

*На правах рукописи*

Колева Лариса

**ЭРИТРОЦИТЫ-БИОРЕАКТОРЫ ДЛЯ УТИЛИЗАЦИИ ИЗ КРОВОТОКА  
НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕТАБОЛИТОВ**

1.5.2. Биофизика

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва, 2022

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Центре теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук

<b>Научный руководитель</b>	<b>Синауридзе Елена Ивановна,</b> доктор биологических наук
<b>Официальные оппоненты</b>	<b>Миндукшев Игорь Викторович,</b> доктор биологических наук, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией клеточные механизмы гомеостаза крови Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института эволюционной физиологии и биохимии им И. М. Сеченова Российской академии наук <b>Тринеева Ольга Валерьевна,</b> доктор фармацевтических наук, доцент кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии Фармацевтического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Воронежский государственный университет»
<b>Ведущая организация</b>	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук

Защита диссертации состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2023 года в \_\_ часов \_\_ минут на заседании Диссертационного совета 24.1.038.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биохимической физики им. Н. М. Эмануэля Российской академии наук по адресу: 119334, Москва, ул. Косыгина, д. 4.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра химической физики им. Н. Н. Семёнова Российской академии наук по адресу: 119991, Москва, Ленинский проспект, д. 38, и на сайте [biochemphysics.ru/assets/uploads/ДИССЕРТАЦИЯ\\_\\_Колева.pdf](http://biochemphysics.ru/assets/uploads/ДИССЕРТАЦИЯ__Колева.pdf)

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2023 года

Ученый секретарь  
диссертационного совета 24.1.038.01,  
кандидат химических наук

**Л.И. Мазалецкая**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Настоящая работа посвящена разработке эритроцитов биореакторов (ЭБР), способных удалять из плазмы такие низкомолекулярные метаболиты как аспарагин или аммоний. Эритроциты-биореакторы удаляющие из плазмы аспарагин, содержат фермент аспарагиназу, а ЭБР, способные убирать из кровотока аммоний (аммоциты), содержат одновременно два включенных фермента – глутаматдегидрогеназу (ГДГ) и аланинаминотрансферазу (АЛТ).

Аспарагиназа является неотъемлемой частью курса терапии острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) у взрослых и детей. Механизм действия аспарагиназы основан на снижении в плазме концентрации аспарагина – аминокислоты, необходимой для синтеза различных белков, в результате чего синтез белков останавливается, что задерживает дальнейшее развитие клеток. В первую очередь это будет влиять на те клетки (к которым относятся и клетки ОЛЛ), в которых отсутствует собственный фермент, синтезирующий аспарагин (аспарагинсинтаза). Несмотря на эффективность аспарагиназы как противоопухолевого препарата, ее применение осложнено многими побочными эффектами. Введенный внутривенно фермент очень быстро выводится из организма, поэтому необходимы его довольно частые инъекции в больших дозах. Однако, медицинские препараты аспарагиназы, как правило, получены из бактерий (*Escherichia coli* или *Erwinia chrysanthemii*) и представляют собой чужеродный для организма человека белок, поэтому введение этих ферментов часто вызывает аллергические реакции, в том числе реакции гиперчувствительности, которые могут препятствовать применению препарата. На введение такого белка быстро вырабатываются антитела, которые делают каждое следующее введение лекарства менее эффективным. В такой ситуации использование эритроцитов как носителей аспарагиназы способно сильно улучшить ее фармакологические свойства, т.к. может увеличить срок жизни препарата в кровотоке и снизить аллергические реакции на него за счет того, что аспарагиназа спрятана в собственных клетках пациента и недоступна для его иммунной системы.

Состояние гипераммониемии (повышение концентрации аммония в крови) является опасным осложнением многих патологических состояний, связанных с дефицитами ферментов цикла мочевины, хроническими и острыми патологиями печени (рак, цирроз и т.д.), а также некоторыми инфекциями желудочно-кишечного тракта. Повышение уровня аммония очень опасно, т.к. он обладает сильной нейротоксичностью и может вызвать у пациента тремор, когнитивные расстройства, кому и даже смерть. Таким образом, необходимо его быстрое выведение из кровотока. Однако, современные медикаментозные средства не очень эффективны, т.к. все они действуют на уровень аммония опосредовано (через активности ряда ферментов, участвующих в цикле мочевины, выводящем из организма азот). С этой точки зрения очень перспективным кажется создание ЭБР, которые содержали бы ферменты, непосредственно перерабатывающие аммоний. Действие таких аммоцитов должно происходить быстро, т.к. они работают с аммонием напрямую. Препятствием для получения подобных аммоцитов до сих пор являлась малая эффективность загрузки в эритроциты основного перерабатывающего аммоний фермента – глутаматдегидрогеназы. Таким образом разработка ЭБР, способных удалять их кровотока аспарагин или аммоний, которые можно было бы применять в клинике, является актуальной задачей.

**Разработанность темы исследования.** В настоящий момент аспарагиназа, включенная в эритроциты, является наиболее успешным проектом по созданию ЭБР. Это единственный препарат, который уже сегодня применяется в клиниках Европы и США. Существуют работы различных мировых научных групп, которые занимались вопросом создания таких ЭБР. Наша лаборатория также работала в этом направлении. В результате нами были получены патенты на способ включения аспарагиназы в эритроциты методом ступенчатого диализа и на способ хранения готовых эритроцитов, загруженных аспарагиназой. Позднее ЭБР, содержащие аспарагиназу, были запатентованы фирмой Erytech и применяются сегодня в клиниках Франции для лечения ОЛЛ. В настоящий момент идут клинические испытания для применения таких ЭБР при лечении некоторых других онкологических заболеваний. Однако в России дальнейших работ в этом направлении на протяжении многих лет не было.

Все попытки создать эффективные ЭБР для переработки аммония до последнего времени были неудачны. В качестве перерабатывающего аммоний фермента были использованы глутаматдегидрогеназа (в работах зарубежных ученых) или глутаминсинтетаза (в России). Однако эффективность таких ЭБР была очень низкой и короткой по времени. Причины этого были обнаружены только после создания в нашей лаборатории математических моделей данных ЭБР. Было показано, что основным ограничивающим эффективностью фактором является практически отсутствующая проницаемость эритроцитарной мембраны для субстратов этих реакций ( $\alpha$ -кетоглутарата и глутамата). Анализ работы аммоцитов с помощью математических моделей позволил нам предложить новую ферментную систему, состоящую из глутаматдегидрогеназы и аланинаминотрансферазы, которая позволяет обойти вопрос с ограничением транспорта субстратов в эритроцит, т.к. при совместной работе данного тандема ферментов, они расходуются и производятся внутри эритроцитов циклически. Это приблизило нас к решению вопроса о создании эффективных аммоцитов, но до последнего времени он так и не был решен, т.к. не удавалось включить в эритроциты глутаматдегидрогеназу с высокой эффективностью. Решению этого вопроса также была посвящена данная работа.

**Цель работы.** Создание эффективных эритроцитов-биореакторов для удаления из кровотока низкомолекулярных метаболитов: аспарагина (для лечения ОЛЛ и некоторых других онкологических заболеваний) и аммония (для лечения гипераммониемии).

#### **Задачи исследования**

1. Выбор оптимального гипоосмотического метода инкапсуляции аспарагиназы в эритроциты.
2. Разработка автоматического устройства для создания эритроцитов-биореакторов в стерильных условиях с помощью метода проточного гипоосмотического диализа и оптимизация условий проведения данного метода инкапсуляции с целью увеличения эффективности включения фермента.
3. Исследование свойств эритроцитов-биореакторов с аспарагиназой, полученных методом проточного гипоосмотического диализа, при хранении.
4. Клинические испытания эритроцитов с аспарагиназой, полученных методом проточного диализа, на безопасность и исследование фармакокинетики и фармакодинамики этих эритроцитов у пациентов с ОЛЛ.
5. Получение аммоцитов путем совместной инкапсуляции в эритроциты ГДГ из *Proteus* sp. и АЛТ из сердца свиньи.

6. Исследование свойств полученных аммоцитов при хранении.
7. Анализ способности аммоцитов утилизировать аммоний *in vitro*.

### **Научная новизна диссертации**

1. Впервые проведено систематическое сравнение различных гипоосмотических методов получения эритроцитов с включенной аспарагиназой. Показано, что наиболее эффективным является метод проточного гипоосмотического диализа.

2. Впервые разработана и запатентована полностью автоматическая установка для стерильного получения эритроцитов с аспарагиназой или другими лекарственными препаратами.

3. Исследованы свойства полученных с помощью метода проточного диализа эритроцитов-биореакторов с аспарагиназой в процессе их хранения. Показано, что хранение в течение 14 дней при 4°C не изменяет существенно активность фермента в эритроцитах и такие свойства этих эритроцитов как эритроцитарные индексы и осмотическая резистентность.

4. Показана безопасность применения отечественных эритроцитов-биореакторов с аспарагиназой в клинической практике у 2-х пациентов с ОЛЛ.

5. Измерена фармакокинетика аспарагиназы, включенной в эритроциты, и способность этих эритроцитов истощать аспарагин *in vivo*.

6. Впервые получены аммоциты, содержащие совместно включенные ГДГ из *Proteus sp.* и АЛТ из сердца свиньи. Показано, что они способны утилизировать аммоний *in vitro*.

7. Установлено, что использование ГДГ из *Proteus sp.* и метода проточного диализа для ее включения в эритроциты, приводит к увеличению активности ГДГ внутри эритроцитов более чем в 5 раз по сравнению с аммоцитами, ранее полученными методом диализа в мешках, содержащими ГДГ из бычьей печени.

8. Впервые для оценки качества полученных эритроцитов-биореакторов был использован метод измерения фильтруемости эритроцитов, характеризующий их способность деформироваться.

9. Установлено, что ферменты в аммоцитах работают согласованно (в тандеме), т.к. в процессе потребления аммония происходит пропорциональное увеличение концентрации аланина.

**Теоретическая и практическая значимость.** В работе впервые создан отечественный препарат аспарагиназы, включенной в эритроциты в стерильных условиях, который может быть использован в клинике. Кроме того, разработана автоматическая установка, в основе которой лежит метод проточного гипоосмотического диализа, для включения в эритроциты различных биологически активных компонентов. Данная установка превосходит по эффективности включения аспарагиназы все другие устройства для получения фармакоцитов, запатентованные в мире.

