

Фармакокинетика рекомбинантного человеческого фактора некроза опухоли альфа в составе средства доставки

А. В. Батенева*, О. В. Симакова, С. Г. Гамалей, Е. А. Волосникова, Л. Р. Лебедев, 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
ул. Химзаводская, д. 9, Бердск, Новосибирская область, 633010, Российская Федерация

Основными проблемами использования фактора некроза опухоли альфа (ФНО-альфа) в противоопухолевой терапии являются его быстрая деградация в кровеносном русле и ограниченная селективность накопления в ткани опухоли. В ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора создана биodeградируемая молекулярная конструкция, обеспечивающая защиту от протеаз и адресную доставку белков в ткань опухоли. На основе этой конструкции разработан противоопухолевый препарат, содержащий рекомбинантный ФНО-альфа человека (рчФНО-альфа). **Цель работы:** изучить фармакокинетику рчФНО-альфа в средстве доставки при его однократном введении. **Материалы и методы:** препарат рчФНО-альфа в средстве доставки вводили самкам аутбредных мышей ICR (CD-1) однократно внутривенно в двух эффективных противоопухолевых дозах 2,55 мкг и 5,1 мкг на 20 г массы тела. Концентрацию ФНО-альфа в сыворотке крови и супернатантах гомогенатов органов, взятых в разные сроки после введения, определяли иммуноферментным методом. **Результаты:** полученные кривые изменения содержания в крови ФНО-альфа удовлетворительно описывались уравнением для двухчастевой модели без всасывания. Быстрая фаза процесса выведения из крови приходилась на период 0–4 ч, медленная — 4–24 ч. Наиболее высоким удельное содержание белка было в ткани кожи, селезенке и почках. Расчет фармакокинетических параметров указал на то, что наиболее высокие значения тканевой доступности f_T были установлены для почек и кожи; более длительно (в соответствии с данными *MRT*) препарат удерживался в почках, печени и коже. Процесс элиминации препарата в основном завершался к концу первых суток после введения.

Выводы: рчФНО-альфа в средстве доставки при однократном внутривенном введении мышам в диапазоне эффективных доз быстро элиминировался из крови и распределялся по тканям внутренних органов. Основными органами распределения препарата являлись кожа, почки и селезенка. Процесс элиминации препарата из крови носил двухфазный характер и в основном завершался к концу первых суток.

Ключевые слова: фармакокинетика; фактор некроза опухоли альфа; молекулярная конструкция; аутбредные мыши; средства доставки

Для цитирования: Батенева АВ, Симакова ОВ, Гамалей СГ, Волосникова ЕА, Лебедев ЛР, Даниленко ЕД. Фармакокинетика рекомбинантного человеческого фактора некроза опухоли альфа в составе средства доставки. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2019;19(3):169–177. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-3-169-177>

***Контактное лицо:** Батенева Алена Владимировна; bateneva_av@vector.nsc.ru

Pharmacokinetics of Recombinant Human Tumor Necrosis Factor Alpha in the Delivery System

A. V. Bateneva*, O. V. Simakova, S. G. Gamaley, E. A. Volosnikova, L. R. Lebedev, E. D. Danilenko

Institute of Medical Biotechnology of the Federal Budgetary Research Institution
«State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector»,
9 Khimzavodskaya St., Berdsk, Novosibirsk oblast 633010, Russian Federation

The main problems of using TNF-alpha in antitumor therapy are its rapid degradation in the bloodstream and the limited selectivity of accumulation in the tumor tissue. The SRC VB «Vector» developed a biodegradable molecular construct that provides protection against proteases and ensures targeted delivery of proteins to the tumor tissue. This construct was used to create an antitumor drug containing recombinant human TNF-alpha (rhTNF-alpha). **The aim of the study** was to analyse rhTNF-alpha pharmacokinetics in the delivery system after a single administration. **Materials and methods:** the rhTNF-alpha drug carried by the delivery system was intravenously administered to female outbred ICR (CD-1) mice only once at two effective antitumor doses, 2.55 µg and 5.1 µg / 20 g of body weight. The concentration of TNF-alpha in the serum and supernatants of organ homogenates, obtained at different time points after administration, was analysed by immunoenzyme assay. **Results:** the obtained curves of TNF-alpha concentration in the blood were satisfactorily described by the equation for the two-compartment model without absorption. The rapid phase of elimination from the blood took 0–4 h, the slow one — 4–24 h. The highest specific content of protein was observed in the skin, spleen, and kidneys tissue. The calcula-

tion of pharmacokinetic parameters demonstrated that the highest values of tissue availability f_T were obtained for the kidneys and skin; the drug was retained for longer periods of time in the kidneys, liver and skin (according to the *MRT* data). As a rule, complete elimination of the drug was observed by the end of the first day after administration. **Conclusions:** rhTNF-alpha carried by the delivery system was quickly eliminated from the blood and distributed in the internal organ tissues after a single intravenous administration to mice in the effective doses range. The main organs in which rhTNF-alpha was distributed were skin, kidneys, and spleen. The elimination of the drug from the blood was a two-phase process which was generally over by the end of the first day.

Key words: pharmacokinetics; tumor necrosis factor alpha; molecular construct; outbred mice; delivery system

For citation: Bateneva AV, Simakova OV, Gamaley SG, Volosnikova EA, Lebedev LR, Danilenko ED. Pharmacokinetics of recombinant human tumor necrosis factor alpha in the delivery system. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2019;19(3):169–177. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-3-169-177>

Corresponding author: Alena V. Bateneva; bateneva_av@vector.nsc.ru

Поиск эффективных средств и способов лечения онкологических заболеваний является одной из актуальных задач современной медицины. Иммуноterapia, в частности цитокиноterapia, приобретает все большую значимость среди методов лечения злокачественных новообразований. Среди цитокинов можно выделить фактор некроза опухоли альфа (ФНО-альфа), интерес к которому связан с наличием выраженных противоопухолевых свойств — способностью оказывать цитотоксическое действие на опухолевые клетки, повреждать опухолевые сосуды, вызывать геморрагический некроз широкого спектра опухолей, активировать иммунный противоопухолевый ответ [1–3]. Однако быстрая деградация белка в кровеносном русле, а также ограниченная селективность накопления белка в ткани опухоли обуславливают необходимость его многократных инъекций для поддержания эффективной дозы. При этом системное введение ФНО-альфа в высоких дозах сопровождается разнообразными токсическими эффектами (гипотензия, почечная недостаточность, повышение свертываемости крови и т. д.) [4, 5], что ограничивает использование препарата в клинической практике. Одним из возможных способов решения данной проблемы является создание транспортных форм для адресной доставки ФНО-альфа к клеткам-мишеням. Использование этих систем позволяет повысить стабильность молекулы белка в кровеносном русле, усилить противоопухолевую активность за счет уменьшения деградации и более интенсивного накопления в ткани опухоли, снизить системную токсичность за счет введения более низких доз по сравнению со свободным белком [6–11].

