФ в крови, костной ткани и костном мозге мышей после однократного внутривенного введения препаратов

Препарат	Концентрация рЧГМ-КСФ в образцах			
	Сыворотка крови, пг/мл			
	3 мин	1 ч	4 ч	24 ч
рЧГМ-КСФ	151715±32571	3138±214	24,5±2,3	0,174±0,148
Конъюгат АЕГ	406468±54586**	8500±2539**	48,8±9,0**	0,676±0,676
Бедренная кость, пг/г				
Контроль	184±139			
рЧГМ-КСФ	3869±458*	322±151	436±52	137±105
Конъюгат АЕГ	11154±1613*,**	1108±387	1706±374*,**	1652±449
Костный мозг бедренной кости, пг/бедро				
Контроль	3,52±2,03			
рЧГМ-КСФ	237±36*	9,84±7,47	0±0	1,20±1,20
Конъюгат АЕГ	567±127*	20,3±12,8	5,64±5,64	15,7±9,7

Примечание: экспериментальные данные представлены в виде средней арифметической величины и стандартной ошибки ($M \pm m$); * – отличия статистически значимы, по сравнению с контролем; ** – отличия статистически значимы, по сравнению с показателем мышей, которым вводили рЧГМ-КСФ ($p < 0,05$ для крови; $p < 0,017$ для тканей).

Спустя 3 мин, 1, 4 и 24 ч после введения препаратов у 5 животных из каждой опытной группы после эвтаназии забирали кровь и одну бедренную кость. У мышей контрольной группы брали аналогичный материал в первый день эксперимента. Из крови получали сыворотку, из бедренной кости извлекали костный мозг путем промывания костномозгового канала 0,9%-ным раствором хлорида натрия в объеме 1 мл. Клетки костного мозга ресуспендировали дозатором до гомогенной суспензии. Бедренную кость после удаления костного мозга взвешивали и готовили 10%-ный гомогенат в 0,1 М калий-фосфатном буфере (рН 7,2), на гомогенизаторе «GlasCol» (США). Полученный биоматериал хранили при температуре не выше -20°C . В день проведения анализа гомогенаты костного мозга и бедренных костей размораживали, центрифугировали (центрифуга 5810R, Eppendorf, Германия) при 5000 g и температуре $2-8^{\circ}\text{C}$ в течение 5 мин, отбирали супернатанты.

В сыворотке крови и супернатантах гомогенатов определяли содержание рЧГМ-КСФ иммуноферментным анализом (ИФА) с применением наборов реагентов для определения ГМ-КСФ человека в сыворотке, плазме крови, супернатантах культур клеток и гомогенатов органов «Human Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor (ГМ-КСФ) ELISA Kit», «CUSABIO», КНР. Диапазон определяемых концентраций стандартного образца, входящего в состав набора, составлял 15,6–1000 пг/мл, чувствительность – менее 3,9 пг/мл.

Статистическая обработка полученных результатов

Полученные результаты обрабатывали с помощью пакета программ «Statgraphics, Versin 5.0» «Statistical Graphics Corp.», США. В связи с малыми объемами

выборок для оценки значимости межгрупповых различий применяли непараметрические критерии – двухвыборочный U-критерий Манна-Уитни и H-критерий множественных сравнений Краскала-Уоллиса с критическим уровнем статистической значимости (p), равным 0,05. При обнаружении статистически значимых различий в H-тесте проводили апостериорные сравнения с помощью U-критерия, при этом скорректированный критический уровень значимости (p) для трех попарных сравнений принимали равным 0,0170 [26, 27]. Экспериментальные данные представлены в виде средней арифметической величины и стандартной ошибки ($M \pm m$). Рисунки построены с использованием программы Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование показало, что однократное введение мышам ЦФ в дозе 250 мг/кг приводило к закономерному развитию миелосупрессии. Общее количество кариоцитов костного мозга у мышей контрольной группы на 5-е сут после введения ЦФ снизилось в 1,5 раза, лейкоцитов крови в 5,5 раза, количество сегментоядерных нейтрофилов – в 13,9 раз.

