

УДК 615.281.8 + 578.245

DOI: 10.20535/1810-0546.2016.3.65102

Т.М. Луценко^{1,2}, Д.Б. Старосила³, С.Л. Рибалко³, О.Ю. Галкін¹¹Національний технічний університет України "КПІ", Київ, Україна²ТОВ "УА "ПРО-ФАРМА", Київ, Україна³ДУ "Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського НАМН України", Київ, Україна

МЕТОДИ ОЦІНКИ БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ РЕКОМБІНАНТНОГО ІНТЕРЛЕЙКІНУ-7 ЛЮДИНИ І ДОСЛІДЖЕННЯ СТАБІЛЬНОСТІ ПРЕПАРАТУ НА ЙОГО ОСНОВІ

Background. Interleukin-7 is one of the most important immune regulatory cytokines. Recombinant human interleukin-7 (rIL-7) in aqueous solution is subjected to chemical degradation mechanisms such as proteolysis, oxidation, disulfide exchange, oligomerisation etc. Such changes affect the shelf life of the preparation on the basis of rIL-7. Evaluation of the biological activity of rIL-7 can be carried out by assessing its antiviral activity.

Objective. Comparison of methods for inhibiting reproduction of the influenza virus, herpes simplex virus and hepatitis C virus with recombinant human interleukin-7 and research stability of the preparation on the basis of rIL-7.

Methods. We used immortalized cells: the kidneys of dogs, the bovine kidneys and kidneys of African green monkey Vero. The following viruses were used: hepatitis C virus surrogate (bovine viral diarrhea virus, BVDV), influenza virus (strain A/FM/1/47 (H1N1)), herpes simplex virus type 2 (HSV-2) (BH strain). To determine the antiviral activity of rIL-7 *in vitro* conditions using daily, immortalized cells. Cells were grown in RPMI-1640 medium.

Results. It was shown that rIL-7 in buffer stabilizing solutions and the culture medium after 1 week of storage was active at a dilution of 0.003 g/ml against BVDV. The study results of antiviral activity of rIL-7 drug in buffer solutions and culture medium against influenza virus A/FM/H1N1 can conclude that storage of the drug in buffer solution and in the intact state at 4 °C for one week has not affected its antiviral activity. It was shown that antiherpetic activity of preparations after 1 week of storage at 4 °C in buffer stabilizing solutions and intact state remained effective. The antiviral activity of drugs in a stabilizing solution has been persisted for 3 months at 4 °C, and in the intact state of rIL-7 lost its antiviral activity after 1 week against the herpes virus, and after 1 month regarding BVDV.

Conclusions. Methods for assessing the antiviral activity of rIL-7 towards BVDV, influenza virus, and HSV-2 were developed. It has been proven that the stabilizing buffer solutions proposed by us provide a high level of biological activity of rIL-7 preparations during storage at 4 °C for 3 months, which is a prerequisite for the development of liquid dosage forms of pharmaceutical preparations on their basis.

Keywords: interleukin-7; human recombinant; antiviral activity; biological standardization.

Вступ

Інтерлейкін-7 (ІЛ-7) – імунний цитокін, який грає центральну роль у розвитку та гомеостазі Т- і В-лімфоцитів, бере участь у розвитку дендритних клітин, натуральних кілерів і клітин-індукторів лімфоїдної тканини, які теж є важливими ланками імунітету. ІЛ-7 здатний регулювати гомеостаз імунної системи завдяки його можливості підтримувати баланс між процесами апоптозу і проліферації тимоцитів, наївних Т-лімфоцитів і клітин пам'яті і тим самим забезпечувати постійність чисельності та функціональної активності цих популяцій [1, 2]. Це підтверджують дані про існування оберненої залежності між кількістю лімфоцитів (насамперед CD4-лімфоцитів) і рівнем ІЛ-7 у периферичній крові в осіб з різною патологією, незважаючи на різний генез зниження рівня CD4-лімфоцитів. Уперше подібна закономірність була виявлена в осіб, що перенесли трансплантацію кісткового мозку і пройшли курси хіміотерапії [3].

