

Афанасьева Татьяна Михайловна

**ПРОТИВОСТАФИЛОКОККОВЫЙ ПРЕПАРАТ «СТАФИЛОЛЕЙКИН»:
ТЕХНОЛОГИЯ,
ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА**

14.04.01 – Технология получения лекарств

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Диссертационная работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор биологических наук, доцент **Николаева Алевтина Максимовна**

Научный консультант:

кандидат медицинских наук, доцент

Мац Александр Наумович

Официальные оппоненты:

Петров Александр Юрьевич - доктор фармацевтических наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий кафедрой фармации;

Первушкин Сергей Васильевич - доктор фармацевтических наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий кафедрой фармацевтической технологии

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Санкт-Петербург

Защита диссертации состоится «26» декабря 2017 г. в 14.00 на заседании диссертационного совета Д 208.068.02 при федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 614990, г. Пермь, ул. Полевая, д. 2. Тел./факс (342)233-55-01.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке (614070, г. Пермь, ул. Крупской, 46) и на сайте (<http://www.pfa.ru>) федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2017г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат химических наук

Замараева Татьяна Михайловна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. *Staphylococcus aureus* вызывает гнойно-воспалительные заболевания различной локализации от легких до генерализированных форм. В настоящее время существующие методы терапии данной инфекции зачастую себя не оправдывают. Это связано с формированием устойчивости возбудителя к антибиотикам и недостаточной эффективностью общепринятой иммунотерапии с использованием иммуноглобулиновых препаратов, которые имеют ограниченный потенциал, прежде всего, в силу низкой пенетрантности полноценных антител из сосудистого русла в ткани. Кроме того, эффективный противостафилококковый иммунный ответ в большей степени основан на механизмах клеточного иммунитета, чем на функциях антител, поскольку для *S. aureus* характерно как вне-, так и внутриклеточное паразитирование (Мац А.Н., 1983; Мокроносова М.А., 2009).

Разработка лечебных и профилактических препаратов направленного действия, в частности, препарата для иммунотерапии хронической стафилококковой инфекции входит в круг задач Федеральной целевой программы «Предупреждение и борьба с заболеваниями социального характера», которая предусматривает создание новых иммунобиологических лекарственных средств для лечения инфекционных заболеваний, разработку технологии и развитие их производства.

Известно о существовании в лейкоцитарных экстрактах, плазме крови и молозиве человека низкомолекулярных полипептидов, способных переносить специфический клеточный иммунитет иммунизированного донора неиммунному реципиенту и обладающих терапевтическим потенциалом при недостаточности противоинфекционного иммунитета (Мац А.Н., 2005; 2008, Kirkpatrick С.Н., 2000). Предполагаемую природу и функцию этих полипептидов выражает их современное название – «низкомолекулярные антигенспецифичные цитокины» (НАСЦ) (Wu Н. М. и др. 2012)

В 90-х годах XX века при лечении стафилококковой инфекции были осуществлены успешные попытки восстановления утраченного противостафилококкового клеточного иммунитета, именно препаратами НАСЦ (Каменкова Н.Н., 1984; Pekárek J., 1991; Lu Xiaolin, 1991; Woodfield D.J., 1991), которые, по-видимому, представляют собой N-концевой фрагмент (5 – 8 кДа) растворимых Т-клеточных антигенсвязывающих белков (ТАБ) (Kirkpatrick С.Н., 2000; Dumonde D.C., 2000; Cone R.E., 2002), экстрагируемых из лимфоцитарных мембран и иммунной плазмы человека (Мац А.Н., 2005). В Чехии (Sevapharma Ltd) был приготовлен и с успехом применялся в клиниках «антистафилококковый иммодин» из лимфоцитов доноров с высокими титрами антител к антигенам штаммов *S. aureus*. (Pekárek J., 1991). Аналогичный иммунотерапевтический препарат стафилококковой специфичности разрабатывался в начале двухтысячных годов в Universidad Autónoma de Nuevo León (Мексика). Мексиканский препарат из спленоцитов коров не только индуцирует противостафилококковый клеточный иммунитет у пациентов,

но и обладает специфическими бактериостатическими и бактерицидными свойствами (Armides Franco-Molina M., 2006).

В исследованиях, проведенных Мацем А.Н. с соавторами, было установлено, что Т-клеточные антигенсвязывающие белки, выделенные из фракции α -глобулинов плазмы крови доноров, иммунизированных стафилококковым анатоксином, могут служить источником приготовления специфических иммунотерапевтических лекарственных средств типа разработанного ранее полиспецифичного трансфер-факторного препарата «Аффинолейкин» (Мац А.Н. 1998; Трофимова И.Б., 2002; Самсонов В.А., 2004; Мокроносова В.А., 2009).

В настоящее время на фармацевтическом рынке существует пять фармакопейных препаратов НАСЦ с доказанной иммунотерапевтической эффективностью: это «Immodin» (Чехия), «Leukonorm» (Германия), «Hebertrans» (Куба), «Transferon» (Мексика), «Аффинолейкин» (Россия). Высокая эффективность «Аффинолейкина» показана в контролируемых клинических испытаниях, в которых участвовало более 400 больных, включая новорождённых детей. Использование препарата в комбинированной фармакотерапии неонатальных пневмоний (Кусельман А.И. и др., 2003, 2011; Кутбутдинова М.Х., 2004), рецидивирующего бронхита у детей (Голубцова О.И. и др., 2006), урогенитального хламидиоза (Работникова Г.И., 2007), хронического гнойного отита (Мусалова Н.М., 2009) и туберкулёза лёгких (Мордовская Л.И., 2010) существенно повысило её эффективность. Получено клиничко-лабораторное подтверждение, что в основе лечебного действия «Аффинолейкина» лежит восстановление клеточного иммунитета к микобактериям туберкулёза, вирусам герпеса, возбудителю стафилококковой инфекции и дрожжеподобным грибам (Дианова Д.Г., 2001; Мац А.Н., 1998; Мокроносова М.А., 2009).

Производство всех коммерческих препаратов НАСЦ однотипно и начинается со взятия крови у доноров нормальной плазмы. Из крови выделяют лейкоциты, их разрушают, готовят экстракт, из которого, используя методы мембранной технологии, получают компоненты с молекулярной массой менее 10 кДа.

Так как указанные низкомолекулярные антигенспецифичные цитокины содержатся и в плазме крови (Мац А.Н., 2005, 2008; Kirkpatrick С.Н., 2000), представлялось целесообразным разработать технологию их выделения непосредственно из плазмы доноров, предварительно вакцинированных против стафилококковой инфекции. При производстве иммуноглобулинов по Кону (дифференциальное этаноловое осаждение при минусовой температуре) антигенспецифичные цитокины и их предшественники содержатся во фракции, обозначаемой как «осадок Б» - отход производства донорского иммуноглобулина.

Степень научной разработанности темы

Проблеме разработки трансфер-факторных препаратов на основе низкомолекулярных полипептидов посвящены работы таких авторов, как Мац А.Н., Borkowsky W., Dumonde D.C., Kirkpatrick С.Н., Lawrence H.S.