Изменение числа лейкоцитов, сегментоядерных нейтрофилов и клеток костного мозга мышей после введения препаратов оценивали по сравнению с показателями контрольной группы (физиологический раствор), значения которых принимали за 100 %. Введение животным как препарата рЧГМ-КСФ, так и его конъюгатов с АЛН, приводило к более быстрому статистически значимому ($p \leq 0,05$) увеличению числа лейкоцитов крови по сравнению с контрольными показателями (рис. 3). На 5-е сут после введения ЦФ число лейкоцитов крови мышей, получавших препараты рЧГМ-КСФ, превышало

контрольный показатель на 46–100%, на 6-е сут – на 56–94%. Существенных отличий в уровне стимуляции лейкопоза в группах, которым вводили конъюгаты разного типа, либо рчГМ-КСФ, не наблюдалось.

В группах мышей, которым вводили конъюгаты GEA и DGA, на 5-е сут после введения ЦФ отмечено статистически значимое увеличение числа сегментоядерных нейтрофилов по сравнению с контролем (на 414 и 200%, соответственно, $p \leq 0,05$), на 6-е сут повышенные (на 77 и 169%) значения показателя зарегистрированы во обеих группах с введением конъюгатов. Достоверный стимулирующий эффект исходного рчГМ-КСФ был отмечен лишь на 6-е сут, число сегментоядерных нейтрофилов крови в этот период повышалось на 218% по сравнению с показателем животных, получавших физиологический раствор (рис. 4).

Из данных, представленных на рисунке 5, видно, что введение рчГМ-КСФ приводило к статистически значимому увеличению общего числа кариоцитов через 5 сут на 43% после введения ЦФ по сравнению с контрольными значениями. Аналогичные, но более выраженные, изменения были отмечены в группах мышей, которым вводили конъюгаты. При этом максимальным был эффект DGA (повышение показателя на 100% по сравнению с контролем). Через 6 сут после введения цитостатика число кариоцитов в костном мозге мышей, которым вводили конъюгаты, на 58–63% превышало уровень контроля и на 30–34% уровень показателя, зарегистрированного после введения рчГМ-КСФ.

Таким образом, конъюгирование рчГМ-КСФ с АЛН не приводило к снижению гемостимулирующей активности белка. Не обнаружено значимых различий в уровне лейкостимулирующей активности исследованных препаратов. Конъюгаты GEA и DGA ускоряли восстановление числа нейтрофилов крови мышей. Конъюгаты AEG и DGA оказывали более выраженное по сравнению с ГМ-КСФ стимулирующее действие на продукцию клеток костного мозга, что проявлялось в более интенсивном и более раннем увеличении общей клеточности костного мозга после воздействия цитостатика.

Усиление стимулирующего эффекта рчГМ-КСФ в составе конъюгата на продукцию кариоцитов, очевидно, может быть связано с повышенной тропностью белка к клеткам костной ткани.

Для подтверждения адресной доставки рчГМ-КСФ в составе конъюгата с АЛН в костную ткань было проведено сравнительное изучение накопления препарата в костной ткани и костном мозге после внутривенного введения препарата рчГМ-КСФ и его конъюгата AEG.

Динамика изменения концентрации белка в крови, костной ткани и костном мозге мышей после однократного внутривенного введения препарата рчГМ-КСФ и его конъюгата в эффективной

гемостимулирующей дозе (90 мкг/кг) представлена в таблице 1.

Полученные данные свидетельствуют о том, что наибольшие значения рчГМ-КСФ в крови мышей были зарегистрированы через 3 мин после введения препаратов и составляли 19,2% от введенной дозы у мышей, получавших конъюгат AEG, и 7,2% у мышей после введения рчГМ-КСФ (табл. 1). Белок сохранялся в сыворотке крови мышей обеих экспериментальных групп в течение 4 ч наблюдения. Через 1 час после введения препаратов значения показателя уменьшались по сравнению с точкой «3 мин» в 48 раз и в последующие сроки отмечено их дальнейшее снижение до уровня фона. Концентрация рчГМ-КСФ в крови мышей, получавших инъекцию конъюгата, превышала соответствующий показатель после введения рчГМ-КСФ в 2,7 раза через 3 мин и 1 ч, в 2 раза – через 4 ч после введения (различия статистически значимы, $p \leq 0,05$). Через 24 ч после введения рчГМ-КСФ в незначительных количествах был обнаружен в крови двух животных из пяти после введения препарата рчГМ-КСФ и у одной мыши из пяти, получавших инъекцию конъюгата AEG. В сыворотке крови контрольных животных значения показателя ни в один из сроков наблюдения не отличались от нуля.