В качестве средства для транспортировки белков группой ученых ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора была разработана и исследована двухслойная молекулярная конструкция. В центральной части конструкции, ядре, содержится полинуклеотидный материал, представленный двуспиральной РНК из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и покрытый оболочкой из конъюгата спермидин-полиглюкин (декстран) [12, 13]. Все компоненты данной конструкции обладают способностью к биodeградации, биологической активностью и низкой токсичностью. Самосборка конструкции осуществляется за счет разнополярного ионного взаимодействия между ее компонентами. В дальнейшем разработанный метод был использован

для получения частицы, несущей на своей поверхности рекомбинантный человеческий ФНО-альфа (рчФНО-альфа) [14–16]. В экспериментах на мышах было показано, что рчФНО-альфа в составе частицы был менее токсичным, чем свободный белок. В ходе изучения противоопухолевой активности было показано торможение роста опухоли у мышей в дозах в 10–100 раз меньших, чем после инъекций ФНО-альфа. Эффект был обусловлен более длительной циркуляцией препарата в крови и более интенсивным его накоплением в ткани опухоли в ранние сроки после введения [17–19].

Цель работы — изучить фармакокинетику лекарственной формы рекомбинантного человеческого ФНО-альфа в составе средства доставки при однократном внутривенном введении мышам в диапазоне эффективных противоопухолевых доз.

Материалы и методы

Для изучения фармакокинетики использовали препарат готовой лекарственной формы рчФНО-альфа в средстве доставки, лиофилизат для приготовления раствора для внутривенного введения производства Института медицинской биотехнологии (ИМБТ) ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Содержание ФНО-альфа в препарате составило 0,16 мг/мл, дсРНК — 0,09 мг/мл, специфическая (цитолитическая) активность — $3,1 \cdot 10^6$ МЕ/мл, в качестве наполнителя использовали D-маннит в концентрации 47,4 мг/мл. Серия препарата была аттестована в лаборатории контроля качества ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора на соответствие проекту нормативной документации.

В основу дизайна исследования были положены методические рекомендации по проведению фармакокинетики лекарственных средств¹. Исследование проводили на здоровых самках белых аутбредных мышей ICR (CD-1) с массой тела 18–22 г. Животные были получены из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора и прошли период адаптационного карантина. До начала и в ходе эксперимента мыши содержались в стандартных условиях вивария при естественном освещении на сбалансированном пищевом рационе со свободным доступом к корму и воде. Условия содержания и ухода за животными соответствовали действующим нормативным документам². Все манипуляции с животными проводили согласно Протоко-

¹ Методические рекомендации по проведению доклинических исследований фармакокинетики лекарственных средств. В кн.: Миронов АН, ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К; 2012. С. 845–855.

Оценка фармакокинетики и проявлений токсических эффектов. В кн.: Миронов АН, ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 2. М.: Гриф и К; 2012. С. 252–3.

² СП 2.2.1.3218-14 от 29 августа 2014 г. № 51 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)».

ГОСТ 33215-2014 Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур.

ГОСТ 33216-2014 Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами.

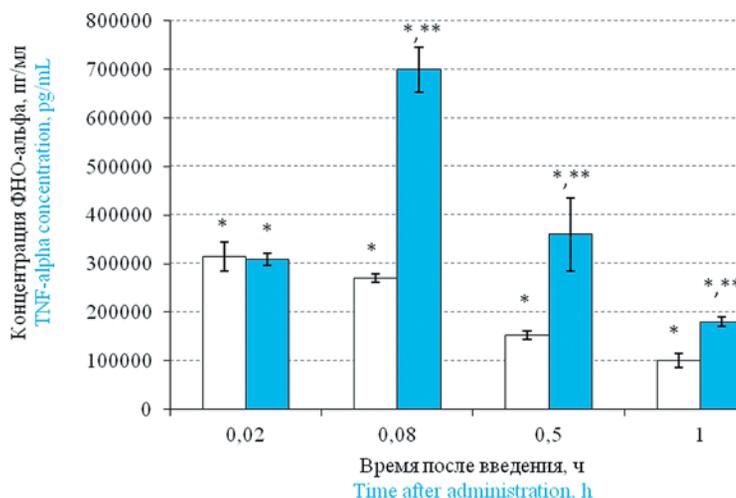


Рис. 1. Динамика изменения концентрации ФНО-альфа в сыворотке крови мышей в течение 1 ч после однократного внутривенного введения препарата рчФНО-альфа. □ — минимальная эффективная доза (ЭД_{min}); ■ — максимальная эффективная доза (ЭД_{max}).

* статистически значимое отличие от контроля; ** статистически значимое отличие от группы ЭД_{min}, $p \leq 0,05$.

Fig. 1. Dynamic pattern of TNF-alpha concentration in the serum of mice within 1 h after a single intravenous administration of the rhTNF-alpha drug. □ — minimum effective dose (ED_{min}); ■ — maximum effective dose (ED_{max}).

* statistically significant difference from control; ** statistically significant difference from group ED_{min}, $p \leq 0.05$.

лу-заявке № 62 от 12.09.2016 на работу с лабораторными животными, утвержденному Биоэтической комиссией ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Исследование было выполнено согласно основным регулирующим стандартам в области надлежащей лабораторной практики³.

