

УДК 615.012

УДОСКОНАЛЕННЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНОГО ОДЕРЖАННЯ ІМУНОЛІПОСОМ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ HER2-ПОЗИТИВНИХ ПУХЛИН*Д. В. Безрукавий¹, Ю. М. Краснопольський², О. М. Близнюк³,**¹магістрант кафедри біотехнології, біофізики та аналітичної хімії, НТУ «ХПІ», Харків, Україна**²професор кафедри біотехнології, біофізики та аналітичної хімії, доктор фарм. наук, НТУ «ХПІ», Харків, Україна**³завідувач кафедри біотехнології, біофізики та аналітичної хімії, доктор техн. наук, професор, НТУ «ХПІ», Харків, Україна**dima_b1998@meta.ua*

Актуальною проблемою онкології є створення нових засобів терапії злоякісних захворювань. Триває інтенсивний пошук речовин з протипухлинною активністю серед хімічних сполук, препаратів біологічної природи та екстрактів рослин. Активно створюються препарати для фотодинамічної терапії злоякісних захворювань. Успіхи в молекулярній біології та генній інженерії створили можливість конструювання нових речовин з раніше невідомими властивостями [1].

HER2 (також *neu* або *c-erbB2*) являє собою протоонкоген сімейства рецепторів епідермального фактора росту – рецепторних тироксинкіназ. Ампліфікація гена HER2 призводить до гіперекспресії білка HER2 на мембрані клітин пухлини, що, в свою чергу, викликає постійну активацію рецептора HER2 [2]. У людини HER2/*neu* виявляється у нормальних тканинах, однак його гіперекспресія або ампліфікація гену характерна тільки для пухлинних клітин і зустрічається у 20-25 % випадків РМЗ (раку молочної залози) [3].

Рак молочної залози (РМЗ) займає 1-ше місце у загальній структурі злоякісних пухлин серед жінок. Захворюваність коливається від 50-60 на 100 тис. жіночого населення. Щорічно в Україні реєструється понад 16 тис. нових випадків РМЗ, з них 24,5 % складають жінки репродуктивного віку. Рівень захворюваності на РМЗ за останні 30 років зріс в 2,5 рази, щорічний приріст при цьому складає 7,1 % [4].

Великі надії покладаються на наноструктуровані лікарські форми протипухлинних препаратів. Наноформи лікарських препаратів змінюють фармакокінетику лікарської речовини, збільшують час циркуляції в крові, сприяють селективному накопиченню препарату в пухлинній тканині. Серед них перевага надається ліпосомальним лікарським формам. Мембрана ліпосом не відрізняється від поверхневої клітинної мембрани. Ліпосоми біосумісні та здатні до біодеградації, вони не викликають побічних токсичних ефектів. Ліпосоми оберігають агресивні протипухлинні речовини від руйнування. У ліофільно висушеній формі вони зберігаються протягом тривалого часу.

Головна перевага ліпосомальних препаратів – специфічне накопичення в пухлині. Вибірковість накопичення ліпосом в пухлині пов'язана з особливостями неангіогенеза пухлини. Новоутворені кровоносні судини мають дефект у покривному епітелії – пори розміром від 50 до 700 нм. Ліпосоми проникають через ці пори в пухлинну строму і там залишаються. Ефект «проникності та накопичення» забезпечує пасивне накопичення ліпосом у пухлинній тканині. Для створення імуноліпосом до ліпосом приєднують моноклональні антитіла, які специфічно зв'язуються з антигенами на мембрані пухлинних клітин і не взаємодіють з нормальними клітинами [1].

Метою проекту є запропонувати шляхи вдосконалення біотехнології одержання імуноліпосом для лікування HER2-позитивних пухлин. Задачами проекту є зменшення

витрат на електроенергію, сировину та матеріали при виготовленні лікарського засобу, а також підвищення його ефективності.

У якості фрагменту моноклонального антитіла для кон'югації з ліпосомами був вибраний варіант гуманізованого антитіла huMAb4D5-8 анти-p185^{HER2} Fab'-фрагмент, який одержується шляхом періодичного культивування з підживленням штаму *Escherichia coli* W3110 (ATCC 27325). Fab'-фрагмент виділяється за допомогою афінної хроматографії. Окремо готують ліпосоми шляхом одержання ліпідної плівки з подальшою її гідратацією та екструзією, завантажують ліпосоми доксорубіцином гідрохлоридом методом активної загрузки за допомогою створення хімічного градієнта. Завантажені ліпосоми кон'югують із анти-p185^{HER2} та анти-CD3 Fab'-фрагментами, очищують, готують розчин для подальшого отримання ліофілізату, наповнюють у флакони та проводять власне ліофілізацію.

Готовий препарат являє собою порошок-ліофілізат для приготування інфузій двокон'югованих анти-p185^{HER2}/анти-CD3-імуноліпосом, 1 флакон містить доксорубіцину гідрохлориду 10 мг. У якості допоміжних речовин виступають: L-гістидину гідрохлорид, L-гістидин, α,α -трегалози дигідрат, полісорбат 20. Двокон'юговані анти-p185^{HER2}/анти-CD3-імуноліпосоми мають розмір 140-160 нм, ступінь включення АФІ складає не менше 90%.

До технології були внесені зміни, а саме:

- у якості фрагменту моноклонального антитіла для кон'югації з ліпосомами ми вибираємо анти-p185^{HER2} Fab'-фрагмент замість анти-p185^{HER2} Fab-фрагменту, так як Fab'-фрагмент має додатковий залишок цистеїну на С-кінці;

- пропонується кон'югувати на поверхні імуноліпосом додатковий анти-CD3 Fab'-фрагмент;

- на стадії отримання ліпідної плівки пропонується додаткове висушування у вакуумі при 0,04-0,05 мбар.

- на стадії завантаження ліпосом доксорубіцином пропонується розбавити у 20 разів нагрітим до 60°C буфером НЕРЕС суспензією, отриману зі стадії гомогенізації, після гідратації у 250 мМ сульфату амонію.

Такі зміни повинні оптимізувати отримання стерично стабілізованих термочутливих активновантажених доксорубіцином ліпосом, зменшити витрати на електроенергію, сировину та матеріали, підвищити ефективність препарату.

Список літератури:

1. Матюшин А. А. Получение и изучение анти-CD20 иммунолипосом митоксантрона *in vitro* / А. А. Матюшин, О. В. Хугаева, М. А. Барышникова [et.al.] // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 3 – С. 15 – 16.

2. Краснопольский Ю. М. Фармацевтическая биотехнология: Технология производства иммунобиологических препаратов: учеб. пособие / Ю. М. Краснопольский, М. И. Борщевская. – Харьков: НТУ «ХПИ», 2009.– 352 с.– На рус. яз. – С. 244 – 245.

3. Reuckert S. Моноклональные антитела в лечении рака молочной железы / S. Reuckert , I. Ruehl, S. Kahlert, G. Konecny, M. Untch // Эффективная фармакотерапия в онкологии, гематологии и радиологии. – 2006. – № 3 – С. 16.

4. Рак молочної залози. Діагностика та лікування [Електрон. ресурс]. – Режим доступу: <http://www.pfizermed.com.ua>.