Наибольший уровень рчГМ-КСФ в гомогенатах бедренных костей мышей был обнаружен через 3 мин после введения препаратов. При этом содержание белка в костной ткани мышей, получавших конъюгат, в этой точке в 60 раз превышало показатель животных с введением рчГМ-КСФ. В последующие сроки концентрация белка во всех бедренных костях мышей, которым вводили рчГМ-КСФ, снижалась до уровня контроля (1 ч после введения, табл. 1). В образцах костной ткани мышей, получавших инъекцию конъюгата AEG, концентрация рчГМ-КСФ через 1 ч после введения превышала контрольный уровень в 6 раз (отличия статистически недостоверны, $p \leq 0,017$), в последующие сроки (4 и 24 ч) – в 9 раз (статистические отличия наблюдались в 4-часовой точке). Через 24 ч после введения только у двух из пяти мышей, получивших инъекции рчГМ-КСФ, в костной ткани было обнаружено повышенное содержание рчГМ-КСФ (541 и 146 пг/г ткани), тогда как более высокий, чем в контроле, уровень рчГМ-КСФ (от 1408 до 2460 пг/г) после введения конъюгата AEG наблюдался у четырех из пяти животных.

Максимальную концентрацию рчГМ-КСФ в костном мозге мышей обеих опытных групп, также как в крови и гомогенатах бедренных костей, регистрировали в первой точке, через 3 минуты после введения (табл. 1). Значения показателя у мышей, которым вводили конъюгат AEG, в 161 раз превышали контрольные значения и в 2,4 раза – показатель мышей, которым вводили рчГМ-КСФ. В последующие сроки содержание белка в обеих опытных группах снижалось. Однако следует отметить, что через 4 и

24 ч после введения рчГМ-КСФ у всех пяти мышей белок в костном мозге не определялся, в то время как в группе, получившей конъюгат АЕГ, у 2 мышей были зарегистрированы следовые количества рчГМ-КСФ (от 28,2 до 42,2 пг/бедро).

Таким образом, введение в состав рчГМ-КСФ алендроновой кислоты способствовало повышению накопления и распределения рчГМ-КСФ в костной ткани и костном мозге мышей, что согласуется с имеющимися литературными данными о накоплении препаратов алендроновой кислоты в костной ткани, прочном связывании и удержании их костным матриксом [28–34]. Концентрация конъюгированного белка в крови в первые часы после введения была выше, чем свободного рчГМ-КСФ, что, возможно, связано с повышением в результате модификации устойчивости белка к протеолитическим ферментам