Самки мышей были разделены на группы: 2 опытные (по 30 особей в каждой группе) и 2 контрольные (по 5 особей); по критерию массы тела, разброс показателя которой внутри группы не должен превышать 10%. Препарат вводили животным однократно внутривенно (в хвостовую вену). Дозы препарата были выбраны из диапазона эффективных доз, установленных при изучении противоопухолевой активности. Мышам первой опытной группы вводили препарат в минимальной эффективной дозе (ЭД_{min}) — 2,55 мкг белка ($5 \cdot 10^4$ МЕ) на 20 г веса мыши. Мышам второй опытной группы вводили максимальную эффективную дозу (ЭД_{max}) — 5,1 мкг белка ($1 \cdot 10^5$ МЕ) на 20 г веса мыши. Контрольные животные получали внутривенные инъекции физиологического раствора.

Через 0,02 (1 мин), 0,08 (5 мин), 0,5 (30 мин), 1, 4 и 24 ч после внутривенного введения препарата рчФНО-альфа (опытные группы) и через 4 ч после введения физиологического раствора (группа контроля) у мышей забирали на анализ образцы крови, внутренних органов (печень, почки, селезенка), ткань мышцы и кожи. Органы и ткани взвешивали. Образцы забирали у 5 животных в группе на каждый срок исследования. Выбор периферических тканей осуществляли таким образом, чтобы среди объектов были ткани, отличающиеся по степени васкуляризации. Из образцов крови получали сыворотку путем centrifугирования при 3000 об/мин, 4 °C в течение 15 мин. Сыворотку крови и органы замораживали и хранили при температуре минус 20–25 °C.

Перед анализом образцы органов и тканей размораживали и готовили 10% гомогенаты в охлажденном физиологическом растворе с помощью системы для гомогенизации «Glas-Col»

(США). Гомогенаты centrifугировали при 10000 об/мин, 4 °C в течение 20 мин и отбирали супернатанты для анализа. Концентрацию ФНО-альфа в образцах сыворотки крови и супернатантах гомогенатов определяли твердофазным иммуноферментным методом с помощью коммерческих наборов реагентов «альфа-ФНО-ИФА-БЕСТ» (АО «Вектор-Бест», р.п. Кольцово, Новосибирская область) согласно инструкции по применению.

Полученные результаты обрабатывали с помощью пакета программ «Statgraphics, Vers. 5.0» (Statistical Graphics Corp., США). Рассчитывали следующие параметры описательной статистики: среднюю арифметическую величину, дисперсию, стандартное отклонение, минимальное и максимальное значения, размах, коэффициенты асимметрии (Skewness) и эксцесса (Kurtosis), медиану, стандартную ошибку. В связи с малыми объемами выборок для оценки значимости межгрупповых различий применяли непараметрический *H*-критерий Краскела-Уоллиса. При обнаружении статистически значимых различий проводили сравнения с помощью двухвыборочного *U*-критерия Манна-Уитни. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез (*p*) принимали равным 0,05. Экспериментальные данные представлены в виде средней арифметической величины и стандартной ошибки.

На основании полученных результатов количественного определения ФНО-альфа проводили проверку гипотезы линейности путем регрессионного анализа и расчет фармакокинетических параметров с использованием метода частных моделей [17]. Характеристику распределения ФНО-альфа по органам описывали согласно рекомендациям по анализу данных фармакокинетики⁴ путем расчета следующих параметров: AUC_{0-24} — площадь под кривой «концентрация–время» в интервале 0–24 ч методом наименьших квадратов; *MRT* — среднее время удержания препарата в организме; f_1 — тканевая доступность.

³ Приказ Минздрава России от 01.04.2016 № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики».

ГОСТ 33044-2014 Принципы надлежащей лабораторной практики.

⁴ Методические рекомендации по проведению доклинических исследований фармакокинетики лекарственных средств. В кн.: Миронов АН, ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К; 2012. С. 845–855.

Таблица 1. Содержание ФНО-альфа в сыворотке крови мышей после однократного внутривенного введения препарата рчФНО-альфа

Table 1. TNF-alpha concentration in the serum of mice after a single intravenous administration of the rhTNF-alpha drug

Время после инъекции, ч Time after injection, h	Содержание ФНО-альфа TNF-alpha concentration			
	ЭД _{мин} ED _{min}		ЭД _{макс} ED _{max}	
	Концентрация, пг/мл Concentration, pg/mL	% от введенной дозы % of administered dose	Концентрация, пг/мл Concentration, pg/mL	% от введенной дозы % of administered dose
0,02	314 586 ± 30 088 ^a	12,3	309 369 ± 12 152 ^a	6,1
0,08	269 889 ± 8233 ^a	10,6	699 648 ± 46 714 ^{a,b}	13,7
0,5	152 197 ± 8884 ^a	6,0	360 258 ± 75 371 ^{a,b}	7,1
1	100 801 ± 14 422 ^a	4,0	180 406 ± 9936 ^{a,b}	3,5
4	166 ± 19 ^a	0,007	1015 ± 181 ^{a,b}	0,020
24	3,48 ± 1,59	0,0001	6,09 ± 2,74	0,0001

Примечание. ЭД_{мин} — минимальная эффективная доза; ЭД_{макс} — максимальная эффективная доза.

^a Статистически значимое отличие от контроля; ^b статистически значимое отличие от группы ЭД_{мин}, $p \leq 0,05$.

Note. ED_{min} — minimum effective dose; ED_{max} — maximum effective dose.

^a Statistically significant difference from control; ^b statistically significant difference from group ED_{min}, $p \leq 0.05$.

Результаты и обсуждение

Динамика изменения концентрации ФНО-альфа в сыворотке крови мышей после однократного внутривенного введения препарата рчФНО-альфа в средстве доставки представлена на рисунке 1 и в таблице 1.

Анализ полученных данных показал, что в первой точке (через 1 мин после введения) содержание ФНО-альфа в крови мышей, получавших ЭД_{мин} препарата, было максимальным из зарегистрированных в этой группе. Концентрация белка была равна 314586 пг/мл и составляла 12,3% от величины введенной дозы (рис. 1, табл. 1). В дальнейшем наблюдалось снижение уровня ФНО-альфа в крови: в период 0,08–1 ч в 1,2–3,1 раза, через 4 ч — в 1895 раз, а через 24 ч показатель снижался до значения контрольной группы (в контроле — 4,66 ± 0,39 пг/мл).

