

Экспериментальное исследование фармакодинамики моноклональных антител к $\alpha 4\beta 1$ -интегрину на морских свинках

Б. Н. Крапивин, О. В. Гончарова, Е. Л. Морозова

Закрытое акционерное общество «БИОКАД», пос. Любучаны, Чеховский р-н, Московская обл., Россия

Поступила 24.05.2016. Принята к публикации 18.08.2016.

В статье представлен материал по оценке фармакодинамики моноклональных антител к $\alpha 4\beta 1$ -интегрину на морских свинках. Исследовано воздействие препарата на абсолютное содержание лейкоцитов периферической крови после однократного внутривенного введения в трех дозах. Показано, что внутривенное введение препарата в дозах 30, 60 и 120 мг/кг вызывает двукратное повышение содержания лейкоцитов уже в первые сутки после введения, достигая максимальных значений к 6 суткам. Впоследствии к 11–18 суткам, в зависимости от дозы препарата, содержание лейкоцитов постепенно снижается до контрольных значений.

Ключевые слова: моноклональные антитела к $\alpha 4\beta 1$ -интегрину; рассеянный склероз; фармакодинамика; экспериментальные исследования.

Библиографическое описание: Крапивин БН, Гончарова ОВ, Морозова ЕЛ. Экспериментальное исследование фармакодинамики моноклональных антител к $\alpha 4\beta 1$ -интегрину на морских свинках. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2016; 16 (3): 179–181.

Рассеянный склероз — заболевание центральной нервной системы, в основе которого лежит распад миелиновых оболочек (демиелинизация). Основной причиной демиелинизации, вероятно, служат иммунные нарушения, но некоторую роль, возможно, играют также наследственные факторы, факторы окружающей среды и некоторые вирусы [1]. Рассеянный склероз — одно из самых частых неврологических заболеваний. Наиболее высокая распространенность регистрируется в Северной и Центральной Европе, России, Южной Канаде, северной части США. Распространенность рассеянного склероза в этих странах составляет 30–110 случаев на 100000 жителей [2].

На сегодняшний день для лечения ремиттирующего рассеянного склероза одобрен препарат моноклональных антител к $\alpha 4\beta 1$ -интегрину — натализумаб (Тизабри®) [3]. Натализумаб — гуманизированное моноклональное IgG4 антитело к $\alpha 4$ -интегрину адгезионных молекул, экспрессируемых на мембране лимфоцитов, моноцитов и эозинофилов [4]. Было показано, что блокирование $\alpha 4$ -интегрина может предотвратить развитие демиелинизирующих поражений на модели рассеянного склероза мышей [5]. Натализумаб ингибирует взаимодействие $\alpha 4\beta 1$ с VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1) и $\alpha 4\beta 7$ с MAdCAM-1 (mucosal addressin cell adhesion molecule-1) [6]. VCAM-1 и MAdCAM-1 обнаружены на мембране эндотелиальных клеток, и их взаимодействие с $\alpha 4\beta 1$ и $\alpha 4\beta 7$ лейкоцитов приводит к экстравазации последних в очаг воспаления [7]. Натализумаб предотвращает миграцию аутореактивных лейкоцитов из кровеносных сосудов в органы-мишени путем блокирования $\alpha 4$ -компоненты адгезионной молекулы лейкоцитов, уменьшая воспаление. Поскольку VCAM-1 экспрессируется на поверхности цереброваскулярных эндотелиальных клеток, $\alpha 4\beta 1$ является критиче-

ской мишенью натализумаба для предотвращения миграции лейкоцитов в ткани ЦНС при рассеянном склерозе [2].

Изменение миграции лимфоцитов, которое связано с фармакологической активностью натализумаба, было положено в основу данного эксперимента.

Цель данной работы — исследование фармакодинамики селективного ингибитора молекул адгезии по изменению концентрации лейкоцитов в крови морских свинок [8].

Материалы и методы

Животные

Исследование проведено на морских свинках пестрые агути (самцах) массой 260–280 г, полученных из питомника Филиал Андреевка ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Все манипуляции с животными выполняли согласно национальному стандарту РФ ГОСТ Р 53434–2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики».