Работы А.Н. Маца и соавторов (Перепечкина Н.П., Райхер Л.И., Райхер И.И.) по созданию полиспецифичного препарата «Аффинолейкин» с использованием в качестве сырья лейкоцитов человека в значительной мере способствовали проведению исследования по разработке противостафилококкового препарата на основе антигенспецифичных цитокинов «Стафилолейкин» из нового источника сырья – отхода производства иммуноглобулина человека антистафилококкового – осадка Б.

Цель исследования

Разработка технологии получения нового антистафилококкового препарата на основе направленных антигенспецифичных цитокинов из отхода производства антистафилококкового иммуноглобулина.

Задачи исследования:

1. Разработать способ получения низкомолекулярных антигенспецифичных цитокинов из осадка Б - отхода производства противостафилококкового иммуноглобулина.
2. Разработать состав и технологию лекарственной формы Стафилолейкина.
3. Определить нормы качества и провести стандартизацию лекарственной формы препарата «Стафилолейкин». Разработать пакет нормативных документов.
4. Провести доклинические исследования по изучению специфической активности и специфической безопасности препарата.

Методология и методы исследования

Методологическую основу исследования составили труды как отечественных, так и зарубежных ученых по разработке препаратов на основе низкомолекулярных полипептидов, обладающих терапевтическим потенциалом. В исследовательской работе были использованы аналитические и статистические методы анализа. В зависимости от поставленных целей и задач данные методы применялись на разных этапах исследования.

Научная новизна

Впервые из осадка Б – отхода производства антистафилококкового иммуноглобулина, выделены иммунопептиды с молекулярной массой 5-8 кДа, представляющие собой фрагменты растворимых антигенсвязывающих белков Т-клеточного происхождения, которые можно отнести к серологическим коррелятам протективного антистафилококкового иммунитета.

Впервые показано, что «Стафилолейкин» индуцирует специфический клеточный иммунитет, защищает мышей от подострого менингоэнцефалита, способствует излечению стафилококкового кератита у кроликов.

Впервые установлено, что цитокиновый препарат «Стафилолейкин» обладает способностью повышать функциональную аффинность гомологичных антител.

Практическая значимость работы и внедрение материалов исследования

- Разработана экспериментально-производственная технология получения препарата «Стафилолейкин» из осадка Б, являющегося отходом производства антистафилококкового иммуноглобулина. Технология является универсальной и может быть использована для получения цитокинов различной направленности из отходов производства других специфических иммуноглобулинов человека (против гепатита В, против клещевого энцефалита и др.).

- Разработаны проекты нормативно-технической документации на производство нового антистафилококкового препарата на основе антигенспецифичных цитокинов.

- Разработанная технология апробирована в цехе иммуноглобулинов филиала ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед» (акт внедрения от 18.02.2015).

- Изготовлены 4 экспериментально-производственные серии противостафилококкового препарата на основе антигенспецифичных цитокинов.

Личное участие автора в получении научных результатов. Автор лично участвовала в планировании и проведении экспериментов, разработке технологии получения препарата, интерпретации результатов исследований, подготовке научных публикаций.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 6 печатных работ, в том числе 3 в изданиях Перечня ВАК РФ.

Исследования выполнены в соответствии с планом научно-исследовательских работ ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России, номер государственной регистрации 01.9.50 007426.

Основные положения, выносимые на защиту:

- Технология получения препарата на основе антигенспецифичных цитокинов из отхода производства антистафилококкового иммуноглобулина – осадка Б.

- Методы контроля и стандартизация препарата «Стафилолейкин».

- «Стафилолейкин» не обладает токсичностью, индуцирует специфический клеточный иммунитет, защищает мышей от подострого стафилококкового менингоэнцефалита, способствует излечению стафилококкового кератита у кроликов, обладает способностью повышать функциональную аффинность гомологичных антител.

Степень достоверности и апробация работы. Научные положения, выводы базируются на большом количестве экспериментальных исследований, выполненных с использованием современных методов анализа. Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью электронных таблиц Excel для Windows (Microsoft), AtteStat и компьютерной программы «Паралайн».

Результаты проведенных исследований были доложены и обсуждены на научно-практической конференции ПГФА (г. Пермь, 2010); Международной конференции: «Биология – наука XXI века» (г. Москва 2012); конференции молодых ученых НИИВС им. И.И. Мечникова Российской академии медицинских наук (г. Москва

2013); на заседании Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов (г. Пермь, 2016).

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 136 страницах машинописного текста, содержит 24 таблицы, 17 рисунков; включает введение, обзор литературы (глава 1), экспериментальную часть (главы 2, 3, 4), список цитируемой литературы, содержащий 155 библиографических источника, из которых 120 на иностранных языках, приложение.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения, выносимые на защиту, соответствуют паспорту специальности 14.04.01 – технология получения лекарств, а именно: пункту 3- «Разработка технологий получения субстанций и готовых лекарственных форм» и пункту 6 – «Исследование биофармацевтических аспектов в технологии получения лекарственных средств, их дизайн и изучение факторов, влияющих на их биодоступность».

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Первая глава содержит анализ отечественной и зарубежной литературы по теме диссертации. Описаны основные факторы вирулентности золотистого стафилококка. Рассмотрено состояние современной базы антистафилококковых препаратов и представлена их краткая характеристика. Детально освещены вопросы, касающиеся технологии производства и использования цитокиновых препаратов. Определен круг вопросов, которые необходимо решить для разработки нового антистафилококкового препарата направленных цитокинов.

Во второй главе приведены основные материалы и методы, использованные при проведении экспериментальных исследований.

Сырьем для выделения низкомолекулярных антигенспецифичных цитокинов служил осадок «Б», являющийся отходом серийного производства антистафилококкового иммуноглобулина. В качестве препарата сравнения использовали полиспецифичный отечественный коммерческий препарат «Аффинолейкин».

Физико-химические методы

Метод дифференциальной диафильтрации применяли для выделения НАСЦ на установке «Sartaflo Beta» с использованием ультрафильтрационных модулей из полисульфона на 30, 10 и 5 кДа производства «Sartorius stedim».

Лиофилизацию препарата проводили на сублимационной установке ТГ50 (Германия) на базе филиала ФГУП «НПО «Микроген» МЗ РФ «Пермское НПО «Биомед». В качестве стабилизатора перед сублимацией в препарат добавляли глицин производства «Panreac».

Молекулярные параметры полуфабриката и готового препарата изучали с помощью ВЭЖХ на колонке Superdex 2000 10/300 (элюция 0,15 М раствором хлорида натрия, забуференным (рН 7,2±0,2) 0,05 М фосфатами калия, со скоростью 0,5 мл/мин, детекция при 280 нм) и электрофореза в полиакриламидном геле с

додецилсульфатом натрия (процедуру проводили в соответствии с инструкцией к прибору «BIO-RAD»).

Концентрацию белка определяли методом Лоури и спектрофотометрически при длине волны 280 нм.

Иммунологические и биологические методы. Оценка препарата «Стафилолейкин» с использованием животных проведена в соответствии с этическими нормами и рекомендациями по гуманизации работы с животными, отраженными в «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях» (Страсбург, 1985).