Благодаря высокоэффективному методу включения ферментов в эритроциты (метод проточного диализа) и использованию ГДГ бактериального происхождения, впервые появилась возможность увеличить эффективность загруженной в эритроциты ГДГ, что позволяет надеяться на возможность получения аммоцитов, которые можно будет использовать в клинической практике для терапии гипераммониемии. Все полученные результаты способствуют применению в клинике такой новой лекарственной формы, как эритроциты-биореакторы.

**Методология и методы исследования.** Методология работы была построена таким образом, чтобы получить в результате эритроциты-биореакторы, которые можно было бы применять в клинической практике. Для этого желательно использовать такой метод загрузки фермента/ов в эритроциты, который позволяет получить ЭБР с наиболее эффективной нагрузкой, но, одновременно, со свойствами наиболее близкими к свойствам исходных эритроцитов. Поэтому на первом этапе было проведено сравнение нескольких гипоосмотических методов получения ЭБР (метод обратимого лизиса, метод диализа в мешках и метод проточного гипоосмотического диализа). Для характеристики свойств получаемых ЭБР и сравнения их со свойствами исходных эритроцитов измеряли стандартные эритроцитарные индексы (средний объем эритроцита (МСV в фл), среднее содержание гемоглобина в эритроците (МСН в пг) и среднюю концентрацию гемоглобина в клетке (МСНС в г/л)), осмотическую резистентность, а в случае аммоцитов также фильтруемость исходных эритроцитов и полученных ЭБР, как свежеприготовленных, так и в ходе хранения при +4°C. С использованием оптимального метода включения, в стерильных условиях были получены ЭБР, содержащие аспарагиназу, безопасность которых была исследована в клинических испытаниях, наряду с фармакокинетикой и способностью снижать уровень аспарагина в плазме. Для стандартизации процесса включения различных биологически активных соединений в эритроциты и исключения возможных ошибок оператора в ходе выполнения этого сложного процесса, была разработана полностью автоматическая установка для включения ферментов и других биологически активных соединений в эритроциты методом проточного гипоосмотического диализа. Были отработаны условия проведения данного метода для получения наиболее эффективного включения препарата.

Для получения клинически перспективных аммоцитов, содержащих ГДГ и АЛТ, также был использован наиболее эффективный метод включения ферментов в эритроциты с помощью проточного диализа, а кроме того, стандартный препарат ГДГ из бычьей печени, который подвергается агрегации при увеличении его концентрации в растворе выше 0.1 мг/мл, был заменен неспособным агрегировать бактериальным препаратом ГДГ из *Proteus* sp. Это позволило увеличить эффективность включения ГДГ в эритроциты более, чем в 5 раз. Были исследованы свойства впервые полученных таким способом аммоцитов и их изменение в ходе 6 дней хранения при +4°C. При этом было показано, что оба включенных фермента работают в клетке согласованно. Активности всех ферментов в работе измеряли биохимическими методами (при  $\lambda=710$  нм для измерения аспарагиназы и  $\lambda=340$  нм для ГДГ и АЛТ). Уровень гемоглобина при измерении скорости гемолиза и осмотической резистентности эритроцитов измеряли спектрофотометрически (при  $\lambda=540$  нм). Аммоний и аланин измеряли флуориметрически по убыли NADH ( $\lambda_{\text{возб}}=365$  нм,  $\lambda_{\text{испуск}}=440$  нм). Стандартные эритроцитарные индексы измеряли на клиническом гематологическом анализаторе. Все полученные результаты были статистически обработаны.

#### **Положения, выносимые на защиту**

1. Метод проточного диализа является оптимальным для получения ЭБР с включенными ферментами (аспарагиназой или ГДГ из *Proteus* sp. и АЛТ).
2. Разработанная автоматическая установка и соответствующий метод для стерильного включения лекарственных соединений в эритроциты позволяют увеличить эффективность включения аспарагиназы в эритроциты по сравнению со всеми другими существующими устройствами.

3. Активность ферментов (аспарагиназы или ГДГ из *Proteus* sp. и АЛТ), включенных в ЭБР методом гипоосмотического проточного диализа, сохраняется внутри эритроцитов 14 дней (для аспарагиназы) и 6 дней (для ГДГ и АЛТ). Свойства полученных ЭБР (стандартные эритроцитарные индексы и осмотическая резистентность) не уступают свойствам ранее полученных в других работах ЭБР и не изменяются драматически в ходе хранения ЭБР.

4. Измерение фильтруемости эритроцитов может быть использовано для характеристики деформируемости полученных ЭБР.

5. ЭБР с аспарагиназой, полученные с помощью метода гипоосмотического проточного диализа в стерильных условиях, безопасны, имеют более продолжительное время жизни в кровотоке по сравнению со свободным ферментом и способны снижать концентрацию аспарагина в плазме, причем продолжительность истощения аспарагина пропорциональна активности включенной в ЭБР аспарагиназы.

6. ГДГ из *Proteus* sp. и АЛТ из сердца свиньи могут быть совместно включены в эритроциты методом проточного диализа. Инкапсуляция данным методом позволяет увеличить эффективность включения обоих ферментов.

7. Полученные аммоциты потребляют аммоний из среды *in vitro*, при этом включенные в эритроцит ферменты работают согласованно.

**Степень достоверности результатов.** Достоверность результатов и справедливость сделанных на их основании выводов обеспечены использованием общепринятых современных методов анализа (спектрофотометрия, флуориметрия, статистические методы обработки результатов) и подтверждаются внутренней согласованностью всех полученных материалов и их согласованностью с ранее опубликованными в литературе результатами.

**Апробация результатов.** Результаты работы были представлены на International Conference of Systems Biology and Systems Physiology: Regulation of Biological Networks, Moscow, December 7-9, 2020 (Москва, Россия) (2 доклада); на Hybrid International Conference of Systems Biology and Systems Physiology: Regulation of Biological Networks, dedicated to 75<sup>th</sup> anniversary of Fazly Ataulakhanov, Moscow, August 25-27, 2021 (Москва, Россия) (2 доклада); 4<sup>th</sup> International virtual Conference on Pharmaceutics and Advanced Drug Delivery Systems, April 5, 2021, London, UK; Российском конгрессе «Детская онкология, гематология и иммунология XXI века: от науки к практике», 27-29 мая, 2021 (Москва, Россия).

**Публикации.** По результатам работы опубликовано 14 работ, в том числе статей в рецензируемых журналах – 7, публикаций в трудах конференций – 6, 1 патент.

**Структура и объем работы.** Диссертация изложена на 147 страницах машинописного текста и включает содержание, введение, литературный обзор (глава 1), описание материалов и методов (глава 2), результаты и обсуждение (глава 3), заключение, выводы, список цитированной литературы (193 источника), список сокращений и благодарности. Работа содержит 27 рисунков и 5 таблиц.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** описана актуальность исследованной темы, цели и задачи исследования и дана общая характеристика работы.

**Глава 1** содержит обзор литературы, который включает описание строения, метаболизма и регуляции объема эритроцитов, описание гипоосмотических методов

включения в эритроциты биологически активных веществ, а также функций, которые могут осуществлять эритроциты-носители лекарств (фармакоциты) в организме. Изложены сведения об использовании аспарагиназы в противоопухолевой терапии, а также описаны предыдущие попытки создать ЭБР для убиения из кровотока аспарагина или избыточного аммония.

**Глава 2** описывает материалы и методы, использованные при выполнении работы. Включение аспарагиназы в эритроциты гипоосмотическими методами лизиса или диализа в мешках были проведены по ранее описанным стандартным процедурам. Включение ферментов с помощью гипоосмотического проточного диализа подробно описано ниже. Кроме методов включения биологически активных соединений в эритроциты подробно описаны методы пробоподготовки, а также измерения параметров, характеризующих состояние эритроцитов (осмотической резистентности клеток, их стандартных гематологических индексов, стерильности и апиrogenности, а также фильтруемости через искусственные фильтры с диаметром пор 3-5  $\mu\text{м}$ ). Последний метод также описан подробно ниже. Активности ферментов (ГДГ, АЛТ и аспарагиназы) были измерены спектрофотометрически при  $\lambda=340$  нм (для ГДГ и АЛТ) и  $\lambda=710$  нм (для аспарагиназы). Концентрации аммония и аланина измеряли флуориметрически по убыли NADH ( $\lambda_{\text{возб}}=365$  нм,  $\lambda_{\text{испуск}}=465$  нм). Описаны также процедуры статистической обработки результатов. Для включения ГДГ и АЛТ в эритроциты были использованы диализаторы малого объема (~ 1-0.85 мл), сборка которых также проводилась согласно ранее описанной методике.

**Включение аспарагиназы в эритроциты методом гипоосмотического проточного диализа.** Установку с диализатором и контейнерами для компонентов крови помещали в ламинарный шкаф. Система для включения аспарагиназы оставалась закрытой на протяжении всей процедуры. Использовали только стерильные растворы. К 45-65 мл суспензии отмытых эритроцитов с гематокритом 60-65% добавляли 380-400  $\mu\text{л}$  раствора L-аспарагиназы (с активностью 2500 МЕ/мл). Диализ проводили в системе, состоящей из стандартного педиатрического диализатора, стерильных мешков и кровопроводящих магистралей. Эритроцитарную суспензию с ферментом прокачивали через внутренний контур диализатора со скоростью 1-3 мл/мин, а гипоосмотический раствор (5 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 2 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 5 мМ глюкозы, 37 мМ  $\text{NaCl}$ , 60 мОсм/кг, pH 7.4) прокачивали противотоком через внешний контур со скоростью 10-30 мл/мин. После окончания прохождения суспензии по внутреннему контуру, через него прокачивали еще 20-30 мл физиологического раствора для того, чтобы вымыть оставшиеся в диализаторе эритроциты в приемный мешок. Для отмывания эритроцитов и фармакоцитов в случае проведения стерильной процедуры включения аспарагиназы использовали стандартный прибор для отмывания клеток крови – АСР-215 (Haemonetics SA, США) с применением стандартных одноразовых комплектов для такого отмывания и стерильного раствора Bio-Wash (физиологический раствор и 0.2% глюкозы). После отмывания эритроцитов на АСР-215 суспензия клеток имеет гематокрит от 10 до 20%, поэтому ее центрифугировали еще 1 раз для того, чтобы сконцентрировать с помощью фракционатора до гематокрита 40-50%. В случае работы на разработанной автоматической установке для включения биологически активных компонентов в эритроциты, концентрирование суспензии клеток после их отмывания проводилось стерильно с использованием того же диализатора автоматически. После окончания диализа к суспензии добавляли гиперосмотический раствор (1 М  $\text{NaCl}$ , 50



мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 5 мМ АТФ, 50 мМ глюкозы, 50 мМ натриевой соли пирувата, рН 7.4, 2240 мОсм/кг) в количестве, рассчитанном по формуле:

$$V_{\text{гипер}} \text{ (в мл)} = V_{\text{сусп}} \times (\text{Осм}_{\text{целев}} - \text{Осм}_{\text{диализ сусп}}) / (\text{Осм}_{\text{гипер}} - \text{Осм}_{\text{целев}}) \quad (1),$$

где  $V_{\text{гипер}}$  - объем гипертонического раствора, который необходимо добавить,  $V_{\text{сусп}}$  - объем диализированной суспензии эритроцитов,  $\text{Осм}_{\text{диализ сусп}}$  - исходная осмоляльность диализированной суспензии (60 мОсм/кг),  $\text{Осм}_{\text{целев}}$  - конечная осмоляльность суспензии, которой требуется достичь (равная примерно 300 мОсм/кг) и  $\text{Осм}_{\text{гипер}}$  - осмоляльность гипертонического раствора (2240 мОсм/кг). Далее суспензию инкубировали при 37 °С в течение 30 мин. После этого клетки отмывали путем пятикратного центрифугирования в четырехкратном объеме буфера PBS (рН 7.4) в течение 8 мин при 1000 г.