В подальшому була виявлена обернена залежність між рівнем ІЛ-7 у сироватці і ступенем зниження кількості CD4-лімфоцитів у онкологічних хворих, що одержували курси хіміотерапії, а також у пацієнтів з ідіопатичною лімфопенією [4]. Було показано, що ІЛ-7 ефективно інгібує репродукцію вірусу гепатиту С в умовах *in vitro* [5].

Рекомбінантні білки, які плануються до застосування в медицині із лікувальною чи діагностичною метою, мають відповідати специфічним вимогам, що відрізняє їх від тих білків, які використовуються виключно у науково-дослідних роботах. У той же час специфіка використання рекомбінантних білків (терапія чи діагностика) також ставить специфічні вимоги щодо їх стандартизації. Вкрай важливим є питання забезпечення стабільності рекомбінантного білка у тій чи іншій лікарській формі [6, 7].

При розробці препаратів на основі рекомбінантних білків основні проблеми, з якими стикаються розробники, пов'язані з біологічною

нестабільністю білкових препаратів. Подібно до інших протеїнів рекомбінантний інтерлейкін-7 людини (рІЛ-7) у водних розчинах піддається механізмам хімічного розкладання, таким як протеоліз, окиснення, дисульфідний обмін, олігомеризація, деамінування, і фізичним механізмам, таким як агрегація, осадження і адсорбція. Подібні зміни впливають на строк придатності препарату на основі рІЛ-7 [8, 9].

Як відомо, стабільність лікарських препаратів залежить від багатьох факторів: температури, рН, умов зберігання, освітленості, складу навколишньої атмосфери, способу приготування, допоміжних речовин, виду лікарської форми, особливо її агрегатного стану, упаковки тощо. Зазвичай з метою стабілізації прийнято використовувати як хімічні методи – додавання стабілізаторів, антиоксидантів та консервантів, так і фізичні – захист від впливу факторів зовнішнього середовища, застосування високоочищених препаратів і допоміжних речовин, а також комбінації зазначених методів [8, 9].

Оцінити біологічну активність рІЛ-7 можна за його противірусною активністю – прямою [5] чи опосередкованою завдяки імуностимулюючим властивостям [2]. У контексті стабільності препаратів рІЛ-7 головним є збереження біологічної активності препаратів на його основі.

Постановка задачі

Метою наших досліджень є порівняння методів інгібіції репродукції вірусів грипу, простого герпесу та гепатиту С рекомбінантним інтерлейкіном-7 людини та дослідження стабільності препарату на його основі.

Матеріали і методи

Препарат. Рекомбінантний інтерлейкін-7 людини був наданий ТОВ “УА “ПРО-ФАРМА”, м. Київ.

Культури клітин. У роботі використовували перещеплювану культуру клітин нирки собак (Madin-Darby canine kidney (MDCK)), перещеплювану культуру клітин нирки бика (Madin-Darby bovine kidney (MDBK)) та перещеплювану культуру клітин нирки африканської зеленої мавпи Vero (Інститут вірусології ім. Д.І. Івановського РАМН, Росія), які культивували в атмосфері 5 % CO₂ у середовищі RPMI-1640, “Sigma”, США, з 10 % ембріональної телячої сироватки (за температури 37 °С) і з додаванням гентаміцину.

Віруси. Як сурогатний вірус гепатиту С (ВГС) використовували вірус бичачої вірусної діареї (ВБВД), що є тест-моделлю ВГС. Вірус бичачої вірусної діареї належить до роду *Pestivirus* у межах родини *Flaviviridae*. Геном ВБВД складається із одного позитивного ланцюга РНК. Вірусний матеріал на 4 пасажі був наданий науковим співробітником Інституту ветеринарної медицини НААН України О.М. Дерябіним. Інфекційний титр вірусу після десяти проведених пасажів у культурі клітин MDBK становив 6-7 lg ID₅₀.

