

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии
Российской академии наук

На правах рукописи

Колева Лариса

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

1.5.2 Биофизика

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук
Синауридзе Елена Ивановна

Москва, 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1. Физиология, метаболизм и регуляция объема эритроцита	14
1.1.1. Физиология и метаболизм эритроцитов	14
1.1.2. Деформируемость эритроцитов и регуляция объема	17
1.2. Осмотические методы включения лекарственных веществ в эритроциты	19
1.3. Влияние осмотических методов включения лекарственных соединений на физиологию и жизнеспособность эритроцитов.....	24
1.4. Эритроциты-носители лекарственных соединений.....	27
1.4.1. Эритроциты с постепенным высвобождением лекарства	28
1.4.2. Направленная доставка лекарственных соединений	29
1.4.3. Эритроциты-биореакторы.....	30
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	40
2.1. Материалы.....	40
2.2. Выделение эритроцитов и подготовка растворов.....	42
2.3. Методы инкапсуляции ферментов в эритроциты.....	43
2.3.1. Включение аспарагиназы в эритроциты.....	44
2.3.2. Совместное включение в эритроциты глутаматдегидрогеназы и аланинаминотрансферазы.....	47
2.4. Запечатывание и отмывание готовых фармакоцитов.....	49
2.5. Методы определения стерильности и апиrogenности фармакоцитов.....	50
2.5.1. Определение стерильности препаратов фармакоцитов.....	50
2.5.2. Определение апиrogenности образцов.....	51
2.6. Измерение активности ферментов.....	52
2.6.1. Измерение активности аспарагиназы.....	52
2.6.2. Измерение активности ГДГ и АЛТ.....	54
2.7. Расчет процента инкапсуляции ферментов и выхода клеток.....	55
2.8. Измерение кинетики потребления аммония и продукции аланина в среде с аммоцитами.....	56
2.8.1. Приготовление проб для измерения аммония и аланина.....	56
2.8.2. Измерения аммония и аланина.....	57

2.9. Измерение фильтруемости эритроцитов.....	58
2.10. Измерение осмоляльности растворов.....	59
2.11. Измерение эритроцитарных индексов.....	59
2.12. Измерение осмотической резистентности эритроцитов.....	59
2.13. Хранение эритроцитов–биореакторов	60
2.14. Измерение гемолиза эритроцитов.....	61
2.15. Измерение аспарагина в плазме.....	61
2.16. Дизайн клинического исследования эритроцитов с включенной L-аспарагиназой.....	64
2.17. Статистический анализ данных.....	66
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	67
3.1. Включение L-аспарагиназы в эритроциты различными методами.....	67
3.2. Определение оптимальных условий включения аспарагиназы в эритроциты методом проточного гипоосмотического диализа.....	77
3.3. Получение эритроцитов с аспарагиназой методом проточного диализа в стерильных условиях.....	82
3.4. Исследование фармакокинетики и фармакодинамики аспарагиназы у пациентов с ОЛЛ при внутримышечном введении раствора фермента	87
3.5. Клинические испытания фармакоцитов с аспарагиназой, полученных методом проточного диализа	89
3.6. Разработка автоматического устройства для включения биологически активных компонентов, в том числе аспарагиназы, в эритроциты.....	93
3.7. Эритроциты-биореакторы, утилизирующие из кровотока аммоний (аммоциты)	101
3.7.1. Совместное включение ГДГ из <i>Proteus</i> sp. и АЛТ в эритроциты методом обратимого гипоосмотического диализа.....	103
3.7.2. Исследование свойств новых аммоцитов.....	105
3.7.3. Эффективность удаления аммония аммоцитами <i>in vitro</i>	110
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	116
ВЫВОДЫ.....	119
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	121
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	123
БЛАГОДАРНОСТИ.....	148

ВВЕДЕНИЕ

Современная медицина не только ищет новые лекарственные препараты для лечения определенных патологий, но и создает новые лекарственные формы уже известных препаратов, чтобы улучшить их фармакологические свойства и безопасность. Одной из таких новых лекарственных форм являются эритроциты-переносчики биологически активных компонентов. Препараты на основе эритроцитов могут выполнять несколько качественно различных функций. Они могут выполнять роль биореакторов, внутри которых находятся определенные ферменты, катализирующие реакции непосредственно внутри клетки, при условии, что субстраты этих реакций легко проникают в клетку из плазмы через эритроцитарную мембрану (а продукты достаточно легко покидают эритроцит). Такая форма имеет целый ряд преимуществ перед традиционными формами введения ферментных лекарственных препаратов. Основными из них являются удлинение времени жизни препарата в кровотоке, отсутствие аллергических реакций и реакций гиперчувствительности на введенный препарат, а также снижение токсичности лекарства из-за снижения его пиковой дозы в плазме после введения. Эритроциты-носители могут быть также депо-формой лекарства, которое запечатано в эритроцит, но постепенно выходит из него, обеспечивая постоянный, не очень высокий, но достаточный для терапевтического воздействия уровень препарата в плазме в течение достаточно долгого времени после одного введения. Такая форма также удлиняет время присутствия лекарственного препарата в организме, т.к. он не подвергается разрушению внутри эритроцитов. Это снижает количество необходимых введений лекарства, его токсичность и улучшает качество жизни пациента. И, наконец, эритроциты-носители биологически активных компонентов могут служить для направленной доставки лекарства к определенным органам и тканям пациента. В первую очередь это печень, селезенка и ретикуло-эндотелиальная система. Направленная доставка, с одной стороны, обеспечивает снижение воздействия препарата на окружающие орган-мишень ткани и другие органы, а с другой – увеличивает эффективность

воздействия препарата на нужный орган, т.к. вся введенная доза лекарства оказывается именно в нужном месте.

Актуальность темы

Настоящая работа посвящена разработке эритроцитов биореакторов (ЭБР), способных удалять из плазмы некоторые низкомолекулярные метаболиты. В качестве примеров выбраны ЭБР с ферментом L-аспарагиназой, удаляющие из плазмы аспарагин, а также ЭБР, способные снижать избыточную концентрацию аммония (аммоциты), содержащие одновременно два включенных фермента – глутаматдегидрогеназу (ГДГ) и аланинаминотрансферазу (АЛТ).

Аспарагиназа является неотъемлемой частью курса лечения 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, способный синтезировать аспарагин (аспарагинсинтетаза). Несмотря на эффективность аспарагиназы как противоопухолевого препарата, его применение осложнено многими побочными эффектами. Во-первых, введенный внутривенно фермент очень быстро выводится из организма, поэтому необходимы его довольно частые инъекции в больших дозах. Однако т.к. медицинские препараты аспарагиназы являются, как правило, препаратами, полученными из бактерий (*Escherichia coli* или *Erwinia chrysanthemi*), они представляют собой чужеродный для организма человека белок и введение этих препаратов часто вызывает аллергические реакции, включая реакции гиперчувствительности, которые могут препятствовать применению данного препарата. Аллергические реакции на аспарагиназу наблюдаются в 30% случаев ее применения [1]. Зачастую, на введение аспарагиназы быстро вырабатываются антитела, нейтрализующие фермент, при отсутствии клинически выраженной реакции, что сильно снижает эффективность терапии [2]. Этот феномен называют

“silent inactivation”. 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, а также протеаз, которые могут присутствовать в плазме.

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 [3]. 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 фермента, перерабатывающего аммоний – глутаматдегидрогеназы.

Таким образом, разработка ЭБР, способных удалять их кровотока аспарагин или аммоний, которые можно было бы применять в клинической практике, 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 (α -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 ЭБР с аспарагиназой или другими лекарственными препаратами.

3. Исследованы свойства полученных с помощью метода проточного диализа ЭБР 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 ЭБР 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, полученными ранее 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 ЭБР, 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, 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 (метод проточного диализа), а кроме того, стандартный препарат глутаматдегидрогеназы из бычьей печени, который подвергается агрегации при увеличении его концентрации в растворе выше 0.1 мг/мл, был заменен 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 измерения 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 ($\lambda_{\text{возбуждения}}=365$ нм, $\lambda_{\text{испускания}}=440$ 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

По результатам работы опубликовано 7 статей, из них 3 в Российских (все входят в SCOPUS) и 4 в международных (все входят в SCOPUS и WoS) журналах, а также 6 тезисов международных и общероссийских конференций. Получен патент на установку для включения соединений в эритроциты.

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 75th anniversary of Fazly Ataulakhanov, Moscow, August 25-27, 2021 (Москва, Россия) (2 доклада); 4th 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).

Структура и объем работы

Диссертация изложена на 148 страницах машинописного текста и включает введение, литературный обзор (глава 1), описание материалов и методов (глава 2), результаты и обсуждение (глава 3), заключение, выводы, список цитированной литературы (193 библиографических ссылки), список сокращений и обозначений, а также благодарности. Работа содержит 27 рисунков и 5 таблиц.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Физиология, метаболизм и регуляция объема эритроцита

1.1.1. Физиология и метаболизм эритроцитов

Эритроциты составляют самую большую популяцию клеток крови у млекопитающих [4, 5]. Объемная доля эритроцитов (гематокрит) в крови взрослого человека составляет 40-45 %. В 1 $\mu\text{л}$ крови содержится $4-5 \times 10^6$ эритроцитов. Главной функцией этих клеток является перенос кислорода и углекислого газа, кроме того, они участвуют в тромбообразовании и играют важную роль в иммунном ответе против патогенов [6]. При созревании в красном костном мозге, эритроцит теряет ядро и большинство других органелл. В течение первых нескольких дней пребывания в кровотоке незрелый эритроцит (ретикулоцит) обычно все еще содержит остатки органелл. Доля ретикулоцитов в норме составляет не более 1-2% от числа эритроцитов. Время жизни эритроцитов в кровотоке составляет 100-120 дней, затем они утилизируются макрофагами в селезенке.

У зрелых эритроцитов отсутствует клеточное ядро и большинство органелл. Основным содержимым эритроцитов является гемоглобин - белок, связывающий кислород. Один литр эритроцитов содержит около 300 г гемоглобина, способного связывать около 408 мл кислорода [7]. У них также отсутствует эндоплазматическая сеть и они не синтезируют белки. Скелет эритроцитов представляет собой белковую сеть, в которой наиболее важными компонентами являются спектрин, актин, актин-ассоциированные белки, белок 4.1R и анкирин [6], которые помогают клеткам сохранять свою уникальную структуру и позволяют им изменять свою форму.

Эритроциты имеют форму двояковогнутого диска (Рисунок 1), диаметром 7,5-8 $\mu\text{м}$ и толщиной 1 и 2 $\mu\text{м}$, в центре и по ободу диска, соответственно [8]. Такая форма обеспечивает большую площадь поверхности для эффективного газообмена и способность эритроцита к деформации для прохождения по узким капиллярам.

В эритроцитах отсутствуют митохондрии, поэтому энергию, необходимую для поддержания жизнеспособности, в том числе для поддержания осмотического равновесия между клеткой и средой, они получают в ходе анаэробного гликолиза, превращая глюкозу в лактат. Гликолиз в эритроцитах протекает по классическому пути Эмбдена-Мейергофа [9] (Рисунок 2). На каждую потребленную молекулу глюкозы в эритроцитах приходится производство двух молекул лактата и двух молекул АТФ. Производимый АТФ расходуется в различных энерго-зависимых процессах, в том числе в процессах активного транспорта ионов Na^+ , K^+ и Ca^{2+} через клеточную мембрану.

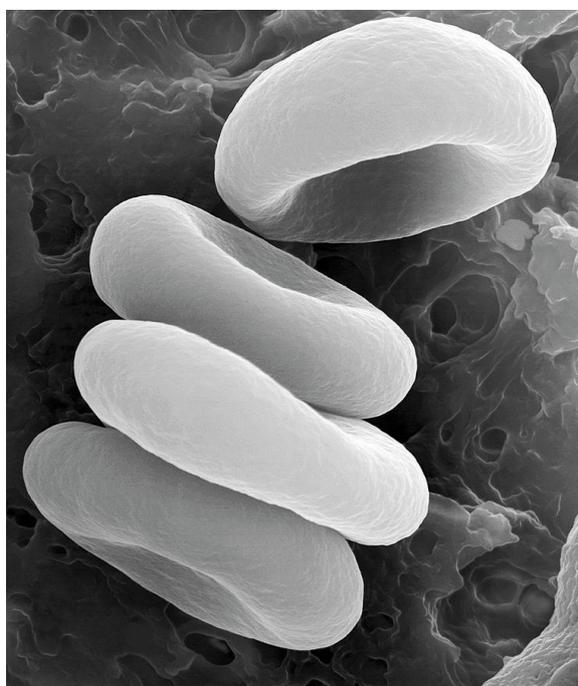


Рисунок 1 — Фотография эритроцитов, полученная с помощью электронного микроскопа [10].

В стационарном состоянии потребляемый в клетках АТФ немедленно воспроизводится в гликолизе и концентрация АТФ остается неизменной во времени. Регуляция гликолиза в эритроцитах устроена таким образом, что при увеличении скорости потребления АТФ скорость гликолиза возрастает, обеспечивая соответствующее увеличение скорости производства АТФ. Это достигается благодаря крутой зависимости скорости гликолиза от концентрации

АТФ с падающим участком в области физиологически нормальных значений АТФ [11–13].

Так как прямая функция эритроцитов связана с переносом кислорода, ему приходится функционировать в присутствии активных форм кислорода, таких как перекись водорода, гидроксил радикал, супероксид радикал, и др., вызывающих окислительное повреждение различных компонентов клетки (ферментов, липидов мембран, гемоглобина) [14, 15]. Активные формы кислорода нейтрализуются в эритроцитах такими ферментами, как каталаза, супероксид дисмутаза, а также антиоксидантами. Основным внутриклеточным антиоксидантом является глутатион. Переход глутатиона из восстановленного состояния в окисленное обеспечивает нейтрализацию реактивных форм кислорода и восстановление поврежденных компонентов клетки. Окисленный глутатион восстанавливается ферментом глутатионредуктазой, что сопряжено с окислением NADPH. В свою очередь, NADPH воспроизводится в эритроцитах специальной метаболической системой, называемой гексозомонофосфатный шунт (ГМФС), или пентозофосфатный путь (ПФП) (Рисунок 2). Пентозофосфатный путь тесно связан с гликолизом. Он начинается с окисления глюкозо-6-фосфата и заканчивается производством метаболитов гликолиза - фруктозо-6-фосфата и глицеральдегид фосфата. В ПФП на одну потребленную молекулу глюкозы производится три молекулы углекислого газа, одна молекула АТФ и одна молекула лактата. При этом происходит восстановление шести молекул NADP до NADPH. Регуляция ПФП в эритроцитах устроена таким образом, что даже небольшое увеличение концентрации окисленного глутатиона приводит к значительному увеличению метаболического потока (и скорости воспроизводства NADPH) в этом пути. Благодаря этому, концентрация восстановленного глутатиона (более 90% от пула глутатиона в клетке) практически не меняется даже при значительных окислительных нагрузках. Возрастает только скорость восстановления окисленного глутатиона [16].

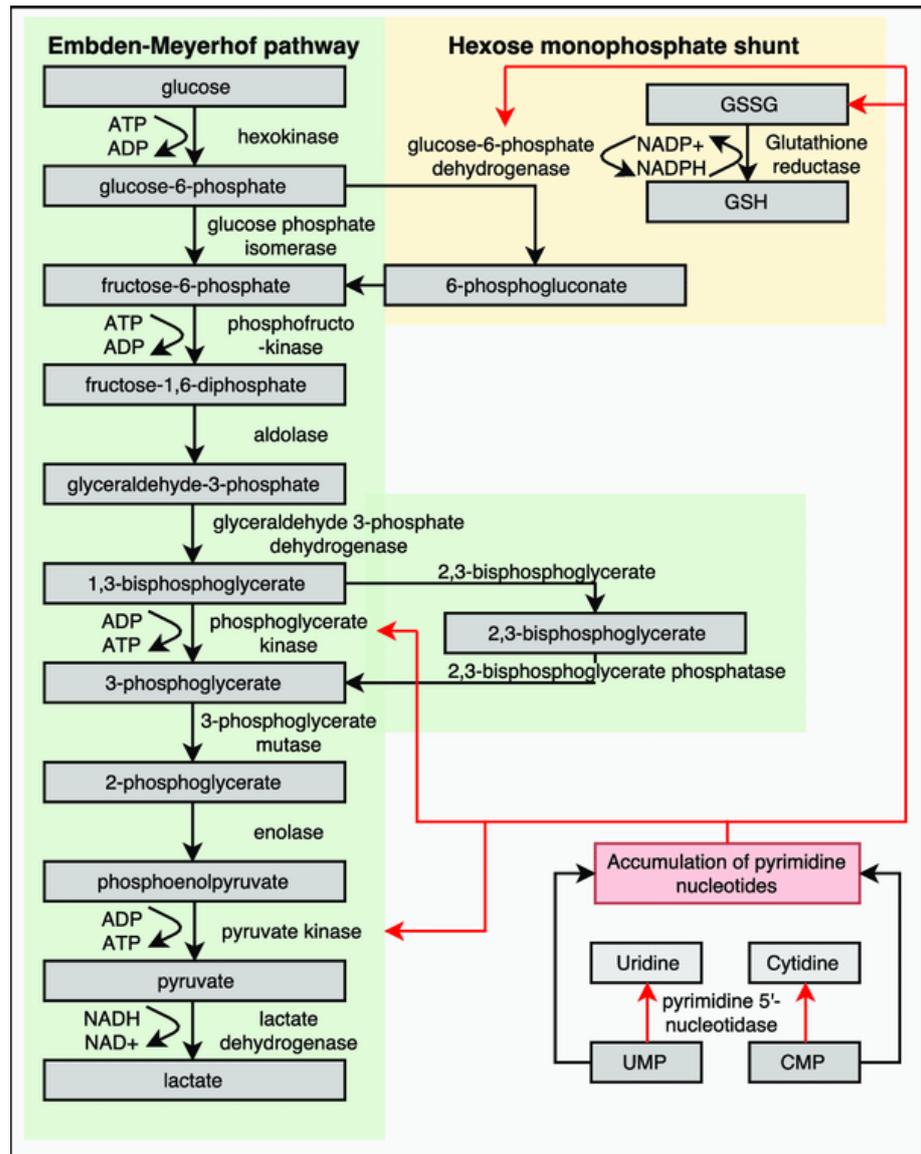


Рисунок 2 — Схема гликолиза в эритроцитах, включая пентозофосфатный путь [17].

1.1.2. Деформируемость эритроцитов и регуляция объема

Для обеспечения основной транспортной функции эритроциту необходимо долго циркулировать в кровотоке, протискиваясь через узкие капилляры и селезеночные пазухи [18], диаметр которых меньше диаметра эритроцитов. Мембрана эритроцитов нерастяжима [6], поэтому прохождение по узким капиллярам обеспечивается уникальной гибкостью и деформируемостью клеток (способностью изменять форму). Неспособность к деформируемости приводит к сокращению продолжительности жизни эритроцитов. Увеличение площади поверхности на 3–4% (растяжение) приводит к лизису клетки. Деформируемость

является функцией структуры белков цитоскелета, поддержания объема и отношения площади поверхности мембраны к объему клетки.

В норме объем эритроцита составляет 80-90 фл [19]. Максимальное увеличение объема эритроцита ограничено и составляет около 1,6 от нормального объема при достижении клеткой сферической формы [19, 20]. Осмотический баланс между клеткой и средой позволяет эритроциту поддерживать объем. Так как концентрация белков и метаболитов в эритроците выше, чем в плазме, эритроцит компенсирует это неравновесным распределением ионов Na^+ и K^+ между клеткой и плазмой (3 иона Na^+ эритроцит меняет на 2 иона K^+) посредством Na^+/K^+ -АТФ-азы, использующей 1 молекулу АТФ. Такой процесс встречной перекачки катионов с большой разницей между внутриклеточными и внеклеточными концентрациями для каждого иона против их градиентов обеспечивает высокую чувствительность к повреждению мембраны и необходим для регуляции объема эритроцита в условиях изменения проницаемости мембраны. При такой системе встречной перекачки увеличение проницаемости мембраны будет приводить к сильному увеличению концентрации Na^+ в клетке, поскольку исходно эта концентрация маленькая, и к сильной активации Na,K -АТФазы. Таким образом, увеличение поступления Na^+ в клетку компенсируется ускорением выхода из клетки ионов K^+ , что обеспечивает стабилизацию объема.

Помимо Na,K -АТФазы в клетке существует система регуляции объема за счет Ca -активируемых калиевых каналов, обеспечивающих быстрый отток K^+ из эритроцитов при увеличении в клетках концентрации Ca^{2+} , что приводит к уменьшению клеточного объема [21, 22], а также регуляция внутриклеточного пула аденилатов [23, 24]. За счет регуляции пула аденилатов стабилизация клеточного объема может быть обеспечена при увеличении проницаемости мембраны в 15 раз.

1.2. Осмотические методы включения лекарственных веществ в эритроциты

Существует много методов, которые позволяют инкапсулировать различные соединения в эритроциты. Из неосмотических методов можно выделить электропорацию [25–27], эндоцитоз [25,26], ультразвук [30], лазерный удар [31], химическую модификацию клеточной мембраны [32] и др. Однако наиболее оптимальными по соотношению эффективности включения/качество клеток в сочетании с простотой исполнения считаются осмотические методы включения [33], поэтому рассмотрим их подробнее.

Изменяя осмотическое давление среды можно управлять объемом эритроцита. Проницаемость мембраны эритроцитов для белков, большинства внутриклеточных метаболитов и катионов металлов, таких как Na^+ , и K^+ , значительно меньше, чем для воды [34]. В гипотонической среде эритроцит увеличивается в объеме за счет проникновения в него воды из среды для компенсации разности осмотического давления внутри и снаружи клетки. При снижении внешней осмоляльности среды ниже, чем 150 мОсм/кг происходит относительное увеличение объема клетки менее чем в 1,8 раза, при котором механические свойства мембраны не влияют на процессы, происходящие в эритроците [35]. При дальнейшем снижении осмоляльности внешней среды происходит натяжение мембраны эритроцита, в результате чего нарушается ее целостность и образуются поры, через которые могут проходить высокомолекулярные вещества, такие как гемоглобин и другие белки с молекулярным весом до 540 кД. Измеренные в литературе размеры пор сильно варьируют и лежат в диапазоне 80-500 Å [36]. Поры довольно стабильны при низкой температуре (0-4°C), однако довольно быстро закрываются при физиологической температуре (37°C) при восстановлении нормальной тоничности среды (300 мОсм), что приводит к восстановлению целостности клеточной мембраны [37]. Этот процесс лежит в основе гипоосмотических методов включения различных соединений в эритроцит, в том числе высокомолекулярных.

В работе [38] было показано, что при достижении диаметра пор 8-10 нм (при осмоляльности среды ниже 130 мОсм/кг) гемоглобин способен выходить из эритроцита (его тетрамер имеет сфероидную форму, размером $65 \times 55 \times 50 \text{ \AA}$ [39]). Это сопровождается падением осмотического давления в эритроците и закрыванием пор. Время выхода гемоглобина из эритроцита варьирует в разных работах от секунд [40, 41] до минут [42, 43]. Гемоглобин выходит из клеток до тех пор, пока не наступит равновесие в его концентрациях внутри и снаружи клетки. Когда это равновесие достигнуто, поры закрываются и клетка становится непроницаемой для гемоглобина и высокомолекулярных веществ [44]. Таким образом, можно предположить, что для эффективного проникновения лекарственного вещества в поры эритроцита во время выхода гемоглобина, размер молекулы вещества должен быть сопоставим с размером молекулы гемоглобина. Используя формулу в работе [45], можно посчитать теоретический размер молекулы, зная ее молярную массу. Рассчитанный размер молекулы аспарагиназы из *E. coli* составляет около 40 \AA (что сопоставимо с размерами гемоглобина) и форма ее молекулы близка к сферической [46], в отличие от молекулы ГДГ, чей диаметр составляет 43 \AA , а длина 133 \AA [47]. Таким образом, молекула аспарагиназы должна беспрепятственно проникать в поры эритроцита в момент выхода гемоглобина, учитывая ее сферическую форму. С молекулой ГДГ сложнее, так как вероятность правильного ориентирования вытянутой молекулы фермента относительно пор ниже, чем у меньших по размеру сферических молекул гемоглобина.

Обратимый гипоосмотический лизис. Принцип метода состоит в том, что суспензию отмытых эритроцитов инкубируют в гипотонической среде (0-50 мОсм/кг) с добавленным лекарственным препаратом при 0°C до 10 минут [48]. В результате происходит мгновенное образование пор в мембране, через которые включаемое вещество входит в клетки одновременно с выходом гемоглобина и других внутриклеточных веществ. После чего осмоличность среды восстанавливают и инкубируют клетки при 37°C . Это довольно простой метод, однако главным его недостатком является низкий процент включения вещества.

Дело в том, что для обеспечения сферуляции эритроцитов соотношение объемов гипотонической среды к суспензии эритроцитов должно составлять 3:1 или 4:1, что сильно разбавляет включаемое вещество, а также приводит к потере 60-70% цитоплазматических веществ, что может отразиться на уменьшении срока циркуляции таких эритроцитов *in vivo* [49].

Метод предварительной сферуляции клеток или ступенчатый лизис.

Суть метода заключается в постепенном снижении (в две или более ступени) осмоляльности гипотонической среды, в которую помещают эритроциты. Сначала отмытые эритроциты суспендируют в гипотоническом растворе такой концентрации (до 150 мОсм/кг), при которой они сферулируются, но еще не лизируют. Затем, предварительно набухшие клетки, суспендируют в гипотоническом растворе более низкой осмоляльности (около 120 мОсм/кг) и последующее увеличение объема вызывает раскрытие пор в мембране с диффузией клеточного содержимого в гипотонический раствор. Командой исследователей под руководством Magnani M. было разработано устройство «Red Cell Loader», позволяющее включать вещества в эритроциты на основе этого метода [50]. После второй ступени лизиса эритроцитов это устройство концентрирует суспензию эритроцитов, используя гемофильтр, чтобы избежать большого разбавления препарата при последующем добавлении лекарственного вещества. Затем к сконцентрированной суспензии эритроцитов добавляется инкапсулируемое вещество и смесь инкубируется 20–30 мин при комнатной температуре. Далее восстанавливается тоничность среды и клетки инкубируют при 37°C в течение 30 минут. Эритроциты, содержащие вещество, отмывают физиологическим раствором. Все описанные процессы происходят в автоматическом режиме. Авторы применяли такое устройство для включения дексаметазон-21-фосфата и преднизолон-21-фосфата [51], эффективность включения которых составляет около 30%. Другой группой авторов была показана возможность включения на этом устройстве фермента тимидинфосфорилазы [52, 53]. Полная автоматизация процесса и неплохая эффективность включения, наряду с сохранением жизнеспособности эритроцитов являются неоспоримыми достоинствами этого

метода и устройства. К недостаткам такого устройства можно отнести небольшой выход клеток (около 40%), который может быть обусловлен концентрированием на гемофилт্রে уже сферулированных (более уязвимых) эритроцитов.