Эффективность процедуры инкапсуляции фермента ( $E$ ) и выход клеток в ходе процедуры оценивали по формулам:

$$\text{Выход клеток (\%)} = V_{\text{конеч}} \times \text{Ht}_{\text{конеч}} \times 100 / (V_{\text{исх}} \times \text{Ht}_{\text{исх}}) \quad (2),$$

$$E (\%) = A_{\text{конеч}} \times V_{\text{конеч}} \times 100 / (A_{\text{исх}} \times V_{\text{исх}}) \quad (3),$$

где  $A_{\text{исх}}$  и  $A_{\text{конеч}}$  - активности фермента в исходной суспензии эритроцитов до процедуры и конечной суспензии фармакоцитов с включенным ферментом, соответственно;  $V_{\text{исх}}$  и  $V_{\text{конеч}}$  - объемы;  $\text{Ht}_{\text{исх}}$  и  $\text{Ht}_{\text{конеч}}$  - гематокриты этих суспензий, соответственно.

**Измерение фильтруемости эритроцитов.** Фильтруемость клеток измеряли, пропуская суспензию эритроцитов через мембранный фильтр с порами диаметром 3.1  $\mu\text{м}$  на фильтрометре ИДА-1. Образцы суспензий разбавляли в PBS до гематокрита 0,1%. Измерения проводили при комнатной температуре. Время, необходимое для пропускания через фильтр фиксированного объема (0,250 мл) буфера PBS ( $t_b$ ), а затем суспензии эритроцитов ( $t_s$ ), измеряли с точностью до 0,1 секунды с помощью датчика, установленного в крышке, закрывающей заполненную образцом колонку. В качестве мембранного фильтра использовали полиэтилентерефталатную пленку толщиной 7  $\mu\text{м}$ . Для характеристики фильтруемости были определены два параметра: индекс фильтруемости (4) и доля клеток, которые не могут пройти через фильтр ( $Z$ , %), которую рассчитывали согласно формуле (5):

$$F = t_b / t_s \quad (4),$$

$$Z = N \times 100 / m \quad (5),$$

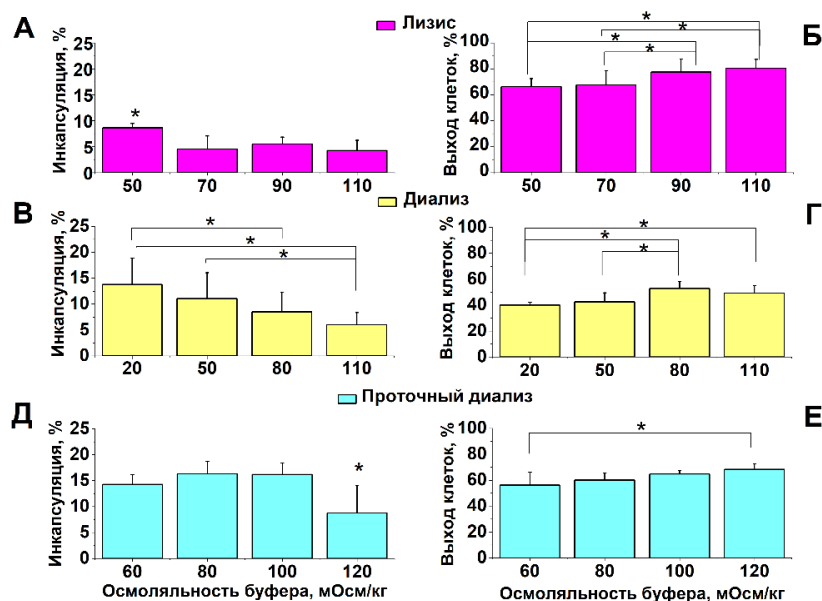
где  $N$  — количество пор, которые были заблокированы непрофильрованными клетками,  $m$  - количество эритроцитов, которые были помещены на фильтр. Величину  $N$  определяли по уравнению (6), зная общее число пор на фильтре ( $N_0$ ), и время повторного прохождения буфера (0,250 мл) через фильтр ( $t_{b1}$ ), который был отмыт после пропускания через этот фильтр 0,250 мл исследуемой суспензии:

$$N = N_0 \times (t_{b1} - t_b) / t_{b1} \quad (6).$$

**Глава 3** посвящена описанию полученных результатов и их обсуждению.

**Включение L-аспарагиназы в эритроциты различными методами.** Считается, что наиболее мягкими и эффективными методами для включения ферментов в эритроциты являются гипотонические. Основным принцип данных методов состоит в том, что эритроциты подвергаются воздействию дозированного гипотонического стресса, что приводит к образованию в их мембране временных пор, через которые в клетку входят вещества, находящиеся во внешней среде. После восстановления в среде нормальной осмотичности поры закрываются и вещество оказывается запечатанным внутри клетки. Для выбора оптимального метода включения в эритроциты L-аспарагиназы (аспарагиназы) в работе было проведено сравнительное изучение трех гипотонических методов: метода

обратимого гипоосмотического лизиса (лизиса), гипоосмотического диализа в диализных мешках (диализа) и проточного гипоосмотического диализа (проточного диализа). Выбор оптимального метода осуществляли, анализируя эффективность инкапсуляции аспарагиназы, процент выживших после процедуры клеток, стандартные эритроцитарные индексы и осмотическую резистентность полученных ЭБР. Для каждого метода эксперименты были проведены при различной осмоляльности гипоосмотического буфера (Рисунок 1). В результате, в качестве оптимального метода загрузки аспарагиназы в эритроциты, был выбран метод проточного диализа (Таблица 1).



**Рисунок 1.** Зависимость эффективности включения в эритроциты (А, В, Д) и выхода клеток (Б, Г, Е) от осмоляльности гипоосмотического буфера при включении аспарагиназы в эритроциты разными методами. (А и Б) – Метод лизиса при осмоляльностях 50 мОсм/кг (n=12), 70 мОсм/кг (n=17), 90 мОсм/кг (n=17) и 110 мОсм/кг (n=17); (В и Г) – метод диализа в мешках при осмоляльностях 20 мОсм/кг (n=6), 50 мОсм/кг

(n=6), 80 мОсм/кг (n=12) и 110 мОсм/кг (n=12); (Д и Е) – проточный диализ при 60 мОсм/кг, 80 мОсм/кг, 100 мОсм/кг, 120 мОсм/кг (для каждой осмоляльности n=6). Представлены средние значения  $\pm$  стандартное отклонение (SD); \* - отличие отмеченной группы от всех других достоверно, либо различие между группами, отмеченными скобкой, достоверно (ANOVA, post hoc Tukey test,  $p < 0,05$ ).

При физиологической осмоляльности среды фармакоциты, полученные методом проточного диализа наиболее близки к нативным эритроцитам по показателю осмотической резистентности. Незначительное снижение MCV, MCH и MCHC из-за потери части гемоглобина не ухудшает существенно функцию ЭБР с аспарагиназой, т.к. основной функцией таких ЭБР является не перенос кислорода, а удаление аспарагина.

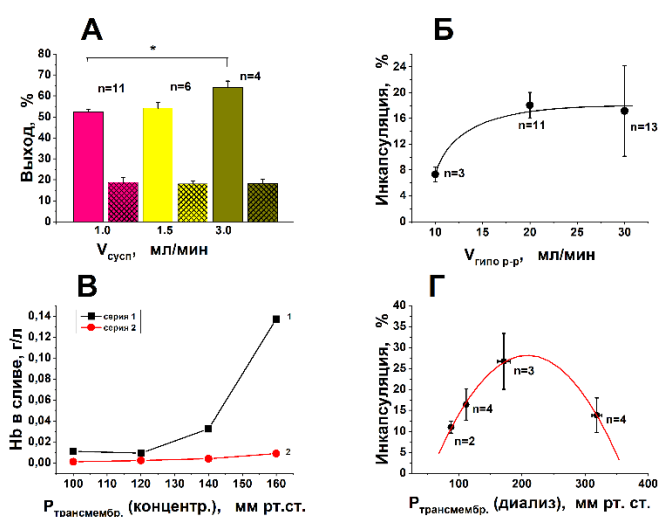
Метод лизиса прост, но является самым жестким и дает низкие выходы включения фермента. Метод диализа является сложной лабораторной методикой, что затрудняет получение таких ЭБР в клинике.

**Выбор оптимальных условий проведения процедуры проточного диализа.** Для повышения эффективности включения фермента в эритроциты методом проточного диализа, после подбора оптимальных условий проведения процедуры, были выбраны следующие скорости протекания суспензии эритроцитов и гипоосмотического буфера по внутреннему и внешнему контуру диализатора: 3 мл/мин и 20 мл/мин, соответственно; трансмембранное давление в диализаторе на стадии концентрирования суспензии (только при использовании автоматической установки для включения лекарств в эритроциты) и лизиса эритроцитов – 100 мм рт. ст. и 170 мм рт. ст., соответственно (Рисунок 2). Эти

**Таблица 1.** Сравнение выхода клеток, процента инкапсуляции аспарагиназы и показателей качества ЭБР, полученных с помощью различных гипоосмотических методов, проведенных при осмоляльностях, соответствующих максимальной эффективности инкапсуляции фермента для каждого из методов <sup>1)</sup>.