У роботі використано штам вірусу грипу А/М/1/47(Н1N1), одержаний із музею вірусів Інституту вірусології ім. Д.І. Івановського РАМН, Росія. Інфекційний титр алантоїсної культури становив 7,0 lg EID₅₀/0,2 мл, титр гемаглютиніну – 1:512 гемаглютинуючих одиниць (ГАО) на 0,2 мл.

У роботі використовували вірус простого герпесу 2 типу (ВПГ-2), а саме штам ВН, одержаний із музею вірусів Інституту вірусології ім. Д.І. Івановського РАМН, Росія. Вірус підтримували серійними пасажами в культурі клітин Vero. Інфекційний титр за цитопатичною дією (ЦПД) в культурі клітин становив 7,0 lg ТЦД₅₀/0,1 мл. До початку експериментальних досліджень вірус зберігали при –70 °С.

Еритроцити використовували в таких концентраціях: еритроцити курей – 1 %, еритроцити мурчаків – 0,75 % (у розчині 0,95 % NaCl).

Вивчення антивірусної активності препарату *in vitro*. Для визначення антивірусної активності рІЛ-7 в умовах *in vitro* використовували добову перещеплювану культуру клітин (чутливу до вірусів), що утворили суцільний шар на субстраті. Клітини вирощували в плашках (Nunclon, Surface, Данія) на середовищі RPMI-1640 з додаванням 10 % ембріональної телячої сироватки за температури 37 °С у термостаті з подачею CO₂.

Ростове середовище зливали, до клітин додавали вірус у дозі 100 ТЦД₅₀. Через 1 год контакту неадсорбований вірус видаляли, а в лунки вносили різні концентрації препарату. Культури інкубували в термостаті з подачею CO₂ протягом 3 діб, щодня контролюючи стан клітин за допомогою мікроскопа. Одночасно проводили контроль вірусу. Через 72 год інкубації клітин культуральну рідину збирали і в ній визначали інфекційний титр вірусу з титруванням у культурі клітин.

Реакцію гемаглютинації (РГА) проводили паралельно з 1 % курячих еритроцитів чи 0,75 % ери-

троцитів мурчака за загальноприйнятою методикою [10].

Розчини для стабілізації препарату рІЛ-7. Для стабілізації субстанції рІЛ-7 використовували два склади стабілізуючих розчинів (СР): № 1 (трилон Б, ніпагін, поліетиленгліколь 400) та № 2 (трилон Б, бензиловий спирт, поліетиленгліколь 400) [11].

Результати і їх обговорення

Дослідження антивірусної активності препаратів рІЛ-7 проти сурогатного вірусу гепатиту С. Антивірусну активність вивчали в культурі MDBK, яку оброблювали різними концентраціями препарату рІЛ-7 і до якої додавали ВБВД у дозі 100 ТЦД₅₀. Культури інкубували в термостаті до специфічної ЦПД у контролі вірусу, а потім у культуральному середовищі різних розведень препарату визначали інфекційний титр вірусу. Результати подані в табл. 1.

Таким чином, проведені дослідження показали, що рІЛ-7 у буферних стабілізуючих розчинах та культуральному середовищі через 1 тиждень зберігання був активним до розведення 0,003 мкг/мл проти вірусу ВБВД, тому що інгібування інфекційного титру було на 2 ID₅₀.

Дослідження антивірусної активності препаратів рІЛ-7 проти вірусу грипу. При визначенні антивірусної активності досліджуваних препаратів у культурі клітин MDCK користувалися методом визначення інфекційного титру вірусу грипу для кожного розведення сполук. Результати проведених досліджень подані в табл. 2.

Таким чином, за результатами досліджень антивірусної активності препарату рІЛ-7 у буферних розчинах та культуральному середовищі проти вірусу грипу А/ФМ/Н1Н1/ можна зробити висновок, що зберігання препарату в буферних розчинах і в інтактному стані за температури 4 °С протягом 1 тижня не впливало на його антивірусну активність.