Введение препарата

Моноклональные антитела к $\alpha 4\beta 1$ -интегрину производства ЗАО «Биокад» вводили однократно внутривенно в дозах 30, 60 и 120 мг/кг в объеме 0,5 мл. Группе контроля в качестве плацебо вводили стерильный 0,9 % физиологический раствор в объеме 0,5 мл. В каждой группе было задействовано по 4 животных.

Исследования крови

Забор крови у морских свинок для гематологического анализа проводили ежедневно интракардиально в течение 21 дня после введения препарата в пробирки с K_3 ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота; MiniCollect® TUBE 0.5 ml; Greiner Bio-One GmbH) в объеме 0,5 мл. Для этого свинку фиксировали в положении лежа на спине, вводили стерильный инсулиновый шприц со съемной иглой в область сердечного толчка. Подсчет количества лейкоцитов проводили с помощью камеры Горяева.

Список сокращений:

VCAM-1 — сосудистая молекула клеточной адгезии 1;
MAdCAM-1 — слизистая молекула-адрессин клеточной адгезии 1;
ЦНС — центральная нервная система.

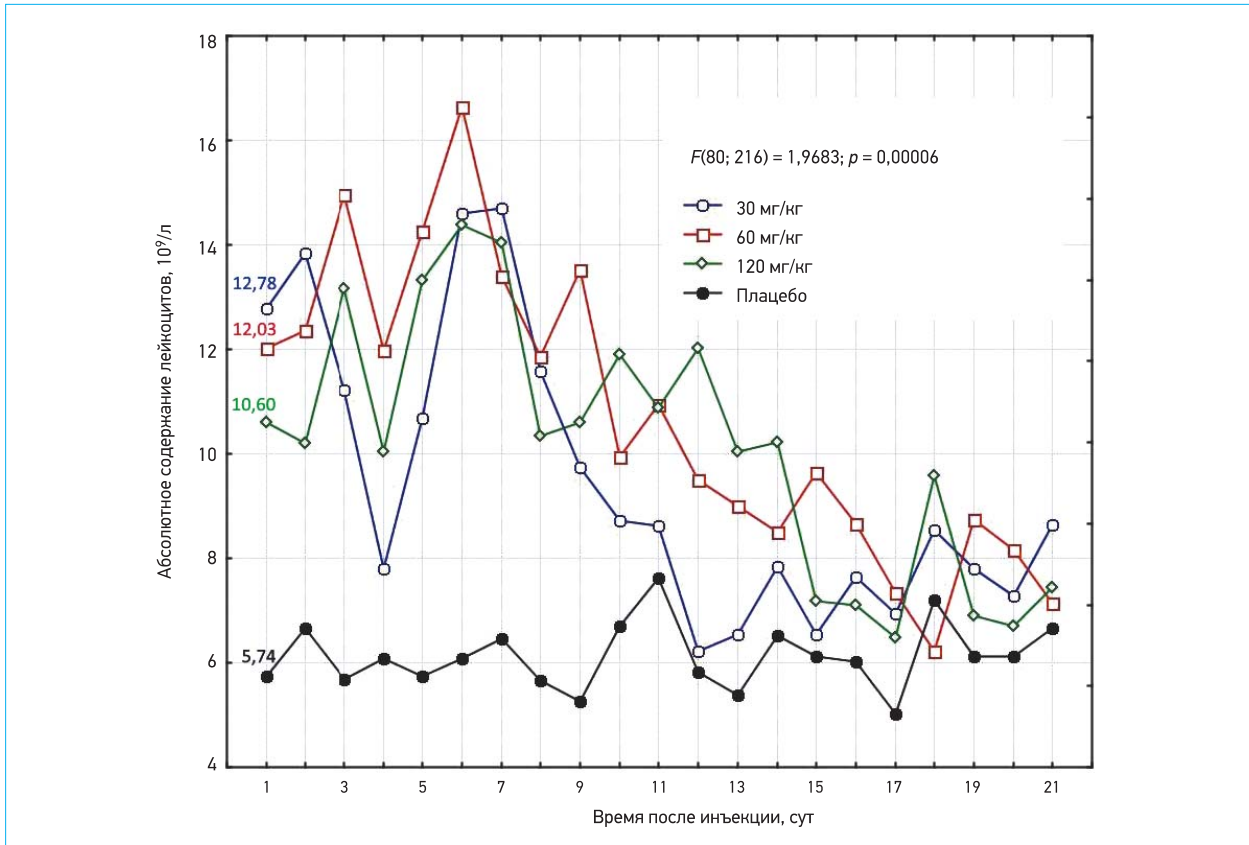


Рис. 1. Фармакодинамика препарата моноклональных антител к $\alpha 4\beta 1$ -интегрину (средние значения).