Перенос гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ), регистрируемый по кожным пробам со стафилококковым белком А (СБА), адсорбированным на алюмокалиевых квасцах, был воспроизведен на мышах BALB/c (самцы массой 18-20 г), по методике Brummer E. (1979), модифицированной Мацем А.Н. (1985). «Стафилолейкин» вводили в объеме 50 мкл интраплантарно в четыре лапки. Предварительно оттитрованная доза составила 32 мкг на мышь. При постановке пробы внутрикожно вводили 13 мкг СБА, адсорбированного на алюмокалиевых квасцах, в объеме 10 мкл. Кожные реакции (положительной считали папулу диаметром не менее 4 мм) учитывали через 24 и 48 ч.

Перенос ГЗТ, регистрируемый с помощью реакции СБА-зависимой конгломерации лейкоцитов, воспроизводили на мышах F1 (СВА × С57BL/6J) массой 18-20 г (аналог классической реакции торможения миграции лейкоцитов) после введения «Стафилолейкина» и «Аффинолейкина». Активность препаратов выражали величиной их дозы в мкг (или единицах активности), введение которой мышам в 100 раз снижало пороговую концентрацию СБА, вызывающую конгломерацию циркулирующих лейкоцитов, в сравнении с эффектом введения неспецифического иммуномодулятора – натрия нуклеината. Согласно ФСП на «Аффинолейкин», доза, дающая «индекс переноса», равный 100 (D_{100}), не должна превышать 50 мкг/мышь.

В иммуноферментном анализе (ИФА) исследовали влияние «Стафилолейкина» на аффинность стафилококковых антител. На полистироловых планшетах адсорбировали анатоксин 0,8 мкг/мл (0,34 ЕС/мл). В качестве антитоксина использовали разведения коммерческого антистафилококкового иммуноглобулина человека производства филиала ФГУП «НПО «Микроген» МЗ РФ «Пермское НПО «Биомед». Связавшийся с анатоксином антитоксин выявляли конъюгатом биотинилированного СБА с авидином. В ИФА связывание антитоксина с анатоксином проводили в двух вариантах нанесения реагентов. Вариант 1: анатоксин + «Стафилолейкин» + антитоксин + конъюгат. Вариант 2: анатоксин + антитоксин + «Стафилолейкин» + конъюгат.

Перенос антистафилококковой резистентности изучали на модели подострого менингоэнцефалита у мышей, заражённых интрацеребрально *S. aureus* МТ-1 (Мац А.Н., Перелыгина О.В., 1984). Исследование проведено на мышах СВА/Sto (самцы массой 18-22 г). «Стафилолейкин» вводили интраплантарно в четыре лапки в дозе 32

мкг и в разные сроки после этого заражали мышей в мозг *S. aureus* МТ-1, вводя 20 – 100 LD₅₀. Гибель животных учитывали в течение месяца.

Оценка потенциала «Стафилолейкина» в терапии язвенных поражений роговицы стафилококковой этиологии. Модель стафилококкового стромального гнойного кератита была воспроизведена на кроликах породы «Шиншилла» (самцы массой 2,5 – 3,0 кг). Ежедневно давали балльную оценку гиперемии конъюнктивы век, инфильтрации роговицы. Инстилляцией «Стафилолейкина» (по 2 капли, содержащие 0,1 ед. или 10 мкг, в конъюнктивальный мешок обоих глаз 4 раза в день) начинали через 1 сутки после заражения, когда развивалась выраженная одинаковая в опытной и контрольной группе картина воспаления с образованием инфильтрата в строме роговицы. В контрольной группе инстиллировали 0,9% раствор натрия хлорида (Мац А.Н., Перелыгина О.В., 1984).

Токсические свойства препарата определяли согласно основным положениям РД 42-28-8-89 «Доклинические испытания новых медицинских иммунобиологических препаратов».

Для изучения «острой» токсичности препарат вводили однократно: морским свинкам (масса от 240 до 260 г) подкожно по 0,5 мл, содержащих 14 человеческих доз (565 доз для животного), мышам (масса 18-22 г) по 2,14 человеческих доз, что соответствует 565 дозам для животного.

Для изучения «хронической» токсичности препарат вводили в течение 20 дней: морским свинкам по 1,4 человеческой дозы, или 56,5 дозы (суммарно 1129 доз) в пересчете на вес животного, белым беспородным мышам (масса 18 - 22 г) по 0,2 человеческой дозы, или 56,3 дозы (суммарно 1126 доз) в пересчете на вес животного. По аналогичным схемам животным группы сравнения вводили физиологический раствор.

Провоспалительную активность «Стафилолейкина» исследовали на мышах одновременно с оценкой переноса ГЗТ, регистрируемого с помощью реакции СБА-зависимой конгломерации лейкоцитов мышей. После взятия крови вскрывали мышей, которым за сутки до исследования вводили под кожу у основания хвоста 100 мкг (2 ед.) «Стафилолейкина». С целью выявления признаков воспаления осматривали место инъекции препарата, подкожную клетчатку передней стенки живота и паховых областей, сосуды и лимфоузлы, расположенные под фасцией, выстилающей подкожную клетчатку изнутри.

Нежелательную миелостимулирующую активность «Стафилолейкина» (способность вызывать активацию лейкопоза), выражающуюся увеличением степени спонтанной конгломерации лейкоцитов (лейкергии), определяли на мышах одновременно с оценкой переноса ГЗТ, регистрируемого с помощью реакции СБА-зависимой конгломерации лейкоцитов мышей, путем дополнительного сопоставления протокольных данных о числе клеток, образующих максимальные лейкоцитарные агломераты в «толстых каплях» крови.

Пирогенность «Стафилолейкина» определяли по ГФ XIII. Кроликам с массой тела 1,5 – 2,0 кг вводили внутривенно по 25 мкг препарата на кг массы животного.

Статистический анализ результатов проводили с помощью методов описательной статистики. В работе использовали электронные таблицы Excel для Windows (Microsoft) и AtteStat, для расчета критерия Фишера. Результаты в большинстве таблиц представлены в виде средней арифметической и ее стандартной ошибки ($M \pm m$). Для оценки значимости межгрупповых различий использовали парный и непарный t-критерий Стьюдента, различия или показатели связи считались значимыми при $p < 0,05$, а также медианы и их 95%-е доверительные интервалы по Ван дер Вардену. Изучение линейности и параллелизма спектрофотометрического метода анализа проводили в соответствии с инструкцией по применению компьютерной программы «Паралайн», разработанной в ГИСК им. Л.А. Тарасевича, которая прошла тестирование в Национальном Институте Биологических Стандартов и Контроля (Великобритания) и в Европейском центре ВОЗ (Дания).

Третья глава посвящена разработке технологии получения антистафилококкового цитокинового препарата «Стафилолейкин», обоснованию методов контроля и стандартизации, изучению его стабильности.

Осадок «Б», использованный нами в качестве сырья для получения «Стафилолейкина», содержит α - и β - глобулины, примесь γ – глобулинов, альбумин, а также липопротеиды. Для максимального перехода в раствор всех белков, содержащихся в осадке «Б», его растворяли в 10-кратном объеме калий-фосфатного буферного раствора концентрацией 0,01М, рН 6,9-7,0, в который добавляли 2М мочевины. Применение хлороформа для удаления липопротеидов оказалось не эффективным из-за снижения выхода целевого продукта.