Дослідження антигерпетичної активності препаратів рІЛ-7 у стабілізуючих розчинах. Для визначення антигерпетичної активності ВПГ-2 у дозі 100 ТЦД₅₀/0,1 мл вносили в культуру Vero та інкубували протягом 60 хв за температури 37 °С. Після адсорбції вірусу на клітинах залишки його видаляли, клітини промивали живильним середовищем, після чого в підтримувальне середовище (RPMI-1640 із 2 % ембріональної телячої сироватки) вносили препарати у різних концентраціях. Відсутність ЦПД у дослідних зразках (оброблених культурах), за наявності його в контролі, зниження інфекційного титру в оброблених культурах, за наявності його в контрольних, а також різниця інфекційних титрів у досліді порівняно з контролем вірусу герпесу не менше ніж 2 lg ID₅₀ дали змогу визначити антивірусну активність препаратів (табл. 3).

Таким чином, у результаті проведених досліджень було показано, що антигерпетична активність препаратів через 1 тиждень зберігання за температури 4 °С у буферних стабілізуючих розчинах та інтактному стані залишалася ефективною.

Таблиця 1. Антивірусна активність препаратів рІЛ-7 у стабілізуючих розчинах проти сурогатного вірусу гепатиту С

Препарат	Концентрація препарату, мкг/мл (строк зберігання – 1 тиждень)					Контроль (ВБВД)
	0,05	0,025	0,0125	0,006	0,003	
	Інфекційний титр вірусу в lg ID ₅₀					
СР № 1 + рІЛ-7	3,0	3,0	3,0	3,0	2,0	5,0
СР № 2 + рІЛ-7	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	5,0
рІЛ-7	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	5,0

Таблиця 2. Антигриозна активність препаратів рІЛ-7 у стабілізуючих розчинах

Препарат	Концентрація препарату, мкг/мл (строк зберігання – 1 тиждень)					Контроль вірусу грипу
	0,025	0,0125	0,006	0,003	0,0015	
	Інфекційний титр вірусу в lg ID ₅₀					
СР № 1 + рІЛ-7	4,0	5,0	3,0	4,0	3,0	7,0
СР № 2 + рІЛ-7	4,0	5,0	2,0	2,0	3,0	7,0
рІЛ-7	2,0	3,0	3,0	2,0	4,0	8,0

Таблиця 3. Антигерпетична активність препаратів рІЛ-7 у стабілізуючих розчинах

Препарат	Концентрація препарату, мкг/мл (строк зберігання – 1 тиждень)				
	0,025	0,0125	0,006	0,003	Контроль вірусу герпесу
	Інфекційний титр вірусу в lg ID ₅₀				
СР № 1 + рІЛ-7	5,0	4,0	5,0	7,0	7,0
СР № 2 + рІЛ-7	4,0	4,0	4,0	5,0	7,0
рІЛ-7	3,0	6,0	2,0	2,0	7,0

Дослідження стабільності препаратів рІЛ-7 при довготривалому зберіганні. Дослідження антивірусної активності при зберіганні препаратів рІЛ-7 за температури 4 °С в буферних стабілізуючих розчинах упродовж 2 тижнів та 1–3 місяців проводили проти вірусів герпесу та ВБВД (гепатит С). Відповідні дані подані в табл. 4.

Аналізуючи одержані результати досліджень щодо впливу препарату рІЛ-7 у буферних стабілізуючих розчинах і в інтактному стані на ре-

продукцію вірусів герпесу та ВБВД, які зберігалися за температури 4 °С упродовж 3 місяців, слід відзначити, що антивірусна активність препаратів у стабілізуючому розчині зберігалася упродовж 3-х місяців, а в інтактному стані рІЛ-7 втрачав свою антивірусну активність через 1 тиждень відносно вірусу герпесу та через 1 місяць відносно ВБВД. Крім того, слід відзначити, що СР № 1 забезпечував більший рівень залишкової активності препаратів рІЛ-7.