Несколько иной была динамика показателя в группе мышей после введения препарата в ЭД_{макс}. Концентрация белка

в крови, взятой через 1 мин после введения препарата, была равна 309369 пг/мл, что составило 6,1% от введенной дозы препарата. Максимальное из зарегистрированных значение содержания белка в крови мышей данной группы наблюдалось через 5 мин и составляло 699648 пг/мл (13,7% от введенного). Такая динамика, на наш взгляд, свидетельствует о возможности быстрого проникновения и распределения препарата рчФНО-альфа в органах и тканях в первые минуты после введения с последующим обратным выходом в кровеносное русло. В последующие сроки, через 0,5 и 1 ч после введения, происходило снижение показателя в 1,9 и 3,9 раза соответственно относительно максимального значения. К концу четырехчасового периода наблюдения концентрация ФНО-альфа в сыворотке крови мышей второй опытной группы составляла 1015 пг/мл белка, к концу первых суток статистически не отличалась от контроля 4,66 ± 0,39 пг/мл.

Тот факт, что повышенный уровень ФНО-альфа в крови животных сохраняется в течение по меньшей мере 4 ч после

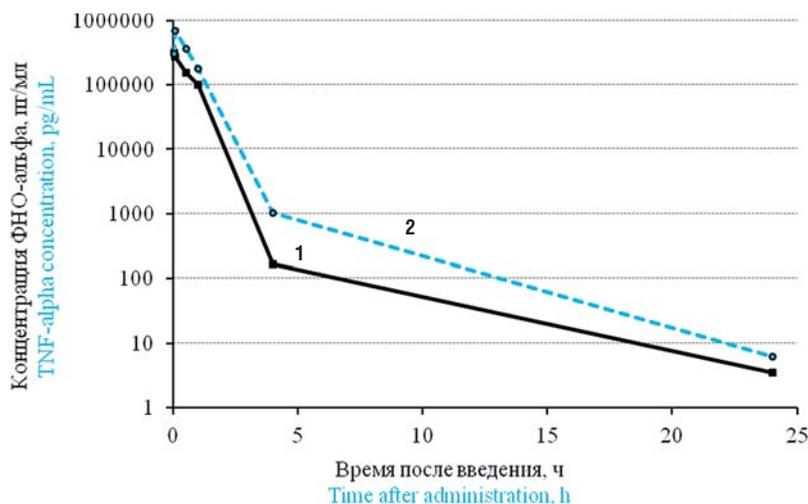


Рис. 2. Зависимость концентрации ФНО-альфа в сыворотке крови мышей от времени после однократного внутривенного введения препарата рчФНО-альфа (в полулогарифмических координатах). 1 — минимальная эффективная доза (ЭД_{мин}); 2 — максимальная эффективная доза (ЭД_{макс}).

Fig. 2. TNF-alpha concentration in the serum of mice as a function of time after a single intravenous administration of rhTNF-alpha (in semi-logarithmic coordinates). 1 — minimum effective dose (ED_{min}); 2 — maximum effective dose (ED_{max}).

введения препарата рЧФНО-альфа, согласуется с результатами, полученными нами ранее [17]. Согласно этим данным, внутривенное введение мышам ФНО-альфа в составе средства доставки приводило к повышению его уровня и удлинению периода циркуляции в кровеносном русле по сравнению со свободным ФНО-альфа. На наш взгляд, одним из возможных объяснений является то, что ФНО-альфа в средстве доставки является более устойчивым к протеазам крови.

Полученные данные зависимости концентрации ФНО-альфа в крови мышей от времени не удалось линеаризовать в полулогарифмических координатах (рис. 2). Однако экспериментальные точки удовлетворительно аппроксимировались уравнением, описывающим двухчастевую линейную модель без всасывания:

$$C(t) = A_1 e^{-\alpha t} + A_2 e^{-\beta t}, \quad (1)$$

где $C(t)$ — концентрация ФНО-альфа в сыворотке крови мышей в момент времени t , пг/мл;

A_1 и A_2 — количество ФНО-альфа, которое выводится из 1 мл сыворотки крови, соответственно, в первой и второй фазах процесса элиминации, пг/мл;

α и β — комплексные параметры, пропорциональные константе скорости выведения препарата в первой и второй стадиях процесса;

e — основание натурального логарифма (2,71828).

Анализ экспериментальных данных показал, что кинетика процесса выведения препарата из кровеносного русла характеризуется наличием быстрой (0–4 ч) и медленной (4–24 ч) фаз (рис. 2). Основная часть препарата элиминировалась в течение первых 4 ч после введения — 99,99 и 99,98 % при введении ЭД_{мин} и ЭД_{макс} соответственно. Формы фармакокинетических кривых после введения обеих доз существенно не отличались друг от друга.

Фармакокинетические параметры, рассчитанные с помощью уравнения (1), приведены в таблице 2.

Расчеты показали, что количество препарата, которое выводилось из крови в быстрой фазе процесса (A_1), различалось для ЭД_{мин} и ЭД_{макс} в 2 раза. В медленной фазе (A_2) процесса количество выводимого препарата в группе при введении ЭД_{макс} было в 7,8 раза больше.