Полученный раствор осветляли центрифугированием, относящиеся к α -глобулинам растворимые Т-клеточные антигенсвязывающие белки (ТАБ) выделяли осаждением сульфатом аммония. Хроматограмма полученного раствора представлена на рисунке 1а: смесь состояла в основном из белков с молекулярной массой более 150 кДа.

На следующем этапе отработывали условия получения низкомолекулярных цитокинов из белковой фракции, содержащей ТАБ. Для этой цели использовали метод криодезинтеграции. В присутствии диссоциирующих реагентов (1 мМ этилендиаминтетраацетат натрия и 10 мМ L-цистеина) при рН 2,0-2,4 полуфабрикат замораживали-оттаивали, отбирая пробы после каждого цикла. По результатам хроматографии (рис. 1б) было установлено, что оптимальное количество циклов должно быть не менее 15. При этом криодезинтеграт содержит 67% пептидов с молекулярной массой от 5 до 19 кДа.

Для сохранения молекул в дезагрегированном состоянии в технологию включена стадия закисления криодезинтеграта с помощью углекислого газа, который пропускали через полуфабрикат в течение 30 минут. Закисленный раствор оставляли на 16-20 часов. Далее препарат переводили на следующую стадию.

Для выделения НАСЦ из криодезинтеграта проводили ступенчатую ультра-, диафильтрацию. Первоначально для этой цели нами были использованы модули с

ретенцией 30 и 5 кДа. Молекулярные параметры полученного препарата приведены на рисунке 1в.

Полученный препарат представлен смесью белков с молекулярной массой от 5 до 19 кДа. Однако он обладал пирогенными свойствами в тесте на кроликах, вероятно, вследствие примеси эндогенного пирогена (прекурсора интерлейкина 8), который имеет молекулярную массу 18 кДа. В связи с этим для удаления пептидов с молекулярной массой более 10 кДа была включена дополнительная стадия ультрафильтрации с использованием модулей с ретенцией 10 кДа.

Таким образом, процесс выделения цитокинов включал следующие стадии:

- получение пермеата на кассетном модуле с ретенцией 30 кДа,
- получение пермеата на кассетном модуле с ретенцией 10 кДа,
- концентрирование пермеата на кассетном модуле с ретенцией 5 кДа. Анализ «Стафилолейкина» с помощью ВЭЖХ, показал его большую гомогенность по сравнению с коммерческим препаратом «Аффинолейкин». Молекулярная масса активного начала составляла около 5-8 кДа. Хроматограммы представлены на рисунках 1в, 1г.

Далее проводили стерилизующую фильтрацию полученного препарата на мембранах 0,22 мкм, добавляли стабилизатор (глицин) до концентрации 0,5 % и пастеризовали при 60 °С в течение 10 часов.

В ходе исследований по разработке лекарственной формы препарата был подобран оптимальный состав ксеропротектора, включающий 2% сахарозы и 0,5 % глицина, отработан способ лиофильного высушивания.

Для полного перехода жидкого препарата в твердое состояние в условиях сверхмедленного охлаждения (менее 1 °С/мин) достаточно 4-часовой экспозиции с последующей 2-часовой выдержкой (закаливанием) при конечной температуре полок сублиматора на уровне не выше минус (25±5) °С.

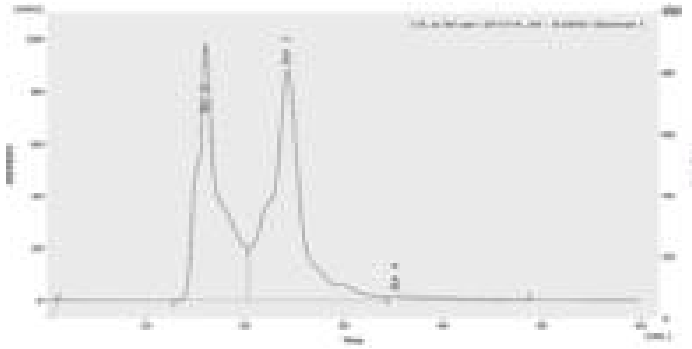
При отработке этапа сублимации предложен режим, отличительной особенностью которого является проведение основного этапа высушивания при температуре полок плюс (14±3) °С в течение (4±2) ч, что позволило максимально сократить процесс удаления воды без негативного влияния на физические и биологические свойства препарата, его внешний вид. Досушивание проводили при нагреве полок (5 °С/ч) до конечной температуры (35±4) °С и выдержкой продукта в плюсовом диапазоне температур не менее 15 ч, что в результате позволило получить препарат с необходимой остаточной влажностью не более 2 %.

Установлена роль температурного градиента, лимитирующего величину разности температур загруженного препарата и полок.

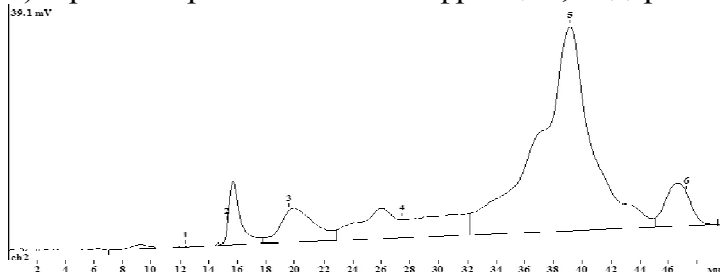
По результатам изучения стабильности определен срок годности препарата при хранении в условиях холодильника при температуре плюс (6±2) °С, который составляет 3 года.

Таким образом, в результате проведенных исследований нами разработана оригинальная технология получения препарата низкомолекулярных цитокинов из отходов серийного производства противостафилококкового иммуноглобулина (рис.

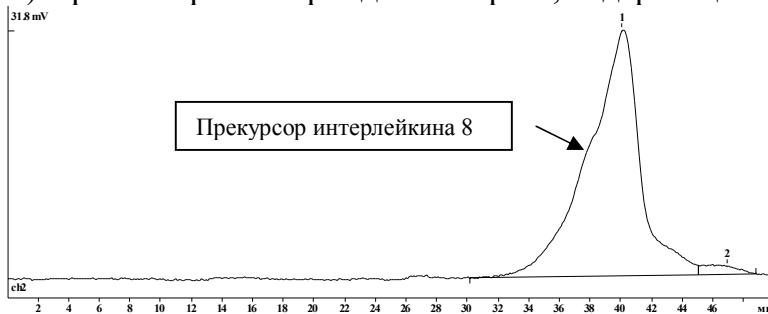
2). Получены четыре экспериментально- производственные серии препарата «Стафилолейкин».