Параметр	Нативные эритроциты	Лизис (50 мОсм/кг)	Диализ (20 мОсм/кг)	Проточный диализ (90 мОсм/кг)
Инкапсуляция L-аспарагиназы, %	-	8,6±0,9* (n=12)	13,8±5,1 (n=7)	16,2±2,2 (n=6)
Выход клеток, %	-	66,2±6,3 (n=12)	40,0 ±2,1* (n=6)	64,7±2,6 (n=6)
MCV, фл	80,0±10,3 (n=53)	70±5,5 (n=12)	70,8±1,3 (n=8)	66,0±5,0 (n=6)
МСН, пг	22,7±8,7 (n=53)	7,7±0,5* (n=12)	16,1±1,8 (n=8)	15,1±1,6 (n=6)
МСНС, г/дл	27,5±9,0 (n=53)	12,3±1,4* (n=12)	22,8±2,2 (n=8)	22,2±1,9 (n=6)
H <sub>50</sub> , мОсм/кг	133,3±10,6 (n=16)	125,3±21,7 (n=5)	140,8±16,9* (n=8)	93,7±13,1 (n=14)
W, мОсм/кг	52,4±14,7 (n=16)	148,8±29,1 (n=5)	185,5±15,0* (n=8)	138,1±18,9 (n=14)

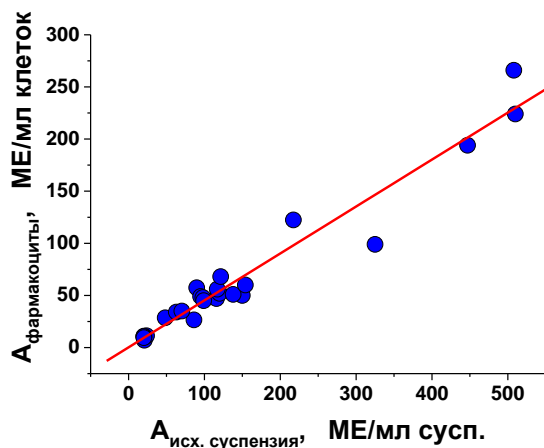
1) Представлены средние значения ± SD; n – количество экспериментов; MCV – средний объем эритроцита (в фл); МСН – среднее содержание гемоглобина в клетке (в пг); МСНС – средняя концентрация гемоглобина в клетке (в г/дл); H<sub>50</sub> – осмоляльность, при которой 50% клеток лизировано; W – ширина распределения клеток по осмотической резистентности равная разности осмоляльностей, при которых лизировано 10 и 90% клеток; \* - отличие отмеченной группы от двух других достоверно; (ANOVA,  $p < 0,05$ ).



**Рисунок 2.** Подбор оптимальных условий проведения процедуры проточного диализа. **А** и **Б** – Зависимость выхода клеток и инкапсуляции от скорости протекания суспензии эритроцитов и гипоосмотического раствора во внутреннем и внешнем контуре диализатора, соответственно. **В** и **Г** – зависимость уровня гемолиза при работе с автоматической установкой (**В**) и выхода инкапсуляции (**Г**) от трансмембранного давления в диализаторе на стадии концентрирования (**В**) и диализа (**Г**) клеточной суспензии.

параметры способствуют снижению потери клеток из-за гемолиза на стадии концентрирования суспензии и увеличению выхода включения фермента на стадии диализа. Достоверной зависимости процента включения от гематокрита исходной суспензии в интервале 40-60 % обнаружено не было. Удельная активность аспарагиназы в

фармакоцитах, была прямо пропорциональна активности аспарагиназы в исходной суспензии эритроцитов (Рисунок 3).



**Рисунок 3.** Зависимость удельной активности аспарагиназы в фармакоцитах ( $A_{\text{фармакоциты}}$ ) от активности аспарагиназы в исходной суспензии ( $A_{\text{исх. суспензия}}$ ).

**Получение эритроцитов с аспарагиназой методом проточного диализа в стерильных условиях.** Для получения ЭБР с аспарагиназой, пригодных для использования в клинике, была разработана стерильная процедура включения фермента в эритроциты. Стерильность обеспечивалась проведением всего процесса в закрытом контуре установки в ламинарном шкафу, с использованием одноразовых стерильных магистралей, мешков для эритроцитов и диализатора, а также стерильных рабочих растворов для отмывания эритроцитов и ЭБР, гипоосмотического диализа и запечатывания полученных ЭБР.

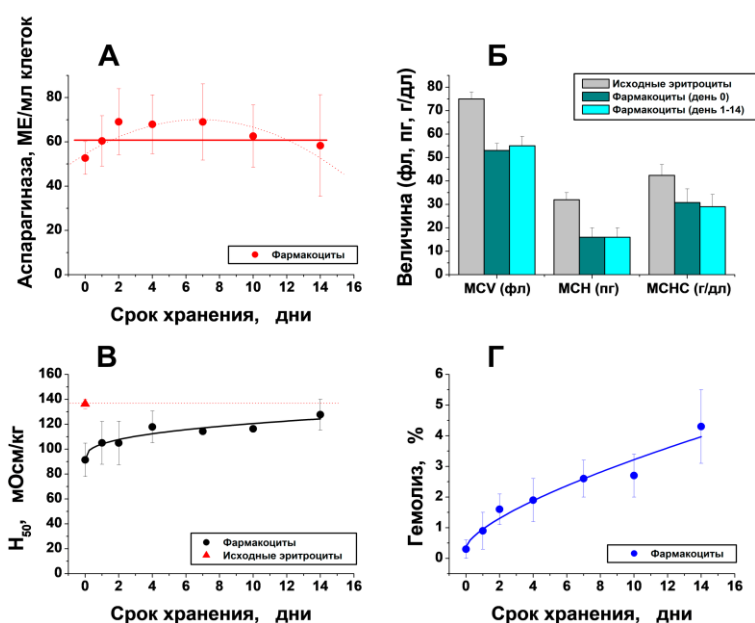
Эффективность разработанной процедуры и стерильность полученных ЭБР были исследованы в 24 экспериментах (5 в отсутствии аспарагиназы), в каждом из которых была проверена стерильность и апиrogenность полученного продукта с помощью стандартного теста на стерильность, проводимого в Бактериологической лаборатории в Национальном медицинском исследовательском центре детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева (НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева), и LAL-теста. Все препараты показали полную стерильность на протяжении всего времени проведения теста (7 дней). Эффективность инкапсуляции фермента и выход клеток при этом не изменились по сравнению с нестерильными процедурами ( $16.7 \pm 2.2\%$  и  $64.7 \pm 2.6\%$  против  $17.0 \pm 2.0\%$  и  $64.5 \pm 2.5\%$  для нестерильной и стерильной процедуры, соответственно). Не изменилась принципиально и кривая осмотической резистентности полученных ЭБР.

**Изменение качества ЭБР с аспарагиназой в процессе хранения.** Свойства ЭБР с аспарагиназой, полученных методом проточного диализа в стерильных условиях, были исследованы как сразу после получения, так и в процессе хранения 10% суспензии этих ЭБР в растворе SAG-M при  $+4^\circ\text{C}$ . Полученные показатели (MCV, MCH и MCHC, осмотическая резистентность клеток (ЭБР и исходных эритроцитов) и скорость их гемолиза при хранении суспензии в течение 14 дней представлены на Рисунке 4.

Активность аспарагиназы внутри клеток практически не падает в течение 14 дней хранения (Рисунок 4А). Величины MCV, MCH и MCHC сразу после получения ЭБР ниже, чем в исходных эритроцитах примерно на 30%, однако дальнейшего падения этих показателей в процессе хранения суспензии ЭБР при  $4^\circ\text{C}$  не происходит (Рисунок 4Б). Осмоляльность, при которой лизирует 50% фармакоцитов ( $H_{50}$ ) в ходе хранения вырастает с 90 мОсм/кг до 130 мОсм/кг (Рисунок 4В). Точная причина этого не известна, но можно

предположить, что в ходе хранения наиболее поврежденная в процессе инкапсуляции фермента часть клеток достаточно быстро лизирует, а оставшиеся клетки в растворе, который содержит инозин, аденин и глюкозу, постепенно восстанавливают свой метаболизм. Концентрации метаболитов гликолиза, часть которых была потеряна в ходе процедуры, постепенно восстанавливаются. Клетки в целом становятся ближе к нормальным и осмоляльность, при которой половина из них лизирует, немного повышается.

Одним из важнейших требований для переливания человеку эритроцитарной суспензии является уровень гемолиза, то есть процент свободного гемоглобина (вне эритроцитов) по отношению к общему количеству гемоглобина в суспензии. В соответствии с принятыми в России правилами, этот уровень не должен превышать 0,8% (при переливании одной дозы ( $250 \pm 50$  мл) эритроцитарной массы с гематокритом 60-70%). Было показано, что уровень гемолиза 0,8% достигается в суспензии фармакоцитов в течение первых суток хранения (Рисунок 4Г). Это означает, что полученные фармакоциты с ферментом не подлежат длительному хранению и, по возможности, должны быть перелиты пациенту именно в течение первых суток, либо перед переливанием должны быть дополнительно отмыты.