и, как следствие, появлением у него способности дольше циркулировать в кровеносном русле.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что конъюгаты рчГМ-КСФ с АЛН обладают гемостимулирующей активностью, сравнимой с активностью исходного белка. Эффект рчГМ-КСФ в составе конъюгатов на клетки костного мозга был более выраженным и продолжительным, что, по-видимому, связано с более длительным присутствием белка в составе конъюгата в крови и повышенным накоплением его в костной ткани и костном мозге. Полученные данные позволяют сделать вывод о перспективности дальнейших работ по созданию гемостимулирующих препаратов на основе конъюгатов рчГМ-КСФ с алендроновой кислотой.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование проведено в рамках работ по выполнению государственного задания ГНЦ ВБ “Вектор” Роспотребнадзора, тема ГЗ-39/21.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Г.Г. Шими́на – проведение экспериментальных исследований, статистическая обработка данных, построение диаграмм, написание текста статьи; А.В. Батенева – литературный поиск, проведение экспериментальных исследований, статистическая обработка данных, написание текста статьи; Е.С. Цыпленкова – проведение экспериментальных исследований; С.Г. Гамалей – проведение литературного поиска, формирование цели и задач исследования, разработка дизайна исследования, доработка текста статьи; Т.И. Есина – получение препаратов для исследования; Волосникова Е.А. – получение препаратов для исследования; Е.Д. Даниленко – утверждение плана экспериментального исследования, редактирование и пересмотр содержания текста статьи, утверждение окончательной версии статьи.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Dygai A.M., Zhdanov V.V., Miroshnichenko L.A., Zyuz'kov G.N., Udut E.V., Simanina E.V., Stavrova L.A., Khrichkova T.Y., Agafonov V.I. Comparison of Specific Activity of Granulocytopoiesis Stimulators after Treatment with Cytostatics with Different Mechanisms of Action // *Bull. Exp. Biol. Med.* – 2013. – Vol. 55. – P. 631–635. DOI: 10.1007/s10517-013-2212-3
2. Hamilton J.A., Anderson G.P. GM-CSF Biology // *Growth Factors.* – 2004. – Vol. 22. No. 4. – P. 225–231. DOI: 10.1080/08977190412331279881
3. Bhattacharya P., Budnick I., Singh M., Thirupathi M., Alharshaw K., Elshabrawy H., Holterman M.J., Prabhakar B.S. Dual Role of GM-CSF as a Pro-Inflammatory and a Regulatory Cytokine: Implications for Immune Therapy // *J. Interferon Cytokine Res.* – 2015. – Vol. 35, No. 8. – P. 585–599. DOI: 10.1089/jir.2014.0149
4. van de Laar L., Coffey P.J., Woltman A.M. Regulation of dendritic cell development by GM-CSF: molecular control and implications for immune homeostasis and therapy // *Blood.* – 2012. – Vol. 119, No. 15. – P. 3383–3393. DOI: 10.1182/blood-2011-11-370130
5. Hübel K., Dale D.C., Liles W.C. Therapeutic Use of Cytokines to Modulate Phagocyte Function for the Treatment of Infectious Diseases: Current Status of Granulocyte Colony-Stimulating Factor, Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor, Macrophage Colony-Stimulating Factor, and Interferon-gamma // *J. Infect. Dis.* – 2002. – Vol. 185, No. 10. – P. 1490–1501 DOI: 10.1086/340221
6. Steward W.P., Scarffe J.H., Austin R., Bonnem E., Thatcher N., Morgenstern G., Crowther D. Recombinant human granulocyte macrophage colony stimulating factor (rhGM-CSF) given as daily short infusions—a phase I dose-toxicity study // *Br. J. Cancer.* – 1989. – Vol. 59, No. 1. – P. 142–145. DOI: 10.1038/bjc.1989.28
7. Morita M., Lamkhied B., Soussi Gounni A., Aldebert D., Delaporte E., Capron A., Capron M. Induction by interferons of human eosinophil apoptosis and regulation by interleukin-3, granulocyte/macrophage colony stimulating factor and interleukin-5 // *Eur. Cytokine Netw.* – 1996. – Vol. 7, No. 4. – P.725–732.
8. Lieschke G.J., Burgess A.W. Granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor // *N. Engl. J. Med.* – 1992. – Vol. 327, No. 2. – P. 99–106. DOI: 10.1056/nejm199207093270207
9. Lee J.H., Nan A. Combination drug delivery approaches in metastatic breast cancer // *J. Drug. Deliv. USA.* – 2012. – Vol. 2012. – Art. ID: 915375. DOI: 10.1155/2012/915375
10. Mu C.F., Shen J., Liang J., Zheng H.S., Xiong Y., Wei Y.H.,