Время полураспределения $t_{1/2}^{\alpha}$ в обеих группах было меньше времени полувыведения $t_{1/2}^{\beta}$ из крови, т. е. препарат довольно

Таблица 2. Расчетные фармакокинетические параметры препарата рЧФНО-альфа
Table 2. Calculated pharmacokinetic parameters of the rhTNF-alpha drug

Исследуемый параметр, размерность Tested parameter, units	Краткое обозначение Symbol	Расчетная величина Calculated value	
		ЭД _{мин} ED _{min}	ЭД _{макс} ED _{max}
Площадь под кривой «концентрация–время», пг·ч/мл Area under the curve, pg·h/mL	AUC_{0-24}	351 213	724 453
Количество препарата, которое выводится в быстрой фазе (α-фаза), пг/мл Amount of drug eliminated during the rapid phase (α-phase), pg/mL	A_1	994 031	1 990 673
Количество препарата, которое выводится в медленной фазе (β-фаза), пг/мл Amount of drug eliminated during the slow phase (β-phase), pg/mL	A_2	360	2824
Комплексный параметр, пропорциональный константе скорости элиминации в быстрой фазе, ч ⁻¹ Complex parameter proportional to the elimination rate constant in the rapid phase, h ⁻¹	α	3,77	4,09
Комплексный параметр, пропорциональный константе скорости элиминации в медленной фазе, ч ⁻¹ Complex parameter proportional to the elimination rate constant in the slow phase, h ⁻¹	β	0,193	0,256
Время полураспределения препарата, ч Drug distribution half-life, h	$t_{1/2}^{\alpha}$	0,184	0,169
Время полувыведения препарата, ч Drug elimination half-life, h	$t_{1/2}^{\beta}$	3,59	2,71
Константа скорости выведения из центральной камеры (1) в камеру (2), ч ⁻¹ Elimination rate constant from central compartment (1) to compartment (2), h ⁻¹	k_{12}	0,024	0,080
Константа скорости выведения из периферической камеры (2) в камеру (1), ч ⁻¹ Elimination rate constant from peripheral compartment (2) to compartment (1), h ⁻¹	k_{21}	0,194	0,261
Константа скорости элиминации препарата, ч ⁻¹ Elimination rate constant, h ⁻¹	k_{el}	3,75	4,01
Стационарный объем распределения, мл Steady-state volume of distribution, mL	V_{ss}	2,88	3,34
Общий клиренс, мл/ч Total body clearance, mL/h	Cl_T	9,6	10,3

Примечание. ЭД_{мин} — минимальная эффективная доза; ЭД_{макс} — максимальная эффективная доза.
Note. ED_{min} — minimum effective dose; ED_{max} — maximum effective dose.

быстро выводился из крови в α -фазе процесса и медленно покидал русло крови в β -фазе. Время полураспределения $t_{1/2}^{\alpha}$ при введении обеих доз препарата было практически одинаковым, в то время как время полувыведения $t_{1/2}^{\beta}$ при введении дозы ЭД_{мин} было большим (на 0,88 ч, или 52 мин) по сравнению с показателем в группе с введением ЭД_{макс}.

Значения стационарного объема распределения препарата V_{ss} не превышали объем внеклеточной жидкости животного (около 20% массы тела), а константы скорости проникновения препарата из крови и высокоvascularизированных тканей (условно отнесенных к «центральной камере») в периферические ткани («периферическая камера») k_{12} были в несколько раз ниже константы скорости обратного выведения k_{21} . Эти данные свидетельствуют о слабом накоплении препарата в периферических тканях.

Константы скорости элиминации k_{el} значительно превосходили константы скорости выведения из центральной камеры k_{12} , что позволяет сделать заключение о преобладании процесса элиминации из организма над проникновением препарата в периферические ткани.

Полученные данные свидетельствуют о том, что дозы введенного препарата мало влияли на характер выведения препарата из организма мышей, что подтверждают фармакокинетические кривые (рис. 2).

В результате проверки гипотезы линейности было установлено, что свободный член уравнения линейной регрессии площади под кривой «концентрация–время» незначимо отличается от нуля ($p = 0,0112$), что позволяет сделать вывод о линейности фармакокинетики препарата в диапазоне использованных доз (рис. 3).

Данные распределения ФНО-альфа по органам и тканям представлены в таблице 3.

Анализ результатов показал, что удельное содержание ФНО-альфа в органах зависело от его дозы: уровень показателя в группе мышей, получавших большую дозу препарата, в основном был выше (табл. 3). Лишь в ткани мышцы значения показателя статистически не отличались от уровня фона на протяжении всего периода наблюдения, что свидетельствует об отсутствии у препарата способности к накоплению в скелетных мышцах после однократного внутривенного введения (данные не приведены).

Максимальное содержание ФНО-альфа после введения препарата в обеих дозах было обнаружено в исследуемых органах в основном в период с 0,08 до 0,5 ч. В последующие

сроки значение показателя постепенно снижалось и к концу наблюдения приближалось к контрольному (фоновый уровень). Исключением были почки и печень, где концентрация белка в конечной точке наблюдения после введения ЭД_{макс} все еще превышала контрольное значение в 5,4 и 2,7 раза соответственно.

Динамика распределения ФНО-альфа в органах имела некоторые особенности в зависимости от дозы препарата. Так, в ткани почек животных группы ЭД_{мин} величина показателя колебалась в пределах 169–302 пг/г ткани в течение 4 ч после введения. В группе животных, получавших ЭД_{макс}, в этот же период содержание ФНО-альфа в почках было примерно в два раза выше (267–680 пг/г ткани). Максимальные уровни ФНО-альфа в ткани кожи мышей второй опытной группы были отмечены в течение первого часа после введения (1793–2672 пг/г ткани) и превышали показатели первой группы в 8,6–14,6 раза. Удельное содержание белка в селезенке в течение первого часа наблюдения в группе ЭД_{макс} было выше, чем после введения ЭД_{мин}, в 2,0–2,3 раза. В печени мышей первой опытной группы в период с 0,08 до 1 ч были обнаружены незначительные количества введенного ФНО-альфа, в то время как у животных второй группы уровень показателя в этот срок статистически значимо отличался от контроля.

Таким образом, анализ динамики распределения ФНО-альфа по тканям внутренних органов после введения препарата рчФНО-альфа показал, что наиболее высоким был уровень его накопления тканями селезенки, почек и кожи в течение первого часа после введения.

Это заключение было подтверждено рассчитанными фармакокинетическими параметрами, отражающими суммарную концентрацию, интенсивность проникновения и длительность удержания препарата периферическими тканями (табл. 4).

При сравнительном анализе оказалось, что показатель суммарной концентрации AUC_{0-24} в органах в целом отражает прямую зависимость от дозы введенного препарата, хотя в ткани почек при введении большей дозы уровень параметра на 16% ниже, что отразилось и на показателе тканевой доступности f_T .