Статистический анализ

Для выявления различий между группами применяли однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA), а также попарное сравнение групп с помощью критерия Бонферони в программном пакете STATISTICA 10 [9]. Статистически достоверными считали различия при уровне значимости $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Через 24 ч после однократного внутривенного введения препарата моноклональных антител к $\alpha 4\beta 1$ -интегрину в дозах 30, 60 и 120 мг/кг наблюдалось резкое повышение абсолютного содержания лейкоцитов в крови, превышающее в 1,8–2,0 раза количество лейкоцитов в крови животных группы контроля.

Максимальных значений количество лейкоцитов в крови животных опытных групп достигало к 6 суткам и превышало показатели группы контроля в 2,4–2,8 раза.

Таблица 1. Сравнение групп с использованием критерия Бонферони. Отображены уровни значимости p, в серых квадратах — средние значения абсолютного содержания лейкоцитов в группе

	30 мг/кг	60 мг/кг	120 мг/кг	Плацебо
30 мг/кг	$M = 9,44$	0,0885	1,0000	0,0000
60 мг/кг	0,0885	$M = 10,80$	1,0000	0,0000
120 мг/кг	1,0000	1,0000	$M = 10,15$	0,0000
Плацебо	0,0000	0,0000	0,0000	$M = 6,12$

При этом к 11 суткам в группе животных, получивших препарат моноклональных антител к $\alpha 4\beta 1$ -интегрину в дозе 30 мг/кг, наблюдалось резкое снижение количества лейкоцитов до уровня в контрольной группе. В группах животных, получивших препарат моноклональных антител к $\alpha 4\beta 1$ -интегрину в дозах 60 и 120 мг/кг, отмечали снижение количества лейкоцитов в крови до уровня контрольной группы на 17 сут исследования (рис. 1).

Дисперсионный анализ выявил значимое влияние препарата моноклональных антител к $\alpha 4\beta 1$ -интегрину на содержание лейкоцитов периферической крови морских свинок ($p = 0,0000$). Поскольку дисперсионный анализ не отвечает на вопрос о том, между какими именно группами различие значимо, было проведено попарное сравнение групп с использованием критерия Бонферони (табл. 1), позволившее выявить отличие экспериментальных групп по абсолютному содержанию лейкоцитов от группы, получившей плацебо ($p = 0,0000$).

Выводы

Исследована фармакодинамика препарата моноклональных антител к $\alpha 4\beta 1$ -интегрину. В качестве основного фармакодинамического параметра использовали абсолютное количество лейкоцитов периферической крови морских свинок.

Проведенные исследования подтвердили правильность выбранной модели. Показано, что внутривенное введение препарата в дозах 30, 60 и 120 мг/кг вызывает двукратное повышение содержания лейкоцитов уже в первые сутки после введения, достигая максимальных значений к 6 суткам.

Показана зависимость длительности периода повышенного содержания лейкоцитов в крови животных от количества введенного препарата. Впоследствии к 11–18 суткам, в зависимости от дозы препарата, содержание лейкоцитов постепенно снижается до контрольных значений, характерных для данного вида животных.

Литература

1. Мументалер М, Маттле Х. Неврология. 3-е изд. М.: МЕДпресс-информ; 2011.
2. Miller DH, Leary SM. Primary-progressive multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2007; 6(10): 903–12.
3. Goodin DS, Cohen BA, O'Connor P, et al. Assessment: the use of natalizumab (Tysabri) for the treatment of multiple sclerosis (an evidence-based review): report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 2008; 71: 766–73.