Таблиця 4. Антивірусна активність проти гепатиту С і ВПГ при довготривалому зберіганні препаратів рІЛ-7 у стабілізуючих розчинах

Концентрації препаратів рІЛ-7, мкг/мл	Строк зберігання	Антигепатитна активність (ВБВД)			Антигерпетична активність		
		СР № 1 + рІЛ-7	СР № 2 + рІЛ-7	рІЛ-7	СР № 1 + рІЛ-7	СР № 2 + рІЛ-7	рІЛ-7
		Інфекційні титри вірусу в lg ID ₅₀					
0,05	2 тижні	6,0	4,0	5,0	2,0	2,0	3,0
0,025		5,0	5,0	5,0	2,0	2,0	3,0
0,012		5,0	5,0	5,0	2,0	3,0	3,0
0,006		4,0	3,0	5,0	4,0	5,0	3,0
0,003		7,0	6,0	7,0	4,0	5,0	3,0
КВ		8,0	8,0	8,0	4,0	4,0	4,0
0,05	1 місяць	3,0	4,0	7,0	4,0	2,0	4,0
0,025		5,0	4,0	7,0	3,0	2,0	6,0
0,012		6,0	5,0	7,0	6,0	3,0	6,0
0,006		6,0	7,0	7,0	6,0	4,0	8,0
0,003		7,0	8,0	7,0	7,0	7,0	6,0
КВ		8,0	8,0	8,0	7,0	7,0	7,0
0,025	2 місяці	3,0	3,0	4,0	2,0	3,0	4,0
0,012		3,0	2,0	4,0	2,0	2,0	4,0
0,006		3,0	3,0	4,0	2,0	3,0	4,0
0,003		3,0	2,5	5,0	2,0	3,0	4,0
КВ		5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
0,05		3 місяці	4,0	4,0	4,0	–	–
0,025	5,0		3,0	4,0	–	–	–
0,012	3,0		6,0	4,0	–	–	–
0,006	4,0		6,0	3,0	–	–	–
0,003	3,0		6,0	3,0	–	–	–
КВ	6,0		6,0	3,0	–	–	–

Примітка. КВ – контроль вірусу; “–” – дослідження не проводили.

Висновки

У результаті проведених досліджень було показано, що біологічну активність рІЛ-7 можливо оцінювати через протівірусну дію цього цитокіну. Було розроблено методики оцінки протівірусної активності рІЛ-7 відносно сурогатного ВГС – вірусу бичачої вірусної діареї, вірусу грипу – на прикладі штаму А/ФМ/1/47(Н1N1), а також вірусу герпесу 2-го типу (штам ВН). Ці методики можуть бути використані при розробці методів контролю якості фармацевтичних препаратів на основі рІЛ-7.

Було доведено, що запропоновані нами буферні стабілізуючі розчини забезпечують високий рівень біологічної активності препаратів рІЛ-7 при їх зберіганні за температури 4 °С упродовж 3-х місяців, що є передумовою для розробки на їх основі рідких лікарських форм фармацевтичних препаратів.

Подальші дослідження можуть бути спрямовані на розробку рідких лікарських форм фармацевтичних препаратів на основі рІЛ-7 та їх біологічну стандартизацію.