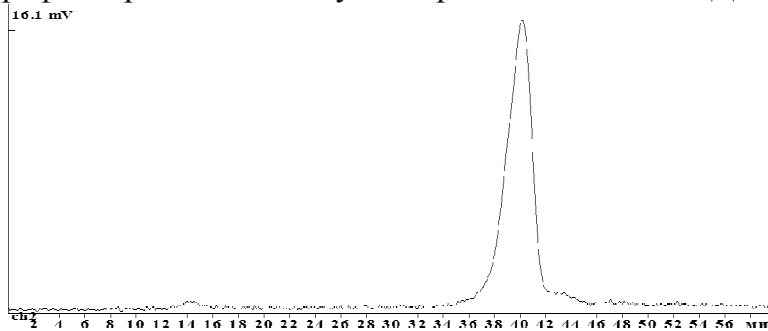
а) Хроматограмма белковой фракции, содержащей ТАБ



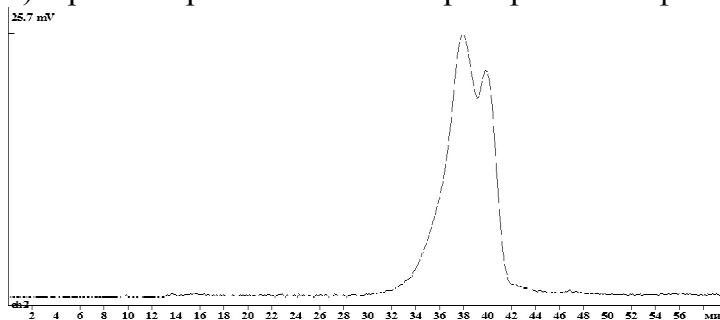
б) Хроматограмма криодезинтеграта, содержащего НАСЦ



в) Хроматограмма «Стафилолейкина» полученного ультрафильтрацией на модулях с ретенцией 30 и 5 кДа. дифференциальной



г) Хроматограмма готового препарата «Стафилолейкин».



д) Хроматограмма коммерческого препарата «Аффинолейкин».

Рис. 1. ВЭЖХ полуфабрикатов и готовых препаратов «Стафилолейкин» и «Аффинолейкин»

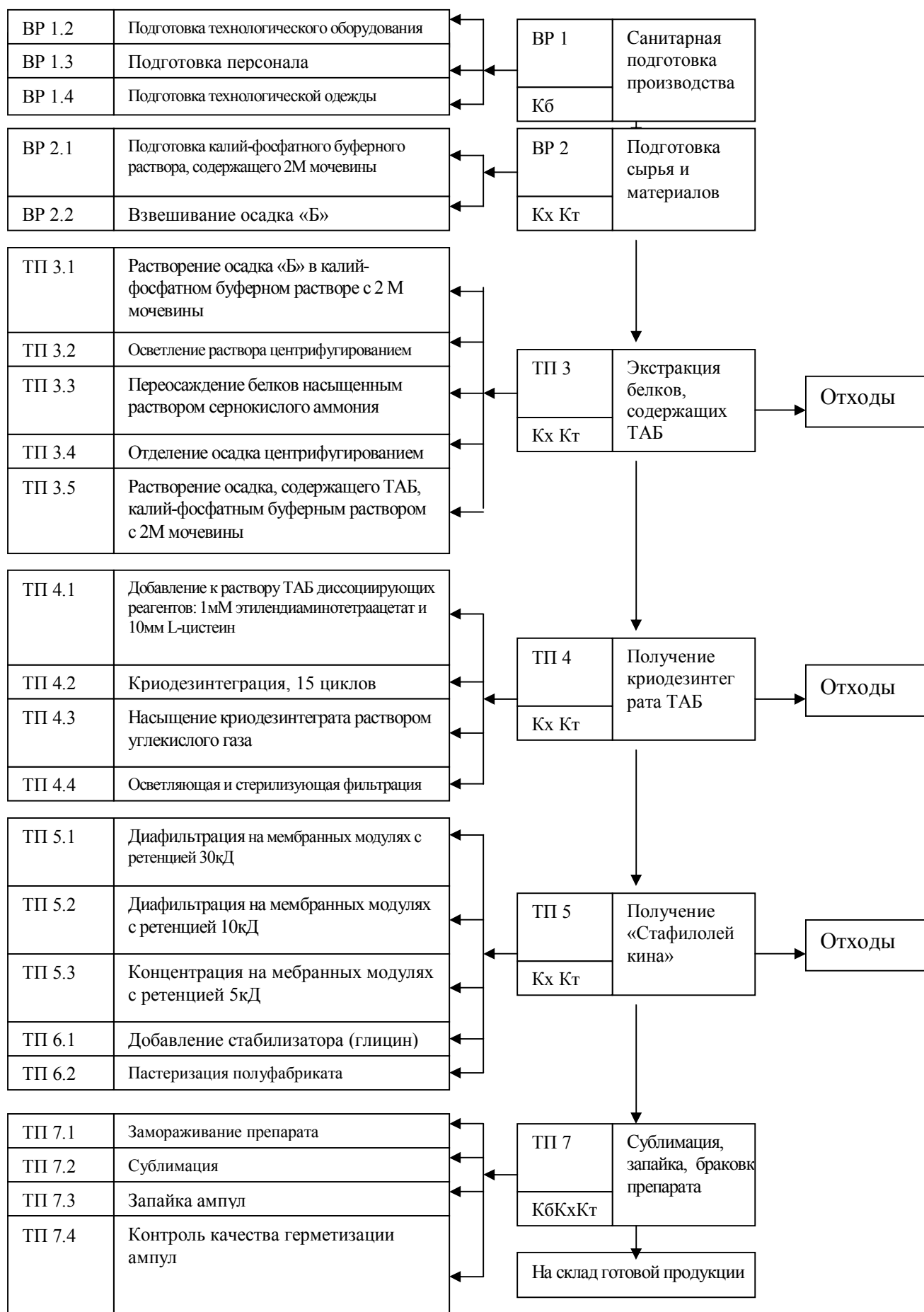


Рис. 2. Технологическая схема производства антистафилококкового препарата «Стафилолейкин»

Для обоснования методов контроля нового препарата нами проведен сравнительный анализ технологий «Стафилолейкина» и «Аффинолейкина». Производство этих препаратов при использовании различного сырья включает аналогичные стадии: криодезинтеграцию, мембранную ультра-, диафильтрацию. Получаемые по этим технологиям цитокиновые препараты подобны по молекулярным параметрам и обладают сходными свойствами.

«Стафилолейкин», как и «Аффинолейкин» представляет собой аморфную массу белого цвета, быстро растворимую в 0,9 % растворе натрия хлорида, образующую прозрачный, бесцветный раствор с максимальным поглощением при (205 ± 5) нм, которое снижается при (240 ± 5) нм, со слабым дополнительным поглощением в области 260 – 290 нм и малой величиной соотношения ОП 260/280. Спектрофотометрические характеристики «Стафилолейкина» подобны характеристикам «Аффинолейкина» и типичны для полипептидов без примесей метаболитов нуклеиновых кислот. Электрофореграмма препарата в ПААГ представлена на рисунке 3.

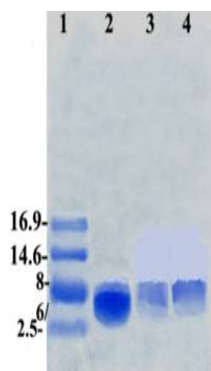


Рис. 3. Дорожки: (1) Калибранты с отметкой молекулярных масс в кДа;

(2) Бычий инсулин 6 кДа;

(3) Полуфабрикат «Стафилолейкина»

до пастеризации, микрофильтрации и лиофилизации;

(4) Готовый препарат «Стафилолейкин»

Основные связывающие краситель компоненты «Стафилолейкина» располагаются в геле на уровне маркеров (бромциан-фрагментированный миоглобин с молекулярной массой 8,2 и 6,2 кДа, бычий инсулин 6 кДа).