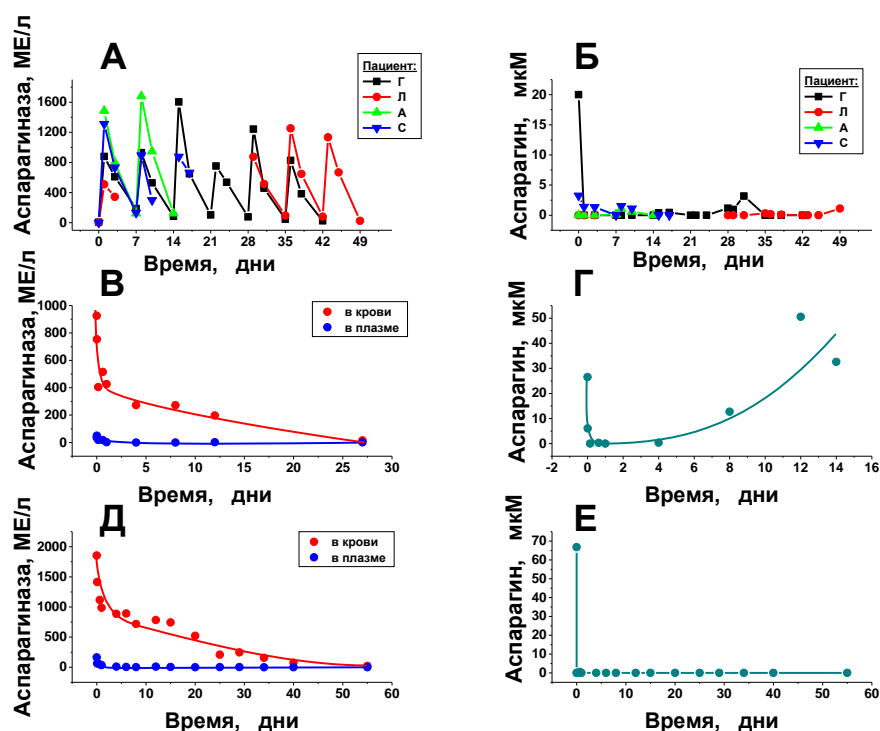
**Рисунок 4.** Изменение активности аспарагиназы (А), гематологических индексов (Б), параметра осмотической резистентности  $H_{50}$  (В) и гемолиза эритроцитов (Г) в ходе хранения суспензии ЭБР в течение 14 дней. Представлены средние значения  $\pm$  SD;  $n=9$  для панелей А, Б, В и  $n=6$  для панели Г.

Таким образом, переход к стерильной технологии получения фармакоцитов с аспарагиназой не влияет на конечный результат, а именно выход клеток, эффективность включения и качество полученных ЭБР. Это позволило нам перейти к пилотным клиническим испытаниям данных ЭБР.

**Исследование фармакокинетики и фармакодинамики аспарагиназы, при внутримышечном введении раствора фермента.** Согласно применяемому в России протоколу лечения ОЛЛ (ALL MB 2015 - Acute Lymphoblastic Leukemia Moscow-Berlin 2015) раствор аспарагиназы вводят внутримышечно в дозе  $10000 \text{ ME/m}^2$  1 раз в неделю в течение 6 недель каждого из трех курсов консолидации. Чтобы сравнить введение стандартного раствора аспарагиназы и вновь разработанного препарата аспарагиназы в эритроцитах, были изучены фармакокинетические и фармакодинамические показатели

каждого из этих препаратов. При введении раствора аспарагиназы были измерены активности аспарагиназы в крови, а также уровень аспарагина в плазме в различное время после введения препарата. Полученные результаты представлены на Рисунке 5А и 5Б.

При стандартном введении пациентам аспарагиназы в растворе ( $10000 \text{ ME/m}^2$ ) ее активность быстро падала практически до нуля в течение первых 7 суток (Рисунок 5А), поэтому для поддержания терапевтической концентрации ( $100 \text{ ME/л}$  крови) аспарагиназу вводили каждые 7 дней. Измеренное время полувыведения активности аспарагиназы из крови при внутримышечном введении раствора свободного фермента составило 40.8 ч.



**Рисунок 5.** А - Фармакокинетика аспарагиназы в крови для 4 пациентов, получавших раствор аспарагиназы (1 раз в неделю внутримышечно в дозе  $10000 \text{ ME/m}^2$  в течение до 6 недель). Б - Уровень аспарагина в плазме тех же пациентов. В и Д – фармакокинетика аспарагиназы в эритроцитах (в крови и плазме) у пациентов 1 и 2, соответственно. Г и Е – уровень аспарагина в плазме пациентов 1 и 2, соответственно.

**Исследование безопасности препарата L-аспарагиназы в эритроцитах.** Первой задачей клинических испытаний новых ЭБР с аспарагиназой было испытание их безопасности. На сегодняшний день в исследовании приняли участие 2 пациента в возрасте от 12 до 13 лет, оба с рецидивом ОЛЛ. Информированное согласие на участие данных пациентов в исследовании было получено от их родителей. Оба пациента получили фармакоциты с аспарагиназой (Kidrolase, EUSA Pharma SAS, Франция) однократно. Было исследовано появление любых отрицательных побочных явлений после переливания фармакоцитов. Фармакоциты с аспарагиназой хорошо переносились пациентами. В обоих случаях не наблюдалось никаких побочных реакций, связанных с их введением.

**Фармакокинетика аспарагиназы и уровень аспарагина в плазме пациентов, получивших ЭБР с аспарагиназой.** Кинетика снижения активности аспарагиназы, инкапсулированной в эритроциты, в крови представляла собой двухфазную кривую. В первые 24 ч после введения наблюдалось резкое падение этой активности, после чего оно прекращалось и скорость дальнейшего экспоненциального снижения активности

аспарагиназы в крови становилась ниже (Рисунок 5В и 5Д). Это соответствовало ранее опубликованным литературным данным о фармакокинетике аспарагиназы в эритроцитах. Медленное снижение наблюдалось в течение 28 дней у пациента 1 и в течение 55 дней у пациентки 2. При этом, наблюдалась минимальная активность аспарагиназы в плазме, что еще раз подтверждает, что аспарагиназа находится внутри эритроцитов. Время полувыведения из крови активности аспарагиназы для медленной фазы выведения составило 5.4 и 9.7 дня для пациентов 1 и 2, соответственно. ЭБР с аспарагиназой снижали уровень аспарагина в плазме. У обоих пациентов он быстро падал до 0 в первые часы после введения ЭБР (Рисунок 5Г и 5Е). Однако у пациента 1 концентрация аспарагина начала восстанавливаться уже на 7 день после введения ЭБР. Это, по-видимому, связано с низкой дозой аспарагиназы в эритроцитах, введенной этому пациенту. В то же время у пациентки 2, получившей более высокую дозу препарата, истощение аспарагина наблюдалось на протяжении 55 дней, то есть, уровень аспарагина ниже 2  $\mu\text{M}$ , необходимый для терапевтического действия препарата, поддерживался в плазме тем дольше, чем выше была доза введенного фермента. Таким образом, одно введение аспарагиназы в эритроцитах в дозе 189 МЕ/кг может быть сопоставимо с 8 введениями стандартной свободной аспарагиназы из *E. coli* (10000 МЕ/м<sup>2</sup> 1 раз в неделю), что подтверждает перспективность данного препарата.

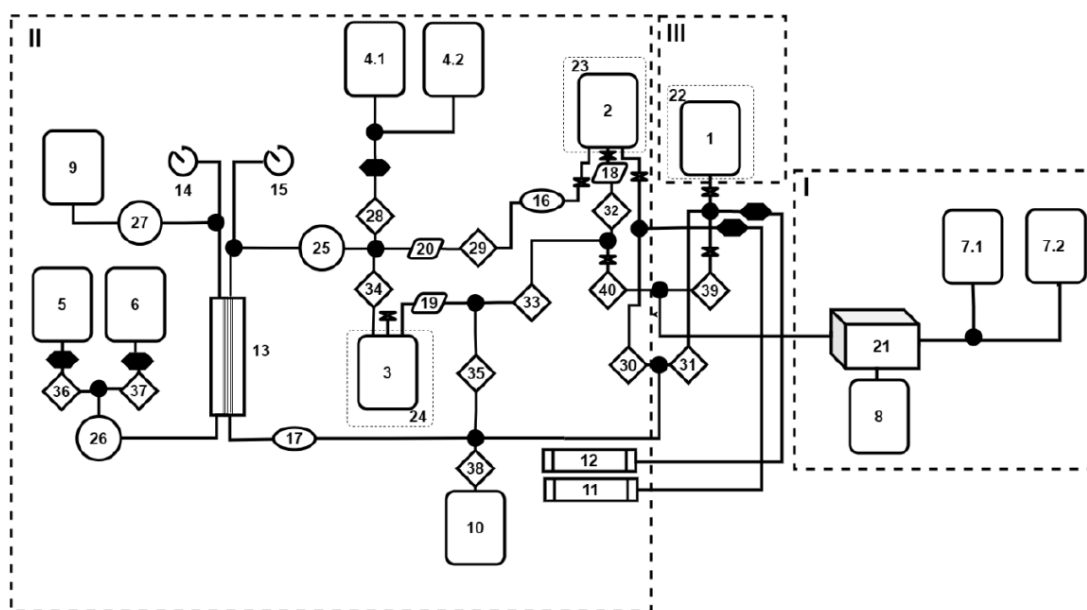
**Разработка автоматического устройства для включения биологически активных компонентов в эритроциты.** Ограничения, препятствующие более широкому применению ЭБР в клинике, связаны с отсутствием эффективных методов, позволяющих рутинно включать препараты в эритроциты для целей терапии. Поэтому разработка автоматического устройства, позволяющего инкапсулировать лекарственные средства в эритроциты в стандартных условиях и с высокой эффективностью, является одной из ключевых задач для применения фармакоцитов в клинической практике. В нашей лаборатории впервые в России была разработана установка для автоматического включения лекарств в эритроциты.

Схема разработанной установки представлена на Рисунке 6. Принцип работы устройства основан на методе описанного выше проточного гипоосмотического диализа с использованием стандартных диализаторов.

Для обеспечения автоматизации и минимального участия оператора в работе устройства, оно объединяет все блоки, необходимые для проведения процедуры получения эритроцитов-носителей с включенным лекарственным препаратом (блоки отмывания клеток, диализа и концентрирования суспензии эритроцитов, а также блок запечатывания полученных эритроцитов-носителей лекарственного препарата). Эти блоки соединены системой гибких магистралей, по которым осуществляется перекачка необходимых растворов и суспензии эритроцитов. Управление процессом осуществляется программным обеспечением, которое управляет пережимными клапанами и насосами, т.е. движением суспензии эритроцитов и растворов в соответствии с показаниями датчиков наличия жидкости в магистралах, сигнализирующих об окончании определенных стадий процесса. Это способствует полной автоматизации всего процесса без необходимости вмешательства оператора. Движение растворов и суспензии эритроцитов по магистралам осуществляется с помощью перистальтических насосов (25-27). Насос (25) установлен на внутреннем контуре диализатора и функционирует с переменной скоростью для поддержания трансмембранного давления в диализаторе на стадии лизиса клеток на уровне 160-180 мм.