Метод гипотонического диализа. Метод сводится к помещению суспензии эритроцитов с добавленным инкапсулируемым веществом в так называемый диализный мешок, представляющий собой полупроницаемую мембрану, отсекающую соединения молекулярной массой до 15 кДа [54, 55]. Мешок герметично закрывают, для предотвращения утечки суспензии эритроцитов, помещают в большой объем холодной (4°C) перемешиваемой гипотонической среды и инкубируют при температуре 2-8°C в течение нескольких часов. В процессе инкубации мешка с суспензией в буфере, клетки набухают, в открытые поры проникает инкапсулируемое вещество, а через мембрану мешка свободно проникают соли, вода и другие низкомолекулярные вещества, но не проникают белки и клетки. Затем тоничность среды доводят до нормального значения и поднимают температуру до 37°C для закрытия пор. После этого суспензию клеток с веществом также отмывают в физиологическом растворе от гемоглобина и препарата, который остался вне клеток.

Таким методом удастся снизить осмоляльность окружающей клетки среды и добиться открытия пор в мембране эритроцита без значительного разбавления суспензии клеток с препаратом, что обеспечивает довольно высокую эффективность включения препаратов в клетки и минимизирует потери клетками гемоглобина и других ферментов. Однако концентрации низкомолекулярных метаболитов и ионов металлов, способных проходить через диализную мембрану, таких как АТФ, глутатион, фосфорилированные углеводы, K^+ , и др. могут существенно уменьшиться в ходе гипотонического диализа эритроцитов [56]. Одним из существенных недостатков метода является длительность процедуры диализа. Также данный метод мало пригоден для инкапсулирования в эритроциты низкомолекулярных веществ, способных проходить через поры диализной мембраны.

Метод проточного диализа. В методе проточного диализа в качестве полупроницаемой мембраны, аналогичной мембране для диализа в мешках, используются диализаторы, созданные для аппаратов гемодиализа. Диализатор представляет собой полый кожух, содержащий волокна из полупроницаемой мембраны. Волокна являются “внутренним контуром диализатора”, а пространство, окружающее волокна – его “внешним контуром”. Оба контура можно подсоединить к перистальтическим насосам с помощью системы пластиковых трубок для компонентов крови. Суть метода заключается в том, что суспензию эритроцитов с высоким гематокритом (60-70%) медленно с помощью перистальтического насоса пропускают по внутреннему контуру диализатора, в то время как по внешнему контуру диализатора, в противоток суспензии эритроцитов, пропускают холодный (4°C) гипотонический раствор. При введении в эритроциты высокомолекулярных веществ (белков) они добавляются к суспензии до ее введения в диализатор. При введении низкомолекулярных веществ есть смысл добавлять их к лизату на выходе из диализатора, чтобы предотвратить отток вещества во внешний контур диализатора. При прохождении эритроцитов через диализатор они сферулируются, вследствие снижения тоничности среды, что приводит к образованию пор в клеточной мембране и к проникновению добавленного к суспензии препарата внутрь клеток. После чего, как всегда, восстанавливается тоничность среды путем добавления гипертонического раствора и инкубации при 37°C в течение 30 мин. Впервые этот метод был применен в работах Ropars С. и соавторов [57–59] для получения эритроцитов, нагруженных инозитолгексафосфатом. В настоящее время этот метод лежит в основе устройства «EryCaps», разработанного и запатентованного компанией Erytech. Устройство позволяет инкапсулировать в эритроциты различные лекарственные вещества разной молекулярной массы в автоматическом режиме. Однако автоматизированы только стадии диализа и восстановления целостности эритроцитов, а стадия отмывки эритроцитов происходит на отдельном устройстве. Данное устройство использовалось авторами для инкапсуляции таких веществ, как аспарагиназа, метиониназа и д.р. [60–62]. К достоинствам метода проточного

диализа относится высокая эффективность включения ферментов, наряду с сохранением качества клеток, простотой исполнения и возможностью стандартизации метода в клинических масштабах, что успешно продемонстрировала компания Erytech в клинических испытаниях аспарагиназы в эритроцитах при различных нозологиях [63, 64].

1.3. Влияние осмотических методов включения лекарственных соединений на физиологию и жизнеспособность эритроцитов

Одной из основных задач эритроцитов-переносчиков является обеспечение пролонгированного действия терапевтического препарата. Из чего очевидно, что сохранение жизнеспособности эритроцита после процедур инкапсуляции является первоочередной задачей любого метода в сочетании с эффективной загрузкой этого препарата. Кроме того, приоритетом является безопасность получаемого препарата на основе эритроцитов. Поэтому важно понимать, как меняется физиология эритроцитов после воздействия гипоосмотической среды.

Как было отмечено выше, одной из особенностей эритроцитов является отсутствие в них синтеза белка. Вследствие этого, любое повреждение метаболических систем в эритроцитах является необратимым. Это необходимо учитывать при манипуляциях с эритроцитами, особенно при приготовлении эритроцитов-носителей лекарственных соединений (ЛС). Потеря внутриклеточного содержимого эритроцитов, в том числе ферментов, может необратимо снизить способность этих клеток к нормальной циркуляции в организме. В ряде работ было показано, что посттрансфузионная приживаемость консервированных эритроцитов хорошо коррелирует с внутриклеточной концентрацией АТФ [65, 66]. Хотя есть исследования, демонстрирующие восстановление внутриклеточной концентрации АТФ в течение нескольких часов после трансфузии [67].

Было показано [68, 69], что уменьшение активности таких ферментов как гексокиназа, дифосфоглицератфосфатаза, енолаза или пируваткиназа в 2-3 раза

может привести к гибели эритроцитов. Дефицит глицеральдегидфосфатдегидрогеназы может влиять на жизнеспособность эритроцитов только при снижении активности фермента в 7-8 раз, а остальные ферменты начинают влиять на жизнеспособность только при снижении их активности в 100 и более раз. Однако в случае дефектных, нестабильных ферментов потеря жизнеспособности эритроцитов может происходить при 2-5 кратном снижении активности любого из них.

Сохранность необходимых внутриклеточных ферментов и метаболитов зависит от метода включения препарата в эритроцит. Так, из осмотических методов включения, наиболее губительным для внутриклеточного содержимого оказывается метод обратимого гипосмотического лизиса, в ходе которого эритроцит может терять до 60% ферментов [49]. Поэтому предпочтительными и используемыми в клинике в настоящий момент являются методы ступенчатого и проточного диализа. Исследователями, применяющими оба метода, было показано, как меняются свойства эритроцитов после процедуры включения этими методами дексаметазон-21-фосфата [50, 51] и аспарагиназы [70]. В этих работах были исследованы метаболические и морфологические параметры, гематологические индексы, такие как средний объем эритроцита (MCV, фл), средняя концентрация гемоглобина (MCHC, г/л), среднее содержание гемоглобина в эритроците (MCH, пг), осмотическая резистентность и другие параметры нагруженных эритроцитов по сравнению с нативными эритроцитами. В последней работе [70], которая вышла уже после окончания нашего исследования, была сделана попытка исследовать деформируемость полученных фармакоцитов, однако авторы использовали для этого стандартный метод эктацитометрии, который, как известно дает только средние параметры деформируемости клеток в популяции (характеристики макрореологии), но не отражает наличия фракций клеток со сниженной скоростью прохождения через узкие капилляры, существование которых очень важно. Именно эти клетки определяют микрореологию крови, которая полностью определяется их способностью деформироваться [71]. Исследователи показали, что для всех нагруженных эритроцитов характерно снижение MCV и MCH в среднем

на 30%, что связано с потерей гемоглобина клетками во время открытия пор. Данные по концентрации АТФ в нагруженных эритроцитах расходятся для двух методов. В работах, где был применен метод ступенчатого диализа для инкапсуляции дексаметазон-21-фосфата, наблюдалось незначительное увеличение уровня АТФ в нагруженных эритроцитах, что авторы связывают с наличием АТФ в составе восстанавливающего раствора. Напротив, в работе с методом проточного диализа для инкапсуляции аспарагиназы исследователи заявляют о снижении уровня АТФ и таких метаболитов как глутатион, пируват и одновременное накопление промежуточных продуктов пентозофосфатного пути, что, по их мнению, указывает на его активацию. Авторы утверждают, что активация ПФП предполагает повышенную выработку NADPH для восстановления окисленного глутатиона, чтобы компенсировать, усиленный окислительный стресс, о котором свидетельствуют повышенные концентрации жирных кислот и повышенный гемолиз нагруженных эритроцитов. Активация ПФП и поддержание гликолитических метаболитов демонстрируют, что эритроциты остаются метаболически активны после процесса инкапсуляции. Более того, концентрация белков в эритроцитах с аспарагиназой практически не изменялась [70]. Снижение уровня лактата и 2,3-ДФГ было характерно для обоих методов получения эритроцитов-переносчиков. Наблюдаемое снижение клеточного содержания 2,3-ДФГ авторы [50] объясняют пониженным содержанием глюкозы, а также тем, что значительная часть клеточного 2,3-ДФГ обычно связана с гемоглобином, количество которого снижается после гипотонического воздействия.

Анализ с помощью оптического микроскопа обнаружил лишь несколько незначительных изменений в морфологии клеток, прошедших процедуру ступенчатого диализа [50]. Было много исследований, показывающих, что методы осмотической инкапсуляции способствовали изменениям формы эритроцитов, включая образование эхиноцитов и сфероцитов [72–74]. Авторы [70] определили, что эхиноциты составляют 15% от нагруженных эритроцитов с аспарагиназой, тогда как доля сфероцитов не изменилась. Было продемонстрировано, что

эхиноциты могут снова превращаться в дискоциты при определенных условиях [75].

Также в работе [70] сообщается о снижении деформируемости эритроцитов с аспарагиназой, однако результаты, полученные с помощью модели микрофльтрации селезенки, не подтверждают более высокую механическую задержку нагруженных эритроцитов по сравнению с нативными эритроцитами.

В любом случае, длительная циркуляция нагруженных эритроцитов после инфузии в кровотоке [61, 62, 76–78] (в среднем около 20 дней) говорит о способности обработанных эритроцитов адаптировать свой метаболизм и обращать изменения, связанные с инкапсуляцией на основе гипотонического диализа. Кроме того, применение специализированных консервирующих растворов [79, 80] может быть использовано для активации путей выработки энергии и антиоксидантов, снижения внутриклеточного кальция, уменьшения активных форм кислорода и восстановления деформируемости эритроцитов.

Таким образом, гипотонический диализ вызывает некоторые изменения в свойствах эритроцитов, которые могут объяснить незначительное снижение периода полувыведения нагруженных эритроцитов по сравнению с необработанными эритроцитами, однако для целей переноса лекарств продолжительность циркуляции инкапсулированных эритроцитов (по крайней мере, такими методами как проточный и ступенчатый диализ) в кровотоке достаточна для продления периода полувыведения инкапсулированного препарата в несколько раз по сравнению с введением свободного препарата.

1.4. Эритроциты-носители лекарственных соединений

Физиологические особенности эритроцитов, описанные выше, позволяют нагружать эти клетки биологически активными веществами разной молекулярной массы для достижения определенного терапевтического эффекта. Первые статьи о применении эритроцитов в качестве переносчиков лекарственных средств появились в 1973 году, когда G. Ihler продемонстрировал в своей работе

возможность включения в эритроциты таких ферментов как β -глюкозидаза и β -галактозидаза методом обратимого гипоосмотического лизиса [49]. Анализ количества публикаций показывает интерес исследователей к данной теме: начиная с 1973 количество выпускаемых статей на тему эритроцитов-носителей увеличивается с каждым годом, и в настоящее время общее их количество насчитывает более 400 статей [81].

Существует немало исследований, демонстрирующих возможность применения эритроцитов-носителей как в терапии, так и в диагностике многих заболеваний (например, в качестве носителей контрастных агентов для магнитно-резонансной томографии (МРТ)) [82, 83]. В терапии, в зависимости от включаемого препарата, эритроцит может быть использован как биореактор, как носитель с постепенным высвобождением лекарственного средства или как система направленной доставки лекарственного препарата, в первую очередь, к макрофагам [84]. В соответствии с темой диссертации, наиболее подробно в данной работе рассмотрены эритроциты-биореакторы.

1.4.1. Эритроциты с постепенным высвобождением лекарственного соединения

Принцип работы эритроцитов с постепенным высвобождением ЛС основан на инкапсуляции в эритроцит препарата, способного медленно диффундировать сквозь мембрану эритроцита в кровотоки, либо на инкапсуляции недиффундирующего пролекарства в эритроцит, которое в нем превращается в диффундирующие сквозь мембрану активные компоненты, обладающие терапевтическим эффектом. Таким образом обеспечивается длительная циркуляция препарата в кровотоке с уменьшением токсического воздействия на организм за счет снижения пиковой концентрации, возникающей сразу после введения препарата. Как правило, такой принцип применения эритроцитов-носителей возможен при включении в эритроцит низкомолекулярных веществ. Наиболее актуально такое применение может быть для токсичных цитостатических препаратов, таких как метотрексат [85, 86], доксорубицин/даунорубицин [87–90],

винкристин/винбластин [91–93] или для глюкокортикоидов, таких как преднизолон или дексаметазон [94–96].

Группа исследователей под руководством Ф.И. Атауллаханова продемонстрировала преимущество применения даунорубицина и доксорубицина в эритроцитах по сравнению с введением свободной формы этих препаратов у пациентов с лейкозами и лимфомами [89, 90, 97]. Препараты в эритроцитах лучше переносились пациентами. При этом наблюдалось уменьшенное количество побочных реакций, отсутствие кумулятивного эффекта, значительное снижение кардиотоксичности, а также уменьшение пиковой концентрации препаратов в плазме минимум в 2 раза и увеличение периода их полувыведения по сравнению со свободной формой препаратов.

Компания EryDel в многочисленных клинических испытаниях доказала преимущества использования дексаметазон-21-фосфата (Dex-21-P) в аутологичных эритроцитах (Ery-Dex) перед свободной формой препарата у пациентов с муковисцидозом [98], язвенным колитом [99] и болезнью Крона [100]. В перечисленных исследованиях наблюдалось отсутствие побочных эффектов, клиническая ремиссия и отсутствие зависимости от стероидных препаратов. Было показано пролонгированное действие дексаметазона в кровотоке в течение 28 дней [98]. В 2021 году компания EryDel анонсировала завершение III фазы клинических испытаний Ery-Dex (trials.gov NCT02770807) с многообещающими результатами для пациентов с редким наследственным заболеванием – атаксией-телангиэктазией (Ataxia telangiectasia), для которого в настоящее время не существует эффективного лечения. Было достигнуто улучшение качества жизни пациентов наряду с хорошей переносимостью Ery-Dex [101].

1.4.2. Направленная доставка лекарственных соединений

Направленная доставка ЛС с использованием эритроцитов может осуществляться, в первую очередь, в клетки и органы, утилизирующие старые и поврежденные эритроциты (т. е. в макрофаги, печень и селезенку, а также к дендритным клеткам печени (антигенпрезентирующие клетки)). Для этого

необходимо модифицировать мембрану эритроцита, нагруженного ЛС, чтобы клетки-мишени воспринимали его как поврежденный [102, 103]. Адресной доставке эритроцитов в макрофаги посвящено немало исследований в терапии вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) [104–106], гепатита С [107], деплеции опухоль-ассоциированных макрофагов [108, 109], а также для индукции иммунной толерантности [110, 111], иммунизации [112–114] и иммунотерапии рака [115, 116].

1.4.3. Эритроциты-биореакторы

Механизм работы эритроцитов-биореакторов основан на включении в эритроцит ферментов, способных расщеплять необходимые метаболиты, циркулирующие в кровотоке, при условии, что эти метаболиты-субстраты проникают внутрь эритроцита, нагруженного ферментом, где происходит их расщепление на безопасные продукты. Такое применение эритроцитов может быть актуально в терапии заболеваний, где в качестве лекарственного средства используется, или может использоваться в будущем, фермент, например, в терапии врожденных дефицитов ферментов (фермент-заместительная терапия), в лечении злокачественных опухолевых заболеваний, или для утилизации токсических метаболитов в кровотоке.

Как правило, фермент, используемый в качестве лекарственного средства, представляет собой чужеродный для человеческого организма белок и, как следствие, его попадание в кровоток при внутривенном или внутримышечном введении зачастую провоцирует аллергические реакции, включая реакции гиперчувствительности и анафилактический шок, а также приводит к короткому периоду полувыведения данного фермента, что затрудняет терапию [117, 118]. Существует несколько способов снижения иммуногенности ферментов – это создание рекомбинатных ферментов с заданными свойствами и поиск новых источников ферментов, создание липосомальных или пэгилированных форм ферментов [119]. Альтернативным и довольно простым способом является инкапсуляция фермента в аутологичные или донорские эритроциты. В данном случае, ферментный лекарственный препарат не попадает непосредственно в

кровоток, что решает проблему его иммуногенности, преждевременной инактивации и увеличивает период его полувыведения.

Фермент-заместительная терапия. Наиболее яркие примеры применения эритроцитов в фермент-заместительной терапии — это эритроциты, нагруженные аденозиндезаминазой [120, 121] и тимидинфосфорилазой [52, 122], предложенные В. Вах и коллегами для терапии дефицитов ферментов аденозиндезаминазы (АДА) и тимидинфосфорилазы (ТР), соответственно.

Дефицит аденозиндезаминазы в 15% случаев является причиной тяжелого комбинированного иммунодефицита. Дефицит этого фермента приводит к системным накоплениям токсичных метаболитов, таких как дезоксиаденозинтрифосфат и дезоксиаденозин, что наиболее сильно влияет на функцию лимфоцитов [123]. Следствием являются тяжелые и рецидивирующие инфекции. В качестве эффективного лечения данного заболевания осуществляется трансплантация гемопоэтических стволовых клеток или генная терапия путем инфузии клеток костного мозга CD34⁺, трансдуцированных вектором, содержащим аденозиндезаминазу. В качестве поддерживающей терапии применяется терапия пэгилированной аденозиндезаминазой (PEG-ADA, Adagen®) [124], которая имеет очень высокую стоимость и не лишена побочных эффектов.

В 2009 году были опубликованы результаты долгосрочной (9 лет) поддерживающей терапии у взрослого пациента с дефицитом аденозиндезаминазы с помощью аденозиндезаминазы в эритроцитах [120]. Было показано, что такая терапия может быть клинически и метаболически эффективной. После 9 лет терапии у пациента наблюдалось значительное снижение (до 24-44 мМ) дезоксиаденозинтрифосфата в плазме (до терапии - 234 мМ), увеличение активности S-аденозилгомоцистеингидролазы до 1,69-2,29 ммоль/ч на мг гемоглобина (до терапии - 0,34 ммоль/ч на мг гемоглобина) и уменьшение частоты респираторных инфекций, хотя абсолютное количество лимфоцитов увеличено не было. Активность аденозиндезаминазы в эритроцитах достигала 40-100 нмоль/ч на мг гемоглобина, что соответствует норме.

Терапия пэгилированной и эритроцитарной формой аденозиндезаминазы может использоваться в качестве поддерживающей терапии до трансплантации гемопоэтических клеток или генной терапии. При этом инкапсуляция свободной аденозиндезаминазы в эритроциты значительно уменьшает стоимость поддерживающей терапии по сравнению с PEG-ADA, так как производство пэгилированной формы ферментов является дорогостоящей процедурой. Включение аденозиндезаминазы в эритроциты увеличивает период полувыведения фермента [121] (12 дней для АДА в эритроцитах против 3-5 дней для PEG-ADA) и уменьшает образование антител к данному ферменту, что важно при последующей трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, после которой восстановится нормальная концентрация аденозиндезаминазы.

Еще одним примером применения эритроцитов в фермент-заместительной терапии являются эритроциты, нагруженные тимидинфосфорилазой. Дефицит TP приводит к накоплению тимидина и дезоксиуридина, что вызывает дисбаланс в митохондриальных пулах дезоксирибонуклеотидов, точечные мутации митохондриальной ДНК, и, в конечном итоге, нарушение функции митохондрий. Это очень редкое заболевание (1-9/1 000 000 [125], для которого в настоящее время нет утвержденных методов лечения. Эффективным лечением дефицита является аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток [126–128], однако для нее тоже имеются ограничения. В настоящее время проводится II фаза клинических испытаний эритроцитов-биореакторов, нагруженных тимидинфосфорилазой (ЕЕ-TP), в которую планируется включить 20 пациентов и оценить безопасность, переносимость и эффективность повторных доз ЕЕ-TP [129]. Ранее, биохимическая и клиническая терапевтическая эффективность ЕЕ-TP была показана для трех пациентов с дефицитом TP [130]. У всех трех пациентов наблюдалось снижение в плазме концентраций связанных с болезнью метаболитов - тимидина и дезоксиуридина, а также увеличение веса и улучшение показателей, изменяющихся при заболевании. Метод терапии дефицита TP с применением ЕЕ-TP запатентован В. Вах и М. Bain [52].

ЕЕ-ТР, как и эритроциты с АДА, можно рассматривать как поддерживающую терапию для пациентов с дефицитами данных ферментов до получения возможности подходящей аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток или нахождения подходящего донора печени, а также в качестве альтернативной терапии для пациентов с необратимой болезнью на конечной стадии и без оптимально подобранного донора [131].

В литературе есть еще немало интересных исследований, посвященных применению эритроцитов-носителей в фермент-заместительной терапии, требующих более глубокого изучения [132–135].

Противоопухолевая терапия. В настоящее время одним из подходов для лечения определенных видов опухолей является истощение в кровотоке с помощью ферментов определенных аминокислот, которые не могут продуцироваться самими опухолевыми клетками. В результате такого истощения клетки гибнут [136]. Селективность этих методов по отношению к опухолевым клеткам определяется тем, что нормальные клетки организма способны самостоятельно синтезировать истощаемую аминокислоту. Иммуногенность и другие токсические эффекты, возможно, являются единственными существенными ограничениями этих методов лечения. Включение таких ферментов в эритроциты решает проблему иммуногенности. Наиболее исследуемым и опробованным в клинической практике ферментом в эритроцитах является аспарагиназа для терапии ОЛЛ. Также, на мышах было продемонстрировано применение метиониназы и аргининдеиминазы в эритроцитах. В обоих случаях наблюдалось пролонгированное истощение метионина и аргинина. В случае с метиониназой наблюдалось значительное уменьшение объема опухоли у мышей с глиобластомой [60] и карциномой молочной железы [137].

Аспарагиназа в эритроцитах. Безусловно, отдельного внимания в разделе противоопухолевой терапии заслуживает L-аспарагиназа в эритроцитах, наиболее исследованный фермент для загрузки в эритроцит. L-аспарагиназа является обязательным компонентом в терапии острого лимфобластного лейкоза с 1970-х годов [138]. Механизм ее противоопухолевого действия основан на снижении

синтеза белков в опухолевых клетках за счет истощения аспарагина - одной из необходимых для этого аминокислот. В первую очередь аспарагиназа влияет на клетки, в которых отсутствует аспарагинсинтетаза, т.е. способность синтеза аспарагина. Однако препарат не лишен побочных эффектов, часть из которых вызвана нарушением синтеза белков в результате снижения концентрации аспарагина [138]. Кроме того, ввиду иммуногенности фермента, применение аспарагиназы очень часто вызывает реакции гиперчувствительности, вплоть до анафилактического шока [139]. Реакции иммунной системы сильно сокращают период полувыведения препарата. При внутривенном введении свободного фермента L-аспарагиназы из *E. coli* он составляет 1,28 дней [140]. Есть несколько способов решения данной проблемы, среди которых поиск новых менее иммуногенных природных аспарагиназ (*Erwinia chrysanthemi*), создание рекомбинантных аспарагиназ с модифицированными свойствами, а также связь фермента со специальными носителями или включение его внутрь везикул или эритроцитов [119, 141]. Создание L-аспарагиназы, связанной с полиэтиленгликолем (пэгилированной аспарагиназы, ПЭГ-аспарагиназы) позволило увеличить время полувыведения фермента из кровотока приблизительно до 5-6 дней [117, 142]. Аллергические реакции на L-аспарагиназу в составе этого препарата частично снижены, однако у пациентов, получавших ПЭГ-аспарагиназу (особенно взрослых) также наблюдались тяжелые аллергические реакции, в том числе на носитель препарата – ПЭГ.

С 1980-х годов различные группы авторов предпринимали попытки создать ЭБР, нагруженные L-аспарагиназой [48, 56, 62, 76]. Компания ERYTECH успешно довела до клинических испытаний эритроциты с включенной L-аспарагиназой. Положительные результаты клинических исследований эритроцитов с аспарагиназой (GRASPA) были получены в терапии ОЛЛ у детей [143] и взрослых [144]. Период полувыведения препарата, инкапсулированного в эритроциты, составил 40 дней, против 1,28 дня для нативной L-аспарагиназы из *E. coli*. Одна инъекция GRASPA оказалась сопоставима с 8 инъекциями нативной L-аспарагиназы из *E. coli*. Кроме того, в III фазе клинических испытаний для

пациентов с рецидивом ОЛЛ, было показано значительное уменьшение частоты (0 против 46%) и тяжести аллергических реакций, вызванных GRASPA по сравнению с нативным препаратом L-аспарагиназы из *E. coli*, вводимым внутривенно [145]. Лечение в группе GRASPA в целом лучше переносилось пациентами, наблюдалось снижение побочных эффектов: со стороны нарушения свертывания крови - 35% случаев в группе GRASPA против 82% в контрольной группе, панкреатической токсичности -27% против 50% и гепатотоксичности -19% против 43% в группе GRASPA и контрольной соответственно. Испытания препарата GRASPA в Европе проводились также и для лечения острого миелобластного лейкоза [61].

Таким образом, GRASPA продемонстрировала благоприятный профиль эффективности и безопасности для пациентов с ОЛЛ, ранее получавших терапию аспарагиназой, включая пациентов, у которых ранее наблюдалась гиперчувствительность к аспарагиназе из *E. coli*.

В начале 2022 года компания ERYTECH анонсировала завершение III фазы клинических испытаний эритроцитов-носителей аспарагиназы (Eryaspase) при метастатическом раке поджелудочной железы (TRYbeCA1) [146]. Хотя исследование не достигло своей основной конечной точки для общей выживаемости (ОВ), наблюдалась положительная тенденция к улучшению у пациентов, получавших терапию на основе Eryaspase и иринотекана (FOLFIRI) по сравнению с терапией только на основе иринотекана (7,5 мес. и 6,7 мес. соответственно).

Ранее сообщалось об успешном проведении I и II фазы клинических испытаний Eryaspase в сочетании с химиотерапией, для лечения метастатического рака поджелудочной железы [63, 147]. Исследование II фазы насчитывало 140 пациентов. Было продемонстрировано, что препарат вызывает значительное повышение общей выживаемости пациентов и выживаемости без прогрессирования заболевания. Лечение химиотерапией совместно с Eryaspase снижало риск смертности на 40% по сравнению с лечением только химиотерапией. Компания так же проводила в США и Европе II/III фазы клинических испытаний

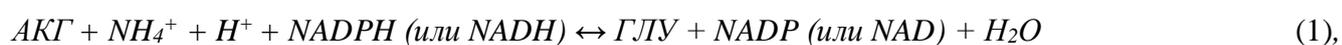
Eryaspase для лечения тройного негативного рака молочной железы [148], но в настоящий момент эти исследования приостановлены.