Список літератури

1. Fry T.J., Maskall C.L. Interleukin-7: from bench to clinic // *Blood*. – 2002. – **99**, № 11. – P. 3892–3894.
2. Луценко Т.Н., Галкін А.Ю. Обоснование биотехнологических подходов получения интерлейкина-7 человека рекомбинантного // Труды Белорусского гос. технолог. ун-та. Сер. Химия, технология органических веществ и биотехнология. – 2015. – **4**, № 177. – С. 188–197.
3. Serum levels of IL-7 in bone marrow transplant recipients: relationship to clinical characteristics and lymphocyte count / E. Bolotin, D. Annett, R. Parkman et al. // *Bone Marrow Transplant*. – 1999. – **23**. – P. 783–788.
4. IL-7 administration to humans leads to expansion of CD8+ and CD4+ cells but a relative decrease of CD4+ T-regulatory cells / S.A. Rosenberg, C. Sportes, M. Ahmadzadeh et al. // *J. Immunother.* – 2006. – **29**, № 3. – P. 313–319.
5. Дослідження протівірусної активності рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини на різних моделях експериментальної вірусної інфекції гепатиту С / Ю.І. Порва, С.Л. Рибалко, С.Т. Дядюн та ін. // Наукові вісті НТУУ "КПІ". – 2015. – **3**. – С. 52–60.
6. Біотехнологічні основи створення засобів серологічної діагностики інфекційних та неінфекційних захворювань: Монографія / О.Ю. Галкін, В.П. Ширококов, А.А. Григоренко та ін.; за ред. В.П. Ширококова. – К.: НТУУ "КПІ", 2015. – 204 с.
7. Обґрунтування параметрів стандартизації препаратів на основі рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини / Т.М. Луценко, О.Ю. Галкін, О.Я. Карпенко та ін. // Вісник Нац. ун-ту "Львівська політехніка". Сер. Хімія, технологія речовин та їх застосування. – 2015. – **812**. – С. 175–183.
8. Препараты альфа-интерферона в виде стабильного водного раствора: Патент 2157236 РФ, МПК А61К38/21, А61К47/00 / Пуи-Хо Ц. Юен, Д.Ф. Клайн; патентообладатель Шеринг Корпорейшн. – Заявл.: 10.10.1995; Опубли.: 10.10.2000.
9. Губайдуллина А.А., Бобкова Е.В., Мелентьев А.И. Метод ускоренного старения для прогнозирования срока годности стабилизированной формы альфа-интерферона // Труды Белорусского гос. ун-та. Сер. Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем. – 2009. – **4**, № 2. – С. 81–86.
10. Руководство по вирусологии: вирусы и вирусные инфекции человека и животных / Под ред. Д.К. Львова. – М.: Мед. информ. агентство, 2013. – 1200 с.
11. Modern methods of aspergillosis diagnosis and biotechnological approaches to creation of allergy / aspergillosis diagnostic preparations / A.A. Savchenko, E.I. Nikitina, A.Yu. Galkin, N.V. Dechtiarenko // *J. Health Sci.* – 2014. – **4**, № 1. – P. 363–374.

References

1. T.J. Fry et al., "Interleukin-7: from bench to clinic", *Blood*, vol. 99, no. 11, pp. 3892–3894, 2002.
2. T.N. Lutsenko and A.Yu. Galkin, "Substantiation of biotechnological approaches to get recombinant human interleukin-7", *Trudy Belarusskogo Gosudarsvennogo Tehnologicheskogo Universita. Ser. Himija, Tehnologija Organicheskikh Veshhestv i Biotehnologija*, vol. 4, no. 177, pp. 188–197, 2015 (in Russian).
3. E. Bolotin et al., "Serum levels of IL-7 in bone marrow transplant recipients: relationship to clinical characteristics and lymphocyte count", *Bone Marrow Transplant.*, vol. 23, pp. 783–788, 1999.
4. S.A. Rosenberg et al., "IL-7 administration to humans leads to expansion of CD8+ and CD4+ cells but a relative decrease of CD4+ T-regulatory cells", *J. Immunother.*, vol. 29, no. 3, pp. 313–319, 2006.