- Li F. Targeted drug delivery for tumor therapy inside the bone marrow // *Biomaterials*. – 2018. – Vol. 155. – P. 191–202. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2017.11.029
11. Kamada H., Tsutsumi Y., Yamamoto Y., Kihira T., Kaneda Y., Mu Y., Kodaira H., Tsunoda S., Nakagawa S., Mayumi T. Antitumor activity of tumor necrosis factor- α conjugated with polyvinylpyrrolidone on solid tumors in mice // *Cancer Res.* – 2000. – Vol. 60, No. 22. – P. 6416–6420.
 12. Даниленко Е.Д., Белкина А.О. Использование бисфосфонатов в качестве средств доставки лекарственных препаратов // *Биофармацевтический журнал*. – 2014. – Т. 6, № 6. – С. 44–53.
 13. Farrell K.B., Karpeisky A., Thamm D.H., Zinnen S. Bisphosphonate conjugation for bone specific drug targeting // *Bone Reports*. – 2018. – Vol. 9. – P. 47–60. DOI: 10.1016/j.bonr.2018.06.007
 14. Sedghizadeh P., Sun S., Junka A., Richard E., Sadrafi K., Mahabady S., Bakhshalian N., Tjokro N., Bartoszewicz M., Oleksy M., Szymczyk P., Lundy M., Neighbors J., Russell R.G., McKenna C., Ebetino F. Design, synthesis, and antimicrobial evaluation of a novel bone-targeting bisphosphonate-ciprofloxacin conjugate for the treatment of osteomyelitis biofilms // *J. Med. Chem.* – 2017. – Vol. 60, No. 6. – P. 2326–2343. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.6b01615
 15. Kamble S., Varamini P., Müllner M., Pelras T., Rohanizadeh R. Bisphosphonate-functionalized micelles for targeted delivery of curcumin to metastatic bone cancer // *Pharm. Dev. Technol.* – 2020. – Vol. 25, No. 9. – P. 1118–1126. DOI: 10.1080/10837450.2020.1798458
 16. Yamashita S., Katsumi H., Sakane T., Yamamoto A. Bone-targeting dendrimer for the delivery of methotrexate and treatment of bone metastasis // *J. Drug Target.* – 2018. – Vol. 26, No. 9. – P. 818–828. DOI: 10.1080/1061186x.2018.1434659
 17. Xie Z., Liu G., Tang P., Sun X., Chen S., Qin A., Zhu P., Zhang J., Fan S. Bone-targeted methotrexate-alendronate conjugate inhibits osteoclastogenesis in vitro and prevents bone loss and inflammation of collagen-induced arthritis in vivo // *Drug. Deliv.* – 2018. – Vol. 25, No. 1. – P. 187–197. DOI: 10.1080/10717544.2017.1422295
 18. Волосникова Е.А., Демин И.Ф., Левагина Г.М., Лебедев Л.Р., Закабунин А.И., Даниленко Е.Д. Синтез конъюгатов фактора некроза опухоли альфа с алендроновой кислотой // *Биоорганическая химия*. – 2016. – Т. 42, № 6. – С. 704–711. DOI: 10.7868/S0132342316060154
 19. Патент РФ № 2609871/06.02.2017. Противоопухолевое средство // Патент № 2015133400. 2016. Бюл. № 4. Закабунин А.И., Даниленко Е.Д., Волосникова Е.А., Левагина Г.М., Демин И.Ф.
 20. Патент РФ № 2708556/09.12.2019. Рекомбинантная плазмидная ДНК p280_2GM, кодирующая полипептид со свойствами гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека, штамм E.COLI SG 20050/p280_2GM — продуцент полипептида со свойствами гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека и способ его получения // Патент № 2018140842. 2016. Бюл. № 34. Гилева И.П., Есина Т.И., Волосникова Е.А., Голина Я.С., Лебедев Л.Р., Даниленко Е.Д.
 21. Есина Т.И., Волосникова Е.А., Лебедев Л.Р., Кочнева Г.В., Гражданцева А.А. Синтез конъюгатов гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора с алендроновой кислотой и их свойства // *Биоорганическая химия*. – 2020. – Т. 46, № 3. – С. 1–8. DOI: 10.31857/S0132342320030112
 22. Мамаева С.А., Крупна И.С., Дятлов В.А., Кутергина И.Ю., Рустамов И.Р., Гумникова В.И. Влияние периодатного окисления на молекулярно-массовые характеристики и фракционную неоднородность полисахаридов // *Успехи в химии и химической технологии*. – 2014. – Т. 28, № 3. – С. 45–48.
 23. Есина Т.И., Лебедев Л.Р., Волосникова Е.А., Гилева И.П., Голина Я.С., Терещенко Т.А., Кочнева Г.В., Гражданцева А.А., Даниленко Е.Д. Способ получения рекомбинантного гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека // *Биотехнология*. – 2019. – Т. 35, № 3. – С. 68–73. DOI: 10.21519/0234-2758-2019-35-3-68-73
 24. Патент РФ № 2332667/27.08.2008. Способ оценки гранулоцитопозэстимулирующей активности фармакологических веществ // Патент № 2006139437/15. 2006. Бюл. № 24. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Зюзьков Г.Н., Жданов В.В., Симанина Е.В., Гурьянцева Л.А., Хричкова Т.Ю., Удут Е.В., Ставрова Л.А., Сотникова Н.В.
 25. Шимица Г.Г., Батенева А.В., Гамалей С.Г., Есина Т.И., Терещенко Т.Г., Даниленко Е.Д. Исследование гемостимулирующих свойств рекомбинантного гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека. // *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. – 2020. – Т. 20, № 4. – С. 268–276. DOI: 10.30895/2221-996X-2020-20-4-268-276
 26. Гржибовский А.М. Анализ количественных данных для двух независимых групп // *Экология человека*. – 2008. № 2. – С. 54–61.
 27. Гржибовский А.М. Анализ трех и более групп количественных данных // *Экология человека*. – 2008. – № 3. – С. 50–58.
 28. Nguyen T.D., Pitchaimani A., Aryal S. Engineered nanomedicine with alendronic acid corona improves targeting to osteosarcoma // *Sci. Rep.* – 2016. – Vol. 6. – Art. ID: 36707. DOI: 10.1038/srep36707
 29. Pan H., Sima M., Kopecková P., Wu K., Gao S., Liu J., Wang D., Miller S.C., Kopecek J. Biodistribution and pharmacokinetic studies of bone-targeting N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide copolymer-alendronate conjugates // *Mol. Pharm.* – 2008. – Vol. 5, No. 4. – P. 548–558. DOI: 10.1021/mp800003u
 30. Miller K., Eldar-Boock A., Polyak D., Segal E., Benayoun L., Shaked Y., Satchi-Fainaro R. Antiangiogenic antitumor activity of HPMA copolymer-paclitaxel-alendronate conjugate on breast cancer bone metastasis mouse model // *Mol. Pharm.* – 2011. – Vol. 8, No. 4. – P. 1052–1062. DOI: 10.1021/mp200083n
 31. Chen H., Li G., Chi H., Wang D., Tu C., Pan L., Zhu L., Qiu F., Guo F., Zhu X. Alendronate-Conjugated Amphiphilic Hyperbranched Polymer Based on Boltorn H40 and Poly (ethylene glycol) for Bone-Targeted Drug Delivery // *Bioconjug. Chem.* – 2012. – Vol. 23, No. 9. – P. 1915–1924. DOI: 10.1021/bc3003088
 32. Akyol U., Sipal S., Demirci E., Gungormus M. The influence of low-level laser therapy with alendronate irrigation on healing of bone defects in rats // *Lasers Med. Sci.* – 2015. – Vol. 30, No. 3. – P. 1141–1146. DOI: 10.1007/s10103-015-1720-y
 33. Lin J.H., Duggan D.E., Chen I.W., Ellsworth R.L. Physiological disposition of alendronate, a potent anti-osteolytic bisphosphonate, in laboratory animals // *Drug Metab. Dispos.* – 1991. – Vol. 19, No. 5. – P. 926–932.
 34. Lin J.H., Chen I.W., Duggan D.E. Effects of dose, sex, and age on the disposition of alendronate, a potent antiosteolytic bisphosphonate, in rats // *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. – 1992. – Vol. 20, No. 4. – P. 473–478.