Проницаемость мембраны эритроцитов человека для аспарагина. Несмотря на такую популярность аспарагиназы в эритроцитах вопрос проницаемости эритроцитарной мембраны для аспарагина изучен слабо. В некоторых работах упоминается, что аспарагин, наряду с глутамином, проникают в эритроциты посредством переносчика N (Amino acid transport by human erythrocyte membranes, Sodium-coupled neutral amino acid (System N/A) transporters of the SLC38 gene family). Однако практически нет работ, в которых измеряется скорость проникновения аспарагина в эритроциты. Одна такая работа была выполнена Ф.А. Атауллахановым и соавторами [149]. В данной работе была показана *in vitro* способность аспарагина проникать в эритроциты человека со скоростью 0,1-0,2 ммоль/час на 1 л клеток при концентрации аспарагина во внешней среде 5-10 мМ. В диапазоне концентраций аспарагина во внешней среде 0,18-3,54 мМ наблюдалась линейная зависимость скорости накопления аспарагина внутри эритроцита от концентрации во внешней среде. Было показано, что процесс транспорта аспарагина в эритроциты может быть описан уравнением Михаэлиса-Ментен с $K_M=2,50$ мМ. Также авторы продемонстрировали, что при инкубации эритроцитов с включенной аспарагиназой в среде с аспарагином, в эритроцитах накапливается аспарагиновая кислота, а скорость накопления аспартата зависит от активности аспарагиназы внутри эритроцитов.

Таким образом, полученные данные этой статьи доказывают способность аспарагина проникать в эритроциты человека и способность аспарагиназы истощать аспарагин внутри эритроцита.

Утилизация аммония из кровотока. Гипераммониемия (ГА) — состояние, характеризующееся повышенной концентрацией аммония в крови, сопровождающее различные приобретенные заболевания печени (рак, цирроз, вирусные заболевания) и врожденный дефицит ферментов, связанный с нарушением обмена аммония [150]. Аммоний токсичен для центральной нервной системы, поэтому необходимо быстро снижать его концентрацию в крови, однако

существующие препараты для лечения ГА малоэффективны [151–153]. В качестве альтернативы для удаления аммония из крови были предложены эритроциты, нагруженные ферментами, утилизирующими аммоний. Эритроциты-биореакторы, для утилизации аммония (аммоциты), создавались различными научными группами. Для включения в эритроциты сначала были использованы глутаматдегидрогеназа, которая катализирует образование L-глутаминовой кислоты из α -кетоглутарата и аммония в присутствии NADPH [154, 155], и глутаминсинтетаза, катализирующая образование L-глутамина из L-глутаминовой кислоты и аммония в присутствии АТФ [156, 157]. Оба фермента были инкапсулированы в эритроциты методом обратимого гипотонического диализа. Однако эксперименты *in vivo* показали, что такие биореакторы эффективно удаляли аммоний из циркуляции у мышей только в первые 0,5–1 ч [154, 157]. По истечении этого времени концентрация аммония в крови снижалась примерно с одинаковой скоростью как у экспериментальных, так и у контрольных животных, которые получали диализированные эритроциты, но без включенных ферментов. Таким образом, через 0,5–1 ч включенные ферменты внутри ЭБР переставали вносить вклад в процесс потребления аммония. С помощью математических моделей эритроцитов-биореакторов, созданных в работе [158] было показано, что причиной такого поведения является истощение субстратов (L- глутаминовой кислоты или α -кетоглутарата), расходующихся в ходе утилизации аммония данными ферментами. Нашей группой в работе [158] была предложена новая многообещающая система для эритроцитов-биореакторов, утилизирующих аммоний, основанная на инкапсуляции в эритроциты тандема из двух ферментов: глутаматдегидрогеназы (ГДГ), катализирующей реакцию (1) и аланинаминотрансферазы (АЛТ) (реакция (2)). В результате, в эритроците был создан новый метаболический путь, в котором α -кетоглутарат и L-глутаминовая кислота производятся и потребляются в циклическом процессе:



где NH_4^+ — ион аммония, АКГ — α -кетоглутарат, ГЛУ — глутамат, ПИР — пируват, АЛА — аланин, NADP и NADPH — окисленная и восстановленная формы никотинамидадениндинуклеотидфосфата, соответственно.

Таким образом проблема истощения этих субстратов внутри клетки была решена, и система стала независимой от их транспорта. Скорость утилизации аммония *in vivo* на мышах для таких биореакторов составила 2 ммоль/ч \times ЛЭБР, к тому же они продолжали работать даже через 2 ч после введения, что отличало их от биореакторов, описанных ранее в литературе [154, 157]. В статье [158] приведен расчет, показывающий, что при физиологических условиях переливание пациенту 200 мл таких ЭБР приведет к снижению концентрации аммония в плазме на 6 мМ/день, что в 10 раз превышает аналогичные значения (600 μ М/день) для лучших существующих сегодня лекарственных средств, применяемых для снижения концентрации аммония. Ограничивающим фактором для таких биореакторов может оказаться концентрация пирувата, однако несмотря на его низкую концентрацию в плазме (приблизительно 50-70 μ М), этот уровень остается стабильным благодаря поступлению пирувата из разных клеток [159].

Для получения аммоцитов с ГДГ и АЛТ в работе [158] применяли ГДГ, полученную из бычьей печени. Недостатком таких аммоцитов являлась низкая эффективность включения ГДГ из бычьей печени в эритроциты (около 3,8-2,2%) [154, 158]. Ранее мы предполагали, что это может быть обусловлено методом загрузки и свойствами самого фермента [160]. Было предложено использовать вместо ГДГ из бычьей печени бактериальный ГДГ из *Proteus* sp., так как это также NADP-зависимый фермент с высокой удельной активностью на 1 мг (по данным производителя эта активность в 10 раз выше, чем у бычьей ГДГ), и можно было предположить, что в отличие от ГДГ из бычьей печени, этот ГДГ не агрегирует в растворе с увеличением его концентрации выше 0.1 мг/мл [161, 162]. В качестве метода загрузки ферментов был предложен гипоосмотический метод проточного диализа, который оказался наиболее эффективным по сравнению с другими классическими лабораторными методами [160]. При осмоляльности 100 мОсм/кг

этот метод позволил повысить эффективность инкапсуляции ГДГ из бычьей печени в 2 раза по сравнению с методом гипоосмотического диализа в мешках [154, 155, 158, 163]. Свойства эритроцитов, содержащих ГДГ, после воздействия проточного диализа изменились незначительно. Активность загружаемой в эритроциты ГДГ из *Proteus* sp. была прямо пропорциональна концентрации ГДГ в исходной суспензии, что подтвердило, что этот фермент не агрегировал с увеличением его концентрации. Это позволило повысить его удельную ферментативную активность в аммоцитах примерно в 18 раз (при концентрации ГДГ в исходной суспензии 1,4 мг/мл). Однако в работе [160] была показана инкапсуляция в эритроциты разными методами только для одного фермента - ГДГ (из бычьей печени или *Proteus* sp.). Поэтому целью настоящего исследования было изготовление ЭБР на основе тандема ГДГ из *Proteus* sp. и АЛТ сердца свиньи методом проточного диализа, а также изучение свойств этих биореакторов и их способности удалять аммоний из среды *in vitro*. Для снижения расхода реагентов использовались модифицированные диализаторы малого объема.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы

Для создания ЭБР с аспарагиназой в работе были использованы лиофилизаты препаратов L-аспарагиназы из *E. coli* (EC 3.5.1.1): Medac (Medac GmbH, Германия), Веро-аспарагиназа (Верофарм ООО, Россия) или Kidrolase (EUSA Pharma SAS, Франция) по 10000 МЕ/флакон. Для создания ЭБР с ГДГ и АЛТ были использованы бактериальная глутаматдегидрогеназа из *Proteus* sp. (EC 1.4.1.4) (забуференный водный раствор, содержащий 50 мМ Трис-НСl буфера, 0.05% NaN₃ и 5 мМ Na₂ЭДТА, pH 7.8) фирмы Sigma-Aldrich (США) со специфической активностью при pH 8.3 184 МЕ/мг белка, или фирмы Toyobo Co. Ltd., Япония с активностью 300 МЕ/мг белка, а также лиофилизованная аланинаминотрансфераза (EC 2.6.1.2) из сердца свиньи фирмы Sigma-Aldrich (США).

Для определения активностей включаемых ферментов, а также аспарагина, аланина и аммония были использованы глутаматоксалоацетаттрансаминаза (GOT EC 2.6.1.1), малатдегидрогеназа (МДГ, EC 1.1.1.37), глутаматдегидрогеназа из бычьей печени (ГДГ), рекомбинантная аланиндегидрогеназа (АДГ, EC 1.4.1.1) и лактатдегидрогеназа (ЛДГ, EC 1.1.1.27) из мышц кролика фирмы Sigma-Aldrich (США). В работе также были использованы α-кетоглутарат, никотинамидадениндинуклеотид окисленный (NAD⁺) и восстановленный (NADH), никотинамидадениндинуклеотидфосфат (NADPH), аденозинтрифосфат (АТФ), инозин, глюкоза, MgCl₂, аспартат-β-гидроксамат (АНА), 8-гидроксихиолин, пиридоксаль-5'-фосфат, Na₂CO₃, трихлоруксусная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) и 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазиносульфоновая кислота (HEPES) фирмы Sigma-Aldrich (США); K₂HPO₄, KH₂PO₄, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, NaCl, аденин, пируват фирмы AppliChem GmbH (Германия); трис(гидроксиэтил)аминометан (Трис) фирмы Reanal (Венгрия); фосфатно-солевой буфер (PBS), содержащий 10 мМ фосфатного буфера, 138 мМ NaCl и 2.7 мМ KCl, pH 7.4 фирмы Биолот (Россия); бычий сывороточный альбумин

(BSA) фирмы BioClot GmbH (Германия); стерильный физиологический раствор фирмы Мосфарм (Россия); стерильный раствор для отмывания эритроцитов Bio-Wash, содержащий дополнительно к физиологическому раствору 0.2% глюкозы, и раствор для консервации эритроцитов SAG-M фирмы Haemonetics SA (США), содержащий 150 мМ NaCl, 1.25 мМ аденина, 45.4 мМ моногидрата глюкозы и 28.8 мМ маннитола; а также стандартные вакуумные пробирки для забора крови Vacuette фирмы Greiner Bio-One GmbH (Austria), содержащие 3,2 % (0,109 М) раствор дигидрата трехзамещенного цитрата натрия. Гипо- и гиперосмотические растворы после приготовления были простерилизованы фильтрованием через мембранные фильтры фирмы Merck Millipore (Merck KGaA, Германия) с диаметром пор 0.22 μm , чтобы предупредить разрушение их термолабильных компонентов.

Для проведения процедуры проточного диализа были использованы педиатрические диализаторы FX Paed фирмы Fresenius (Германия); для изготовления диализаторов малого объема использовали полисульфоновые волокна диализаторов Fresenius HF 80S (Fresenius, Германия), термоусадочные трубки фирмы Rexant (Россия) и герметик Силагерм 6080 фирмы ПО Технология-Пласт (Россия); а для метода диализа использовали диализные мешки Dialysis tubing cellulose membrane D9777 фирмы Sigma-Aldrich (США), отсекающие метаболиты с молекулярным весом ≥ 14000 Да. Для определения фильтруемости эритроцитов использовали полиэтилентерефталатную пленку толщиной 7 μm со средним диаметром пор 3,1 μm (Объединенный институт ядерных исследований, Дубна, Россия). Для стерильных экспериментов использовали одноразовые поливинилхлоридные (ПВХ) контейнеры для компонентов крови и системы для забора донорской крови с интегрированным лейкофильтром фирмы MascoPharma (Франция); прибор для отмывания эритроцитов АСР-215 и одноразовые комплекты для отмывания эритроцитов для этого прибора были фирмы Haemonetics SA, (США); системы кровопроводящих магистралей для гемодиализа фирмы Sundar (Тайвань), флаконы с питательной средой для определения стерильности препаратов BD BACTEC Peds PLUS были фирмы Becton Dickinson (США). Для

определения эндотоксина в образцах (определения их апиrogenности) использовали *Limulus amoebocyte lysate* (LAL) тест фирмы Charles River Endosafe, (США).

2.2. Выделение эритроцитов и подготовка растворов

Для получения фармакоцитов с аспарагиназой методами обратимого гипоосмотического лизиса и гипоосмотического диализа, а также фармакоцитов с ГДГ и АЛТ методом проточного диализа кровь здоровых доноров после пункции локтевой вены забирали в стандартные вакуумные пробирки Vacuette, содержащие 3,2 % (0,109 M) раствор дигидрата трехзамещенного цитрата натрия. Соотношение цитрат:кровь составляло 1:9. Эритроциты осаждали путем центрифугирования при 1000 g в течение 8 мин. Плазму и лейкотромбослой удаляли, а осевшие эритроциты отмывали 2 раза в четырехкратном объеме раствора PBS с последующим центрифугированием в течение 8 мин при 1000 g.

Для получения эритроцитов-носителей с аспарагиназой методом проточного диализа использовали стандартную эритроцитарную массу здоровых доноров, приготовленную в отделении трансфузиологии в Национальном медицинском исследовательском центре детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева (НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева) и хранившуюся не более 5 дней в растворе SAG-M. Отмывали эритроциты однократно в четырехкратном объеме раствора PBS с тем же режимом центрифугирования.

Для получения эритроцитов-носителей аспарагиназы методом проточного диализа в клинических испытаниях использовали в одном случае цельную аутологичную кровь пациента, а в другом, стандартную эритроцитарную массу здорового донора. Кровь пациента после пункции локтевой вены забирали в контейнер для компонентов крови, содержащий лейкотромбофильтр, позволяющий сразу отфильтровать лейкоциты и тромбоциты. Затем кровь центрифугировали 15 мин при 1000 g с охлаждением до 4°C и убирали плазму.

Эритроцитарную массу здорового донора отмывали однократно в стерильном физиологическом растворе центрифугированием при 1000 g, 8 мин.

Во всех экспериментах эритроцитарные суспензии перед процедурой инкапсуляции охлаждали до 8°C в течение 1 ч. Заранее охлаждали также гипоосмотический раствор, содержащий 2 мМ MgCl₂; 5 мМ KН₂PO₄/K₂HPO₄; 5 мМ глюкозы и NaCl от 0 до 35 мМ в зависимости от целевой осмоляльности раствора (рН 7,4). Запечатывающий гиперосмотический раствор, содержащий 55 мМ NaCl, 30 мМ NaH₂PO₄, 458 мМ KCl, 20 мМ АТФ, 3 мМ MgCl₂, 1,5 мМ аденина; 8,4 мМ глюкозы, 1,5 мМ пирувата и 30 мМ инозина (рН 7,4; 2000-2200 мОсм/кг) готовили заранее и хранили в аликвотах при температуре -20°C. В некоторых экспериментах был использован гиперосмотический раствор, содержащий 1 М NaCl, 50 мМ KН₂PO₄/K₂HPO₄, 5 мМ АТФ, 50 мМ глюкозы и 50 мМ натриевой соли пирувата (рН 7,4, 2240 мОсм/кг). Результаты запечатывания лизированных эритроцитов от состава гиперосмотического раствора не зависели. Раствор L-аспарагиназы готовили путем разведения лиофилизата фермента буфером (0,015 М Трис-НСl, 0,015% BSA, рН 7,3) до конечной активности 2000 МЕ/мл или стерильным физиологическим раствором до активности 2500 или 5000 МЕ/мл (в случае проведения стерильного диализа). Активности исходных растворов ГДГ *Proteus* sp. фирмы Sigma-Aldrich и Тоуба измеренные при рН 7,4, (физиологический рН) составляли 2542 или 1943 МЕ/мл, соответственно. Данные растворы были использованы без дополнительного разбавления. АЛТ растворяли в 0,1 М Трис-НСl буфере, рН 8 до активности 80-200 МЕ/мл и хранили при температуре -80°C.

2.3. Методы инкапсуляции ферментов в эритроциты

Для включения ферментов в эритроциты в работе были использованы различные осмотические методы. Все эти методы существенно различались только в первой части процедуры (по способу воздействия гипоосмотической среды на эритроциты), но почти совпадали в части “запечатывания” (закрытия пор эритроцитов после их лизиса в присутствии включаемого вещества) и отмывания

полученных фармакоцитов. Поэтому сначала будут отдельно рассмотрены процедуры гипоосмотической обработки клеток для каждого метода и для каждого типа биореактора.

2.3.1. Включение аспарагиназы в эритроциты

Метод обратимого гипоосмотического лизиса. К 1,7 мл гипотонического раствора (осмоляльности 50, 70, 90 или 110 мОсм/кг) добавляли 20 μ л предварительно разведенного в буфере препарата L-аспарагиназы с активностью 2000 МЕ/мл (см. ранее). К 100 μ л суспензии отмытых из цельной крови эритроцитов с гематокритом $78 \pm 3\%$ добавляли 400 μ л этой смеси гипотонического раствора и L-аспарагиназы и инкубировали 3 мин при 4 °С. После этого фармакоциты запечатывали и затем отмывали (см. далее).

Метод гипоосмотического диализа в мешках. В диализный мешок помещали 1 мл отмытых из цельной крови эритроцитов с гематокритом 70% и 20 μ л раствора L-аспарагиназы с активностью 2000 ЕД/мл. Диализ суспензии эритроцитов проводили против гипоосмотического буфера (с осмоляльностью 20, 50, 80 или 110 мОсм/кг) в течение 2 ч при 4 °С, для чего закрытый диализный мешок с суспензией эритроцитов помещали в стакан с гипоосмотическим раствором. Отношение объема суспензии к объему гипоосмотического раствора составляло 1:100. Равномерное перемешивание раствора в течение процедуры диализа обеспечивали с помощью магнитной мешалки.

Метод проточного диализа. Эту процедуру проводили, в большинстве опытов, используя в качестве исходного материала готовую эритромассу. Данные опыты проводили как в нестерильных, так и в стерильных условиях. При получении фармакоцитов, использованных в клинических испытаниях, в качестве исходного материала для стерильной процедуры включения препарата была использована либо аутологичная цельная кровь пациента (для пациента 1), либо готовая эритромаасса из эритроцитов донора (пациентка 2).

К 45-65 мл суспензии отмытых эритроцитов с гематокритом 60-65% добавляли 380-400 μ л раствора L-аспарагиназы (с активностью 2500 МЕ/мл). В

опытах по стерильному включению аспарагиназы для получения фармакоцитов для клинических испытаний к 70-80 мл суспензии эритроцитов, отмытых из цельной крови пациента (или донора) с гематокритом 70-80% добавляли 4-14 мл раствора аспарагиназы с активностью 2500 или 5000 МЕ/мл. Диализ проводили в системе, состоящей из стандартного педиатрического диализатора для гемодиализа, стерильных мешков и кровопроводящих магистралей, которые перед процедурой промывали стерильным физиологическим раствором в течение 5 мин при скорости его прокачивания насосами 100 мл/мин (Рисунок 3).

Полученную эритроцитарную суспензию с ферментом прокачивали с помощью перистальтического насоса по магистрали внутреннего контура из мешка 1 в мешок 3 со скоростью 1-3 мл/мин, а гипоосмотический раствор прокачивали противотоком по магистралям внешнего контура из мешка 5 в мешок 7 с помощью другого перистальтического насоса со скоростью 10-30 мл/мин.

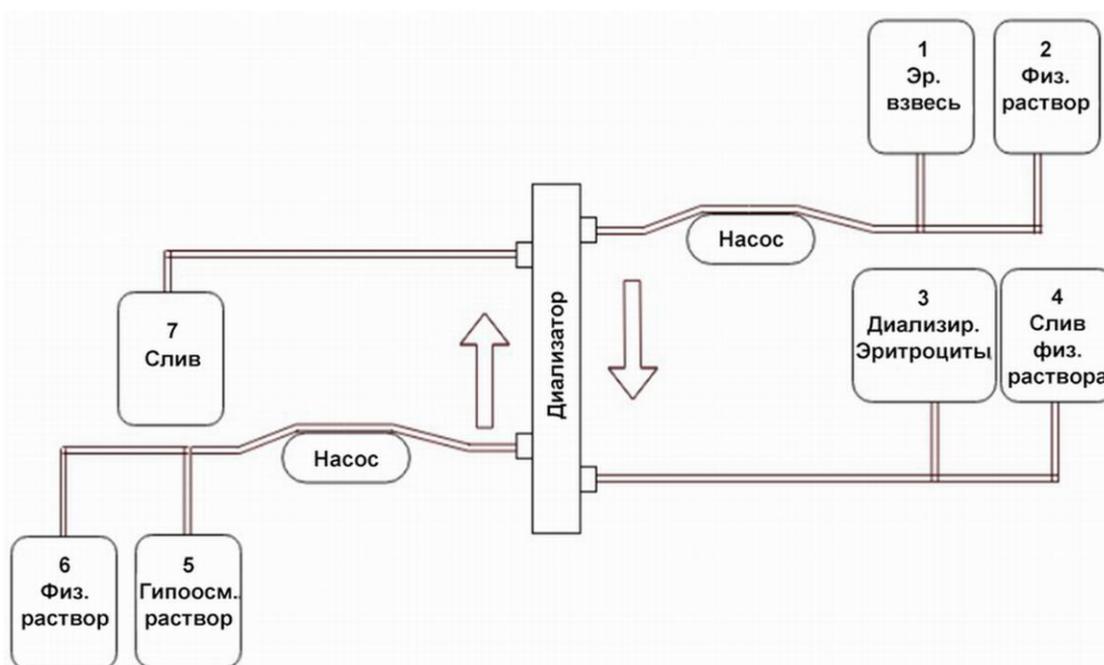


Рисунок 3 — Принципиальная схема установки для проточного диализа. Справа от диализатора – компоненты, проходящие по внутреннему контуру диализатора, слева – по внешнему контуру. Стрелками указаны направления потоков растворов и суспензии эритроцитов.

Во время диализа мешок с эритроцитарной суспензией (1) постоянно мягко перемешивали с помощью шейкера. После того как эритроцитарная суспензия в мешке 1 заканчивалась, по внутреннему контуру прокачивали физиологический раствор из мешка 2 в объеме 20-30 мл для того, чтобы вымыть оставшиеся в диализаторе эритроциты в мешок 3. Физиологический раствор из мешка 6 прокачивали по внешнему контуру диализатора в мешок 7 только при промывке диализатора.

При стерильном включении аспарагиназы в эритроциты для отмывания эритроцитов и фармакоцитов использовали стандартный прибор для отмывания клеток крови – АСР-215 (Haemonetics, США) с применением стандартных одноразовых комплектов для такого отмывания и стерильного раствора для отмывания 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 осуществляли с помощью диализатора автоматически (см. раздел 3.6.)

В случае стерильного включения установку с диализатором и контейнерами для компонентов крови помещали в ламинарный шкаф. Такие компоненты как диализатор, контейнеры для компонентов крови, кровопроводящие магистрали, шприцы использовались одноразово. Присоединение и отсоединение контейнеров для компонентов крови к установке осуществляли при помощи специального запаивателя для стерильного присоединения (или отсоединения) пластиковых магистралей. Таким образом, система для включения аспарагиназы оставалась закрытой на протяжении всей процедуры. Не допускалось соприкосновение эритроцитарной суспензии и используемых растворов с воздухом из внешней среды. Были использованы стандартные стерильные растворы (физиологический раствор и раствор Bio-Wash для отмывания клеток), а приготовленные гипо- и

гиперосмотические растворы были профильтрованы через фильтр 0,22 мкм. Все процедуры проводили в ламинарном шкафу.

Полученный после последнего центрифугирования надосадок использовали для определения бактериологической чистоты фармакоцитов.

2.3.2. Совместное включение в эритроциты глутаматдегидрогеназы и аланинаминотрансферазы

Поскольку минимальный объем используемого нами медицинского (педиатрического) диализатора составляет около 20 мл, а ГДГ и АЛТ довольно дорогие ферменты и не так легко доступны, ранее в работе [160] были разработаны диализаторы малого объема для снижения расхода реагентов при инкапсуляции ферментов методом гипоосмотического проточного диализа на этапе отработки методики.

Сборка диализаторов малого объема. Подробная методика, которую мы использовали для изготовления диализаторов малого объема и проверки их герметичности, описана в работе [160]. Здесь методика будет представлена кратко. Диализатор малого объема представляет собой пучок полупроницаемых полисульфоновых волокон из стандартного диализатора Fresenius HF 80S для гемодиализа с конечной рабочей длиной 7 см (Рисунок 4). Данные волокна имеют толщину стенки волокна 30–35 мкм, общий диаметр волокна 200 мкм и диаметр пор 5–8 нм. Для стандартизации объема получаемых диализаторов волокна взвешивали, чтобы получить массу пучка 0,237–0,240 г, что соответствует примерно 450–455 волокнам. Для фиксации пучка вырезанных волокон на него насаживали 4 отрезка трубок диаметром 7 мм, выполненных из термоусадочного материала: 2 отрезка длиной 15 мм (ближе к центру будущего диализатора) и 2 отрезка длиной 25 мм на концы пучка волокон. Внутренние трубки сдвигали до расстояния между ними 7 см (рабочая длина диализатора), и нагревали до 125°C для термоусадки. На внешние участки пучка волокон наносили полиуретановый клей Силагерм 6080 так, чтобы заполнить все пространство между волокнами, после чего на них сдвигали внешние куски термоусадочных трубок так, чтобы они

перекрывали внутренние куски насаженных трубок на 10 мм, и прогревали внешние куски трубок для их термоусадки. После высыхания клея (через 24 часа) внешние концы пучка волокон и трубок обрезали, и плотно насаживали на концы готового диализатора ПВХ трубки с диаметром 4.5 мм. Объем полученного диализатора составлял 0,85-1 мл.

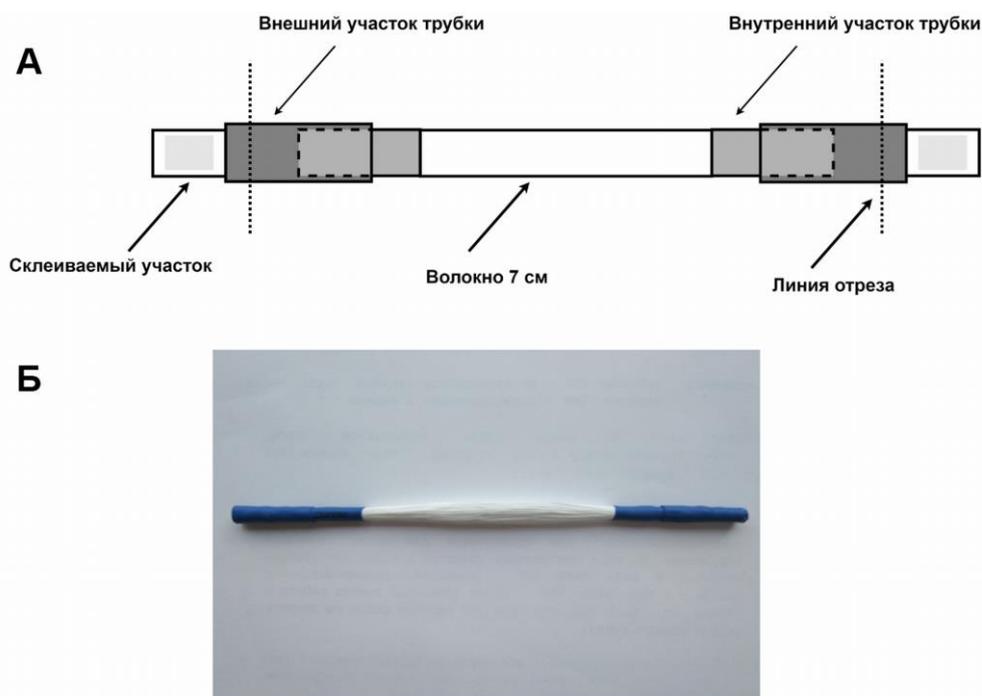


Рисунок 4 — Схема сборки (А) и фотография (Б) диализатора малого объема.