Среднее время удержания препарата в крови MRT оказалось невысоким и составило 0,64 ч (38 мин) для обеих доз. В селезенке и коже этот показатель снижался при увеличении дозы рчФНО-альфа в 2 и 1,4 раза соответственно. Длительность удержания препарата почками составила 6–9 ч, тканью кожи — 2,5–3,6 ч. Наименьшее и наибольшее время присут-

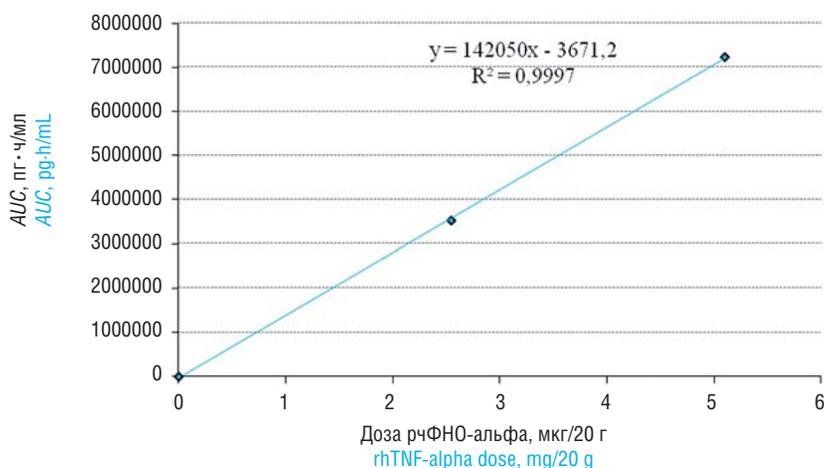


Рис. 3. Зависимость AUC_{0-24} от дозы рчФНО-альфа в системе доставки. AUC — площадь под кривой «концентрация–время».
 Fig. 3. AUC_{0-24} as a function of rhTNF-alpha dose in the delivery system. AUC — area under the curve.

Таблица 3. Удельное содержание ФНО-альфа (пг/г ткани) в органах и тканях мышей в разные сроки после однократного внутривенного введения препарата рчФНО-альфа

Table 3. Specific content of TNF-alpha (pg/g of tissue) in organs and tissues of mice at different time points after a single intravenous administration of the rhTNF-alpha drug

Орган/ Ткань Organ/ Tissue	Содержание ФНО-альфа (пг/г ткани) в органах и тканях мышей контрольных групп TNF-alpha content (pg/g of tissue) in organs and tissues of mice from the control groups	Доза препарата Drug dose	Содержание ФНО-альфа (пг/г ткани) в органах и тканях мышей опытных групп через ... ч TNF-alpha content (pg/g of tissue) in organs and tissues of mice from the treatment groups after ... h					
			0,02	0,08	0,5	1	4	24
Селезенка Spleen	2,00 ± 1,23	ЭД _{ED_{min}} ^{min}	127 ± 17 ^a	660 ± 75 ^a	373 ± 33 ^a	191 ± 12 ^a	28,1 ± 2,6 ^a	10,6 ± 5,2
	5,06 ± 3,49	ЭД _{ED_{min}} ^{max}	168 ± 59 ^a	1306 ± 23 ^a	822 ± 163 ^a	447 ± 28 ^a	22,2 ± 6,7 ^a	3,8 ± 2,8
Печень Liver	19,6 ± 15,9	ЭД _{ED_{min}} ^{min}	0	114 ± 36	62,6 ± 33,5	0	7,6 ± 7,1	5,0 ± 5,0
	26,7 ± 13,0	ЭД _{ED_{min}} ^{max}	73,1 ± 29,4	319 ± 50 ^a	213 ± 37 ^a	117 ± 37 ^a	56,7 ± 23,1	71,4 ± 19,2
Почки Kidneys	22,4 ± 13,6	ЭД _{ED_{min}} ^{min}	269 ± 23 ^a	169 ± 27 ^a	302 ± 23 ^a	195 ± 21 ^a	242 ± 36 ^a	52,6 ± 30,4
	18,4 ± 11,4	ЭД _{ED_{min}} ^{max}	267 ± 37 ^a	680 ± 96 ^a	539 ± 38 ^a	446 ± 24 ^a	86,2 ± 20,5 ^a	99,4 ± 16,6 ^a
Кожа Skin	7,96 ± 3,88	ЭД _{ED_{min}} ^{min}	165 ± 10 ^a	312 ± 71 ^a	231 ± 49 ^a	123 ± 16 ^a	134 ± 42 ^a	0
	20,8 ± 10,7	ЭД _{ED_{min}} ^{max}	336 ± 32 ^a	2672 ± 206 ^a	2604 ± 311 ^a	1793 ± 336 ^a	263 ± 121	15,8 ± 15,8

^a Статистически значимые отличия от контроля по U-критерию Манна-Уитни, $p \leq 0,05$.

^a Statistically significant difference from control according to the Mann-Whitney U-test, $p \leq 0,05$.

Таблица 4. Фармакокинетические параметры распределения препарата рчФНО-альфа в крови и тканях внутренних органов мышей

Table 4. Pharmacokinetic parameters of rhTNF-alpha distribution in the blood and internal organ tissues of mice

Орган/Ткань Organ/Tissue	AUC, пг·ч/мл или пг·ч/г AUC, pg·h/mL or pg·h/g		MRT, ч MRT, h		f_T , %	
	ЭД _{ED_{min}} ^{min}	ЭД _{ED_{max}} ^{max}	ЭД _{ED_{min}} ^{min}	ЭД _{ED_{max}} ^{max}	ЭД _{ED_{min}} ^{min}	ЭД _{ED_{max}} ^{max}
Кровь (сыворотка) Blood (serum)	351 213	724 453	0,64	0,64	100	100
Селезенка Spleen	1053	1752	2,8	1,4	0,30	0,50
Печень Liver	44	1675	0,2	11,4	0,013	0,52
Почки Kidneys	3779	3179	6,0	9,0	1,08	0,91
Кожа Skin	3092	11139	3,6	2,5	0,88	3,17

Примечание. AUC — площадь под кривой «концентрация–время»; MRT — среднее время удержания препарата в крови; f_T — тканевая доступность; ЭД_{ED_{min}}^{min} — минимальная эффективная доза; ЭД_{ED_{max}}^{max} — максимальная эффективная доза.