АВТОРЫ

Шими́на Галина Григорьевна – научный сотрудник отдела биологических исследований ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. ORCID ID: 0000-0002-1078-7033. E-mail: shimina_gg@vector.nsc.ru

Батенева Алена Владимировна – научный сотрудник отдела биологических исследований ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. ORCID ID: 0000-0002-3761-7798. E-mail: bateneva_av@vector.nsc.ru

Цыпленкова Елена Сергеевна – младший научный сотрудник отдела биологических исследований ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. ORCID ID: 0000-0002-1277-6258. E-mail: tsypchenkova_es@vector.nsc.ru

Гамалей Светлана Георгиевна – заведующий отделом биологических исследований ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. ORCID ID: 0000-0002-7441-333X. E-mail: gamaley_sg@vector.nsc.ru

Есина Татьяна Игоревна – младший научный сотрудник отдела разработки технологий и пилотного производства биопрепаратов ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. ORCID ID: 0000-0001-9006-8313. E-mail: esina_ti@vector.nsc.ru

Волосникова Екатерина Александровна – кандидат биологических наук, заведующий лабораторией получения и анализа биосубстанций отдела разработки технологий и пилотного производства биопрепаратов ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. ORCID ID: 0000-0001-5028-5647. E-mail: volosnikova_ea@vector.nsc.ru

Даниленко Елена Дмитриевна – кандидат биологических наук, директор ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. ORCID ID: 0000-0001-5026-1602. E-mail: danilenko_ed@vector.nsc.ru