Совместное включение в эритроциты методом проточного диализа глутаматдегидрогеназы из *Proteus* sp. и аланинаминотрансферазы из сердца свиньи. Для данной процедуры использовали различные объемы ГДГ *Proteus* sp. и АЛТ из сердца свиньи, которые добавляли к суспензии отмытых из цельной крови эритроцитов непосредственно перед процедурой включения. Конечный объем и гематокрит суспензии составляли 2 мл и $65 \pm 5\%$, соответственно. Активность ферментов в исходной суспензии составляла от 2 до 80 ЕД/мл и от 1,3 до 60 ЕД/мл для ГДГ *Proteus* sp. и АЛТ соответственно. Полученную смесь прокачивали со скоростью 0,2 мл/мин (с помощью насоса Perista, Atto, Япония) через диализатор малого объема, погруженный в перемешиваемый гипоосмотический раствор.

Объемное соотношение суспензии и гипосмотического раствора составляло 1:100. Время диализа составляло около 15 минут. Перед запечатыванием эритроцитов после гипосмотического диализа к диализированным клеткам добавляли растворы необходимых для реакции ГДГ кофакторов NADPH и пиридоксаль-5'-фосфата в конечных концентрациях 0,3 и 0,2 мМ, соответственно.

2.4. Запечатывание и отмывание готовых фармакоцитов

Запечатывающий (гиперосмотический) раствор размораживали в день процедуры и добавляли к суспензиям продиализированных эритроцитов в следующих пропорциях:

– после процедуры гипосмотического лизиса – по 90 μ л в каждую пробу объемом 500 μ л;

– после процедуры гипосмотического диализа в мешках – в объеме 1/3 объема суспензии эритроцитов полученной после диализа;

– после процедуры проточного диализа объем раствора рассчитывали по формуле:

$$V_{\text{гипер. раствора}} = V_{\text{сусп}} \times (O_{\text{смцелев}} - O_{\text{смисх}}) / (O_{\text{смгипер. раствора}} - O_{\text{смцелев}}) \quad (3),$$

где $V_{\text{гипер. раствора}}$ – объем гиперосмотического раствора, который надо добавить, $V_{\text{сусп}}$ – объем суспензии эритроцитов после диализа; $O_{\text{смисх}}$ – исходная осмоляльность диализированной суспензии, которую принимали равной осмоляльности гипосмотического раствора; $O_{\text{смцелев}}$ – конечная осмоляльность суспензии, которой необходимо достичь (принимали равной 310 мОсм/кг), и $O_{\text{смгипер. раствора}}$ – осмоляльность гиперосмотического раствора, равная 2000-2200 мОсм/кг.

Далее все пробы инкубировали при 37 °С в течение 30 мин. После инкубации клетки отмывали путем пятикратного центрифугирования в четырехкратном объеме буфера PBS в течение 8 мин при 1000 g.

В случае использования для отмывания клеток стандартного прибора для отмывания компонентов крови – АСР-215 (Haemonetics, США), суспензию

отмытых фармакоцитов, имеющую низкий гематокрит (от 10 до 20%) дополнительно центрифугировали еще 1 раз для того, чтобы ее сконцентрировать с помощью фракционатора до гематокрита 40-50%, либо, при работе на автоматической установке для включения соединений в эритроциты, проводили концентрирование с помощью диализной установки (см. раздел 3.6.). Полученный после центрифугирования надосадок использовали для определения бактериологической чистоты фармакоцитов.

После процедуры проводили измерение объема и гематокрита полученной суспензии фармакоцитов.

2.5. Методы определения стерильности и апиrogenности фармакоцитов

Стерильность и апиrogenность готовых фармакоцитов с аспарагиназой проверяли в надосадке, отобранном из мешка с суспензией фармакоцитов после отмывания на приборе АСР-215 и финального центрифугирования, с помощью стандартных методов, применяемых в клинической практике.

2.5.1. Определение стерильности препаратов фармакоцитов

Стерильность проверяли в Бактериологической лаборатории НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева с помощью анализатора гемокультур BD BACTEC FX (Becton Dickinson, США) для детекции микробного роста в культурах крови и других образцах. Для проведения анализа 1-3 мл надосадка из суспензии фармакоцитов, образовавшегося в ходе финального центрифугирования после их отмывания, добавляли во флаконы с питательной средой для культивирования аэробных гемокультур BD BACTEC Peds PLUS (Becton Dickinson, США), и устанавливали флаконы во флуоресцентный анализатор гемокультур. Принцип работы анализатора основан на регистрации концентрации CO₂, производимого микроорганизмами в случае их наличия. Результат выдавался автоматически после 7 дней инкубации флаконов в анализаторе.

2.5.2. Определение апиrogenности образцов

Апиrogenность тестировали с помощью теста на пиrogenность (LAL-тест) для детекции бактериальных эндотоксинов. Принцип теста состоит в том, что бактериальные эндотоксины приводят к последовательной активации нескольких ферментов, сериновых протеаз, присутствующих в LAL-реактиве. Последний из ферментов, составляющих этот каскад, называемый проферментом, разрезает находящийся в LAL-реактиве белок-субстрат, называемый коагулогеном. Изменение свойств субстрата приводит к помутнению реакционной смеси, которое заканчивается гелеобразованием. Таким образом по величине помутнения можно судить о наличии эндотоксина. В настоящей работе LAL-тест проводили с помощью портативной тестовой системы Endosafe-PTS/MCS (Charles River Endosafe, США). Эта система, включающая картриджи и прибор, использует принцип определения эндотоксина с помощью хромогенного субстрата (кинетическое или по конечной точке достигаемой оптической плотности при фиксированном времени инкубации) [164].

Система Endosafe-PTS/MCS использует для измерения активности активированного эндотоксином профермента синтетический аналог коагулогена. Этот синтетический субстрат также разрезается проферментом, что приводит к высвобождению хромофора - р-нитроанилина (pNA). Желтая окраска р-нитроанилина может быть измерена фотометрически на длине волны 385-410 нм. Измеряемая интенсивность окраски реакционной смеси находится в прямой зависимости от концентрации эндотоксина в образце.

Для определения эндотоксинов в полученных фармакоцитах, надосадов от их последнего отмывания добавляли в специальный картридж, содержащий хромогенный субстрат. Результат получали в течение 15-30 минут.

2.6. Измерение активности ферментов

2.6.1. Измерение активности аспарагиназы

Активность аспарагиназы была исследована как в растворах фермента, так и в крови пациентов или суспензии фармакоцитов. При измерении аспарагиназы в крови или суспензии фармакоцитов эритроциты в пробах сначала были лизированы. Для этого пробы были разбавлены дистиллированной водой (mQ) в 200 раз. Растворы фермента перед измерением активности аспарагиназы разбавляли в 1500 раз. Оптимальной для измерения является активность примерно 100 ME/л пробы, поэтому, если активность в суспензии или растворе была очень высока, пробу разбавляли дополнительно. Измерение проводили индооксиновым методом, описанным в работе [165], с некоторыми модификациями, сделанными в соответствии с работой [166]. Схема последовательных реакций, на которых основано измерение, представлена на Рисунке 5:

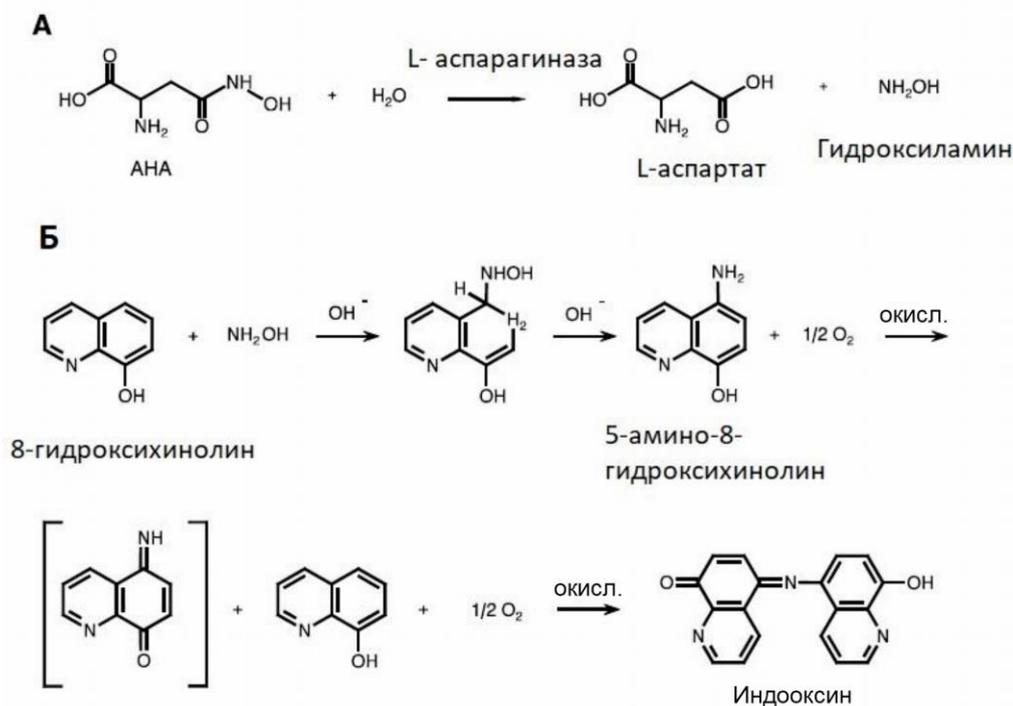


Рисунок 5 — Схема реакций для измерения активности аспарагиназы (адаптировано из работы [165]).

При гидролизе АНА (аспартата- β -гидроксамата), синтетического субстрата аспарагиназы, образуется аспартат и гидроксилламин (NH_2OH). Последний при взаимодействии с 8-гидроксихинолином дает окрашенный продукт – индооксин, измеряемый спектрофотометрически на длине волны 710 нм.

Для измерения активности аспарагиназы к 180 $\mu\text{л}$ буфера (0,015 М Трис- HCl , 0,015% BSA, pH 7.4) добавляли 10 $\mu\text{л}$ лизата эритроцитов (пробы) и 90 $\mu\text{л}$ 10 мМ раствора субстрата АНА. Каждую пробу готовили в трех экземплярах. Затем пробы помещали в термостат и инкубировали при температуре 37°C каждую в течение своего времени (10, 20 или 30 мин). По истечении этого времени пробы последовательно извлекали из термостата и сразу добавляли в каждую пробирку 20 $\mu\text{л}$ раствора трихлоруксусной кислоты (12%) для депротенизации и остановки реакции, 100 $\mu\text{л}$ 1% раствора 8-гидроксихинолина в этаноле и 100 $\mu\text{л}$ раствора Na_2CO_3 (1 М). Далее пробы нагревали в течение 1 мин при 99°C, а затем центрифугировали 10 минут при комнатной температуре и 2500 g. Переносили по 340 $\mu\text{л}$ надосадка в 96-луночный планшет для измерения оптической плотности на планшетном спектрофотометре VersaMax Molecular Devices, California, USA на длине волны 710 нм. Полученные значения оптической плотности пересчитывали в концентрации продукта, (гидроксилламина, NH_2OH), образовавшегося в ходе реакции за 10, 20 и 30 минут, по уравнению Бугера-Ламберта-Бера:

$$C = A/(\varepsilon \times l), \quad (4),$$

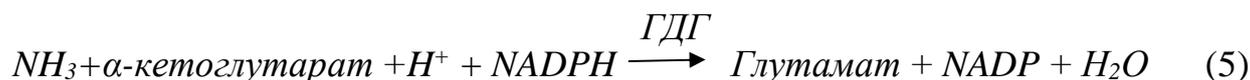
где C – концентрация NH_2OH (в μM); A – значение оптической плотности пробы (в единицах оптической плотности); ε – коэффициент микромолярной экстинкции NH_2OH , который на основании работы [166] принимали равным 0,018 ед. опт. пл. $\times \mu\text{M}^{-1} \times \text{см}^{-1}$; l – длина оптического пути, равная 0,8 см.

По полученным результатам для каждой пробы строили график зависимости концентрации образовавшегося гидроксилламина от времени (10, 20 и 30 мин), и по тангенсу угла наклона этой зависимости ($\mu\text{M}/\text{мин}$) определяли активность фермента L-аспарагиназы в пробе.

2.6.2. Измерение активности ГДГ и АЛТ

Активность ферментов в исходной суспензии эритроцитов с добавленными ферментами и в полученной суспензии аммоцитов измеряли в лизатах, приготовленных добавлением к образцу дистиллированной воды при соотношении объемов образца и воды 1:20. Методы измерения обоих ферментов были адаптированы для измерения небольших объемов образцов с помощью микропланшетного фотометрического ридера Anthos Zenyth 340RT (Biochrom, Ltd., Кембридж, Великобритания). Активность каждого фермента в лизатах измеряли при 30°C на длине волны $\lambda=340$ нм.

Активность ГДГ из *Proteus* sp. измеряли в соответствии с реакцией (5), согласно методике производителя (Тоубо, Япония) [167] с небольшими модификациями:



Модификации состояли в том, что вместо буфера Трис-НСl использовали К-фосфатный буфер, а измерения проводили не при оптимальном для этого фермента рН 8,3, а при физиологическом рН 7,4, так как в организме фармакоциты будут работать именно при физиологическом рН. Согласно данным фирмы Sigma-Aldrich о рН зависимости реакции (5), эффективность фермента при рН 7,4 может быть ниже максимальной примерно на 25-30% [168]. Реакционную смесь (330 μ л), содержащую калий фосфатный буфер, NADPH, ЭДТА, NH₄Cl и пробу с ферментами (по 10 μ л), инкубировали 5 мин при 30 °С, после чего запускали реакцию добавлением α -кетоглутарата. Конечная смесь в лунке (340 μ л) содержала 50 мМ калий-фосфатного буфера (рН 7,4), 0,25 мМ NADPH, 0,85 мМ ЭДТА, 220 мМ NH₄Cl, 7,6 мМ α -кетоглутарата и лизат эритроцитов (10 μ л). Активность ГДГ измеряли по снижению оптической плотности NADPH в результате превращения NADPH в NADP в присутствии α -кетоглутарата, NH₄Cl и ГДГ.

Активность АЛТ измеряли в соответствии с методикой, описанной Н.-У. Bergmeyer, и др. [169], с использованием двух сопряженных реакций, катализируемых аланинаминотрансферазой (6) и лактатдегидрогеназой (7):



Реакционную смесь (330 $\mu\text{л}$), содержащую Трис-буфер (рН 7,4), аланин, пиридоксаль-5'-фосфат, NADH, 10 $\mu\text{л}$ лизата эритроцитов с измеряемым ферментом и лактатдегидрогеназу (ЛДГ), инкубировали в течение 10 мин при 30°C. В течение этого предварительного периода инкубации NADH может окисляться АЛТ (в присутствии пиридоксаль-5'-фосфата) из-за присутствия в образце пирувата и других эндогенных субстратов. Когда фоновый уровень оптической плотности в пробе переставал изменяться, реакцию запускали добавлением α -кетоглутарата и записывали кинетику изменения оптической плотности NADH на длине волны 340 нм в течение 10 мин на микропланшетном фотометре AF2200 (Eppendorf AG, Германия). По тангенсу угла наклона полученной кинетической кривой определяли уровень активности АЛТ в пробе. Общий объем реакционной смеси в измерительной лунке составлял 340 $\mu\text{л}$. Конечная смесь в лунке содержала 100 мМ Трис-HCl буфера (рН 7,4), 500 мМ аланина, 0,1 мМ пиридоксаль-5'-фосфата, 0,18 мМ NADH, 15 мМ α -кетоглутарата, 1,2 МЕ/мл лактатдегидрогеназы, и 10 $\mu\text{л}$ лизата с ферментом (образец).

2.7. Расчет процента инкапсуляции ферментов и выхода клеток

Для оценки эффективности процедуры включения ферментов в эритроциты были рассчитаны абсолютный процент инкапсуляции (E), представляющий собой процент фермента, оказавшегося включенным в фармакоциты после процедуры, и

выход клеток, характеризующий процент клеток, сохранившихся после процедуры включения. Эти показатели были рассчитаны по следующим формулам:

$$\text{Выход клеток (\%)} = V_{\text{конеч}} \times Ht_{\text{конеч}} \times 100 / (V_{\text{исх}} \times Ht_{\text{исх}}) \quad (8),$$

$$E (\%) = A_{\text{конеч}} \times V_{\text{конеч}} \times 100 / (A_{\text{исх}} \times V_{\text{исх}}) \quad (9),$$

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; $Ht_{\text{исх}}$ и $Ht_{\text{конеч}}$ – гематокриты этих суспензий, соответственно.

Кроме того, в ряде экспериментов был рассчитан относительный выход включения (R , %), определяемый по уравнению (10), показывающий, какой процент удельная активность, полученная в фармакоцитах, составляет от максимально возможной в данных условиях, которая, по определению, равна активности фермента в исходной суспензии ($A_{\text{исх}}$).

$$R (\%) = A_{\text{конеч}} \times 100 / (A_{\text{исх}} \times Ht_{\text{конеч}}) \quad (10)$$

2.8. Измерение кинетики потребления аммония и продукции аланина в среде с аммоцитами

2.8.1. Приготовление проб для измерения аммония и аланина

Скорости потребления аммония и продукции аланина в суспензиях фармакоцитов с ГДГ и АЛТ измеряли в герметичной кювете. Общий объем пробы составлял 3 мл. Реакционная смесь содержала буферный раствор (130 мМ фосфата натрия рН 7.4, 10 мМ глюкозы, 2,7 мМ КСl, 1 мМ MgCl₂, 0,2 мМ α-кетоглутарата, 10 мМ пирувата натрия, 1 мМ NH₄Cl) и суспензию аммоцитов (гематокрит в кювете 23%). В качестве контроля использовали нативные эритроциты в такой же среде (без инкапсулированных ферментов). Реакционную среду инкубировали при перемешивании при 25 °С в течение 120–140 мин. Пробы (300 μл) из среды отбирали каждые 20 мин и фиксировали равным объемом смеси 6% HClO₄ и 40%

этанола. Экстракты тщательно перемешивали и замораживали при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ до последующего измерения.

В день измерения полученные экстракты, быстро размораживали и центрифугировали 5 мин при $10\ 000\ \text{g}$ для удаления нерастворимого осадка. Отбирали надосадочную жидкость и нейтрализовали pH в образце, добавляя к нему $2\ \text{M}\ \text{K}_3\text{PO}_4$ до pH 6. Нейтрализованные экстракты были вновь заморожены и разморожены, а затем повторно центрифугированы 5 мин при $3000\ \text{g}$ для удаления солевого осадка. Аммоний и аланин измеряли флуориметрически с использованием планшетного ридера AF2200 (Eppendorf AG, Германия) при длинах волн возбуждения и эмиссии NADH равных 365 и 465 нм, соответственно.

2.8.2. Измерения аммония и аланина

Концентрацию аммония измеряли флуориметрически по методу [170] по реакции превращения α -кетоглутарата в глутамат в присутствии аммония и NADH с использованием ГДГ (реакция аналогичная реакции (5)). Реакционная смесь для измерения содержала $0,2\ \text{M}$ К-фосфатного буфера pH 7,6, $60\ \mu\text{M}$ NADH, $0,5\ \text{mM}$ ЭДТА, $5\ \text{ME}/\text{мл}$ ГДГ, $6\ \text{mM}$ α -кетоглутарата. Данную реакционную смесь инкубировали в течение 30–60 мин при 25°C до постоянного значения флуоресценции. Реакцию запускали добавлением в каждую лунку планшета по $10\ \mu\text{л}$ проб с аммонием до конечного объема $340\ \mu\text{л}$. Через 1 ч инкубации при 25°C (при периодическом встряхивании планшета) измеряли конечную флуоресценцию в лунках. Концентрацию аммония рассчитывали по уменьшению флуоресценции NADH с использованием калибровочной прямой флуоресценции, полученной в аналогичных условиях для образцов с различными известными концентрациями аммония.

Аланин измеряли по увеличению флуоресценции NADH в соответствии с реакцией, катализируемой аланиндегидрогеназой (АДГ) (11), описанной в [171]:



Реакционную смесь (310 μ л), содержащую буфер (40 мМ Трис, 1М гидразин, 1,4 мМ ЭДТА, рН 10,0, свежеприготовленный), 1 мМ β -NAD и 1,5 МЕ/мл АДГ инкубировали в микропланшете в течение 30–60 мин при 25°C до достижения постоянного уровня флуоресценции. Реакцию запускали добавлением в каждую лунку по 30 μ л пробы с аланином до конечного объема 340 μ л. Через 1 ч инкубации при 25°C (при периодическом встряхивании планшета) измеряли конечную флуоресценцию в лунках. Концентрацию аланина рассчитывали по увеличению флуоресценции с использованием калибровочной прямой для разных концентраций аланина.

2.9. Измерение фильтруемости эритроцитов

Фильтруемость клеток измеряли методом фильтрования суспензии эритроцитов через мембранный фильтр, описанным Лисовской И.Л. и соавторами [172] с помощью фильтрометра ИДА-1.(Россия). Метод разработан на основе модифицированного метода, использованного в гемореометре Хансса. 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 μ м со средним диаметром пор 3,1 μ м. Для характеристики фильтруемости были определены такие параметры, как индекс фильтруемости:

$$F = t_b / t_s \quad (12),$$

и доля нефилтрующихся клеток (не проходящих через фильтр) (Z , %), которую рассчитывали согласно работе [172]:

$$Z=N \times 100/m \quad (13),$$

где N — количество пор, которые были заблокированы непрофильтровавшимися клетками, m - количество эритроцитов, которые были помещены на фильтр.

Величину N определяли по уравнению (14), 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:

$$N = N_0 \times (t_{b1} - t_b) / t_{b1} \quad (14).$$

2.10. Измерение осмоляльности растворов

Осмоляльность растворов измеряли на осмометре ОСКР-1 М фирмы КИВИ Осмометрия (Санкт-Петербург, Россия).

2.11. Измерение эритроцитарных индексов

Все пробы для определения гематологических показателей эритроцитов готовили разведением исходной суспензии эритроцитов или полученных фармакоцитов в PBS до гематокрита 20-40%. Измерения среднего объема эритроцитов (MCV, фл), среднего содержания гемоглобина в клетке (MCH, пг) и средней концентрации гемоглобина в клетке (MCHC, г/дл) проводили на гематологическом анализаторе Micros 60 фирмы Horiba ABX (Франция).

2.12. Измерение осмотической резистентности эритроцитов

Для измерения осмотической резистентности исходных эритроцитов или полученных фармакоцитов соответствующие суспензии разводили в PBS до гематокрита 5%. Измерения проводили по методике, описанной в работе [173]. В

кюветы 96-луночного планшета вносили по 300 μ л гипоосмотических растворов различной осмоляльности (от 0 до 297 мОсм/кг) и рН 7,4. В каждую кювету добавляли по 6 μ л пробы и инкубировали взвеси 30 мин при комнатной температуре. Затем в кюветы вносили 40 μ л гипертонического раствора, содержащего 96,2 мМ Na_2HPO_4 ; 15,6 мМ NaH_2PO_4 ; 1,54 М NaCl (рН 7,4). Измерение оптической плотности проб проводили на длине волны 620 нм на планшетном ридере Anthos Zenyth 340rt (Biochrom, Кембридж, Англия).

Процент нелизированных клеток определяли как отношение (в %) оптической плотности, измеренной в конкретной пробе, к оптической плотности той же пробы в растворе с физиологической осмоляльностью, т.е. где процент нелизированных клеток мы принимали за 100%. Величину осмотической резистентности характеризовали значением осмоляльности раствора, при котором 50 % клеток было лизировано (H_{50}), а также значением ширины распределения клеток по осмотической резистентности (W), за которую принимали разность осмоляльностей растворов, при которых наблюдалось 10 и 90% лизиса клеток.

2.13. Хранение эритроцитов–биореакторов

В этих экспериментах были использованы ЭБР, полученные с помощью проточного диализа. Для проверки изменения качества клеток в ходе длительного хранения, исходные эритроциты и полученные ЭБР ресуспендировали в стерильном растворе до гематокрита 10% и хранили эти суспензии при 4°C. Для хранения фармакоцитов с аспарагиназой использовали раствор SAG-M, содержащий 150 мМ NaCl , 50 мМ глюкозы, 1,25 мМ аденина и 28,5 мМ маннитола. Аммоциты хранили в растворе, содержащем 137 мМ NaCl , 2,7 мМ KCl , 10 мМ Na_2HPO_4 , 2 мМ KH_2PO_4 , 1,3 мМ CaCl_2 , 5 мМ MgCl_2 , 10 мМ глюкозы, 5% (по весу) BSA, 30 мМ HEPES, 0,28 мМ аденина и 0,02 мг/мл ампицилина (рН 7,4). На разных сроках хранения проверяли осмотическую резистентность, эритроцитарные индексы клеток, активность ферментов внутри эритроцитов (а для аммоцитов и в надосадке), и уровень гемолиза в суспензии.

2.14. Измерение гемолиза эритроцитов

Для оценки гемолиза в суспензии исходных эритроцитов или фармакоцитов при хранении, на разных сроках хранения измеряли уровень гемоглобина в надосадке в процентах от его общего количества в образце. Для этого отбирали пробы из цельных суспензий и из надосадков этих суспензий, который получали после центрифугирования образца 8 мин при 1000 g. Суспензии разводили в воде в 1000 раз, а надосадок в 10 раз, после чего в полученных образцах измеряли гемоглобин с помощью спектрофотометра UV-2600 SHIMADZU (Япония) на длине волны 540 нм.

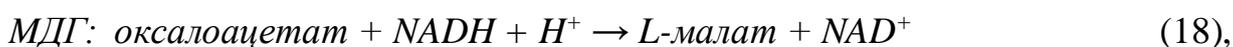
Гемолиз рассчитывали по формуле (15), учитывая разведение:

$$G = [(1 - Ht_{\text{сусп.}}) \times (OD_{\text{надосадка}}/OD_{\text{сусп.}})] \times 100 \quad (15),$$

где G –гемолиз (в %), $Ht_{\text{сусп.}}$ – гематокрит суспензии, $OD_{\text{сусп.}}$ и $OD_{\text{надосадка}}$ - оптическая плотность гемоглобина в суспензии и надосадке, соответственно.

2.15. Измерение аспарагина в плазме

Концентрацию аспарагина в плазме пациентов в процессе клинического исследования измеряли флуориметрически по методике [174], используя три сопряженные реакции (16-18):



где АСП-за - аспарагиназа, ГОТ – глутаматоксалоацетаттрансаминаза, МДГ – малатдегидрогеназа, а АКГ - α-кетоглутарат.

Измерения проводили по начальным скоростям убыли NADH в реакции (18) на планшетном ридере PlateReader AF2200 (Eppendorf, AG, Германия) при длине волны возбуждения 365 нм и длине волны испускания 465 нм.

Приготовление проб для измерения аспарагина. Для проведения анализа кровь пациента забирали в пробирки с ЭДТА объемом 2 мл и центрифугировали 1 мин при 6000 g. Отбирали плазму и смешивали ее в соотношении 1:1 с 1М HClO₄ для осаждения белков. Затем пробы замораживали и хранили до начала измерений при – 80°C. В день измерения пробы размораживали, центрифугировали 10 мин при 600 g, отделяли надосадок и доводили его pH до 7.4, добавляя 2М K₃PO₄ (разбавление в ~1,2 раза). Чтобы отделить осадок образовавшихся солей, пробы еще раз центрифугировали 5 мин при 1000g и отбирали полученный надосадок. Этот надосадок использовали в дальнейшем для измерения аспарагина.