По аналогии с коммерческим препаратом «Аффинолейкин» оценку специфической активности «Стафилолейкина» проводили на мышах с помощью реакции конгломерации лейкоцитов. Доза «Стафилолейкина», дающая «индекс переноса», равный 100 (D_{100}), не должна превышать 50 мкг/мышь, условно эта величина принята за 1 единицу. Концентрация белка в исследованных образцах варьировала от 40 до 50 мкг/мл при постоянной концентрации добавленного глицина 5,0 мг/мл и не более 0,1 мг/мл остаточного натрия хлорида.

Учитывая установленное сходство препаратов, оценку физико-химических и иммунобиологических свойств «Стафилолейкина» проводили по следующим регламентированным показателям качества для коммерческого аналога «Аффинолейкин»: описание, подлинность, растворимость, прозрачность, цветность, механические включения, потеря в массе при высушивании, белок, стерильность, пирогенность, провоспалительная и миелостимулирующая активность, специфическая активность (ФСП 42-0504-7814-06).

Характеристика готового продукта по проекту ФСП

Показатель	Значение
Подлинность	УФ-спектр раствора в 0,9% растворе натрия хлорида должен иметь максимум поглощения в диапазоне 205-240 нм со слабым дополнительным поглощением в области 260-290нм
Растворимость	Полностью растворяется в 1мл 0,9% раствора натрия хлорида в течение не более 15 сек.
Прозрачность	Раствор препарата, содержащий 1 ед. «Стафилолейкина» в 1 мл 0,9% раствора натрия хлорида, выдерживает сравнение с эталоном 1
Цветность	Раствор препарата, содержащий 1 ед. «Стафилолейкина» в 1 мл 0,9% раствора натрия хлорида, должен иметь оптическую плотность при длине волны 400 нм не более 0,09
Механические включения	Препарат должен выдерживать требования «Инструкции по контролю на механические включения инъекционных лекарственных средств» (РД 42-501-98)
рН раствора	От 6,3 до 7,3
Потеря в массе при высушивании	Не более 2%
Белок	Не более 50 мкг белка в 1 мл раствора, содержащего 1 единицу «Стафилолейкина»
Стерильность	Препарат должен быть стерильным
Провоспалительная активность	Не должен вызывать местной воспалительной реакции и увеличения регионарных лимфоузлов при подкожной инъекции
Миелостимулирующая активность	Не должен вызывать активации лейкопоза (показатель миелостимулирующей активности не более 2)
Пирогенность	Препарат должен быть апиrogenным
Специфическая активность	Доза «Стафилолейкина», дающая «индекс переноса» равный 100 (Д100), должна быть меньше или равна 1 ед. (Если Д100 препарата, номинально содержащего в ампуле 1 или 2 ед Стафилолейкина, превысит 1 ед, но будет менее 2 ед, то он может быть маркирован как содержащий в ампуле соответственно 0,5 или 1 ед.)

Близкое сходство физико-химических и иммунобиологических свойств «Стафилолейкина» и «Аффинолейкина» свидетельствуют об идентичности активного начала. В связи с этим можно предположить высокую эффективность «Стафилолейкин» в комплексной иммунотерапии заболеваний стафилококковой этиологии.

Четвертая глава посвящена лабораторно-экспериментальному исследованию «Стафилолейкина». Изучено влияние препарата на формирование противостафилококкового клеточного иммунитета с помощью метода переноса ГЗТ на мышах.

При оценке специфической активности по переносу ГЗТ, регистрируемого по кожным пробам со стафилококковым белком А (СБА) в трёх группах по 20 мышей, которым вводили «Стафилолейкин», положительная кожная реакция отмечена в каждой группе у 60-80 % животных. Отличие от контрольных мышей, которым вводили 0,9 % раствор хлорида натрия, было значимым при $p < 0,025$ (критерий Фишера). СБА, подобно туберкулину – классический антиген, к которому формируется иммунологическая память у человека. В то же время он – поверхностный соматический антиген большинства вирулентных штаммов *S. aureus*, вызывающий иммунный ответ у каждого индивида с ненарушенным иммунологическим статусом.

Судя по результатам переноса ГЗТ к СБА, регистрируемого в реакции СБА-зависимой конгломерации лейкоцитов мышей, «Стафилолейкин» индуцирует более выраженный противостафилококковый клеточный иммунный ответ, чем коммерческий препарат «Аффинолейкин» (табл. 2).

Таблица 2

Доза (D_{100}) «Стафилолейкина» и «Аффинолейкина», снижающая пороговую концентрацию антигенов в 100 раз в реакции конгломерации лейкоцитов мышей

D_{100} «Стафилолейкина» мкг/мл	D_{100} «Аффинолейкина» мкг/мл
6(4 ÷ 32)	12(2 ÷ 16)

Примечание: медиана и 95% доверительный интервал по Ван дер Вардену

Для изучения влияние разработанного препарата на аффинность связывания стафилококковых антител с антигенами в системе *in vitro* нами был выбран широко используемый в медицине и биологии иммуноферментный анализ.

«Стафилолейкин» специфически повышал функциональную аффинность стафилококкового антитоксина лишь при одном условии, когда его наносили на иммобилизованный анатоксин до наслоения антител. Это сдвигало конечную точку титрования на 2-3 лунки к концу ряда. В то же время наслоение «Стафилолейкина» после антитоксина перед наслоением конъюгата не влияло на результат титрования. На рисунке 4 описанная разница представлена графически: по оси ординат оптическая плотность раствора хромогена в иммуноферментном анализе. Верхняя кривая – внесение «Стафилолейкина» между анатоксином и антителами. Нижняя кривая - внесение «Стафилолейкина» после антител.

Показано, что обнаруженный эффект усиления аффинности антител завит от концентрации «Стафилолейкина» и антител. На графике (рис. 5) вершинами парабол этой зависимости отмечены их оптимальные концентрации: 3-25 мкг/мл антител и 0,15 – 0,25 мкг/мл «Стафилолейкина».