рт. ст. Насосы (26) и (27) установлены на входе и выходе из внешнего контура диализатора, соответственно, и работают на стадии диализа с одинаковой скоростью, подавая и откачивая, соответственно, раствор из внешнего контура для обеспечения минимального разбавления суспензии эритроцитов. Инкубация после добавления запечатывающего гипертонического раствора осуществляется в мешке (1) при перемешивании. Отмывка эритроцитов из цельной крови, эритроцитарной массы или продиализированной в присутствии лекарства и запечатанной суспензии эритроцитов-носителей осуществляется посредством стандартного отмывающего устройства для компонентов крови, например, АСР-215 фирмы Haemonetics (21).



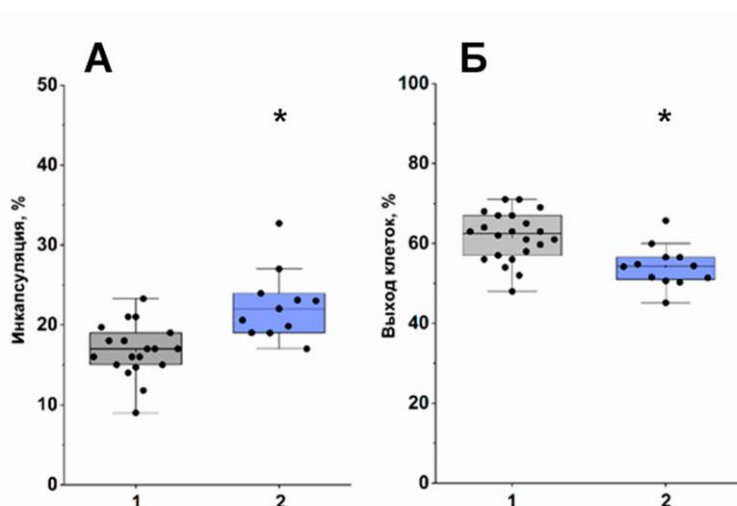
**Рисунок 6.** Схема автоматического устройства для инкапсуляции лекарственных средств в эритроциты, где: (1-10) – мешки для компонентов крови и растворов, (11, 12) – шприцевые насосы для добавления лекарственного вещества и гиперосмотического запечатывающего раствора, соответственно, (13) – диализатор, (14, 15) – датчики давления на внешнем и внутреннем контурах диализатора, (16, 17) – датчики гематокрита, (18-20) – датчики наличия жидкости в магистрали, (21) – отмывающее клетки устройство, (22-24) – перемешивающие устройства (шейкеры), (25-27) – перистальтические насосы, (28-40) – клапаны, пережимающие магистрали, I, II, III – блоки отмывки, диализа и инкубации, соответственно, с поддержанием температуры 20-25°C, 4-8°C и 35-40°C, соответственно.

Как уже было сказано выше, в нашем устройстве предусмотрена стадия концентрирования для обеспечения нужного гематокрита до и после инкапсуляции лекарственного вещества. Концентрирование также осуществляется посредством диализатора (13). В ходе концентрирования суспензия эритроцитов прокачивается по внутреннему контуру диализатора “по кольцу” из мешка (2) в мешок (2). На внешнем контуре диализатора, по-прежнему, работают оба насоса ((26) и (27)), однако насос (26) работает с постоянной скоростью, а насос (27) работает с переменной скоростью, которая сначала больше, чем скорость работы насоса (26). В результате насосом (27) из внешнего контура диализатора выкачивается избыточный раствор за счет чего происходит концентрирование суспензии, которое контролируется датчиками гематокрита (16, 17). Концентрирование происходит до тех пор, пока скорости работы насосов (26) и (27) не



сравниваются. Подбор оптимальных условий работы устройства на каждом из этапов процесса уже был описан выше (Рисунок 2).

**Получение ЭБР с аспарагиназой с использованием нового устройства.** С помощью разработанного автоматического устройства было проведено 11 экспериментов по включению аспарагиназы в эритроциты в стерильных условиях. Полученные на автоматической установке выходы инкапсуляции аспарагиназы и выходы клеток были сравнены с ранее полученными аналогичными выходами при включении аспарагиназы в стерильных условиях, но без автоматизации процесса (n=19) (Рисунок 7). Переход к автоматическому способу включения позволяет увеличить эффективность инкапсуляции аспарагиназы, несмотря на большую потерю клеток, которое может быть связано с добавлением стадий концентрирования, т.к. чем больше стадий, через которые проходят клетки, тем больше вероятность их потери.



**Рисунок 7.** Сравнение эффективности инкапсуляции аспарагиназы в эритроциты (А) и выхода клеток (Б) при включении фермента стерильным методом на лабораторной установке без полной автоматизации процесса (1) (n=19) и на разработанном автоматическом устройстве (2) (n=11). \* - Различие двух групп достоверно (Mann-Whitney Test,  $p < 0,05$ ).

Эффективность инкапсуляции аспарагиназы в эритроциты с использованием разработанного автоматического устройства, превосходит эффективность включения этого фермента с использованием других запатентованных устройств-аналогов, составляя 22.5% вместо 16-16.6% во всех 3 известных установках.

Отличиями разработанного устройства, позволяющими получать фармакоциты с большей эффективностью, чем с помощью других запатентованных систем, являются:

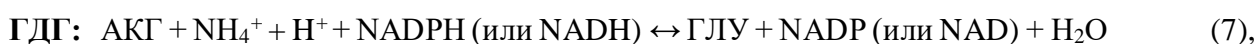
- наличие стадии концентрирования эритроцитов перед процедурой диализа, что позволяет повысить выход инкапсуляции за счет повышения гематокрита суспензии на стадии диализа и рационально расходовать фермент, создавая (при одинаковом количестве добавленного в систему препарата) его более высокую концентрацию в исходной суспензии;
- обеспечение минимального разбавления суспензии во время гипотонического диализа, что позволяет сохранять высокую концентрацию фермента в растворе, окружающем эритроциты. Минимальное разбавление достигается за счет того, что насосы, подающие и откачивающие раствор из внешнего контура, работают с одинаковой скоростью, не позволяя избыточной жидкости входить во внутренний контур диализатора и разбавлять суспензию эритроцитов;

- создание определенного оптимального трансмембранного давления в диализаторе во время стадий диализа и концентрирования (160-180 и 90-120 мм рт. ст., соответственно), что позволяет повысить эффективность включения препарата и снизить потери клеток в результате гемолиза. Это обеспечивает высокую сходимость получаемых результатов;
- полная автоматизация процесса, начиная с отмывания эритроцитов из цельной крови, и заканчивая получением готовой суспензии фармакоцитов, способствующая стандартизации процесса и исключающая возможность ошибок оператора.

Кроме того, созданная установка позволяет работать как с цельной кровью (начиная с малых объемов от 50-70 мл), так и с уже предварительно отмывтой эритроцитарной массой.

***Эритроциты-биореакторы, утилизирующие из кровотока аммоний (аммоциты).***

Повышение концентрации аммония в крови (гипераммониемия) токсично для центральной нервной системы, поэтому удаление аммония из кровотока является важной задачей. Одним из путей ее решения может быть использование эритроцитов-биореакторов с загруженными внутрь ферментами, перерабатывающими аммоний. С помощью математического моделирования ранее было показано, что оптимальной ферментной системой, которая может обеспечить длительность действия аммоцитов в организме, является система двух ферментов: глутаматдегидрогеназы (ГДГ) и аланинаминотрансферазы (АЛТ), которые должны быть включены в эритроциты совместно. В результате, в эритроците создается новый метаболический путь, в котором  $\alpha$ -кетоглутарат и L-глутаминовая кислота производятся и потребляются в циклическом процессе:



где  $\text{NH}_4^+$  — ион аммония, АКГ —  $\alpha$ -кетоглутарат, ГЛУ — глутамат, ПИР — пируват, АЛА — аланин, NADP и NADPH — окисленная и восстановленная формы никотинамидадениндинуклеотидфосфата, соответственно.

Это обеспечивает независимость работы аммоцитов от проницаемости мембраны эритроцитов для плохо проникающих через нее субстратов этих ЭБР —  $\alpha$ -кетоглутарата и глутамата.

Такие ЭБР были ранее получены методом гипоосмотического диализа в мешках, однако их эффективность была низкой. Основной причиной этого была невозможность загрузить в эритроциты достаточно высокую активность ГДГ. Это было связано с низкой удельной активностью коммерческого препарата ГДГ из бычьей печени, большим размером молекул ГДГ и, главное, с тем, что ГДГ из бычьей печени агрегирует при повышении ее концентрации в растворе выше 0.1 мг/мл, что не позволяет создать ее высокую концентрацию в суспензии при загрузке препарата. Чтобы повысить эффективность загрузки ГДГ в эритроциты, в данной работе был использован более эффективный метод загрузки (метод проточного диализа), а кроме того, животный фермент из печени бака был заменен на бактериальную ГДГ из *Proteus* sp., которая, как мы показали ранее, не агрегирует при повышении ее концентрации в растворе. В настоящей работе впервые были получены аммоциты, содержащие ГДГ из *Proteus* sp. и АЛТ, показана их способность удалять аммоний из среды *in vitro*, а также доказано, что оба включенных

фермента работают внутри эритроцитов согласованно. Были исследованы свойства новых аммоцитов как сразу после приготовления, так и в ходе хранения. При этом, впервые была измерена способность полученных аммоцитов деформироваться, которую оценивали по скорости их фильтруемости через поры искусственного фильтра, близкие по размеру к диаметру физиологических капилляров. Все измеренные показатели были сравнены с аналогичными показателями для нативных эритроцитов.

**Совместное включение ГДГ из *Proteus* sp. и АЛТ в эритроциты методом проточного гипоосмотического диализа.** Эффективность включения каждого из ферментов (ГДГ из *Proteus* sp. и АЛТ) при их совместном включении в эритроциты методом проточного диализа была сравнена с аналогичной эффективностью в более ранних работах, где был использован метод диализа в мешках и ГДГ из бычьей печени (Таблица 2).

**Таблица 2.** Эффективность инкапсуляции АЛТ из сердца свиньи и различных типов ГДГ, а также выходы клеток для различных методов загрузки ферментов в эритроциты\*).