Измерение аспарагина. Исходный метод, описанный в литературе, предполагает измерение концентрации аспарагина в депротеинизированных образцах по оптической плотности в конечной точке после полного превращения аспарагина в малат по реакциям (16-18). Для проведения анализа в пробирки вносят 877 μ л измеряемого образца (нейтрализованного экстракта плазмы), добавляя к нему в конечных концентрациях 40 мМ Трис-HCl буфера (pH 8.0), 5 ЕД/мл ГОТ, 24 ЕД/мл МДГ, 1 мМ α -кетоглутарата, 70 μ М NADH. Эту реакционную смесь инкубируют в течение часа при комнатной температуре, затем раскапывают в лунки 96-луночного планшета по 330 μ л, после чего измеряют уровень флуоресценции в лунках. Предполагается, что за время этой предварительной инкубации весь имеющийся в плазме эндогенный аспартат в результате работы ГОТ и МДГ, внесенных в пробы, будет переработан в малат (по реакциям (17) и (18)). При этом часть NADH превратится в NAD⁺. Далее запускают реакцию измерения аспарагина, добавляя в кювету 10 μ л аспарагиназы до конечной активности 2 МЕ/л. Образцы перемешивают и измеряют конечный уровень флуоресценции в каждой лунке (при $\lambda_{\text{возбуждения}}=365$ нм и $\lambda_{\text{испускания}}=465$ нм), после того, как она перестает изменяться (т.е. когда весь имевшийся в пробе аспарагин будет превращен в малат в реакции (18)).

Этот метод прекрасно работает, например, в пробах при построении калибровочной кривой при внесении в исходные образцы известных концентраций аспарагина. Однако у пациентов, которых лечат аспарагиназой, не удастся получить нулевую скорость фоновой реакции (до добавления аспарагиназы). Т.о. оставшаяся фоновая реакция будет давать вклад в суммарное изменение оптической плотности после добавления аспарагиназы и завышать рассчитанную по оптической плотности конечной точки концентрацию аспарагина. Чтобы учесть этот факт, мы предложили измерять аспарагин кинетически по начальной скорости реакции (18). Учитывая, что K_M аспарагиназы для аспарагина составляет примерно $11.5 \mu\text{M}$ [119], а концентрация аспарагина в плазме в норме $20-30 \mu\text{M}$ (т.е. $2.64-3.96 \mu\text{г/мл}$), можно ожидать, что метод измерения аспарагина по начальным скоростям будет достаточно точно работать в области низких концентраций аспарагина, но может занижать его значения при высоких (больше $2 \times K_M$) концентрациях, где скорость реакции уже не будет зависеть от концентрации аспарагина, т.к. аспарагиназа уже полностью насыщена по этому субстрату. Это соответствует задаче определения длительности истощения аспарагина в плазме в ходе терапии аспарагином, когда надо уловить именно низкие концентрации аспарагина в плазме ($< 1-2 \mu\text{M}$).

Для проведения кинетического анализа содержания аспарагина, в лунки 96-луночного планшета вносили реакционную смесь, приведенную выше. Смесь инкубировали 1 час при комнатной температуре, а потом запускали реакцию, добавляя в пробы аспарагиназу (2 ME/л). Параллельно ставили контрольные (фоновые) пробы, которые содержали все компоненты реакционной смеси, но вместо аспарагиназы в них был добавлен тот же объем буфера. Инкубацию проводили 1 час при комнатной температуре, измеряя флуоресценцию во всех пробах каждые 30 сек. Начальные скорости реакции (18) были определены по зависимостям флуоресценции пробы от времени. Параллельно измеряли начальные скорости соответствующих контрольных реакций.

Расчет производили по начальным скоростям реакций в пробах за вычетом начальных скоростей для соответствующих контрольных кривых, используя

калибровочную прямую (зависимость начальной скорости реакции (интенсивность флуоресценции/время) от концентрации аспарагина в пробе).

2.16. Дизайн клинического исследования эритроцитов с включенной L-аспарагиназой

Пилотные клинические исследования фармакокинетики и безопасности препарата L-аспарагиназы, инкапсулированного в эритроциты, были одобрены Независимым Этическим Комитетом и Экспертным Советом НМИЦ ДГОИ им. Рогачева. (Протокол Независимого Этического Комитета № 4/2019 от 28.05.2019; протокол Экспертного Совета от 17.04.2019).

Цели исследования:

1. Оценка безопасности препарата L-аспарагиназы, инкапсулированного в эритроциты

Параметры оценки:

- Оценка частоты и тяжести нежелательных явлений
- Оценка гиперчувствительности к исследуемому препарату

2. Изучение фармакокинетики и фармакодинамики препарата L-аспарагиназы, инкапсулированного в эритроциты

Параметры оценки:

- измерение активности аспарагиназы в крови и плазме пациента (через 15 мин, 6 ч, 24 ч, 3, 6, 12, 14 и т. д. дней после введения исследуемого препарата с интервалом 2-3 дня, пока сохраняется уровень аспарагина менее 2 μM)
- измерение концентрации аспарагина в плазме крови в те же моменты времени после введения исследуемого препарата.

Первоначально запланированное число пациентов в исследовании составляло 10 человек, однако, по независящим от нас причинам, реально стало возможным исследовать только двоих пациентов. Все параметры клинического исследования приведены в Таблице 1.

Таблица 1 — Параметры клинического исследования эритроцитов с включенной аспарагиназой.

Тип исследования	Пилотное, нерандомизированное
Критерии включения	<ul style="list-style-type: none"> - Возраст от 12 до 18 лет. - Наличие подписанного добровольного информированного согласия. - Пациенты с достоверно установленным вторым и более рецидивом острого лимфобластного лейкоза, которым показана непрограммная терапия с применением L-аспарагиназы.
Критерии исключения	<ul style="list-style-type: none"> - Возраст младше 12 лет. - Гиперчувствительность к препаратам L-аспарагиназы в анамнезе. - Отсутствие добровольного информированного согласия.
Планируемое количество пациентов	10
Исследуемый препарат / исследуемая терапия	L-аспарагиназа, инкапсулированная в эритроциты пациента (АСПЭР), назначаемая в рамках непрограммной терапии второго и более рецидива острого лимфобластного лейкоза
Режим дозирования и способ введения	<p>Внутривенное введение препарата.</p> <p>Предполагается, что режим дозирования может корректироваться в зависимости от результатов мониторинга безопасности препарата, уровня аспарагина и активности аспарагиназы в крови пациента.</p> <p>Предполагаемая доза аспарагиназы в эритроцитах от 100 до 200 МЕ/кг массы тела пациента (в среднем 150 МЕ/кг)</p>
Сроки наблюдения после введения препарата	<p>Период наблюдения в рамках данного исследования составляет 1 месяц после введения препарата.</p> <p>Общая продолжительность наблюдения – 12 месяцев.</p>
Критерии преждевременной остановки исследования	<p>Частота выявления непереносимой токсичности исследуемого препарата более 25% (у 3 пациентов из 10).</p> <p>Частота выявления аллергических реакций на исследуемый препарат более 25% (у 3 пациентов из 10).</p>

Для инкапсуляции аспарагиназы в эритроциты было использовано 120 мл аутологичной цельной крови (пациент 1) или 80 мл донорской эритроцитарной массы, подготовленной в отделении переливания крови НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева (пациентка 2). Из цельной крови были выделены эритроциты

(лейкотромбослой был отделен с использованием стандартных систем для забора крови). В обоих случаях полученные эритроциты перед началом процедуры инкапсуляции отмывали 1 раз в физиологическом растворе центрифугированием при 1000 g в течение 8 мин. Инкапсуляцию аспарагиназы в эритроциты осуществляли методом проточного диализа, как описано в разделе 2.3.1. Полученные фармакоциты с аспарагиназой вводили пациентам внутривенно однократно. В различные моменты времени после окончания инфузии ЭБР с аспарагиназой (15 мин, 6 ч, 24 ч, 3, 6, 12, 14 и т.д. дней после введения исследуемого препарата) у пациентов забирали кровь из вены 2 мл в пробирки с ЭДТА для определения концентрации аспарагина и активности аспарагиназы. Из этой крови немедленно отбирали 20 μ л для определения активности аспарагиназы, сразу разбавляли их водой mQ до активности аспарагиназы примерно 100 МЕ/л и замораживали пробу при -20°C до измерения (см. раздел 2.6.1). Далее кровь обрабатывали для определения аспарагина как описано в разделе 2.15. Измерение активности аспарагиназы в крови и плазме, а также уровня аспарагина в плазме проводили методами, описанными выше в разделах 2.6.1 и 2.15.

2.17. Статистический анализ данных

При сравнении двух групп в случае отсутствия нормального распределения и маленькой выборки применяли непараметрический тест U-критерий Манна - Уитни. При сравнении более двух групп в полученных экспериментальных результатах, был использован однофакторный дисперсионный анализ one-way ANOVA с последующим post hoc анализом (Tukey test) и поправкой Бонферрони. Экспериментальные результаты представлены как средние величины \pm стандартные отклонения (SD), либо стандартные ошибки среднего (SEM). Различия между группами считали достоверными при $p < 0,05$. Статистическая обработка данных и построение графиков были выполнены в программе OriginPro 8.1 (OriginLab Corporation, USA).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Включение L-аспарагиназы в эритроциты различными методами

Как уже было сказано выше, аспарагиназа является одним из ферментных противоопухолевых препаратов, применяемых в курсе комплексной терапии острого лимфобластного лейкоза и некоторых других онкологических заболеваний. Она снижает содержание в кровотоке аминокислоты аспарагина, препятствуя таким образом синтезу белка (в основном в опухолевых клетках, не имеющих своей аспарагинсинтетазы), а, следовательно, и дальнейшей пролиферации этих клеток. Включение данного препарата в эритроциты защищает его от протеаз и антител, находящихся в плазме, что сильно увеличивает срок жизни лекарства в кровотоке, а также снижает токсичность препарата в результате снижения пиковой концентрации свободного фермента в плазме в момент введения. Иммуногенность и аллергенность препарата также снижается за счет того, что он находится внутри эритроцитов [175, 176]. В настоящее время считается [33], что наиболее мягкими и эффективными методами для включения ферментов в эритроциты являются гипоосмотические. Существует несколько вариантов данных методов. Для выбора оптимального варианта включения L-аспарагиназы (аспарагиназы) в эритроциты в работе было проведено сравнительное изучение трех гипоосмотических методов: метода обратимого гипоосмотического лизиса (лизиса), гипоосмотического диализа в диализных мешках (диализа) и проточного гипоосмотического диализа (проточного диализа) (см. главу 2, Материалы и Методы). Каждый метод был использован при различных осмоляльностях гипоосмотического буфера. Выбор оптимального метода осуществляли, анализируя такие характеристики процесса как эффективность инкапсуляции аспарагиназы, процент выживших после процедуры клеток, стандартные эритроцитарные индексы и осмотическая резистентность полученных ЭБР. Полученные показатели были сравнены с аналогичными характеристиками исходных нативных эритроцитов. В результате, в качестве оптимального метода загрузки аспарагиназы в эритроциты был выбран

метод проточного диализа. Для него был разработан стерильный вариант включения фермента в эритроциты, а также были исследованы изменения параметров исходных эритроцитов и полученных данным методом ЭБР в процессе их хранения в течение двух недель при $+4^{\circ}\text{C}$. В качестве параметров, характеризующих клетки в процессе хранения, были использованы скорость гемолиза эритроцитов в суспензии, изменение осмотической резистентности клеток и изменение активности аспарагиназы в ЭБР в ходе хранения. Разработка стерильного метода включения фермента в эритроциты позволила получить препарат аспарагиназы, который может быть использован в клинике, и перейти к пилотным клиническим испытаниям данного препарата (исследованию его безопасности, фармакокинетики в организме, а также способности данного препарата убирать из крови аспарагин).

Зависимость эффективности инкапсуляции и выхода клеток при включении аспарагиназы в эритроциты разными методами от осмоляльности гипоосмотического буфера. На Рисунке 6 представлены результаты измерения эффективности инкапсуляции и выхода загруженных лекарственным препаратом клеток (фармакоцитов) при различных осмоляльностях гипоосмотического буфера, полученные для разных методов включения аспарагиназы в эритроциты.

Для методов лизиса и диализа наблюдалось сильное снижение инкапсуляции при осмоляльности буфера выше 50 мОсм/кг (Рисунок 6А, В). Выход клеток для этих методов, напротив, возрастал с увеличением осмоляльности гипоосмотического буфера и был максимальным при 110 и 80 мОсм/кг (Рисунок 6Б, Г). В результате процедуры проточного диализа наибольший процент включения аспарагиназы наблюдался в диапазоне осмоляльностей 80-100 мОсм/кг, но выше этого диапазона он достоверно снижался (Рисунок 6Д). Выход клеток, как и в других методах, увеличивался с увеличением осмоляльности диализующего раствора (Рисунок 6Е).

Для метода проточного диализа осмоляльность используемого буфера 100 мОсм/кг является пороговой. При ее увеличении инкапсуляция аспарагиназы снижается, при этом, не происходит существенного выигрыша в выходе клеток.

Для методов лизиса и диализа максимальное включение было достигнуто при самой низкой исследованной осмоляльности гипотонического раствора (50 и 20 мОсм/кг, соответственно), но выход клеток при этом был минимален (66.2 и 40.0% для метода лизиса и диализа, соответственно).

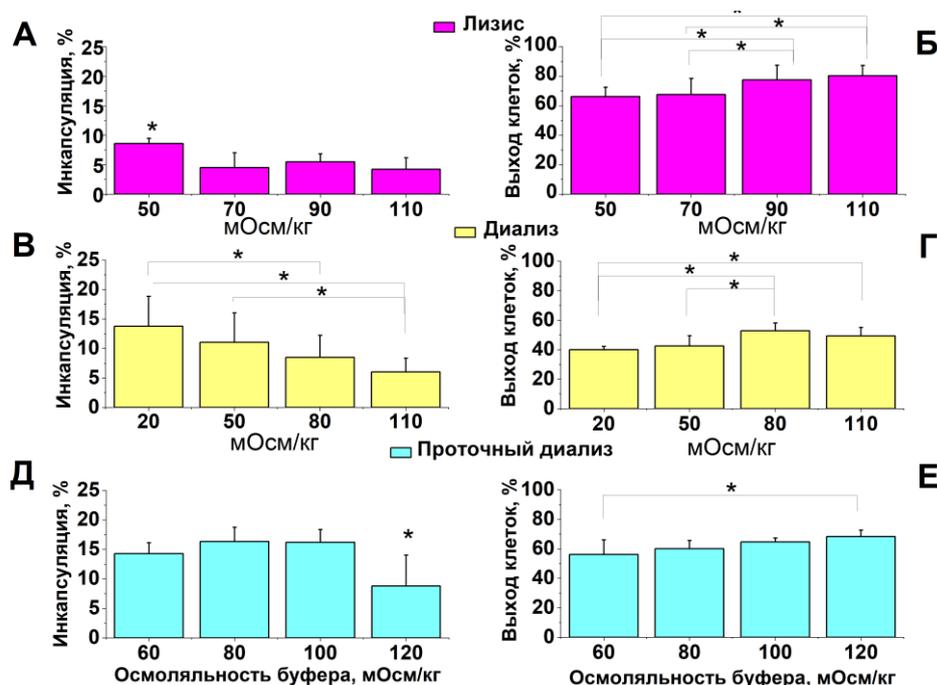


Рисунок 6 — Зависимость эффективности включения в эритроциты (А, В, Д) и выхода клеток (Б, Г, Е) от осмоляльности гипотонического буфера при включении L-аспарагиназы в эритроциты разными методами. (А и Б) — Фармакоциты получены методом обратимого гипотонического лизиса при осмоляльностях 50 мОсм/кг (n=12), 70 мОсм/кг (n=17), 90 мОсм/кг (n=17) и 110 мОсм/кг (n=17); (В и Г) — фармакоциты получены методом гипотонического 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) — фармакоциты получены методом проточного диализа при осмоляльностях буфера 60 мОсм/кг, 80 мОсм/кг, 100 мОсм/кг, 120 мОсм/кг (для каждой осмоляльности n=6). Представлены средние значения ± стандартное отклонение (SD); * - отличие отмеченной группы от всех других достоверно, либо различие между группами, отмеченными скобкой, достоверно (ANOVA, post hoc Tukey test, $p < 0,05$).

Параметр «процент инкапсуляции» представляет собой процент вещества, которое оказалось включено в эритроциты в ходе процедуры, таким образом, он автоматически учитывает не только удельную активность вещества, включенную в эритроциты, но и количество сохранившихся в ходе процедуры клеток. Учитывая это, можно считать, что оптимальной осмотичностью гипотонического буфера для

методов лизиса и диализа, являются 50 мОсм/кг и 20 мОсм/кг, соответственно. Для проточного диализа максимальный процент включения наблюдается при более высокой осмотичности буфера от 80 до 100 мОсм/кг. При данных осмотичностях эффективность включения аспарагиназы в эритроциты для каждого из исследованных методов была максимальной.

Изменение гематологических показателей эритроцитов после включения в них аспарагиназы разными методами. Для выбора оптимального метода включения аспарагиназы в эритроциты важна не только эффективность включения, но также свойства полученных при этом ЭБР. Одними из важнейших показателей при этом являются стандартные эритроцитарные индексы полученных фармакоцитов. Эти индексы, а именно средний объем эритроцита (mean cell volume, MCV), средняя концентрация (mean cell hemoglobin concentration, MCHC) и среднее количество гемоглобина (mean content of hemoglobin, MCH) в эритроцитах для нативных и нагруженных ферментом эритроцитов были измерены для всех исследованных методов включения аспарагиназы при различных осмоляльностях гипоосмотического буфера. Полученные результаты представлены на Рисунок 7. Стандартные эритроцитарные показатели всегда изменяются после воздействия на клетки гипоосмотического стресса [51, 70]. После открытия пор в мембране эритроцита часть внутриклеточного содержимого, в том числе низкомолекулярные метаболиты гликолиза, а также часть гемоглобина (Hb) и гликолитических ферментов, выходит из эритроцита во внешнюю среду. В результате объем клетки и общее содержание в ней Hb несколько уменьшаются. Также имеет место снижение средней концентрации Hb в клетке, но оно менее выражено, так как наряду со снижением содержания Hb уменьшается и объем клетки.

Из ранее опубликованных работ, в которых были исследованы эритроцитарные индексы различных фармакоцитов, известно, что при такой степени изменения эритроцитарных показателей, которая обычно наблюдается для фармакоцитов, полученных методами диализа и проточного диализа, не происходит сильного ухудшения состояния эритроцитов, которое привело бы к

сокращению их жизни в кровотоке [76, 144]. В данной работе впервые было проведено систематическое сравнение свойств фармакоцитов с аспарагиназой, полученных разными методами [177]. Снижение содержания гемоглобина в эритроците на 30% не может существенно повлиять на общую кислородтранспортную функцию эритроцитов, поскольку доля переливаемых пациенту ЭБР не будет превышать 10-20% от всех его эритроцитов, то даже при снижении в этих ЭБР уровня гемоглобина на 50% общее содержание Hb в крови снизится только на 5-10%. Однако известно, что переливание донорской эритроцитарной массы пациентам требуется при гораздо более сильном снижении уровня гемоглобина (со 130 г/л до уровня ниже 70-80 г/л) [178].

Снижение содержания Hb в эритроците не влияет на его выживаемость в кровотоке, но снижение гликолитических ферментов может повлиять на эту выживаемость, так как гликолиз является единственной системой, обеспечивающей эритроцит энергией. Однако было показано, что гипоосмотический диализ не приводит к сильному снижению активности гликолитических ферментов [70].

Для всех исследованных методов включения, MCV фармакоцитов был меньше соответствующего объема нативных клеток максимум на 15-30% (Рисунок 7А, Б, В). Для методов лизиса и проточного диализа максимальное снижение MCV наблюдается при осмоляльностях буфера 50 и 80 мОсм/кг, соответственно, что коррелирует с максимальным процентом включения аспарагиназы в этих методах. Самым незначительным (примерно 15%) было снижение MCV у фармакоцитов, полученных методом диализа, причем оно практически не изменялось с изменением осмотичности гипоосмотического буфера.

MCH после процедуры включения аспарагиназы в эритроциты для всех исследованных методов уменьшалось на 40-70% в зависимости от метода (Рисунок 7Г, Д, Е). Для методов лизиса и диализа MCH снижается с уменьшением осмоляльности гипоосмотического буфера. Для метода проточного диализа уменьшение MCH фармакоцитов не зависело от уменьшения осмотичности буфера в диапазоне 60-120 мОсм/кг. Максимальная потеря гемоглобина наблюдалась в

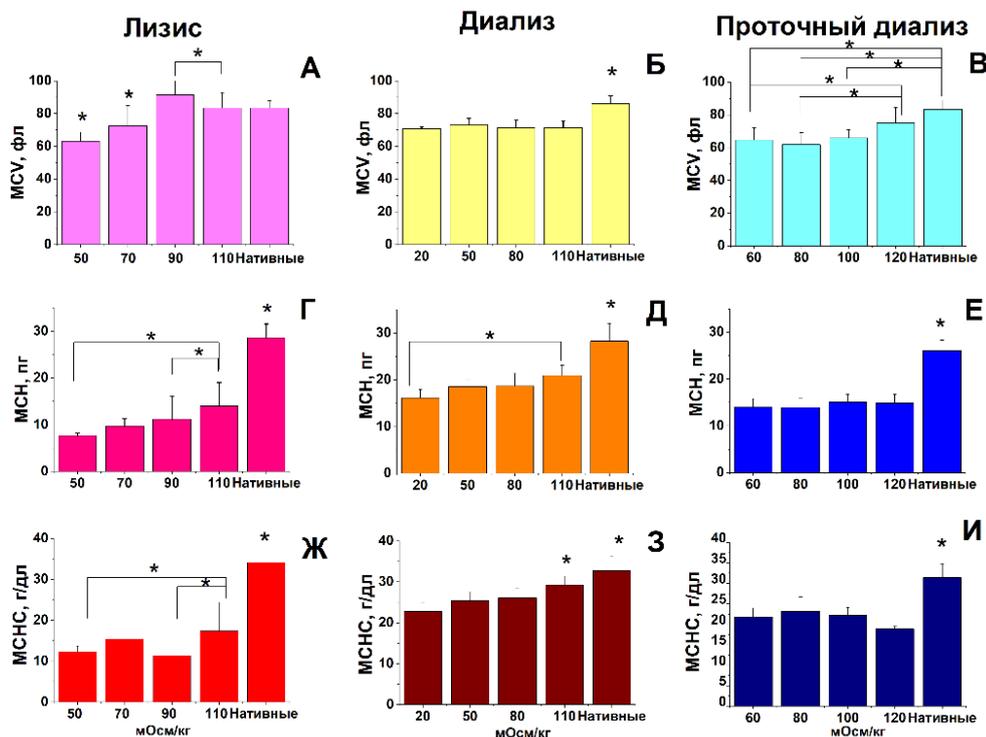


Рисунок 7 — Изменения среднего объема эритроцита (MCV) (А, Б, В), среднего содержания гемоглобина (MCH) (Г, Д, Е) и средней концентрации гемоглобина в клетке (MCHC) (Ж, З, И) для фармакоцитов в зависимости от осмоляльности гипоосмотического буфера, использованного при включении аспарагиназы в эритроциты методами обратимого гипоосмотического лизиса, гипоосмотического диализа и проточного диализа, по сравнению с аналогичными показателями исходных (нативных) эритроцитов (А, Г, Ж) – Фармакоциты после процедуры обратимого гипоосмотического лизиса при осмоляльностях 50 мОсм/кг (n=12), 70 мОсм/кг (n=19), 90 мОсм/кг (n=12), 110 мОсм/кг (n=25) и исходные эритроциты (n=19); (Б, Д, З) – фармакоциты после процедуры гипоосмотического диализа в мешках при осмоляльностях 20 мОсм/кг (n=8), 50 мОсм/кг (n=9), 80 мОсм/кг (n=12), 110 мОсм/кг (n=14) и исходные эритроциты (n=18); (В, Е, И) – фармакоциты после процедуры проточного диализа при осмоляльностях 60 мОсм/кг (n=7), 80 мОсм/кг (n=10), 100 мОсм/кг (n=5), 120 мОсм/кг (n=6) и исходные эритроциты (n=22). Представлены средние значения ± стандартные отклонения (SD). * - Различия между данной и всеми остальными группами или между двумя группами, отмеченными скобкой, достоверны (ANOVA, post hoc Tukey test, $p < 0,05$).

методе обратимого лизиса и составляла 60-70% от исходного значения в нативных эритроцитах. (Рисунок 7Г).

МCHC фармакоцитов после гипоосмотического воздействия также падала для всех трех методов. Наибольшее падение МCHC наблюдалось для метода обратимого лизиса (50-60%) в диапазоне осмоляльностей 50-110 мОсм/кг (Рисунок 7Ж). После диализа эта концентрация падала не больше, чем на 30% при самой низкой исследованной осмоляльности (Рисунок 7З), а после проточного диализа

падение концентрации гемоглобина в клетках составляло примерно 30-40% (Рисунок 7И).

Таким образом, более всего по всем гематологическим показателям от нативных эритроцитов отличаются эритроциты, загруженные аспарагиназой с помощью метода обратимого гипоосмотического лизиса. Особенно сильно относительно исходных эритроцитов снижается величина МСН (на 60-70%). Меньшее снижение наблюдается для параметров MCV и MCHC.

Изменение осмотической резистентности эритроцитов при включении в них аспарагиназы различными методами. Осмотическая резистентность эритроцитов изменяется после воздействия на них осмотической нагрузки. Кривые осмотической резистентности загруженных аспарагиназой фармакоцитов, полученных всеми исследованными методами при одинаковой осмоляльности гипоосмотического буфера (90-110 мОсм/кг), имеют общую тенденцию сдвига в сторону большей резистентности, по сравнению с исходными эритроцитами (50% фармакоцитов лизирует при более низкой концентрации солей в растворе, чем нативные эритроциты) (Рисунок 8). Наиболее выражен сдвиг кривой в сторону увеличения осмотической резистентности относительно нативных эритроцитов у фармакоцитов после проточного диализа (параметр H_{50} , представляющий собой осмотичность среды, при которой лизирует 50% клеток, снижен у них в 1,4 раза). Меньший сдвиг по показателю H_{50} в сторону резистентности наблюдается у фармакоцитов, полученных методом обратимого гипотонического лизиса, а ближе всех к нативным эритроцитам оставались фармакоциты, полученные методом диализа. По-видимому, это может быть частично связано с тем, что эритроцит, потеряв какое-то количество гемоглобина, обладает более низким внутренним онкотическим давлением, и ему легче противостоять снижению осмоляльности внешней среды. Как видно из Рисунка 8, для фармакоцитов, полученных при осмоляльности гипотонического буфера 100-110 мОсм/кг (для которых приведены кривые осмотической резистентности на Рисунке 8). Наименьшая потеря гемоглобина (по уровню МСНС) наблюдалась в методе диализа, что соотносилось с бóльшим показателем H_{50} .