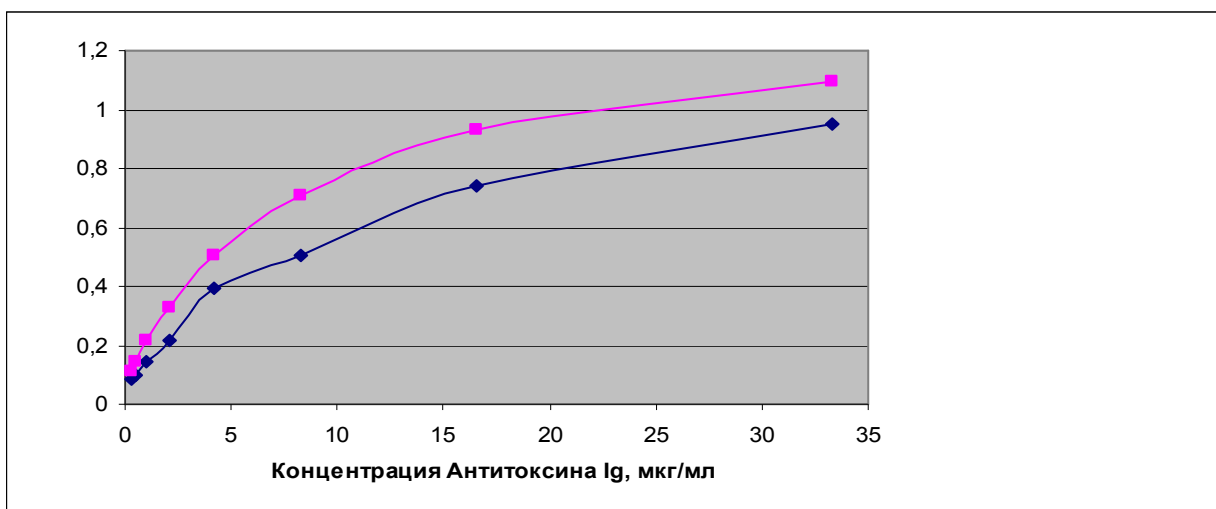


Рис. 4. Увеличение связывания стафилококковых антител с иммобилизованным анатоксином при наложении Стафилолейкина

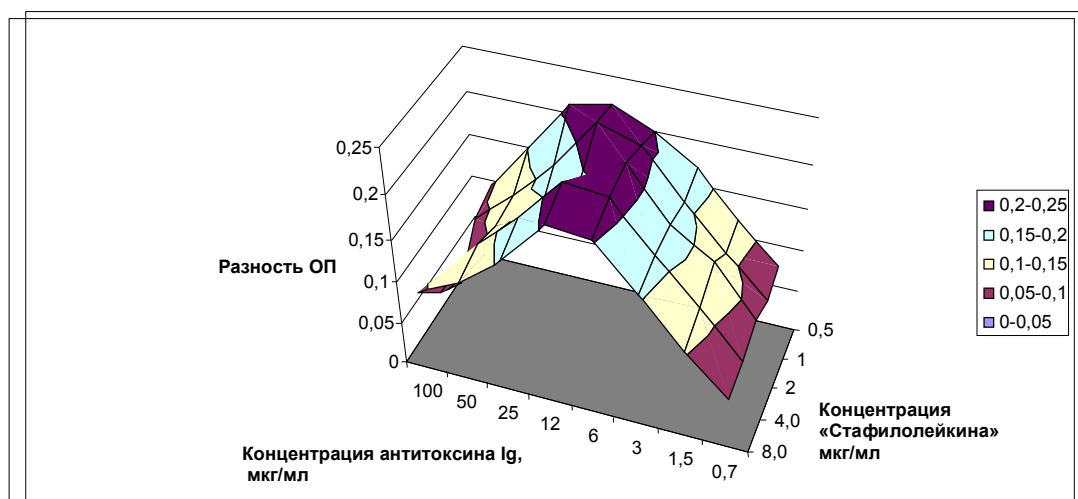


Рис. 5. Разность оптической плотности между вариантом нанесения реагентов: анатоксин + «Стафилолейкин» + антитела и вариантом: анатоксин + антитела + «Стафилолейкин» характеризует увеличение аффинности стафилококковых антител, оптимально проявляющееся при 3 – 25 мкг/мл анител и 0,15 – 0,25 мкг/мл «Стафилолейкина»

Усиление степени связывания стафилококковых антител с иммобилизованным анатоксином под воздействием «Стафилолейкина» проявлялось только в специфичной системе «стафилококковый анатоксин – стафилококковые антитела», но не при взаимодействии антигена и антител другой специфичности, то есть, связывание «Стафилолейкина» с иммобилизованным анатоксином увеличивало его комплементарность в отношении антител по типу дополнительного слабоаффинного пептид-белкового взаимодействия. По-видимому, данный специфический шапероноподобный эффект «Стафилолейкина» лежит в основе его иммунокорректирующего действия *in vivo*.

Изучение терапевтического потенциала нового препарата проводили на модели стафилококкового гнойного кератита кроликов и подострого менингоэнцефалита мышей.

При оценке потенциала «Стафилолейкина» в терапии язвенных поражений роговицы стафилококковой этиологии через трое суток лечения была отмечена заметная (значимая по баллам) разница тяжести воспалительного процесса в опытной и контрольной группах животных. К концу недели в половине глаз опытной группы признаки воспаления исчезли, тогда как в контрольной у всех животных имел место воспалительный процесс. На девятые сутки в глазах опытной группы воспалительный процесс был завершен, а в контрольной - у всех животных отмечались его слабо выраженные признаки. Через две недели в опытной группе образовались легкие помутнения со слабо заметными новообразованными сосудами. В контрольной – отмечались грубые помутнения с выраженными новообразованными сосудами, что свидетельствовало о большей тяжести прошедшего воспалительного процесса. Таким образом, инстилляцией «Стафилолейкина» в конъюнктивальный мешок на неделю, по сравнению с контролем, ускоряли заживление при значимом различии балльных оценок.

Изучение иммуноспецифической активности «Стафилолейкина» в переносе антистафилококковой резистентности на модели подострого менингоэнцефалита у мышей показало, что введение «Стафилолейкина» за неделю до заражения защищало в разных опытах от 20 до 25% животных (отличие от контроля было незначимо). Однако инъекция «Стафилолейкина» за 1 день до заражения защищала в трёх опытах 30 – 60% мышей. В двух опытах со «Стафилолейкином» выжили 55 и 60% мышей ($p < 0,025$). Наибольшую протективную активность (70 – 80% выживших мышей, $p < 0,01$) проявлял «Стафилолейкин» при введении в мозг в одном шприце с заражающей дозой (табл. 3).

Одним из важнейших этапов лабораторно-экспериментальных исследований нового препарата является изучение острой и хронической токсичности. Было установлено, что введение «Стафилолейкина» не вызвало падения массы тела животных и не тормозило её физиологическое увеличение с возрастом. Ни одно животное не погибло, и не было замечено каких-либо симптомов интоксикации. Более того, ежедневное введение препарата «Стафилолейкин» в течение 20 дней не только не привело к замедлению физиологического нарастания веса животных, но и в группе самок вызвало тенденцию к ускорению привеса в последнюю неделю наблюдения. Гистологические исследования, проведенные при изучении острой и хронической токсичности препарата «Стафилолейкин», не выявили каких-либо патологических изменений внутренних органов.

Перенос противостафилококковой резистентности на модели подострого стафилококкового менингоэнцефалита у мышей

Введение	Опытная группа (процент выживаемости)	Контрольная группа (процент выживаемости)
За 7 дней до заражения	20 – 25	10 – 16
За 1 день до заражения	30 – 60	11 – 18
Одновременно с заражающей дозой	70 – 80	13 – 20

В экспериментах на кроликах была установлена апирогенность полученных серий «Стафилолейкина». Общая сумма максимальных изменений температуры (без учета знаков) у всех животных не превышала 0,5° С.

Ни одна из 4 серий разработанного препарата не дала показатель миелостимулирующей активности (ПМА), превышающий 2,0, то есть, миелостимулирующая активность 100 мкг «Стафилолейкина» была ниже активности 20 мкг нуклеината натрия. Эти данные свидетельствуют о безопасности препарата по данному показателю.