5. Yu.I. Porva *et al.*, "The study of antiviral activity of recombinant human interleukin-7 on various models of experimental hepatitis C virus infection // *Naukovi Visti NTUU KPI*, vol. 3, pp. 52–60, 2015 (in Ukrainian).
6. *Biotechnological Bases of Creation of Tools for Serological Diagnosis of Infectious and Non-Infectious Diseases*, V.P. Shyrobokov, Ed. Kyiv, Ukraine: NTUU KPI, 2015 (in Ukrainian).
7. T.M. Lutsenko *et al.*, "Substantiation of parameters for standardization of drugs based on recombinant human interleukin-7", *Visnyk Natsionalnoho Universytetu "Lvivska Politekhnikha". Ser. Khimiia, Tekhnolohiia Rechovyn ta Yikh Zastosuvannia*, vol. 812, pp. 175–183, 2015 (in Ukrainian).
8. Pui-Ho Ts. Yuen and D.F. Klein, "The preparations of alpha-interferon in the form of a stable aqueous solution", Russian Federation Patent 2157236, IPC A61K38/21, A61K47/00, Oct. 10, 2000 (in Russian).
9. A.A. Gubaidullina *et al.*, "Accelerated aging method for predicting the shelf life of the stabilized forms of alpha interferon", *Trudy Belarusskogo Gosudarsvennogo Universita. Ser. Fiziologicheskije, Biohimicheskie i Molekuljarnye Osnovy Funkcionirovanija Biosistem*, vol. 4, no. 2, pp. 81–86, 2009 (in Russian).
10. D.K. Lvov, *Virology Guide: Viruses and Viral Infections of Humans and Animals*. Moscow, Russia: Med. Inform. Agentstvo, 2013 (in Russian).
11. A.A. Savchenko *et al.*, "Modern methods of aspergillosis diagnosis and biotechnological approaches to creation of allergy/aspergillosis diagnostic preparations", *J. Health Sci.*, vol. 4, no. 1, pp. 363–374, 2014.

Т.М. Луценко, Д.Б. Старосила, С.Л. Рибалко, О.Ю. Галкін

МЕТОДИ ОЦІНКИ БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ РЕКОМБІНАНТНОГО ІНТЕРЛЕЙКІНУ-7 ЛЮДИНИ І ДОСЛІДЖЕННЯ СТАБІЛЬНОСТІ ПРЕПАРАТУ НА ЙОГО ОСНОВІ

Проблематика. Інтерлейкін-7 є одним із найважливіших регуляторних цитокінів імунної системи. Рекombінантний інтерлейкін-7 людини (рІЛ-7) у водних розчинах піддається механізмам хімічного розкладання, таким як протеоліз, окиснення, дисульфідний обмін, олігомеризація тощо. Подібні зміни впливають на строк придатності препарату на основі рІЛ-7. Оцінку біологічної активності рІЛ-7 можна проводити через його протівірусну активність.

Мета дослідження. Порівняння методів інгібіції репродукції вірусів грипу, простого герпесу та гепатиту С рекombінантним інтерлейкіном-7 людини та дослідження стабільності препарату на його основі.

Методика реалізації. У роботі використовували перещеплювані культури клітин: нирки собак, нирки бика та нирки африканської зеленої мавпи Vero. Використовували такі віруси: сурогатний вірус гепатиту С (вірус бичачої вірусної діареї (ВБВД)), вірус грипу (штам A/FM/1/47(H1N1)), вірус простого герпесу 2 типу (ВПГ-2) (штам ВН). Для визначення антивірусної активності рІЛ-7 в умовах *in vitro* використовували добову перещеплювану культуру клітин. Клітини вирощували на середовищі RPMI-1640.

Результати дослідження. Показано, що рІЛ-7 у буферних стабілізуючих розчинах і культуральному середовищі через 1 тиждень зберігання був активним до розведення 0,003 мкг/мл проти вірусу ВБВД. За результатами досліджень антивірусної активності препарату рІЛ-7 у буферних розчинах та культуральному середовищі проти вірусу грипу A/FM/H1N1 можна зробити висновок, що зберігання препарату в буферних розчинах і в інтактному стані за температури 4 °С протягом 1 тижня не впливало на його антивірусну активність. Показано, що антигерпетична активність препаратів через 1 тиждень зберігання за температури 4 °С у буферних стабілізуючих розчинах та інтактному стані залишалася ефективною. Антивірусна активність препаратів у стабілізуючому розчині зберігалася упродовж 3-х місяців за температури 4 °С, а в інтактному стані рІЛ-7 втрачав свою антивірусну активність через 1 тиждень відносно вірусу герпесу і через 1 місяць відносно ВБВД.