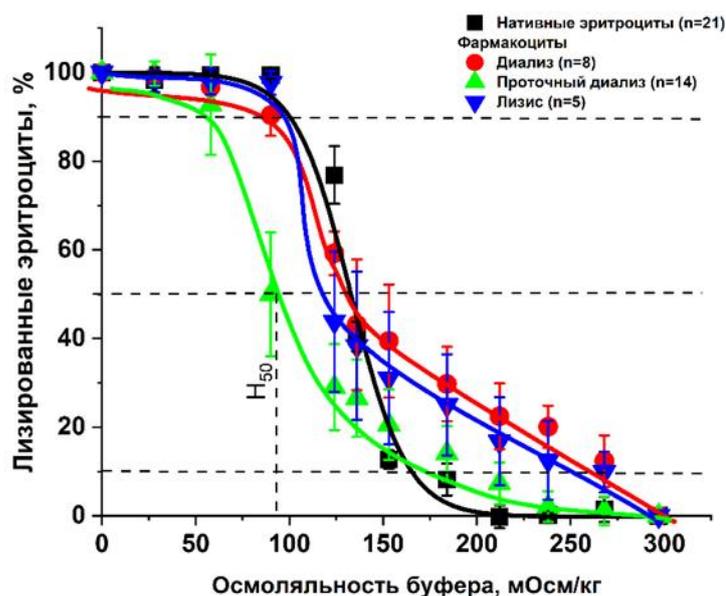


Рисунок 8 — Кривые осмотической резистентности исходных эритроцитов и фармакоцитов, полученных методами обратимого гипоосмотического лизиса, диализа и проточного диализа при осмоляльности гипотонического буфера 100-110 мОсм/кг. Представлены средние значения \pm стандартное отклонение. Горизонтальные пунктирные линии соответствуют уровню лизиса клеток 10, 50 (параметр H_{50}) и 90%.

После гипоосмотического воздействия на клетки меняется также форма кривой осмотической резистентности — она становится более полой. Это значит, что эритроциты становятся более разнородными по своей способности противостоять гипоосмотической среде. Параметр W , равный разности осмотических давлений при которых лизировано 10 и 90% клеток, у фармакоцитов выше, чем у нативных эритроцитов.

Кроме того, если в области средних осмоляльностей (75-150 мОсм/кг) осмотическая устойчивость фармакоцитов существенно возрастает по сравнению с исходными эритроцитами, то в области физиологических осмоляльностей все кривые оказываются достаточно близки к кривой нормальных исходных эритроцитов. При осмоляльности среды 250-300 мОсм/кг фармакоциты, полученные методом проточного диализа наиболее близки к нативным эритроцитам, и в этом случае процент лизированных клеток близок к 0, в то время как для фармакоцитов, полученных двумя другими методами, при

физиологических осмоляльностях среды, наблюдается больший процент лизированных клеток (около 10%).

Сравнивая осмотическую резистентность фармакоцитов, можно отметить, что методом диализа удастся получить фармакоциты, наиболее близкие по показателю N_{50} к нативным клеткам, но, в то же время, с самым широким распределением популяции клеток по осмотической резистентности (W).

После процедуры проточного диализа показатель N_{50} сдвигается в сторону большей резистентности, однако при этом сохраняется некоторая однородность популяции (ширина распределения W для этих фармакоцитов минимальна среди всех исследованных методов).

В Таблице 2 суммированы параметры, характеризующие максимальную эффективность включения и свойства фармакоцитов, полученных тремя исследованными методами включения L-аспарагиназы в эритроциты в условиях, соответствующих максимальной эффективности включения фермента для каждого метода. Выход инкапсуляции оказался самым высоким для метода проточного диализа. Для этого метода также лучше всего сохранилась ширина распределения клеток по осмотической резистентности, хотя сама кривая была сдвинута в сторону увеличения этой резистентности сильнее, чем для других методов инкапсуляции. Таким образом, для эффективного включения аспарагиназы каждый из методов имеет свой оптимум осмоляльности гипотонического буфера (Таблица 2, Рисунок б). По совокупности показателей можно сделать вывод о том, что только метод проточного диализа даёт эффективное включение фермента в эритроциты (эффективность в 1,2 раза выше, чем для метода диализа, и почти в 2 раза выше, чем для метода лизиса) с сохранением высокого выхода клеток и гематологических показателей близких к исходным нативным эритроцитам (Таблица 2).

По качеству эритроцитов, получаемых после процедуры, ближе всего к норме оказались фармакоциты, полученные методом гипоосмотического диализа и проточного диализа. При физиологических осмоляльностях среды фармакоциты,

Таблица 2 — Сравнение выхода клеток, процента инкапсуляции аспарагиназы и показателей качества ЭБР, полученных с помощью процедур обратимого гипоосмотического лизиса, гипоосмотического диализа и проточного гипоосмотического диализа, проведенных при осмоляльностях, соответствующих максимальной эффективности инкапсуляции фермента для каждого из методов. ¹⁾

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)
Осмотическая резистентность (H ₅₀), 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)
Осмотическая резистентность (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 ± стандартное отклонение; 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); H₅₀ – осмоляльность, при которой 50% клеток лизировано; W – ширина распределения клеток по осмотической резистентности равная разности осмоляльностей, при которых лизировано 10 и 90% клеток.

полученные методом проточного диализа наиболее близки к нативным эритроцитам по показателю осмотической резистентности, что имеет важное значение при переливании таких фармакоцитов пациентам. Незначительное снижение MCV, MCH и MCHC не ухудшают существенно функцию фармакоцитов, как биореакторов с L-аспарагиназой, т.к. основной функцией таких фармакоцитов является не перенос кислорода, а терапевтический эффект. Также стоит отметить, что метод проточного диализа наиболее привлекателен для применения в клинике для получения фармакоцитов, так как этот метод легко масштабируется, что позволяет стерильно работать с большими объемами крови пациентов (от 50 до 450 мл), а также имеет перспективу полной автоматизации [179].

Метод обратимого гипоосмотического лизиса прост, но является самым жестким и дает низкие выходы включения фермента. Метод диализа является, по большей части, лабораторной методикой, требующей сложных манипуляций, что может стать затруднением при переходе к постоянному производству таких эритроцитов в клинике медицинским персоналом.

3.2. Определение оптимальных условий включения аспарагиназы в эритроциты методом проточного гипоосмотического диализа

С целью получения высокой эффективности инкапсуляции аспарагиназы в эритроциты методом проточного диализа были определены оптимальные условия включения, а именно скорости прохождения суспензии эритроцитов и растворов в контурах диализатора во время процедуры диализа, необходимое трансмембранное давление, создаваемое в диализаторе, гематокрит исходной суспензии эритроцитов (подробнее о проведении процедуры см. главу Материалы и Методы).

Зависимость эффективности включения аспарагиназы в эритроциты от скоростей протекания суспензии и растворов по контурам диализатора. Увеличение скорости протекания суспензии эритроцитов по внутреннему контуру диализатора от 1 до 3 мл/мин не влияет на процент инкапсуляции фермента, однако выход клеток выше при скорости 3 мл/мл (Рисунок 9А). Это, по-видимому,

объясняется тем, что при большей скорости протекания суспензии обеспечивается менее длительный контакт эритроцитов с гипотонической средой, что сохраняет больший процент клеток. С другой стороны, при более низкой скорости протекания суспензии в клетки успевает проникнуть больше фермента, в результате чего общая эффективность процедуры инкапсуляции при исследованных скоростях оказывается примерно одинаковой.

Таким образом, при низкой скорости протекания суспензии в клетку включается больше фермента, но выживает меньше клеток, а при большей скорости, наоборот. Мы предполагаем, что предпочтительнее получать больше клеток с меньшим количеством фермента, чем небольшое количество клеток с большим количеством фермента, так как в кровотоке лимитирующим фактором работы биореакторов с аспарагиназой является скорость проникновения аспарагина в эритроцит. Соответственно, чем больше будет клеток с ферментом, тем быстрее весь аспарагин окажется внутри этих клеток. При увеличении скорости протекания гипотонического буфера по внешнему контуру диализатора с 10 до 30 мл/мин эффективность инкапсуляции возрастает и при скорости 20 мл/мин достигает своего максимума (Рисунок 9Б). Высокая скорость протекания гипотонического буфера обеспечивает быстрое снижение осмотичности в диализаторе и, как следствие, более длительный контакт эритроцитов с гипотонической средой, что приводит к увеличению эффективности включения.

Выбор оптимального трансмембранного давления для проведения стадии лизиса при включении фермента в эритроциты. В ходе проведения экспериментов по включению аспарагиназы в эритроциты было замечено, что при использовании эритроцитов разных доноров в диализаторе создается разное трансмембранное давление (Рисунок 10А) и эффективность включения оказывается разной (Рисунок 10Б). На Рисунке 11 представлена общая зависимость эффективности включения аспарагиназы от трансмембранного давления, создаваемого в диализаторе во время процедуры лизиса. Как видно из графика максимальная эффективность инкапсуляции достигается в диапазоне создаваемого давления 160-180 мм. рт. ст., а дальнейшее увеличение трансмембранного давления

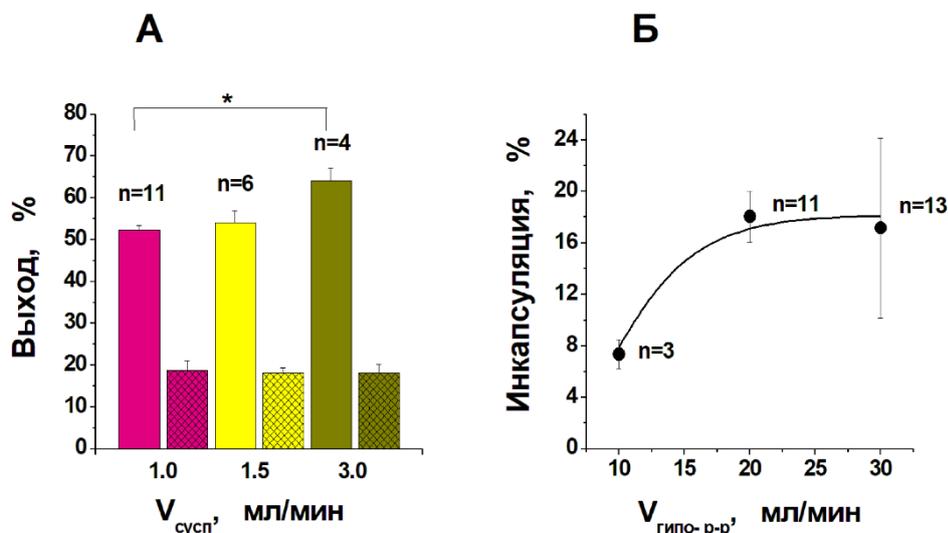


Рисунок 9 — А - зависимость эффективности включения L-аспарагиназы в эритроциты (заштрихованные столбцы) и выхода клеток (незаштрихованные столбцы) от скорости прохождения суспензии эритроцитов во время диализа по внутреннему контуру диализатора ($V_{\text{суп}}$); Б - зависимость эффективности включения L-аспарагиназы в эритроциты от скорости прохождения гипоосмотического раствора по внешнему контуру диализатора во время диализа ($V_{\text{гипо-р-р}}$). Представлены средние значения \pm стандартное отклонение. * - Различия между указанными группами достоверны (ANOVA, $p < 0,05$).

приводит, наоборот, к снижению эффективности включения. Это, по-видимому, связано с тем, что слишком высокое давление приводит к большей потере клеток, а при слишком низком давлении клетки могут быть недостаточно сферулированы, что, в свою очередь, приводит к низкому проценту инкапсуляции фермента.

Таким образом, чтобы достичь хорошей воспроизводимости эффективности включения, целесообразно создавать и поддерживать во время диализа оптимальное давление. В качестве такого давления было выбрано давление 160-180 мм. рт. ст. Создавать определенное трансмембранное давление можно, изменяя скорость прокачивания суспензии клеток по внутреннему контуру диализатора.

Зависимость эффективности включения аспарагиназы в эритроциты от гематокрита исходной суспензии и от активности в ней аспарагиназы.

Зависимость эффективности включения аспарагиназы в эритроциты от гематокрита исходной суспензии клеток была изучена в области гематокритов от 40 до 60%. При добавлении одного и того же количества фермента к исходным суспензиям эритроцитов с увеличивающимся гематокритом, эффективность

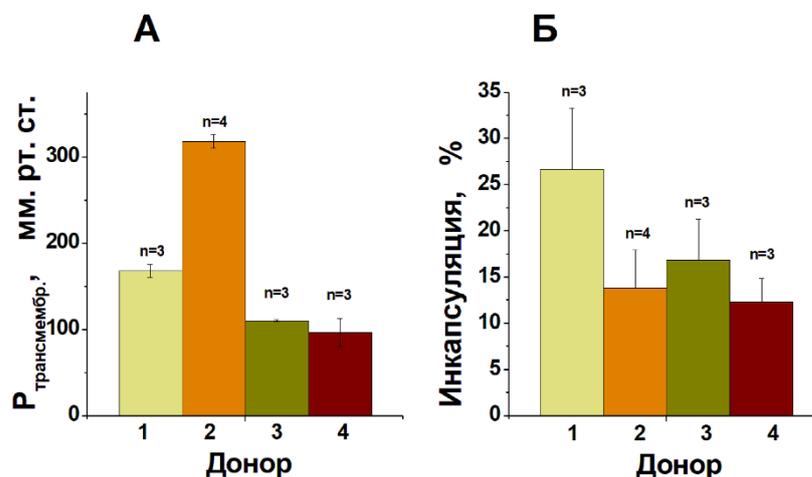


Рисунок 10 — Типичные примеры создаваемого в диализаторе во время стадии диализа трансмембранного давления ($P_{\text{трансмембр.}}$) (А) и соответствующая эффективность включения аспарагиназы в эритроциты (Б), для эритроцитов от 4-х разных доноров. Цифрами 1-4 отмечены номера доноров эритроцитов. Все эксперименты проведены при одинаковых условиях (осмотичность гипотонического буфера 90 мОсм/кг, скорость прохождения суспензии во внутреннем контуре диализатора 3 мл/мин, скорость прохождения гипоосмотического буфера во внешнем контуре диализатора 30 мл/мин). На рисунке представлены ошибки воспроизведения результата ($\pm SD$) при повторных измерениях (n – число повторов).

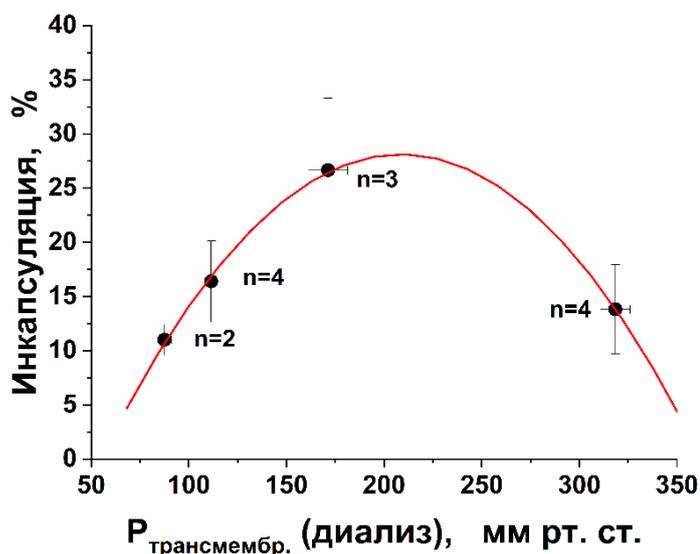


Рисунок 11 — Зависимость эффективности включения L-аспарагиназы в эритроциты от возникающего во время диализа трансмембранного давления (для всех точек осмотичность буфера составляла 90 мОсм/кг, скорость прохождения суспензии во внутреннем контуре была равна 3 мл/мин, а скорость прохождения гипоосмотического буфера во внешнем контуре диализатора была 30 мл/мин). Представлены усредненные величины и стандартные отклонения для процента инкапсуляции фермента и трансмембранного давления в диализаторе. Количество экспериментов (n) усредненных в каждой точке приведено на графике.

включения имела тенденцию к повышению, однако эта зависимость не была достоверной (Рисунок 12А). Максимальная возможная активность фермента в эритроцитах после полного уравнивания активности в клетках и окружающей среде равна активности фермента в исходной суспензии эритроцитов (эта активность будет равна суммарной активности добавленного фермента, разделенной на общий объем суспензии клеток). Таким образом она будет одинакова для всех исследованных суспензий с разным гематокритом, поскольку величина добавленной в суспензию активности аспарагиназы везде одинакова и суммарный объем суспензии клеток тоже одинаковый). Однако доля фермента, которая окажется в клетках будет тем выше, чем больше доля клеток в суспензии (т.е., чем выше ее гематокрит). Таким образом, для рационального использования фермента, целесообразно создавать высокий гематокрит в исходной суспензии,

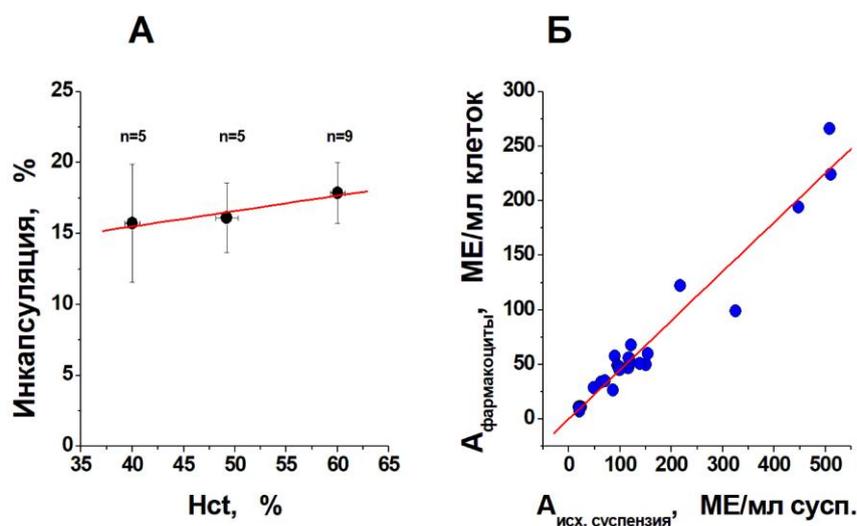


Рисунок 12 — Зависимость эффективности включения аспарагиназы от гематокрита исходной суспензии (А) и зависимость удельной активности аспарагиназы в фармакоцитах ($A_{\text{фармакоциты}}$) от активности аспарагиназы в исходной суспензии ($A_{\text{исх. суспензия}}$) (Б). Различия между тремя группами с разным гематокритом на панели А недостоверны (ANOVA, $p > 0,05$, Bonferroni test, величины n указаны на рисунке)

оптимально 60-70%. Работа с еще более высоким гематокритом ограничена возникновением слишком высокого трансмембранного давления в диализаторе во

время процедуры гипоосмотического диализа, что приводит к лизису большого количества эритроцитов.

Удельная активность аспарагиназы, которая включается в фармакоциты, была прямо пропорциональна активности аспарагиназы в исходной суспензии эритроцитов. Эта зависимость представлена на Рисунке 12Б. Существование такой зависимости позволяет заранее рассчитать необходимое для процедуры включения количество препарата и получать желаемые контролируемые дозы фермента в эритроцитах, что играет важную роль при использовании фармакоцитов в клинике. Все выбранные оптимальные величины отдельных параметров процесса были далее применены при создании автоматической установки для получения фармакоцитов (см. раздел 3.6.).

3.3. Получение эритроцитов с аспарагиназой методом проточного диализа в стерильных условиях

Для получения фармакоцитов, пригодных для клинического использования, необходимо было разработать метод проведения всей процедуры в стерильных условиях. Такой метод для получения фармакоцитов с помощью гипоосмотического проточного диализа в стерильных условиях был разработан (см. Материалы и Методы).

Эффективность включения аспарагиназы и стерильность полученных фармакоцитов. Возможность проведения процедуры проточного диализа в стерильных условиях была проверена в 24 экспериментах (в 5 из них процедура была проведена полностью, но без включения фермента). Полученную после каждой процедуры суспензию фармакоцитов тестировали на бактериологическую чистоту стандартным методом в Бактериологической лаборатории НМИЦ ДГОИ им. Д. Рогачева (см. Материалы и Методы). Во всех 24 опытах полученная суспензия фармакоцитов была стерильна. Выход клеток и процент инкапсуляции фермента при стерильном проведении процедуры были близки к полученным в экспериментах, проведенных нестерильно (Таблица 3 и Таблица 2).

Таблица 3 — Результаты проведения проточного диализа эритроцитов стерильным методом

С включением L-аспарагиназы			
Количество экспериментов	Выход клеток, % среднее±SD	Инкапсуляция, % среднее±SD	Стерильность есть/нет
n=19	62±6	17±2	19/0
Без L-аспарагиназы			
n=5	67±7	–	5/0

Осмотическая резистентность фармакоцитов с аспарагиназой, полученных методом проточного гипоосмотического диализа в стерильных условиях. Кривая осмотической резистентности фармакоцитов с аспарагиназой, полученных методом проточного диализа в стерильных условиях (Рисунок 13) аналогична кривым осмотической резистентности, полученным ранее для метода проточного диализа в нестерильных условиях. Важно, что при физиологической осмоляльности среды фармакоциты практически не отличаются от нативных эритроцитов, однако при более низкой осмоляльности, фармакоциты оказываются даже более устойчивыми к понижению концентрации соли в среде, чем нативные клетки. Так, 50% лизированных клеток для нативных эритроцитов наблюдается уже при величине осмоляльности 136 мОсм/кг, тогда как 50 % лизированных фармакоцитов наблюдается только при достижении осмоляльности среды 100 мОсм/кг, в то время, когда уже практически все нативные эритроциты лизированы. Это может быть связано с тем, что фармакоциты содержат меньшее количество гемоглобина, и, как следствие, обладают более низким внутренним онкотическим давлением, в результате чего для лизиса таких клеток требуется более низкая осмоляльность среды.

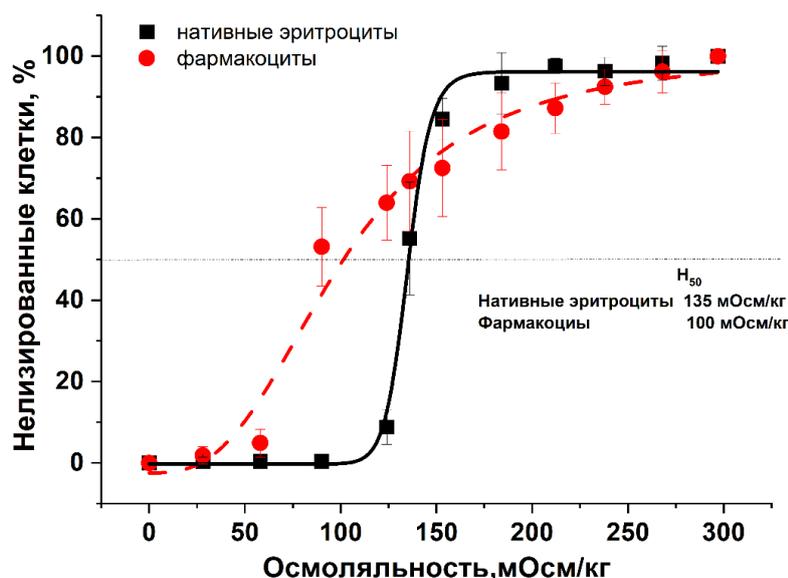


Рисунок 13 — Сравнение осмотической резистентности нативных эритроцитов (n=14) и фармакоцитов с включенной аспарагиназой, полученных методом проточного гипоосмотического диализа в стерильных условиях (n=14). Представлены средние величины \pm SD

Изменение качества ЭБР с аспарагиназой в процессе хранения.

Эритроциты-биореакторы, полученные методом гипоосмотического диализа в стерильных условиях, являются тем продуктом, который предполагается использовать в клинике. Поэтому были исследованы не только свойства этих ЭБР сразу после получения, но и то, как эти свойства изменяются в процессе хранения суспензии полученных ЭБР при $+4^{\circ}\text{C}$ в течение двух недель.

Полученные показатели (эритроцитарные индексы и осмотическую резистентность) фармакоцитов с L-аспарагиназой, сравнили с аналогичными показателями исходных эритроцитов. Кроме того, было измерено, как в процессе хранения изменяется активность включенного в ЭБР фермента и исследована

скорость гемолиза клеток при хранении суспензии этих фармакоцитов. Результаты представлены на Рисунке 14.

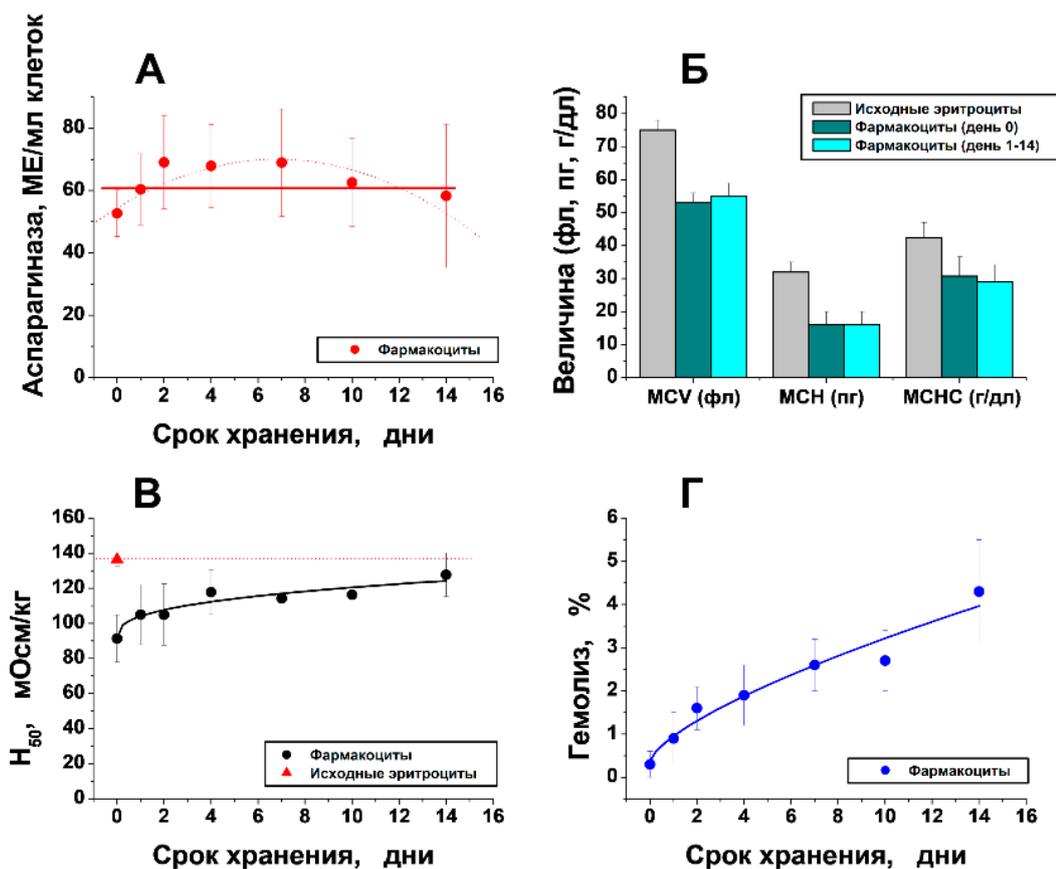


Рисунок 14 — Изменение активности аспарагиназы (А), гематологических индексов (Б), параметра H_{50} (В) и гемолиза эритроцитов (Г) в ходе хранения суспензии фармакоцитов в течение 14 дней. Представлены средние значения \pm стандартное отклонение; величины $n=9$ для панелей А, Б, В и $n=6$ для панели Г

Активность аспарагиназы в ЭБР была измерена сразу после окончания процедуры включения, а также в ходе последующего хранения ЭБР в специальном растворе при 4°C (см. раздел Материалы и Методы). Полученные результаты показали, что активность аспарагиназы внутри клеток практически не падает в течение 14 дней хранения (Рисунок 14А).