Note. AUC — area under the curve; MRT — mean residence time; f_T — tissue availability; ED_{ED_{min}}^{min} — minimum effective dose; ED_{ED_{max}}^{max} — maximum effective dose.

ствия препарата среди всех исследованных органов было зарегистрировано в печени (0,2 ч для ЭД_{ED_{min}}^{min} и 11,4 ч для ЭД_{ED_{max}}^{max} соответственно).

Расчетные показатели тканевой доступности f_T свидетельствуют о том, что наиболее высокие значения данного параметра были установлены для почек и кожи. Препарат не только сильнее в них накапливался, но и дольше удерживался, о чем свидетельствуют более высокие значения времени удержания MRT. Наименее проницаемой для рчФНО-альфа была ткань печени, при этом значение MRT при введении препарата в ЭД_{ED_{max}}^{max} оказалось наибольшим.

Следует отметить, что процесс элиминации препарата рчФНО-альфа после его однократного введения в исследованных дозах в основном завершился к концу первых суток. Рекомендуемый интервал времени введения препарата, основанный на результатах противоопухолевых исследований, составляет двое суток, что позволяет говорить о низкой вероятности кумуляции препарата в этих условиях. Однако окончательный вывод может быть сделан на основании сопоставления фармакокинетических данных, полученных при одно- и многократном введении препарата, а также результатов токсикологических экспериментов.

Заключение

На основании полученных результатов можно заключить, что препарат рчФНО-альфа в средстве доставки при однократном внутривенном введении в диапазоне эффективных противоопухолевых доз быстро элиминировался из кровеносного русла и распределялся по тканям внутренних органов мышей. Процесс элиминации препарата из крови носит двухфазный характер, при этом формы фармакокинетических кривых при введении двух уровней доз существенно не отличались друг от друга. Основными органами распределения препарата являлись кожа, почки и селезенка. Процесс элиминации препарата после его введения в исследованных дозах в основном завершился к концу первых суток после введения.

Благодарности. Исследование проводилось при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках Федеральной целевой программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу», Государственный контракт № 14.N08.12.0089 от 29.08.2016.

Acknowledgments. The study was carried out with the financial support of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation within the framework of the Federal Target Programme «Development of pharmaceutical and medical industry of the Russian Federation for the period up to 2020 and beyond», State Contract No. 14.N08.12.0089 of August 29, 2016.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interests. Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Литература/References

1. Чубенко ВА. Иммуноterapia на основе цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-2, TNF, KCF, Интерфероны). *Практическая онкология*. 2016;17(2):99–109. [Chubenko VA. Immunotherapy is based on cytokines (IL-1, IL-2, FNO, CSF, IFN). *Prakticheskaya onkologiya = Practical oncology*. 2016;17(2):99–109 (In Russ.)]
2. Kalliolias GD, Ivashkiv LB. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nat Rev Rheumatol*. 2016;12(1):49–62. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2015.169>
3. Roberts NJ, Zhou S, Diaz LA Jr, Holdhoff M. Systemic use of tumor necrosis factor alpha as an anticancer agent. *Oncotarget*. 2011;2(10):739–51. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.344>
4. Tracey KJ, Beutler B, Lowry SF, Merryweather J, Wolpe S, Milsark IW, et al. Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science*. 1986;234(4775):470–4. <https://doi.org/10.1126/science.3764421>
5. Beutler B, Milsark IW, Cerami AC. Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin. *Science*. 1985;229(4716):869–71. <https://doi.org/10.1126/science.3895437>
6. Сысоева ГМ, Даниленко ЕД, Гамалей СГ, Батенева АВ, Романов ВП, Масычева ВИ. Противоопухолевые свойства композиционного препарата фактора некроза опухоли альфа с производными гематопорфирина. *Сибирский онкологический журнал*. 2010;6(42):36–41. [Sysoeva GM, Danilenko ED, Gamalei SG, Bateneva AV, Romanov VP, Masycheva VI. Anti-tumor activity of composite agent comprising tumor necrosis factor alpha with hematoporphyrin derivatives. *Sibirskii onkologicheskii zhurnal = Siberian Journal of Oncology*. 2010;6(42):36–41 (In Russ.)]
7. Лебедев ЛР, Даниленко ЕД, Телегина ЮВ, Зайцев БН. Противоопухолевое средство на основе фактора некроза опухоли с тропностью к костной ткани. *Биомедицинская химия*. 2015;61(5):652–6. [Lebedev LR, Danilenko ED, Telegina YuV, Zaitsev BN. An antitumor osteotropic agent based on tumor necrosis factor. *Biomeditsinskaya khimiya = Biomedical Chemistry*. 2015;61(5):652–6 (In Russ.)] <https://doi.org/10.18097/PBMC20156105652>
8. Сысоева ГМ, Батенева АВ, Лебедев ЛР, Волосникова ЕА, Иванова ОС, Левагина ГМ и др. Исследование цитотоксической активности рекомбинантного фактора некроза опухоли альфа в средствах адресной доставки и модулирующего эффекта интерферона гамма на клетках меланомы В16-F10. *Биофармацевтический журнал*. 2016;8(5):9–14. [Sysoeva GM, Bateneva AV, Lebedev LR, Volosnikova EA, Ivanova OS, Levagina GM, et al. Evaluation of cytotoxic activity of recombinant tumor necrosis factor alpha in targeted delivery devices and modulating effect of interferon gamma in B16-F10 melanoma cells. *Biofarmatsevticheskii zhurnal = Russian Journal of Biopharmaceuticals*. 2016;8(5):9–14 (In Russ.)]
9. Li M, Qin X, Xue X, Zhang C, Yan Z, Han W, et al. Safety evaluation and pharmacokinetics of a novel human tumor necrosis factor-alpha exhibited a higher antitumor activity and a lower systemic toxicity. *Anticancer Drugs*. 2010;21(3):243–51. <https://doi.org/10.1097/CAD.0b013e328333d5ce>
10. Gong J, Tan G, Sheng N, You W, Wang Z. Targeted treatment of liver metastasis from gastric cancer using specific binding peptide. *Am J Transl Res*. 2016;8(5):1945–56.
11. Xu G, Gu H, Hu B, Tong F, Liu D, Yu X, et al. PEG-b-(PELG-g-PLL) nanoparticles as TNF- α nanocarriers: potential cerebral ischemia/reperfusion injury therapeutic applications. *Int J Nanomedicine*. 2017;12:2243–54. <https://doi.org/10.2147/IJN.S130842>
12. Karpenko LI, Lebedev LR, Ignatyev GM, Agafonov AP, Poryvaeva VA, Pronyaeva TR, et al. Construction of artificial virus-like particles exposing HIV epitopes, and the study of their immunogenic properties. *Vaccine*. 2003;21(5–6):386–92. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(02\)00406-1](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(02)00406-1)
13. Лебедев ЛР, Азаев МШ, Туманов ЮВ, Сизов АА, Ильичев АА, Татьков СИ. Искусственные микобактериальные частицы для иммунизации против туберкулеза. *Доклады Академии наук*. 2002;387(2):272–5. [Lebedev LR, Azaev MSh, Tumanov YuV, Sizov AA, Il'ichev AA, Tat'kov SI. Artificial mycobacterial particles for immunization against tuberculosis. *Doklady Akademii Nauk = Reports of the Academy of Sciences*. 2002;387(2):272–5 (In Russ.)]
14. Масычева ВИ, Лебедев ЛР, Даниленко ЕД, Сысоева ГМ, Гамалей СГ. Противоопухолевое средство на основе наночастиц, несущих рекомбинантный фактор некроза опухоли альфа человека. Патент Российской Федерации № 2386447; 2008. [Masycheva VI, Lebedev LR, Danilenko ED, Sysoeva GM, Gamaley SG. Anticancer drug based on nanoparticles bearing recombinant human tumor necrosis factor alpha. Patent of the Russian Federation No. 2386447; 2008 (In Russ.)]
15. Масычева ВИ, Даниленко ЕД, Сысоева ГМ, Батенева АВ, Устименко СЮ, Акулова НИ и др. Конструирование нанобиопрепарата, содержащего фактор некроза опухоли альфа человека. В кн.: *Материалы Пятого международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития»*. М.; 2009. Ч. 1. С. 456. [Masycheva VI, Danilenko ED, Sysoeva GM, Ustimenko SYu, Akulova NI, et al. Construction of the nanobiopreparation containing human tumor necrosis factor alpha. In: *Materials of the fifth International Congress «Biotechnology: State of the Art and prospects of development»*. Moscow; 2009. Part 1. P. 456 (In Russ.)]
16. Даниленко ЕД, Левагина ГМ, Волосникова ЕА, Лебедев ЛР, Сысоева ГМ, Вязовая ЕА. Противоопухолевое средство на основе биodeградируемых наночастиц, не-