Висновки. Розроблено методики оцінки протівірусної активності рІЛ-7 відносно ВБВД, вірусу грипу, а також ВПГ-2. Доведено, що запропоновані нами буферні стабілізуючі розчини забезпечують високий рівень біологічної активності препаратів рІЛ-7 при їх зберіганні за температури 4 °С упродовж 3-х місяців, що є передумовою для розробки на їх основі рідких лікарських форм фармацевтичних препаратів.

Ключові слова: інтерлейкін-7 людини рекombінантний; протівірусна активність; біологічна стандартизація.

Т.Н. Луценко, Д.Б. Старосила, С.Л. Рыбалко, А.Ю. Галкин

МЕТОДЫ ОЦЕНКИ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ РЕКОМБИНАНТНОГО ИНТЕРЛЕЙКИНА-7 ЧЕЛОВЕКА И ИССЛЕДОВАНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ ПРЕПАРАТА НА ЕГО ОСНОВЕ

Проблематика. Интерлейкин-7 является одним из важнейших регуляторных цитокинов иммунной системы. Рекombінант-ный интерлейкин-7 человека (рІЛ-7) в водных растворах подвергается механизмам химического разложения, таким как протеолиз, окисление, дисульфидный обмен, олигомеризация и т.д. Подобные изменения влияют на срок годности препарата на основе рІЛ-7. Оценку биологической активности рІЛ-7 можно проводить посредством оценки его протівірусной активности.

Цель исследования. Сравнение методов ингибирования репродукции вирусов гриппа, простого герпеса и гепатита С рекombінантным интерлейкином-7 человека и исследование стабильности препарата на его основе.

Методика реализации. В работе использовали перевиваемые культуры клеток: почки собак, почки быка и почки африканской зеленой мартышки Vero. Использовали такие вирусы: сурогатный вирус гепатита С (вирус бычьей вирусной диареи (ВБВД)), вирус гриппа (штам A/FM/1/47 (H1N1)), вирус простого герпеса 2 типа (ВПГ-2) (штамм ВН). Для определения антивірусной активности рІЛ-7 в условиях *in vitro* использовали суточную перевиваемую культуру клеток. Клетки выращивали на среде RPMI-1640.

Результаты исследования. Показано, что рИЛ-7 в буферных стабилизирующих растворах и культуральной среде через 1 неделю хранения был активным в разведении 0,003 мкг/мл против вируса ВБВД. По результатам исследований противовирусной активности препарата рИЛ-7 в буферных растворах и культуральной среде против вируса гриппа A/FM/H1N1 можно сделать вывод, что хранение препарата в буферных растворах и в интактном состоянии при температуре 4 °С в течение 1 недели не влияло на его противовирусную активность. Показано, что антигерпетическая активность препаратов через 1 неделю хранения при температуре 4 °С в буферных стабилизирующих растворах и интактном состоянии оставалась эффективной. Противовирусная активность препаратов в стабилизирующем растворе сохранялась в течение 3-х месяцев при температуре 4 °С, а в интактном состоянии рИЛ-7 терял свою противовирусную активность через 1 неделю в отношении вируса герпеса и через 1 месяц в отношении ВБВД.

Выводы. Разработаны методики оценки противовирусной активности рИЛ-7 по отношению к ВБВД, вирусу гриппа, а также ВПГ-2. Доказано, что предложенные нами буферные стабилизирующие растворы обеспечивают высокий уровень биологической активности препаратов рИЛ-7 при их хранении при температуре 4 °С в течение 3-х месяцев, что является предпосылкой для разработки на их основе жидких лекарственных форм фармацевтических препаратов.

Ключевые слова: интерлейкин-7 человека рекомбинантный; противовирусная активность; биологическая стандартизация.

Рекомендована Радою
факультету біотехнології і біотехніки
НТУУ "КПІ"

Надійшла до редакції
29 квітня 2016 року