Величины стандартных эритроцитарных индексов при проведении процедуры включения ферментов в эритроцит с помощью гипосмотического

стресса, как было показано выше для разных методов, изменяются, так как после образования в мембране эритроцита пор, часть внутриклеточного содержимого может выходить во внешнюю среду. На Рисунке 14Б видно, что сразу после получения фармакоцитов МСV, МСНС и МСН в ЭБР ниже, чем в исходных эритроцитах примерно на 30%, однако дальнейшего падения этих показателей в процессе хранения суспензии ЭБР при 4°С практически не происходит. Величина осмоляльности, при которой лизирует 50% фармакоцитов (H_{50}) в ходе хранения вырастает с 90 мОсм/кг до 130 мОсм/кг (Рисунок 14В). Точная причина этого не известна, но можно предположить, что в ходе хранения в растворе, который содержит аденин и глюкозу, метаболизм эритроцитов постепенно восстанавливается, концентрации метаболитов гликолиза, часть которых была потеряна в ходе процедуры, постепенно восстанавливаются, что должно приводить к небольшому увеличению онкотического давления внутри эритроцитов. Клетки по этому показателю становятся ближе к нормальным и осмоляльность, при которой половина из них лизирует, немного повышается. Можно предположить также, что наиболее поврежденная в процессе инкапсуляции фермента часть клеток достаточно быстро лизирует. Это, по-видимому, клетки которые потеряли больше гемоглобина, т.к. открытие пор в их мембране было в силу различных причин более эффективным. При этом оставшиеся клетки также оказываются в среднем более близки к исходным эритроцитам.

Одним из важнейших показателей клеточной суспензии, предназначенной для переливания в организм, 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 о подготовке компонентов крови к переливанию [180], этот уровень не должен превышать 0,8% (при переливании одной дозы (250±50 мл) эритроцитарной массы с гематокритом 60-70%).

Чтобы исследовать, насколько процедура включения ферментов в эритроциты может снизить устойчивость клеток и повысить уровень их гемолиза в

процессе хранения, были проведены измерения свободного гемоглобина в суспензиях фармакоцитов с аспарагиназой в ходе их хранения. Измерения проводили в день получения эритроцитов (день 0), а также на 1, 2, 4, 7, 10 и 14 дни хранения. Было показано, что уровень гемолиза 0.8% достигается в суспензии фармакоцитов в течение первых суток хранения (Рисунок 14Г). Это означает, что полученные фармакоциты с ферментом не подлежат длительному хранению и, по возможности, должны быть перелиты пациенту именно в течение первых суток. Однако в случае необходимости переливания суспензии фармакоцитов, которая хранилась в течение более длительного времени, эту проблему можно решить дополнительной отмывкой фармакоцитов перед переливанием пациенту.

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

3.4. Исследование фармакокинетики и фармакодинамики аспарагиназы у пациентов с ОЛЛ 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 МЕ/м² 1 раз в неделю в течение 6 недель каждого из трех курсов консолидации. Чтобы сравнить введение стандартного раствора аспарагиназы и разработанного препарата аспарагиназы в эритроцитах, были изучены фармакокинетические и фармакодинамические показатели каждого из этих препаратов. Во всех исследованиях *in vivo* был использован препарат аспарагиназы Kidrolase (EUSA Pharma SAS, Франция). Раствор аспарагиназы был введен пациентам с ОЛЛ, согласно стандартному протоколу, на протяжении 6 недель. Были измерены активности аспарагиназы в крови, а также уровень

аспарагина в плазме в различное время после введения препарата. Полученные результаты представлены на Рисунке 15. Так как основной механизм действия

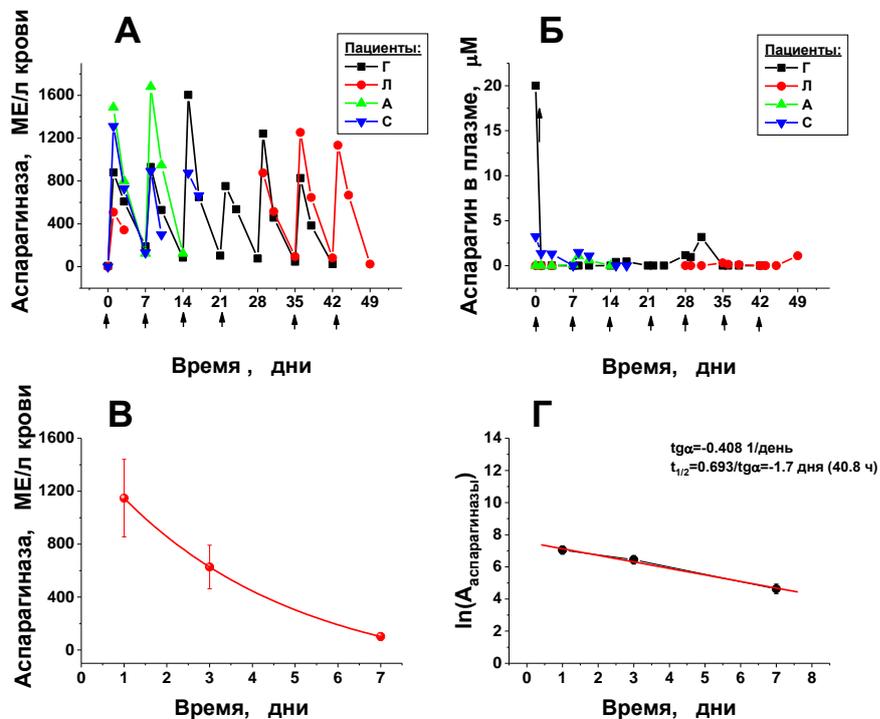


Рисунок 15 — Исследование фармакокинетики и фармакодинамики стандартного раствора аспарагиназы (Kidrolase). **А** - Фармакокинетика аспарагиназы в крови каждого из 4 исследованных пациентов, и **Б** - уровень аспарагина в плазме тех же пациентов при еженедельном однократном внутримышечном введении фермента в дозе 10000 МЕ/м². Стрелками обозначены дни введения аспарагиназы. **В** – Усредненная фармакокинетическая кривая снижения активности аспарагиназы в крови пациентов после введения препарата (n=4). **Г** - расчет времени полувыведения препарата аспарагиназы в крови при внутримышечном введении раствора аспарагиназы в дозе 10000 МЕ/м².

аспарагиназы связан с тем, что она снижает уровень аспарагина в плазме пациентов, что приводит к невозможности синтеза белков и, соответственно, прекращению деления опухолевых клеток, фармакодинамику препарата можно оценить по тому, какое снижение уровня аспарагина в плазме пациентов он вызывает. В ряде работ полагают, что для эффективного терапевтического воздействия аспарагиназа должна снизить этот уровень до $<1 \mu\text{M}$ [181], а в некоторых работах этот уровень считают даже более низким ($<0.1\text{-}0.2 \mu\text{M}$) [182].

При стандартном введении пациентам аспарагиназы в растворе (10000 МЕ/м²) ее активность быстро падала практически до нуля в течение первых 7 суток (Рисунок 15), поэтому для поддержания терапевтической концентрации (100 МЕ/л крови) [181] аспарагиназу вводили каждые 7 дней.

Измеренное время полувыведения активности аспарагиназы из крови при внутримышечном введении раствора свободного фермента составили 40.8 ч (Рисунок 15Г).

3.5. Клинические испытания фармакоцитов с аспарагиназой, полученных методом проточного диализа

Первой задачей клинических испытаний новых ЭБР с аспарагиназой было испытание безопасности этих ЭБР. Параллельно была исследована фармакокинетика такой аспарагиназы в крови и плазме пациентов, а также уровень аспарагина в плазме. Эти показатели сравнили с фармакокинетикой и фармакодинамикой препарата аспарагиназы, который, согласно существующему протоколу, вводили пациентам с ОЛЛ в виде раствора внутримышечно в дозе 10000 МЕ/м² (1 раз в неделю в течении до 6 недель).

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. Ниже приведены подробные данные о каждом из пациентов.

Пациент 1: пациент со вторым рецидивом ОЛЛ, возраст 12 лет, вес 30 кг, объем крови 1.8 л, суммарная доза препарата при введении 2700 МЕ/30 кг (т.е. 90 МЕ/кг), через 24 ч после введения доза препарата в организме составляла уже 24 МЕ/кг. ЭБР были приготовлены из собственных клеток пациента.

Пациентка 2: пациентка со вторым рецидивом ОЛЛ, возраст 12 лет, вес 39.6 кг, объем крови 2.4 л, суммарная доза препарата при введении 7490 МЕ/39.6 кг (т.е.

189 МЕ/кг), через 24 часа доза аспарагиназы составляла 62 МЕ/кг. ЭБР были приготовлены из донорских эритроцитов.

Исследование безопасности нового препарата L-аспарагиназы в эритроцитах. Самой первой задачей пилотных клинических испытаний было определение безопасности нового препарата. 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 после введения фармакоцитов 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 резкое падение прекращалось и скорость дальнейшего экспоненциального снижения активности аспарагиназы в крови становилась ниже (см. Рисунок 16А и 17А). Это полностью согласуется с данными других авторов [76].

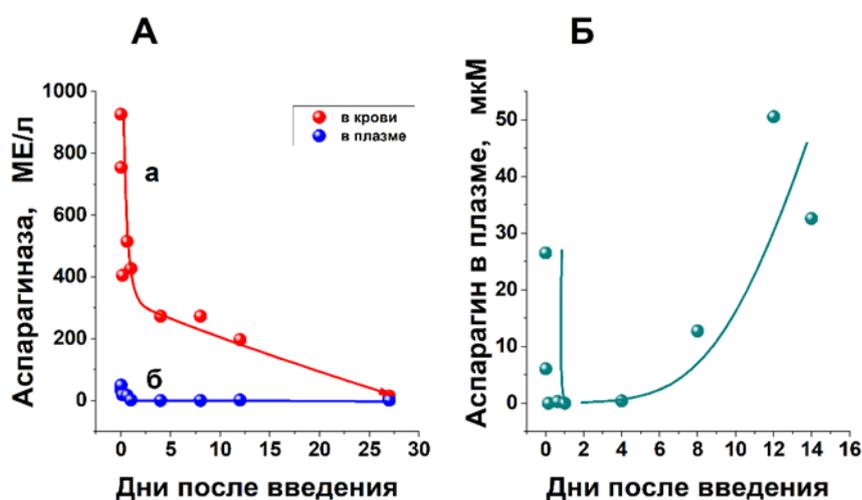


Рисунок 16 — Фармакокинетика аспарагиназы (А) в крови (а) и плазме (б) и уровень аспарагина в плазме (Б) для пациента 1.

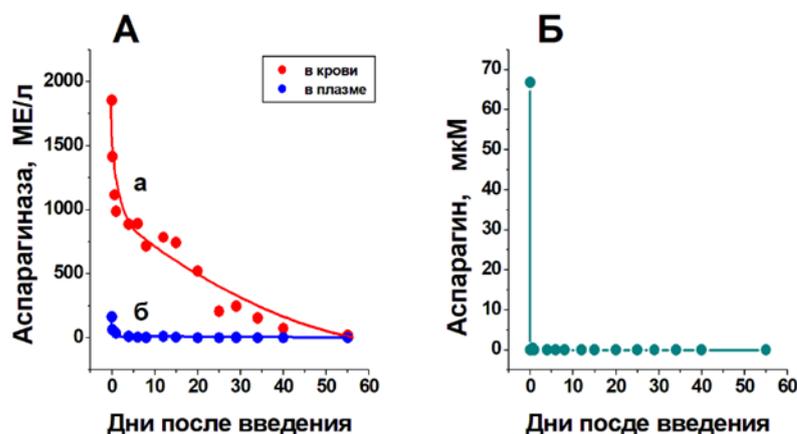


Рисунок 17 — Фармакокинетика аспарагиназы (А) в крови (а) и плазме (б) и уровень аспарагина в плазме (Б) для пациентки 2.

За сутки активность упала до 24 ЕД/кг и до 61 ЕД/кг у первого и второго пациента, соответственно, после чего начала снижаться медленно. Это 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.

Далее для медленной фазы падения активности было рассчитано время полувыведения из крови активности аспарагиназы, введенной пациентам в ЭБР (Рисунок 18). Расчет сделан на основании того, что падение активности происходит экспоненциально. Таким образом, активность аспарагиназы снижается по уравнению реакции первого порядка:

$$A = C \times e^{-kt} \quad (19),$$

где A – активность аспарагиназы в крови, t – время, а C и k – константы.

После логарифмирования имеем:

$$\ln A = \ln C - k \times t \quad (20).$$

Таким образом, k представляет собой тангенс угла наклона зависимости $\ln A$ от времени, а C – активность аспарагиназы в момент времени 0.

При уменьшении активности в 2 раза имеем:

$$\ln(A/2) = \ln C - k \times t_{1/2} \quad (21).$$

Вычитая уравнение (21) из уравнения (20) получаем:

$$\ln A - \ln A + \ln 2 = k \times t_{1/2} \quad (22),$$

или:

$$t_{1/2} = \ln 2 / k = 0.693 / k \quad (23).$$

Время полувыведения для второй (медленной) фазы фармакокинетической кривой ($t_{1/2}$) согласно этому расчету составляло 5.4 и 9.7 дней для пациентов 1 и 2, соответственно (Рисунок 18). Введенная в эритроциты аспарагиназа снижает уровень аспарагина в плазме (Рисунок 16Б и 17Б). При этом уровень аспарагина ниже 2 μM , необходимый для осуществления терапевтического эффекта препарата, поддерживается в плазме тем дольше, чем выше доза введенного фермента. Такая фармакокинетика нового препарата аспарагиназы в эритроцитах согласуется с фармакокинетикой аспарагиназы в эритроцитах, полученной в других исследованиях [76, 183].

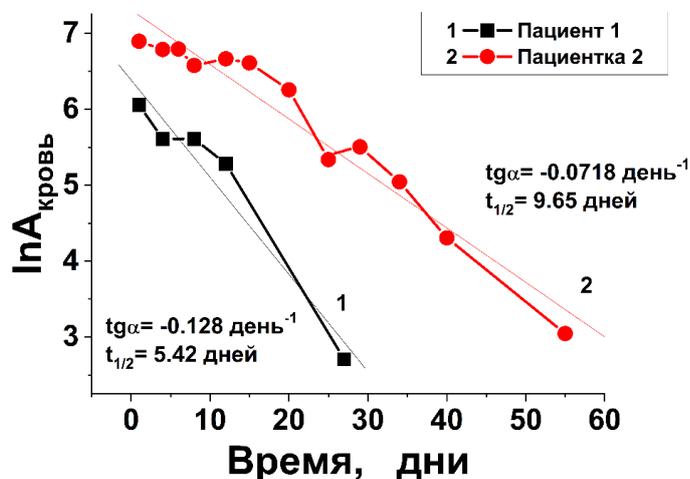


Рисунок 18 — Расчет времени полувыведения из крови пациентов препарата аспарагиназы, введенной в эритроцитах, для медленной фазы выведения (после 24 ч)

Уровень аспарагина у обоих пациентов быстро падал до 0 в первые часы после введения фармакоцитов (Рисунок 16Б, 17Б). Однако у пациента 1 концентрация аспарагина начала восстанавливаться уже на 7 день после введения фармакоцитов. Это, по-видимому, связано с невысокой 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.

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/м² 1 раз в неделю).

Первые полученные результаты показали, что фармакоциты с аспарагиназой являются перспективным препаратом для удаления аспарагина из кровотока. Они хорошо переносятся пациентами, а продолжительность истощения аспарагина зависит от дозы введенной аспарагиназы. Полученные данные по фармакокинетике нового разработанного препарата аспарагиназы в эритроцитах согласуются с опубликованными в литературе [76, 181]. Для получения достоверных результатов исследование необходимо продолжать.

3.6. Разработка автоматического устройства для включения биологически активных компонентов, в том числе аспарагиназы, в эритроциты

Как уже было сказано выше, включение ферментов, применяемых при терапии различных заболеваний, в эритроциты позволяет создать новую лекарственную форму этих ферментов (эритроциты-биореакторы), которая обладает рядом существенных преимуществ по сравнению с прямым введением в кровотоки растворов данных ферментов. Несмотря на преимущества такой формы препарата, которые были описаны выше, применение подобных ЭБР в клинике очень ограничено. Это связано с отсутствием эффективных методов, позволяющих рутинно включать препараты в эритроциты в клинике. Таким образом 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.

Принцип работы новой установки для включения лекарственных соединений в эритроциты. Впервые в России нами была разработана установка для автоматического включения лекарств в эритроциты [179].

Разработка технических деталей нового устройства не входила в непосредственные задачи данной работы, однако в эти задачи входил подбор оптимальных условий работы этого устройства на каждом из этапов процесса, поэтому основное внимание далее будет уделено не подробному описанию самой созданной установки (будет описан только принцип ее работы), а выбору оптимальных условий работы этой установки для получения высокоэффективного и воспроизводимого включения лекарственного препарата в эритроциты.

Схема разработанной установки представлена на Рисунке 19. Принцип работы устройства основан на методе описанного выше проточного гипоосмотического диализа с использованием стандартных диализаторов для гемодиализа. Для обеспечения автоматизации и минимального участия оператора в работе устройства, оно объединяет все стадии (блоки), необходимые для проведения процедуры получения эритроцитов-носителей с лекарственным препаратом (блок отмывания клеток, диализа и концентрирования суспензии эритроцитов, а также блоки запечатывания полученных эритроцитов-носителей лекарственного препарата). Эти блоки соединены системой гибких ПВХ 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 магистральных, сигнализирующих об окончании определенных стадий процесса. Это способствует полной автоматизации всего процесса без необходимости вмешательства оператора. Процесс инкапсуляции осуществляется в диализаторе (13) аналогично описанному выше в главе Материалы и Методы. Выбор оптимальных условий проведения для большей

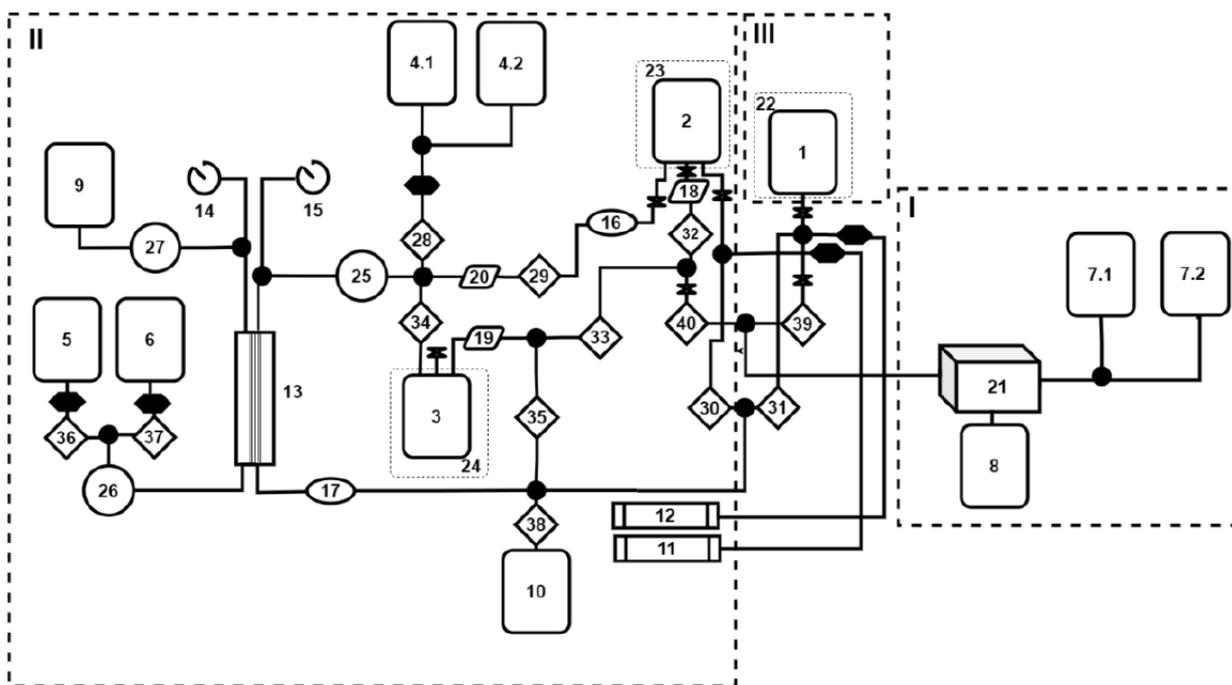


Рисунок 19 — Схема автоматического устройства для инкапсуляции лекарственных средств в эритроциты, где:

(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.

части стадий процесса уже был описан выше (см. раздел 3.2.), однако автоматизация процесса отмывания клеток с помощью таких стандартных приборов, как, например, Haemonetics ACP-215 (Haemonetics SA, Швейцария), приводит к получению после отмывания достаточно разбавленной суспензии клеток, что требует их дополнительного концентрирования перед проведением диализа. Условия такого концентрирования были подобраны отдельно (см. ниже).

Движение растворов и суспензии эритроцитов по магистралям 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). 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 выше, 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 сравняются.

Выбор оптимального трансмембранного давления для стадии концентрирования суспензии эритроцитов. При выборе условий концентрирования надо учитывать, что увеличение эффективности включения препарата в эритроциты и снижение потери внутриклеточного содержимого достигаются за счет снижения разбавления суспензии эритроцитов в ходе процедуры на стадии диализа. Чтобы достичь такого снижения разбавления, суспензия эритроцитов перед стадией диализа должна быть сконцентрирована. Задача концентрирования – откачать из суспензии лишнюю жидкость, максимально сохранив число целых клеток в образце. Для выбора трансмембранного давления в диализаторе на стадии концентрирования было исследовано, как повышение этого давления влияет на гемолиз эритроцитов, находящихся в диализаторе. На Рисунке 20 представлены результаты экспериментов на эритроцитах из двух различных образцов крови. Суспензии

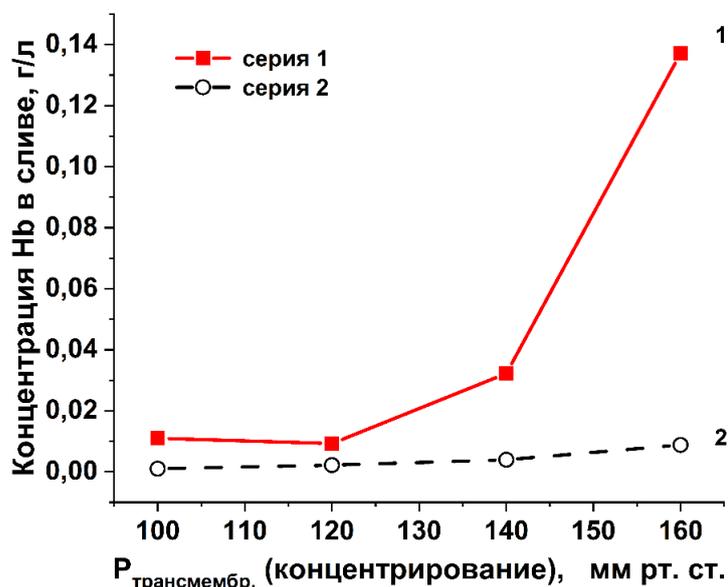


Рисунок 20 — Увеличение концентрации гемоглобина в сливаемой жидкости при проведении процедуры концентрирования суспензий эритроцитов при различных трансмембранных давлениях в диализаторе для двух различных образцов крови (исходный гематокрит 10%, длительность процедуры 8 мин).

эритроцитов (Ht 10%) прокачивали по внутреннему контуру диализатора в режиме концентрирования при различном трансмембранном давлении 8 мин. Затем была измерена концентрация гемоглобина в слитой жидкости. Как видно на Рисунке 20, при трансмембранном давлении выше 120 мм рт. ст. для некоторых образцов эритроцитов уже может наблюдаться увеличение содержания гемоглобина в сливаемой из диализатора жидкости, что соответствует увеличению гемолиза в ходе процесса концентрирования. С другой стороны, трансмембранное давление ниже 90 мм рт. ст. вполне допустимо, но сильно увеличивает длительность процедуры концентрирования.

Таким образом, оптимальным для стадии концентрирования суспензии эритроцитов был выбран интервал трансмембранного давления 90-120 мм рт. ст. По той же причине, чтобы не терять эритроциты в результате их гемолиза, давление на входе во внутренний контур диализатора, по которому проходят эритроциты, может регулироваться, но не должно превышать атмосферное более, чем на 120 мм. рт. ст., т.к. именно такое давление многие производители диализаторов указывают как максимальное, при котором гемолиза эритроцитов еще нет.

Получение эритроцитов с аспарагиназой с использованием нового устройства. С помощью разработанного нового 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) (см. раздел 3.3, Таблица 3). На Рисунке 21 можно видеть, что переход к автоматическому способу включения позволяет увеличить эффективность инкапсуляции аспарагиназы в эритроциты, несмотря на бóльшую потерю клеток. Уменьшение процента выхода клеток может быть связано с добавлением стадий концентрирования до гипотонического диализа и после отмывания полученных фармакоцитов, т.к. чем больше стадий, через которые проходят клетки, тем больше вероятность их потери.

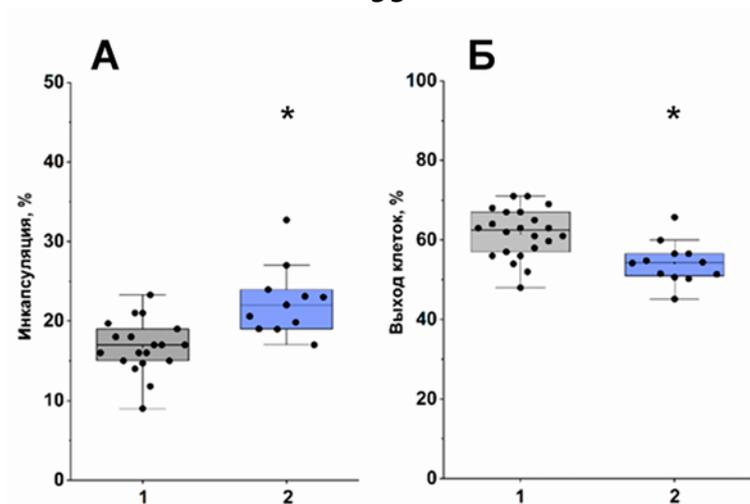


Рисунок 21 — Сравнение эффективности инкапсуляции (А) аспарагиназы в эритроциты и выхода клеток (Б) при включении фермента стерильным методом на лабораторной установке без полной автоматизации процесса (1) (n=19) и на разработанном автоматическом устройстве (2) (n=11). * - Различие двух групп достоверно (Mann-Whitney Test, $p < 0,05$)

Эффективность инкапсуляции аспарагиназы в эритроциты с использованием разработанного автоматического устройства, превосходит таковую для этого же фермента с использованием других запатентованных устройств-аналогов (Таблица 4).