«Стафилолейкин» не вызывал у мышей признаков воспаления, кроме зависимого от дозы увеличения регионарного к месту введения (пахового) лимфоузла. Это увеличение – лимфопролиферативная реакция, обусловленная предсуществующей стафилококковой колонизацией мышей, находящихся в конвенциональном микробиологическом статусе, воспроизводилось лишь у некоторых партий животных, и было интерпретировано как проявление специфической, а не как неспецифической провоспалительной активности препарата.

Проведенные исследования показали, что «Стафилолейкин» обладает иммуносpezifической активностью в переносе (индукции) иммунореактивности в отношении стафилококкового белка А, в переносе (индукции) противостафилококковой резистентности на модели подострого стафилококкового менингоэнцефалита у мышей и при иммунотерапии стафилококкового гнойного кератита у кроликов. Разработанная технология позволяет получать апирогенный препарат. «Стафилолейкин» в дозах, многократно превышающих расчётные для человека, не проявляет ни острой, ни хронической токсичности, ни провоспалительного, ни миелостимулирующего действия. Результаты выполненных экспериментально-лабораторных исследований могут быть рассмотрены как предпосылка для последующих клинических испытаний «Стафилолейкина» при иммунотерапии хронической, устойчивой к антибиотикам, очаговой и септической стафилококковой инфекции.

ВЫВОДЫ

1. Разработан оригинальный способ получения низкомолекулярных антигенспецифичных цитокинов из осадка Б – отхода серийного производства противостафилококкового иммуноглобулина. Способ универсален и перспективен для получения цитокиновых препаратов различной направленности из отходов производства специфических иммуноглобулиновых препаратов (против гепатита В, против клещевого энцефалита и др.).
2. Разработаны состав и технология лиофилизированной лекарственной формы «Стафилолейкина». Установленный срок годности препарата составляет 36 месяцев при температуре хранения $(6\pm 2) ^\circ\text{C}$.
3. Проведена стандартизация и разработана спецификация на лекарственную форму препарата «Стафилолейкин» - лиофилизат комплекса полипептидов молекулярной массы 5 – 8 кДа с концентрацией белка не более 50 мкг/мл, содержащем одну единицу активности в ампуле. Составлены нормативные документы (лабораторный регламент, проект ФСП).
4. Специфическая активность полученных экспериментально-производственных образцов препарата доказана в тестах переноса гиперчувствительности замедленного типа, а также в иммуноферментном анализе по увеличению аффинности противостафилококковых антител.
5. Установлена иммунотерапевтическая активность «Стафилолейкина» в эксперименте: препарат способствовал излечению стафилококкового гнойного кератита у кроликов и защищал мышей от подострого стафилококкового менингоэнцефалита. «Стафилолейкин» не обладает пирогенными свойствами, ни острой и ни хронической токсичностью, не проявляет провоспалительного действия, не вызывает активации миелопоэза, индуцирует противостафилококковый клеточный иммунитет. Результаты проведенных исследований являются обоснованием для проведения I фазы клинических испытаний.

Статьи по теме диссертации

1. **Нарушение иммунологической памяти на АКДС – вакцинацию вследствие перинатального ВИЧ-контакта и антиретровирусной химиопрофилактики: коррекция Аффинолейкином / М.Н. Кузьмина, Е.В., Чепрасова, Т.М. Афанасьева // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. - 2010. - №6 (55). - С. 54 - 62.**
2. Попытка иммунокоррекции Аффинолейкином нарушений ревакцинаторного ответа на АКДС у ВИЧ-негативных детей, рожденных ВИЧ-инфицированными матерями после антиретровирусной химиопрофилактики / М.Н. Кузьмина, Т.М. Афанасьева, А.Н. Мац [и др.] // Биопрепараты. – 2010. - № 4 (40). - С. 26 - 35.
3. Антигенспецифичная цитокиновая активность низкомолекулярного субпротеома иммунной плазмы человека как основа создания новых иммунотерапевтических препаратов / В.П. Петровских, А.Н. Мац, Т.М. Афанасьева [и др.] // Вестник Пермской государственной фармацевтической академии - 2012. - № 7. – С. 283 – 286.
4. **Технология получения препарата «Стафилолейкин» из осадка «Б» - отхода производства антистафилококкового донорского иммуноглобулина / Т.М. Афанасьева, В.П. Петровских, А.Н. Мац [и др.] // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. – 2012. – Т. 8, № 1 - С. 27 – 31.**
5. «Стафилолейкин» – новый препарат для профилактики и иммунотерапии стафилококковой инфекции / Т.М. Афанасьева, В.П. Петровских, А.Н. Мац // Материалы конференций молодых ученых. Россия, Москва, Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова Российской академии медицинских наук, 2008-2013 гг. [Электронный ресурс] – 2013. – С. 27 – 42. Режим доступа ISBN 978-5-906223-84-5.
6. **Доклинические исследования нового препарата «Стафилолейкин» / Т.М. Афанасьева, А.Н. Мац, В.П. Петровских [и др.] // Современные проблемы науки и образования. [Электронный ресурс] – 2015. – № 5. Режим доступа URL: www.science-education.ru/128-21513**

Афанасьева Татьяна Михайловна (Россия)

Противостафилококковый препарат «Стафилолейкин»: технология получения, физико-химическая и иммунобиологическая характеристика

Разработана оригинальная технология получения специфического цитокинового препарата «Стафилолейкин» из отхода серийного производства антистафилококкового иммуноглобулина, включающая стадии переосаждения, криодезинтеграции и ступенчатой ультрафильтрации для выделения и очистки низкомолекулярных антигенспецифичных цитокинов. Технология универсальна и перспективна для получения цитокиновых препаратов различной направленности (против гепатита В, против клещевого энцефалита и др.). Препарат, полученный по разработанной технологии, индуцирует противостафилококковый клеточный иммунитет, не обладает токсичностью и миелостимулирующим действием, не вызывает провоспалительной реакции. В эксперименте показана его иммунотерапевтическая активность: «Стафилолейкин» способствует излечению стафилококкового гнойного кератита у кроликов и защищает мышей от подострого стафилококкового менингоэнцефалита. Проведенные доклинические испытания обосновывают возможность применения препарата в качестве лечебно-профилактического средства.

Anti-staphylococcal preparation “Staphyloleikin”: production technology, physico-chemical and immunological characterization.

There has been designed the original technology of the specific cytokine preparation “Staphyloleikin”, obtained from the antistaphylococcal human immunoglobulin mass production wastes which includes stages of precipitation, cryo disintegration and three step ultrafiltration intended for isolation and purification of low molecular weight antigen-specific cytokines. The technology is multipurpose and perspective for the production of cytokine preparations with different specific activities (against hepatitis B, tick borne encephalitis and etc.). The preparation obtained by the designed technology induces anti-staphylococcal cellular immunity, does not possess toxicity and myelopoiesis effect, does not cause pro-inflammatory reaction. The immunotherapeutic activity of the preparation has been shown in the experiment: “Staphyloleikin” facilitates cureing of purulent keratitis in rabbits and protects mice from subacute staphylococcal meningoencephalitis. The preclinical research provides an appropriate opportunity of the use of “Staphyloleikin” as a means of prevention and treatment.