4. Lobb RR, Hemler ME. The pathophysiologic role of alpha 4 integrins in vivo. *J Clin Invest.* 1994; 94: 1722–8.
5. Brocke S, Piercy C, Steinman L, et al. Antibodies to CD44 and integrin alpha4, but not L-selectin, prevent central nervous system inflammation and experimental encephalomyelitis by blocking secondary leukocyte recruitment. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 6896–901.
6. Rice GP, Hartung HP, Calabresi PA. Anti-alpha4 integrin therapy for multiple sclerosis: mechanisms and rationale. *Neurology* 2005; 64: 1336–42.
7. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, et al. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol.* 2007; (7): 678–89.
8. Wehner NG, Gasper C, Shopp G, Nelson J, Draper K, Parker S, Clarke J. Immunotoxicity profile of natalizumab. *J Immunotoxicol.* 2009; 6(2): 115–29.
9. Трухачева НВ. Математическая статистика в медико-биологических исследованиях с применением пакета Statistica. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2013.

Об авторах

Закрытое акционерное общество «БИОКАД» (ЗАО «БИОКАД»). Российская Федерация, 142380, Московская обл., Чеховский район, п. Любучаны.

Крапивин Богдан Николаевич. Старший научный сотрудник отдела доклинических испытаний лекарственных средств.

Гончарова Ольга Владимировна. Заведующая отделом рекомбинантных продуцентов, канд. биол. наук.

Морозова Елена Леонидовна. Руководитель отдела доклинических испытаний лекарственных средств.

Адрес для переписки: Крапивин Богдан Николаевич; krapivin@biocad.ru

Experimental study of the pharmacokinetics of monoclonal antibodies to $\alpha 4\beta 1$ -integrin in guinea pigs

B. N. Krapivin, O. V. Goncharova[†], E. L. Morozova

CJSC «BIOCAD», 143422 Moscow Dist., Krasnogorskiy Area, Petrovo-Dalneye

This article presents the data on pharmacodynamics evaluation of monoclonal antibodies to $\alpha 4\beta 1$ -integrin in guinea pigs. The effect on total content of peripheral blood leukocytes after a single intraperitoneal injection of three doses of the drug has been studied. It was shown that intraperitoneal injection of the drug at doses of 30, 60, and 120 mg/kg causes a two-fold increase in the content of leukocytes in the first hours after the administration, reaching a maximum value to 6th day. Subsequently 11–18 days, depending on dose, leukocytes content gradually decreased to control values.

Key words: monoclonal antibodies to $\alpha 4\beta 1$ -integrin; multiple sclerosis; pharmacodynamics; experimental research.

For citation: Krapivin BN, Goncharova OV, Morozova EL. Experimental study of the pharmacokinetics of monoclonal antibodies to $\alpha 4\beta 1$ -integrin in guinea pigs. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2016; 16 (3): 179–181.

References

1. Mumentaler M, Mattle H. Neurology. 3rd ed. Moscow: MEDpress-Inform; 2011 (in Russian).
2. Miller DH, Leary SM. Primary-progressive multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2007; 6(10): 903–12.
3. Goodin DS, Cohen BA, O'Connor P, et al. Assessment: the use of natalizumab (Tysabri) for the treatment of multiple sclerosis (an evidence-based review): report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 2008; 71: 766–73.
4. Lobb RR, Hemler ME. The pathophysiologic role of alpha 4 integrins in vivo. *J Clin Invest.* 1994; 94: 1722–8.
5. Brocke S, Piercy C, Steinman L, et al. Antibodies to CD44 and integrin alpha4, but not L-selectin, prevent central nervous system inflammation and experimental encephalomyelitis by blocking se-

condary leukocyte recruitment. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 6896–901.

6. Rice GP, Hartung HP, Calabresi PA. Anti-alpha4 integrin therapy for multiple sclerosis: mechanisms and rationale. *Neurology* 2005; 64: 1336–42.
7. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, et al. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol.* 2007; (7): 678–89.
8. Wehner NG, Gasper C, Shopp G, Nelson J, Draper K, Parker S, Clarke J. Immunotoxicity profile of natalizumab. *J Immunotoxicol.* 2009; 6(2): 115–29.
9. Truhacheva NV. *Mathematical Statistics in biomedical research with Statistica package.* Moscow: GEOTAR-Media; 2013 (in Russian).

Authors

Closed joint-stock company «BIOCAD» (CJSC «BIOCAD»), Lyubuchany village, Chekhov district, Moscow region 143280, Russian Federation.

Krapivin BN. Senior researcher of the Department of preclinical trials of drug products.

Goncharova OV. Head of the Department of recombinant proteins. Candidate of Biological Sciences.

Morozova EL. Head of the Department of preclinical trials of drug products.

[†] Deceased