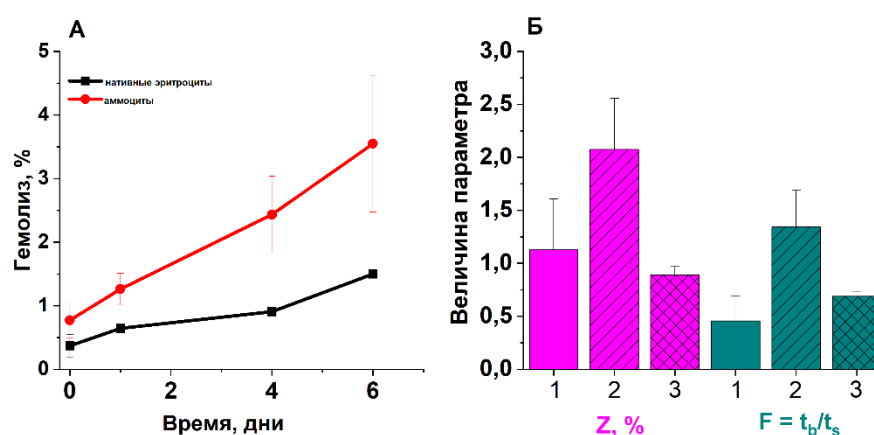
Включенный фермент	ГДГ из бычьей печени		ГДГ из <i>Proteus</i> sp.		АЛТ из сердца свиньи	
	Диализ в мешках	Проточный диализ	Диализ в мешках	Проточный диализ	Диализ в мешках	Проточный диализ
<b>Выход инкапсуляции (%)</b>	1.8 ± 0.8 (n=8) <sup>[1]</sup>  2.20 ± 0.82 (n=10) <sup>[2]</sup>  2.28±0.93 (n=7) <sup>[3]</sup>	4.70 ± 1.41 (n=9) <sup>[2]</sup>	-	12.20 ± 4.25 (n=5) <sup>[2]</sup>  9.4 ± 4.9 (n=31) (эта работа)	11.69 ± 6.39 (n=10) <sup>[3]</sup>	26.0 ± 10.0 (n=31) (эта работа)
<b>Выход клеток (%)</b>	65.1 ± 4.5 (n=8) <sup>[1]</sup>  43.3 ± 12.0 (n=10) <sup>[3]</sup>  44.0±4.8 (n=7) <sup>[2]</sup>	66.1 ± 12.0 (n=9) <sup>[2]</sup>	-	63.7±2.2 (n=5) <sup>[2]</sup>  70.0 ±9.0 (n=31) (эта работа)	43.3 ± 12.0 (n=10) <sup>[3]</sup>	70.0 ± 9.0 (n=31) (эта работа)

\*) Представлены средние значения выходов и SD для включения данных ферментов в эритроциты человека. В работах <sup>[1]</sup> и <sup>[2]</sup> исследования проводили для ГДГ в отсутствие АЛТ. В настоящей работе и работе <sup>[3]</sup> были получены аммоциты, содержащие одновременно два фермента (АЛТ и ГДГ из разных источников). (<sup>[1]</sup> - Sanz S. et al. // *Biotechnol. Appl. Biochem.*– 1995.– V. 22, № 2.– P. 223–231; <sup>[2]</sup> - Protasov E.S. et al. // *Sci. Rep.*– 2019.– V. 9, № 1.– ID 1455; <sup>[3]</sup> - Д. В. Борсакова et al. // *Биологические мембраны.*– 2019.– V. 36, № 3.– P. 192–206.)

Полученные данные подтверждают, что метод проточного диализа является более эффективным методом инкапсуляции, чем простой диализ в мешках. Более низкая инкапсуляция ГДГ по сравнению с АЛТ связана, по-видимому, с тем, что ГДГ имеет более высокую чем АЛТ молекулярную массу (340 и 115 кДа, соответственно), что позволяет АЛТ лучше проникать в образовавшиеся при диализе временные поры эритроцитов. Инкапсуляция еще увеличивается при включении в эритроциты ГДГ из *Proteus* sp., что связано, по-видимому с тем, что этот фермент не агрегирует в растворе. Таким образом, впервые была показана возможность одновременного включения ГДГ из *Proteus* sp. и АЛТ

в эритроциты методом проточного диализа. При этом эффективность включения ГДГ из *Proteus sp.* более, чем в 5 раз выше, чем при включении ГДГ из бычьей печени методом диализа в мешках.

**Исследование свойств новых аммоцитов.** Как и для ЭБР с аспарагиназой, свойства новых аммоцитов были исследованы сразу после приготовления и в ходе 6 дней хранения 10% суспензий этих клеток при 4 °С. Эксперименты показали, что существенного различия в свойствах ЭБР с аспарагиназой и аммоцитов, полученных методом проточного диализа, не наблюдается. Активности ГДГ и АЛТ в эритроцитах полностью сохранялись все 6 дней, а активность во внешней среде за 6 дней не превышала 5%. Осмотическая резистентность аммоцитов вела себя аналогично осмотической резистентности ЭБР с аспарагиназой. Аналогичной была и скорость их гемолиза (Рисунок 8А). Однако кроме уже известных параметров, в случае аммоцитов была изучена также их способность деформироваться (Рисунок 8Б).

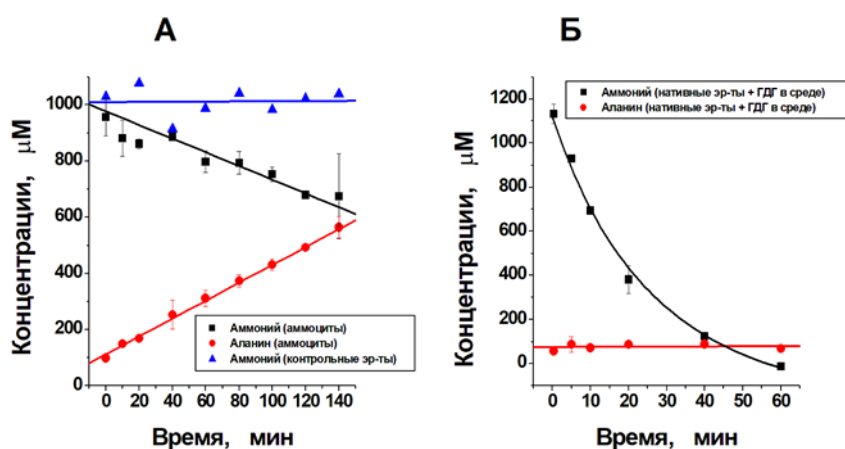


**Рисунок 8.** Изменение свойства аммоцитов и нативных эритроцитов в ходе хранения **А** – Гемолиз аммоцитов и нативных клеток на разных сроках хранения. Представлены средние значения  $\pm$  SD ( $n=4$  для нативных эритроцитов и  $n=12$  для аммоцитов). **Б** – Фильтруемость исходных эритроцитов (1), свежеприготовленных аммоцитов (2) и аммоцитов после 2 ч инкубации при комнатной температуре (3), выраженная как фракция клеток не способная проходить через фильтр ( $Z$ , %), или как индекс фильтруемости ( $F=t_b/t_s$ ). Представлены средние величины  $\pm$  SD,  $n=7$ .

Способность к деформации — одно из важнейших свойств, определяющих время жизни эритроцита в кровотоке. Она была оценена по скорости фильтрования суспензии эритроцитов через искусственные мембранные фильтры с порами, близкими по диаметру к диаметру мельчайших капиллярных сосудов (3-5  $\mu$ М). При этом были рассчитаны два параметра: индекс фильтруемости ( $F$ ), который является отношением времени, за которое через фильтр проходит 250  $\mu$ л буфера, к аналогичному времени для суспензии исследуемых клеток (с гематокритом 1%) и процент нефилтрующихся клеток в суспензии ( $Z$ ). Проведенный анализ показал, что эти параметры являются очень чувствительными к состоянию эритроцитов. Для свежеприготовленных аммоцитов  $F$  был практически в 2 раза ниже, а  $Z$ , наоборот, в 2 раза больше, чем для нативных эритроцитов. Чтобы понять, насколько необратимы эти изменения, для аммоцитов была измерена фильтруемость не только свежеприготовленных эритроцитов-носителей, но и после 2 ч их инкубации при комнатной температуре в буфере для хранения, содержащем кроме солей (включая  $MgCl_2$ ) глюкозу, аденин и альбумин. После 2 ч такой инкубации фильтрационные параметры

аммоцитов улучшились (Рисунок 8Б). Процент нефилтующихся клеток в суспензии аммоцитов уже не отличался достоверно от значений данного параметра для исходных эритроцитов (ANOVA,  $p < 0.05$ , post hoc test Tukey). Повышался и индекс фильтруемости аммоцитов. Это говорит об активной работе метаболизма аммоцитов и дает надежду на то, что при переливании в организм, аммоциты смогут максимально восстановить свою способность к деформации.

**Эффективность удаления аммония аммоцитами *in vitro*.** Способность аммоцитов удалять из среды аммоний была исследована *in vitro*. Для этого суспензию аммоцитов инкубировали в течение 120-140 мин при 25°C в среде, содержащей 1 мМ  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Образцы отбирали каждые 20 минут и измеряли концентрации аммония и аланина. Типичные кинетические кривые для одного из экспериментов представлены на Рисунке 9А. В качестве контроля измеряли удаление аммония из аналогичной среды с добавленным  $\text{NH}_4\text{Cl}$  в присутствии нативных эритроцитов.



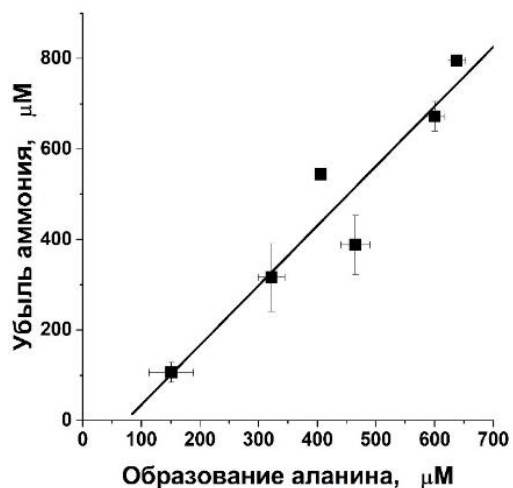
**Рисунок 9.** Типичная кинетика потребления аммония (черные кривые) и образования аланина (красные кривые) в присутствии аммоцитов или свободного фермента ГДГ из *Proteus* sp. *in vitro*.