- сущих рекомбинантный фактор некроза опухоли альфа человека. Патент Российской Федерации № 2691938; 2018. [Danilenko ED, Levagina GM, Volosnikova EA, Lebedev LR, Sysoeva GM, Vyazovaya EA. Antitumour agent based on biodegradable nanoparticles carrying a recombinant human tumor necrosis factor alpha. Patent of the Russian Federation No. 2691938; 2018 (In Russ.)]
17. Гамалей СГ, Батенева АВ, Сысоева ГМ, Даниленко ЕД, Лебедев ЛР, Масычева ВИ. Фармакокинетика и противоопухолевые свойства препарата, содержащего ФНО- α в составе наночастиц. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2010;149(3):296–9. [Gamaley SG, Bateneva AV, Sysoeva GM, Danilenko ED, Lebedev LR, Masychева VI. Pharmacokinetics and antitumor effects of the drug containing TNF- α in nanoparticles. *Bulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2010;149(3):296–9 (In Russ.)]. <https://doi.org/10.1007/s10517-010-0937-9>
18. Сысоева ГМ, Гамалей СГ, Лебедев ЛР, Нуштаева АА, Даниленко ЕД, Левагина ГМ. Исследование противоопухолевой активности молекулярной конструкции фактора некроза опухоли *in vitro* и *in vivo*. *Медицинская иммунология*. 2015;17(S):425. [Sysoeva GM, Gamaley SG, Lebedev LR, Nushtaeva AA, Danilenko ED, Levagina GM. Study on the antitumor activity of the molecular construct of tumor necrosis factor *in vitro* and *in vivo*. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*. 2015;17(S):425 (In Russ.)]
19. Сысоева ГМ, Зуева ЕП, Попова НА, Каледин ВИ, Симакова ОВ, Гамалей СГ и др. Противоопухолевая эффективность рекомбинантного фактора некроза опухоли альфа человека в системе доставки. *Acta Naturae*. 2017;спецвыпуск:165. [Sysoeva GM, Zueva EP, Popova NA, Kaledin VI, Simakova OV, Gamaley SG, et al. Antitumor efficacy of recombinant human tumor necrosis factor alpha within the delivery system. *Acta Naturae*. 2017;special issue:165 (In Russ.)]
20. Соловьев ВН, Фирсов АА, Филлов ВА, ред. *Фармакокинетика*. М.: Медицина; 1980. [Soloviev VN, Firsov AA, Filov VA, eds. *Pharmacokinetics*. Moscow: Meditsina; 1980 (In Russ.)]

Об авторах / Authors

Батенева Алена Владимировна. Alena V. Bateneva. **ResearcherID:** A-8050-2014

Симакова Ольга Владимировна. Olga V. Simakova. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-1222-7574>

Гамалей Светлана Георгиевна. Svetlana G. Gamaley. **ResearcherID:** B-7418-2014

Волосникова Екатерина Александровна, канд. биол. наук. Ekaterina A. Volosnikova, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-5028-5647>

Лебедев Леонид Рудольфович, д-р мед. наук. Leonid R. Lebedev, Dr. Sci. (Med.). **ResearcherID:** C-8596-2014

Даниленко Елена Дмитриевна, канд. биол. наук. Elena D. Danilenko, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-5026-1602>

Поступила 01.07.2019

После доработки 02.08.2019

Принята к публикации 26.08.2019

Received 1 July 2019

Revised 2 August 2019

Accepted 26 August 2019