Концентрация добавленного в среду  $\text{NH}_4\text{Cl}$  составляла везде 1

мМ. **А** – Кинетика потребления аммония в присутствии нативных эритроцитов (контроль, синяя кривая), а также потребление аммония и образование аланина в присутствии аммоцитов одного из доноров (черная кривая) и образования аланина (гематокрит суспензии 23%, температура 25°C, активности ГДГ и АЛТ в суспензии аммоцитов равны 0.57 МЕ/мл и 6.7 МЕ/мл, соответственно). **Б** – Кинетика аммония и аланина в присутствии нативных эритроцитов и добавленной во внешнюю среду ГДГ (0.2 МЕ/мл раствора). Представлены средние величины  $\pm$  SD ( $n=2$ ).

В присутствии аммоцитов наблюдали линейное снижение концентрации аммония и сопоставимую продукцию аланина, в то время как в контроле (нативные эритроциты без включенных ферментов) никаких изменений в концентрации аммония не было. Эта кинетика отличалась от кинетики удаления аммония из среды, где присутствовали нативные эритроциты и свободная ГДГ (без АЛТ) (Рисунок 9Б). Здесь наблюдалось снижение концентрации аммония, но без увеличения концентрации аланина. Такая разная кинетика доказывает, что превращение аммония в присутствии аммоцитов (Рисунок 9А) происходит внутри клеток, а ферменты ГДГ и АЛТ работают согласованно. Это подтверждают и усредненные результаты всех измерений (Рисунок 10), которые показывают, что удаление аммония биореакторами сопровождалось образованием пропорционального количества аланина и доказывают, что ГДГ и АЛТ функционируют взаимосвязано (в тандеме), и аммоний превращается в аланин в соответствии с уравнениями (7) и (8).

Таким образом, использование метода проточного диализа, а также бактериальной ГДГ *Proteus sp.* для создания аммоцитов, позволило увеличить эффективность загрузки фермента в клетки, что позволяет надеяться на получение достаточного по эффективности для применения в клинике препарата аммоцитов.



**Рисунок 10.** Взаимосвязь между потреблением аммония и образованием аланина. Представлены данные для экспериментов с аммоцитами, полученными из эритроцитов разных доноров, с разной активностью инкапсулированных ферментов. Условия аналогичны описанным выше. Представлены средние значения  $\pm$  SD. Для всех точек  $n=2$ , кроме первой, где  $n=4$ .

## ВЫВОДЫ

1. Установлено, что метод проточного гипоосмотического диализа является оптимальным и высокоэффективным для получения эритроцитов-биореакторов и позволяет получить ЭБР со свойствами достаточно близкими к свойствам исходных эритроцитов.
2. Разработанная автоматическая установка и соответствующий метод для стерильного включения лекарственных соединений в эритроциты позволяет увеличить эффективность инкапсуляции аспарагиназы в эритроциты по сравнению со всеми другими существующими устройствами (с примерно 16% до 22.5%).
3. Исследование свойств ЭБР, полученных с помощью метода гипоосмотического проточного диализа, показало, что активность включенных в эритроциты ферментов не изменяется в течение 6 дней для АЛТ и ГДГ из *Proteus sp.* и 14 дней для аспарагиназы. Гематологические индексы ЭБР и их осмотическая резистентность отличаются от аналогичных показателей для нативных эритроцитов, однако данное различие согласуется с ранее опубликованными данными для других способов загрузки эритроцитов. Наблюдаемые изменения не критичны для выживаемости эритроцитов в кровотоке. При этом, в процессе хранения 10% суспензии ЭБР при  $+4^{\circ}\text{C}$ , не происходит существенного изменения данных показателей.
4. Показано, что фильтруемость свежеполученных ЭБР почти в 2 раза ниже, чем у исходных эритроцитов, но практически восстанавливается после 2 ч инкубации этих ЭБР при комнатной температуре, что говорит о способности метаболизма ЭБР быстро восстанавливать состояние клеток после процедуры гипоосмотического диализа. Таким образом, показатель фильтруемости может являться важным параметром, характеризующим одно из основных свойств клетки, важных для ее выживания, способность деформироваться.

5. На основании проведенных клинических испытаний ЭБР с аспарагиназой, полученных методом гипоосмотического проточного диализа (у двух пациентов с ОЛЛ), было показано, что данные ЭБР не вызывают никаких побочных эффектов. Фармакокинетика аспарагиназы в эритроцитах показывает более продолжительное время полувыведения аспарагиназы из кровотока пациентов по сравнению с введением свободного фермента ( $t_{1/2}$  для ЭБР составляло 5.42 дня и 9.65 дня у пациентов 1 и 2, соответственно, по сравнению с  $t_{1/2}=40.8$  ч при введении свободного фермента). Полученные ЭБР способны снижать концентрацию аспарагина в плазме пациентов до терапевтического уровня  $< 2 \mu\text{M}$ , причем тем дольше, чем выше активность включенной в ЭБР аспарагиназы.
6. ГДГ из *Proteus sp.* и АЛТ из сердца свиньи могут быть совместно включены в эритроциты методом проточного диализа. Инкапсуляция данным методом позволяет увеличить активность ГДГ в ЭБР более, чем в 5 раз по сравнению с методом диализа в мешках, применяемым для включения ГДГ из бычьей печени в эритроциты. Эффективность включения АЛТ увеличилась в 2.2 раза.
7. Аммоциты, содержащие ГДГ из *Proteus sp.* и АЛТ способны снижать концентрацию аммония в среде *in vitro*. При этом, оба включенных в эритроцит фермента работают согласованно, т.к. при определенном потреблении аммония в среде наблюдается пропорциональное увеличение концентрации аланина.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### *Статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК, и патент:*

1. Борсакова Д.В. Сравнительные методологические исследования включения L-аспарагиназы в эритроциты/ Борсакова Д.В., Плахотник М.Е., Колева Л.Д., Бовт Е.А., Александрович Ю.Г., Синауридзе Е.И., Атауллаханов Ф.И. // Онкогематология. – 2018.- V. 13, № 3. –Р. 91-101.
2. Бовт Е.А. Дефицит пируваткиназы и несфероцитарная гемолитическая анемия/ Бовт Е.А., Колева Л.Д., Черняк Е.А., Сметанина Н.С., Атауллаханов Ф.И., Синауридзе Е.И. // Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. – 2020. –V. 19, № 3. – Р. 121-130.
3. Колева Л. Д. Эритроцит как идеальный носитель для внутрисосудистой доставки лекарств. /Колева Л.Д., Атауллаханов Ф.И., Синауридзе Е.И. // Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. -2020.-V. 19, № 4. – Р. 234-242.
4. Koleva L. Erythrocytes as carriers: from drug delivery to biosensors / Koleva L., Bovt E., Ataulakhanov F., Sinauridze E. // Pharmaceutics. – 2020. – V. 12, № 3. - P. 276.
5. Protasov E. Theoretical analysis of the built-in metabolic pathway effect on the metabolism of erythrocyte-bioreactors that neutralize ammonium / Protasov E., Koleva L., Bovt E., Ataulakhanov F., Sinauridze E. // Metabolites. – 2021. –V. 11, №1. - P. 36.
6. Borsakova D.V. Ammonium removal by erythrocyte-bioreactors based on glutamate dehydrogenase from *Proteus sp.* jointly with porcine heart alanine aminotransferase / Borsakova D.V., Koleva L.D., Protasov E.S., Ataulakhamov F.I., Sinauridze E.I. // Sci Reports. – 2022. – V. 12, № 1.- P. 5437.
7. Koleva L. Erythrocytes for targeted drug delivery. / Koleva L. // Encyclopedia. -2022. [Электронный ресурс]: <https://encyclopedia.pub/entry/20899>.
8. Атауллаханов Ф.И., Борсакова Д.В., Бовт Е.А., Даниелян А.Д., Зейналов А.М., Колева Л.Д., Кушнир Н.С., Протасов Е.С., Синауридзе Е.И., Суворова А.С. Устройство для включения биологически активных компонентов в эритроциты способом проточного диализа. Патент РФ № 2 772 209 (заявка № 2021125401 от 27.08.2021), патентообладатель ООО «РБК-Фармэко» Москва, РФ (2022). Дата публикации 18.05.20226 Бюлл. №14

*Публикации в трудах конференций и съездов:*

9. Protasov, E. Erythrocytes-bioreactors and limitations of their efficiency. / Protasov E., Koleva L., Bovt E., Ataullakhanov F., Sinauridze E. // Тезисы докладов конференции “International Conference of Systems Biology and Systems Physiology: Regulation of Biological Networks”, Москва, 7-9 декабря, 2020, с. 8.
10. Koleva, L. Erythrocytes-bioreactors for removing ammonium from the blood. / Koleva L., Borsakova D., Protasov E., Ataullakhanov F., Sinauridze E. Тезисы докладов конференции “International Conference of Systems Biology and Systems Physiology: Regulation of Biological Networks”, Москва, 7-9 декабря, 2020, с. 41.
11. Protasov, E. Mathematical modeling of the RBC-bioreactors. / Protasov E., Koleva L., Bovt E., Sinauridze E., Ataullakhanov F. // Тезисы докладов конференции “International Conference of Systems Biology and Systems Physiology: Regulation of Biological Networks, the meeting is dedicated to 75th anniversary of Fazly Ataullakhanov”, Москва, 25-27 августа, 2021, с. 15.
12. Protasov, E. Erythrocytes-bioreactors that neutralize ammonium. / Protasov E., Koleva L., Bovt E., Ataullakhanov F., Sinauridze E. // Тезисы докладов конференции “4th International virtual Conference on Pharmaceutics and Advanced Drug Delivery Systems held during”, London, 5 апреля, 2021, с. 21.
13. Koleva, L. Development of an automatic device for creating drug-loaded erythrocytes. / Koleva L., Kushnir N., Bovt E., Borsakova D., Suvorova A., Sinauridze E., Danielyan A., Ataullakhanov F. // Тезисы докладов конференции “Hybrid International Conference of Systems Biology and Systems Physiology: Regulation of Biological Networks, the meeting is dedicated to 75th anniversary of Fazly Ataullakhanov”, Москва, 25-27 августа, 2021, p. 15.
14. Колева, Л.Д. Старт пилотного исследования безопасности и фармакокинетики отечественного препарата L-аспарагиназы в эритроцитах (АСПЭР) в терапии острого лимфобластного лейкоза. / Колева Л.Д., Бовт Е.А., Макагонова А.С., Кушнир Н.С. // Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. – 2021. – V. 20, № S2. Приложение 1, 102. (Материалы Российского конгресса "Детская онкология, гематология и иммунология XXI века: от науки к практике", 2021, Москва).