Особенностями и 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 не только повысить выход инкапсуляции за счет повышения гематокрита суспензии на стадии диализа, но 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;

Таблица 4 — Сравнение эффективности включения аспарагиназы (или гексокиназы) в эритроциты с помощью различных существующих в мире запатентованных устройств.*)

№ п/п	Использованное устройство (патент)	Включенный фермент	Эффективность включения		Ссылка
			<i>R</i> , %	<i>E</i> , %	
1	US 4,752,586	L-аспарагиназа	43.6 ± 14.2%	16.6 ± 3.6%	[76]
2	RU 2 670 070	Гексокиназа	-	16%	[184]
3	US 10, 273, 444	L-аспарагиназа	29.8 ± 2.4%	-	[185]
4	Разработанное нами устройство	L-аспарагиназа	51.8 ± 9.6%	22.5 ± 4.4	

*) Для устройства 2 данные для аспарагиназы отсутствуют, поэтому приведены данные по включению в эритроциты фермента гексокиназы, молекула которого по размеру близка к молекуле аспарагиназы. Для всех параметров представлены средние величины и стандартные отклонения (среднее ± SD). *R* – относительный выход включения, показывающий, какой процент удельная активность, полученная в фармакоцитах, составляет от максимально возможной в данных условиях, *E* – абсолютный выход включения фермента, показывающий, какой процент от общего количества введенного в систему фермента оказался включенным в эритроциты в результате процесса.

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

способствующая стандартизации процесса и исключая возможность ошибок оператора.

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

Таким образом, было разработано устройство, позволяющее в автоматическом режиме эффективно инкапсулировать ферментные лекарственные препараты, в том числе аспарагиназу, в эритроциты, которое было запатентовано [179], и для которого были подобраны оптимальные условия проведения различных стадий процесса. В настоящий момент ведутся работы по созданию опытного образца прототипа разработанного устройства для его промышленного производства.

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

Как уже было сказано выше, ЭБР с различными включенными ферментами могут быть использованы для удаления из кровотока целого ряда низкомолекулярных метаболитов [81]. Одним из таких метаболитов может быть аммоний. Повышение концентрации аммония в крови (гипераммониемия) токсично для центральной нервной системы, поэтому удаление его из кровотока является актуальной задачей.

Одним из подходов для ее решения может быть использование эритроцитов-биореакторов с загруженными внутрь ферментами, перерабатывающими аммоний. Такие ЭБР были предложены в работах ряда исследовательских групп [154–157, 186], в том числе и в нашей лаборатории [158]. С помощью математического моделирования 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 [158]. Это обеспечивает независимость работы аммоцитов от проницаемости мембраны эритроцитов для плохо проникающих через нее субстратов этих ЭБР – α -кетоглутарата и глутамата.

Такие ЭБР были получены с помощью метода гипоосмотического диализа в мешках, однако их эффективность была низкой. Причины этого обсуждались выше (см. раздел 1.4.3.). Одной из них является агрегация стандартно используемого для включения в ЭБР животного фермента ГДГ бычьей печени при повышении концентрации фермента в растворе выше 0.1 мг/мл [2]. В настоящей работе были предприняты попытки повысить активность ГДГ внутри аммоцитов. Для этого для загрузки в эритроциты вместо ГДГ из бычьей печени мы использовали бактериальную ГДГ из *Proteus* sp., т.к. ранее в работе нашей лаборатории было показано, что такая ГДГ не агрегирует при повышении ее концентрации в растворе [160]. В той же работе [160] было показано, что использование бактериальной ГДГ из *Proteus* sp. позволяет увеличить эффективность включения ГДГ методом проточного диализа примерно в 2.6 раза (с 4.7 до 12.2%). Однако включение ГДГ из *Proteus* sp. в эритроциты в этой работе было проведено в отсутствие АЛТ. В настоящей работе была исследована возможность совместной инкапсуляции в эритроциты ГДГ из *Proteus* sp. и АЛТ из сердца свиньи. Впервые были получены аммоциты на базе этих двух ферментов, 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 кроме эритроцитарных индексов и осмотической резистентности 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.

3.7.1. Совместное включение ГДГ из *Proteus sp.* и АЛТ в эритроциты методом обратимого гипоосмотического диализа

Нами были получены аммоциты, содержащие ГДГ из *Proteus sp.* и АЛТ из сердца свиньи, описанным выше методом проточного гипоосмотического диализа (без полной автоматизации процесса) [187]. Полученные результаты были сравнены с результатами включения ГДГ из бычьей печени и АЛТ в эритроциты ранее описанным методом гипоосмотического диализа в мешках (Таблица 5).

Таблица 5 — 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 sp.</i>		АЛТ из сердца свиньи	
	Диализ в мешках	Проточный диализ	Диализ в мешках	Проточный диализ	Диализ в мешках	Проточный диализ
Выход инкапсуляции (%)	1) 1.8 ± 0.8 (n=8) [163] 2) 2.20 ± 0.82 (n=10) [158] 3) 2.28 ± 0.93 (n=7) [160]	4.70 ± 1.41 (n=9) [158]	—	1) 12.20 ± 4.25 (n=5) [158] 2) 9.4 ± 4.9 (n=31) (эта работа)	11.69 ± 6.39 (n=10) [160]	26.0 ± 10.0 (n=31) (эта работа)
Выход клеток (%)	1) 65.1 ± 4.5 (n=8) [163] 2) 43.3 ± 12 (n=10) [160] 3) 44.0 ± 4.8 (n=7) [158]	66.1 ± 12.0 (n=9) [158]	—	1) 63.7 ± 2.2 (n=5) [158] 2) 70.0 ± 9.0 (n=31) (эта работа)	43.3 ± 12.0 (n=10) [160]	70.0 ± 9.0 (n=31) (эта работа)

*) Представлены средние значения выходов и стандартные отклонения для включения данных ферментов в эритроциты человека. В работах [158] и [163] исследования проводили для ГДГ в отсутствие АЛТ. В настоящей работе и работе [160] были получены аммоциты, содержащие одновременно два фермента (АЛТ и ГДГ из разных источников).

Данные по выходу клеток при проточном диализе достаточно хорошо согласуются с предыдущим исследованием [160]. Эффективность инкапсуляции

АЛТ в данном исследовании значительно выше, чем при включении этого фермента методом диализа в мешках в работе [158], и чем эффективность инкапсуляции ГДГ из *Proteus* sp. методом проточного диализа в данной работе. Это еще раз подтверждает вывод работы [158], 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 молекулярную массу, чем АЛТ (340 и 115 кДа, соответственно), что позволяет АЛТ лучше проникать в образовавшиеся при диализе временные поры эритроцитов. Эффективность включения в эритроциты для ГДГ из *Proteus* sp. в данном исследовании несколько ниже, чем в предыдущей работе [160, 187] (9.4 % против 12.2 %), однако она все же в 2 раза выше, чем для ГДГ из бычьей печени (4.7%). Мы полагаем, что это различие связано с тем, что в работе [160] была использована ГДГ из *Proteus* sp. фирмы Тоубо (Япония), в первой половине данной работы (n=17) был использован тот же фермент, а вторая половина данного исследования была выполнена с ГДГ из *Proteus* sp. фирмы Sigma-Aldrich, но все результаты были усреднены. Возможно, более низкий процент включенной активности связан со степенью чистоты фермента. Производители заявляют разную удельную активность для этих двух ферментов: 300 и 184 ЕД/мг белка для ГДГ фирмы Тоубо и Sigma-Aldrich, соответственно. Это приводит к тому, что при включении одной и той же концентрации ГДГ (в ЕД/мг) величина включенной активности во втором случае будет меньше.

Таким образом, впервые была показана возможность одновременного включения ГДГ из *Proteus* sp. и АЛТ из свиного сердца в эритроциты методом проточного диализа. Показано, что эффективность включения АЛТ методом проточного диализа выше, чем методом диализа в мешках, выполненном в предыдущем исследовании [158]. Эффективность включения ГДГ из *Proteus* sp. выше, чем ГДГ из бычьей печени, что согласуется с предыдущим исследованием [160].

3.7.2. Исследование свойств новых аммоцитов

Как и в случае фармакоцитов, загруженных аспарагиназой, в этом разделе работы были исследованы свойства полученных аммоцитов, как свежеприготовленных, так и в ходе 6 дней хранения 10% суспензии этих аммоцитов при 4°C. Все результаты были сравнены с результатами, полученными при хранении исходных эритроцитов в тех же условиях. Были изучены эритроцитарные индексы, гемолиз, осмотическая резистентность, а также внутриклеточная и внеклеточная активность ГДГ и АЛТ. Кроме того, была измерена фильтруемость клеток, которая характеризует их способность деформироваться, для исходных эритроцитов, свежеприготовленных аммоцитов, а также аммоцитов после 2 ч инкубации при комнатной температуре в восстанавливающем растворе.

Эритроцитарные индексы. Как уже неоднократно было сказано выше, стандартные эритроцитарные показатели (MCV, MCH, MCHC) всегда изменяются после воздействия на клетки гипоосмотического стресса (см. раздел 3.1.). Это наблюдалось и в случае полученных нами аммоцитов.

Эритроцитарные показатели аммоцитов, содержащих ГДГ из *Proteus* sp и АЛТ, полученных методом проточного диализа, представлены на Рисунке 22А-В.

Так же, как и в случае с аспарагиназой, эритроцитарные индексы аммоцитов после процедуры проточного диализа незначительно изменились относительно аналогичных величин для исходных эритроцитов, но при дальнейшем хранении оставались постоянными. Степень их изменения не превышала изменения аналогичных показателей в других ранее опубликованных исследованиях [154, 160, 163].

Гемолиз нативных эритроцитов и аммоцитов. Скорость гемолиза аммоцитов в ходе хранения была выше, чем у нативных эритроцитов (Рисунок 22Г). Это может свидетельствовать о том, что после осмотического стресса мембрана и метаболизм части эритроцитов претерпевают необратимые изменения, что приводит к более быстрому гемолизу клеток. Как и в случае с аспарагиназой, аммоциты не обладают длительным сроком хранения и их дальнейшее применение

целесообразно в кратчайшие сроки после получения (или с дополнительной отмывкой перед введением пациенту при более длительных сроках хранения).

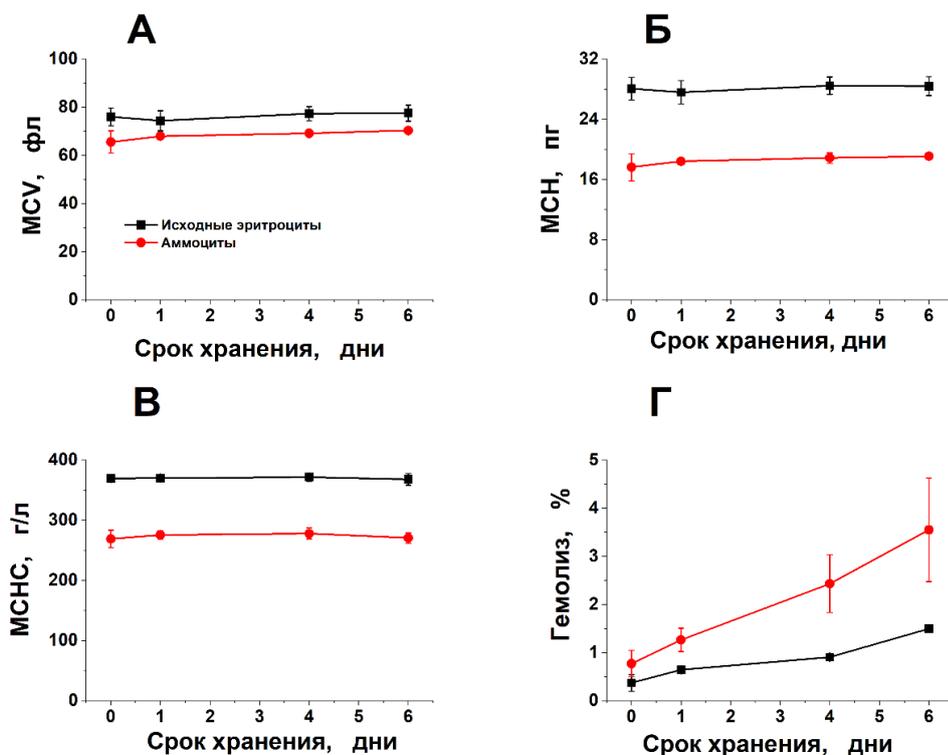


Рисунок 22 — Эритроцитарные индексы и гемолиз нативных эритроцитов и аммоцитов при хранении. Суспензии нативных эритроцитов (черные символы) и аммоцитов (красные символы) с гематокритом 10% хранили при +4°C в течение 6 суток. **А** – средний объем клетки (фл). **Б** – среднее содержание гемоглобина в клетках (пг). **В** – средняя концентрация клеточного гемоглобина (г/л). **Г** – гемолиз аммоцитов и нативных клеток на разных сроках хранения. Представлены средние значения \pm SD. Для всех эритроцитарных индексов $n=5$ (кроме дня 0, где $n=7$). Для гемолиза аммоцитов $n=12$, кроме дня 0 ($n=7$), для гемолиза нативных клеток $n=4$, кроме дня 0 ($n=5$)

Осмотическая резистентность. Этот показатель характеризует устойчивость клеток к снижению осмоляльности среды (к осмотическому стрессу). Результаты измерения осмотической резистентности для нативных клеток и аммоцитов представлены на Рисунке 23А, и хорошо согласуются с другими опубликованными результатами [154, 160, 163, 182, 188] (чтобы не загромождать рисунок опущены кривые, соответствующие 4 дням хранения суспензий). Видно, что форма кривой осмотической резистентности аммоцитов отличается от аналогичной кривой исходных эритроцитов. Она становится более полой,

причем осмотическая устойчивость аммоцитов оказывается выше, чем у исходных эритроцитов в области низких осмоляльностей, но ниже, чем у исходных эритроцитов в области более высоких осмоляльностей. В области физиологических осмоляльностей (выше 250 мОсм/кг) кривые почти не отличаются. Показатель H_{50} (осмоляльность среды, при которой лизирует 50% клеток (пунктирная линия)) для исходных эритроцитов и свежеприготовленных аммоцитов (день 0), практически не различаются (126 и 124 мОсм/кг, соответственно). В ходе хранения величины H_{50} увеличиваются как для нативных эритроцитов, так и для аммоцитов, особенно сильно для аммоцитов на 6 день хранения. Это согласуется с более высокой скоростью гемолиза аммоцитов. Ширина распределения эритроцитов по осмотической резистентности (W , разница между осмоляльностью среды, в которой лизировало 10% и 90% клеток) также была достоверно выше у аммоцитов, чем у нативных эритроцитов в любой день хранения. Однако, в отличие от H_{50} , в процессе хранения эта разница постепенно уменьшалась, составляя 110, 106 и 93 мОсм/кг для 0, 1 и 6 суток хранения соответственно. Такие изменения ширины распределения при хранении нативных эритроцитов и аммоцитов можно объяснить тем, что суспензия аммоцитов исходно более разнородна и содержит долю «ослабленных» в процессе процедуры клеток, которые при снижении осмоляльности среды подвергаются более быстрой деструкции, чем нативные эритроциты. При хранении эти клетки достаточно быстро разрушаются, в то время как сохраняются аммоциты более близкие по свойствам к исходным нативным эритроцитам.

Таким образом, полученные результаты согласуется с результатами, полученными нами ранее для эритроцитов-носителей аспарагиназы, и с другими опубликованными исследованиями [154, 160, 163, 182, 188].

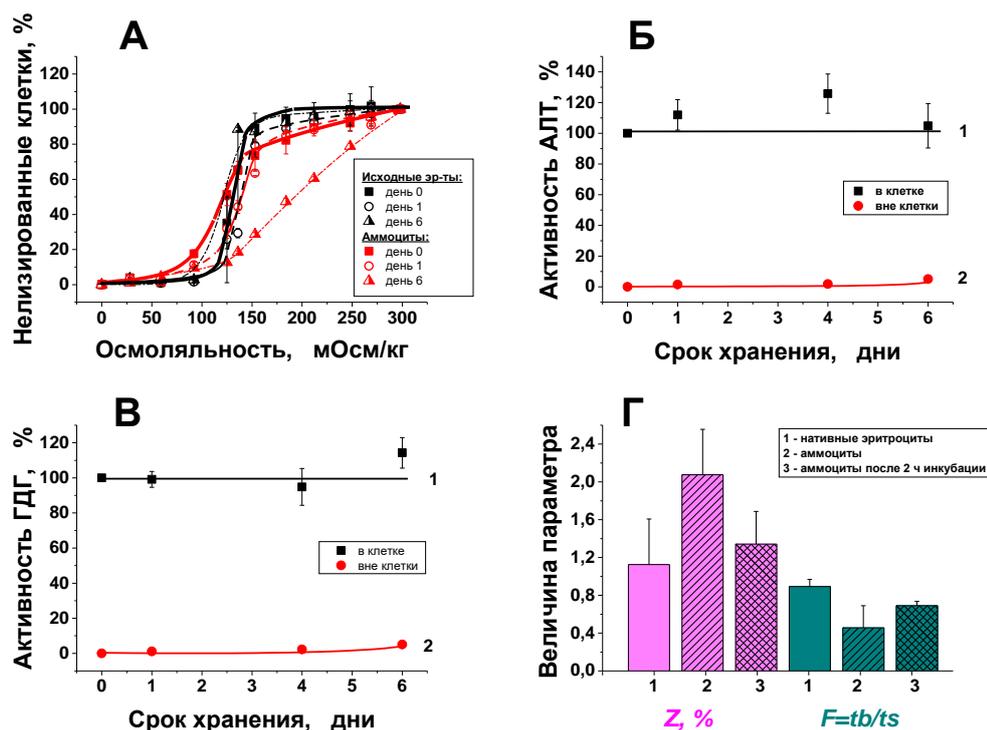


Рисунок 23 — Свойства аммоцитов и нативных эритроцитов. **А** – Изменение кривых осмотической резистентности аммоцитов (красные линии) и нативных эритроцитов (черные линии) при хранении 10% суспензий этих клеток при +4°C. Представлены средние величины ± SD (n=4) для клеток сразу после приготовления (день 0), а также на 1 и 6 сутки хранения. **Б** и **В** – Активность ГДГ и АЛТ, соответственно, внутри аммоцитов (1) и во внешней среде (2) на различных сроках хранения, выраженная как процент от исходной активности каждого из ферментов в аммоцитах в день 0. Представлены средние величины ± средняя ошибка среднего (SEM), n=8. **Г** – 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 ($F=tb/ts$). Представлены средние величины ± SD, n=7

Изменение концентрации ферментов внутри аммоцитов при хранении.

Увеличение концентрации ферментов (ГДГ и АЛТ) во внеклеточном растворе с аммоцитами за 6 суток хранения не превышало 10%. Часть фермента оказывалось вне клеток, по-видимому, за счет гемолиза небольшой доли эритроцитов, но это не влияло на активность ферментов внутри клеток (Рисунок 23Б и В). Таким образом, оба фермента внутри эритроцитов были стабильны в течение, как минимум, 6 дней хранения.

Фильтруемость исходных эритроцитов и полученных аммоцитов.

Жизнеспособность эритроцитов-носителей лекарственных препаратов

(фармакоцитов) в кровотоке во многом определяется их способностью деформироваться и легко проходить через узкие капилляры. Деформируемость эритроцитов можно определить с помощью фильтрационных методов, т.к. скорость фильтрации суспензии эритроцитов или фармакоцитов через искусственный мембранный фильтр с порами диаметром чуть меньше диаметра эритроцитов прямо зависит от этой способности клеток. Фильтруемость клеток в данной работе была оценена по двум параметрам: индексу фильтруемости (F), определяемому по уравнению (12), и доле клеток в суспензии, которые не проходят через поры фильтра (Z), определяемой по уравнениям (13) и (14) (см. раздел Материалы и Методы). Для ЭБР параметр фильтруемости был измерен в данной работе впервые, т.к. он никогда ранее не измерялся ни для каких фармакоцитов.

Полученные результаты представлены на Рисунке 23Г. Оба исследованных параметра (F и Z) в свежеприготовленных аммоцитах отличались от аналогичных параметров для нативных эритроцитов и свидетельствовали о более низкой фильтруемости аммоцитов. Поскольку индекс фильтруемости F определяется отношением времени прохождения через фильтр одного и того же объема (250 μ л) буфера и суспензии эритроцитов, этот индекс для нативных эритроцитов близок к 1 (что означает, что клетки проходят через поры фильтра почти так же быстро, как буфер), в то время как у свежеприготовленных аммоцитов индекс фильтруемости был снижен примерно в 2 раза. Доля нефилтующихся клеток (Z) в свежеприготовленных аммоцитах, наоборот, была достоверно повышена примерно в 2 раза по сравнению с аналогичным показателем нативных эритроцитов (Рисунок 23Г). Чтобы понять, насколько необратимы эти изменения, для нагруженных ферментами эритроцитов была измерена фильтруемость не только свежеприготовленных эритроцитов-носителей, но и их фильтруемость после 2 ч инкубации при комнатной температуре в буфере для хранения, содержащем кроме солей (включая $MgCl_2$) глюкозу, аденин и альбумин (см. Материалы и Методы). После 2 ч такой инкубации фильтрационные параметры аммоцитов улучшились (Рисунок 23Г). Было показано, что после инкубации процентное содержание нефилтующихся клеток в суспензии аммоцитов понижается (относительно

суспензии свежеполученных аммоцитов) и не отличается достоверно от значений данного параметра для исходных эритроцитов (ANOVA, $p < 0.05$, post hoc test Tukey). Повышается 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.

3.7.3. Эффективность удаления аммония аммоцитами *in vitro*

После изучения свойств полученных аммоцитов, в работе была измерена их способность удалять аммоний из среды *in vitro*. Для этого суспензию аммоцитов инкубировали в течение 120-140 мин при 25°C в среде, содержащей 1 мМ NH₄Cl. Образцы отбирали каждые 20 минут и измеряли концентрации аммония и аланина. Типичные кинетические кривые для одного из экспериментов представлены на Рисунке 24А. В качестве контроля измеряли удаление аммония из аналогичной среды с добавленным NH₄Cl в присутствии нативных эритроцитов.

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 наблюдали. Эта кинетика существенно отличалась от кинетики удаления аммония из среды, где присутствовали нативные эритроциты и свободная ГДГ (без АЛТ) (Рисунок 24Б). Здесь наблюдалось более быстрое снижение концентрации аммония, но без увеличения концентрации аланина. Такая разная кинетика доказывает, что превращение аммония в присутствии аммоцитов (Рисунок 24А) происходит внутри клеток, а ферменты ГДГ и АЛТ работают согласованно.

Все концентрации на Рисунке 24 приведены в ммоль/л суспензии, т. е. включают концентрацию каждого метаболита в клетках и надосадочной жидкости (в соответствующих пропорциях). При этом, концентрация аммония во взвеси везде одинакова, так как аммоний очень быстро проникает в эритроцит и его концентрация в клетке и надосадочной жидкости выравнивается, а концентрация

аланина в клетках и во внешней среде может быть разной. Соотношение концентраций аланина в аммоцитах и во внешней среде определяется скоростью продукции аланина и скоростью его транспорта через мембрану эритроцита. В данной работе измерялась только общая концентрация аланина в суспензии, однако вопрос о том, насколько может увеличиваться его концентрация внутри эритроцитов при работе биореакторов, очень важен, т.к. накопление слишком высокой концентрации аланина внутри аммоцитов может приводить к их разрушению из-за слишком высокого осмотического давления в клетках.

В ранее опубликованной работе [158] накопление аланина в эритроците рассчитывалось с использованием математической модели, в которой транспорт аланина был представлен в очень упрощенном виде как линейный процесс, пропорциональный градиенту концентрации аланина внутри и снаружи эритроцита. Расчеты по такой упрощенной модели показали, что аланин не способен накапливаться внутри клетки в высоких концентрациях. При работе биореактора его концентрация внутри клетки быстро достигает стационарного уровня, который не превышает 0,84 ммоль/л эритроцитов (при активности ГДГ и АЛТ в эритроцитах, равной 8 и 40 МЕ/мл эритроцитов, соответственно, что примерно соответствует уровню активности данных ферментов, который может быть реально достигнут в аммоцитах (см. Таблицу 4)).

В работе [189] мы разработали уточненную математическую модель функционирования аммоцита, в которой уравнения транспорта для всех метаболитов записаны в соответствии с их реальными механизмами.

Известно, что аланин может проникать через мембрану эритроцитов с помощью двух транспортных систем: системы ASC - насыщаемой, зависимой от ионов Na^+ , которая описывается уравнением Михаэлиса - Ментен, и системы L, переносящей аланин пропорционально его концентрации и не зависящей от ионов Na^+ . Несмотря на то, что приток (или отток) аланина здесь увеличивается линейно, пропорционально его концентрации, это не процесс простой диффузии, а работа определенного переносчика аланина, поэтому этот процесс можно назвать

«диффузионным» только условно. В ряде работ, посвященных экспериментальному изучению транспорта аланина, были измерены кинетические

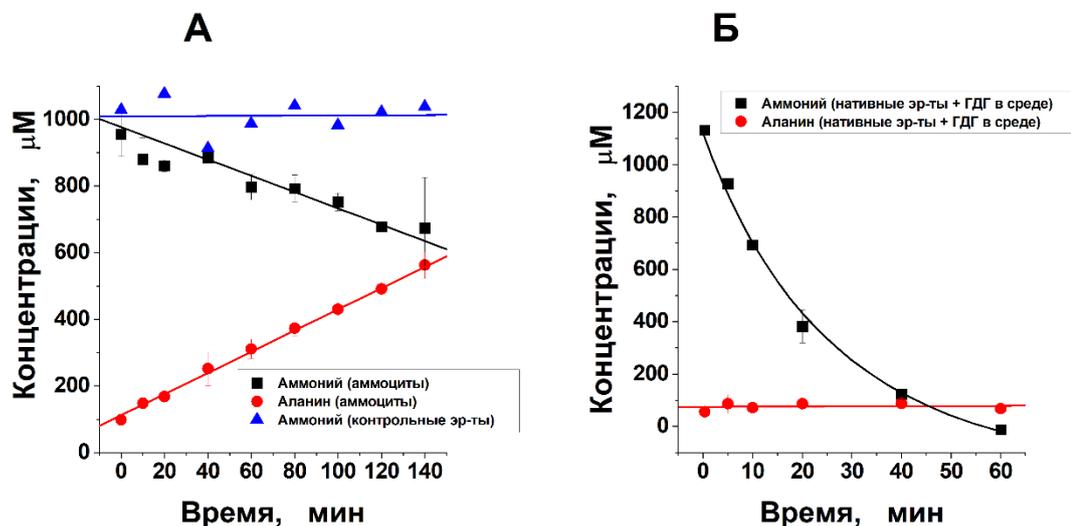


Рисунок 24 — Типичная кинетика потребления аммония (черные кривые) и образования аланина (красные кривые) в присутствии аммоцитов или свободного фермента ГДГ из *Proteus sp. in vitro*. Концентрация добавленного в среду NH_4Cl составляла везде 1 мМ. **А** – Кинетика потребления аммония в присутствии нативных эритроцитов (контроль, синяя кривая), а также потребление аммония (черная кривая) и образование аланина (красная кривая) в присутствии аммоцитов одного из доноров (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).

константы обеих этих систем [190–193]. В соответствии с этим, уравнение скорости транспорта аланина можно записать следующим образом:

$$V_{\text{трансп.}} = [(V_{\text{трансп. max}} \times [ALA]) / (K_M + [ALA])] + kd \times [ALA] \quad (24),$$

где $V_{\text{трансп. max}}$ — максимальная скорость поступления аланина в эритроциты или оттока во внешнюю среду, если используется концентрация аланина вне или внутри эритроцитов, соответственно, K_M — константа Михаэлиса для переносчика аланина системы ASC, kd — коэффициент проницаемости для переносчика аланина системы L. Суммарная скорость и направление транспорта аланина будут

определяться разницей скоростей его входа и выхода из эритроцита. Расчет накопления аланина в биореакторе по уточненной математической модели [189] несколько изменил значение его стационарной концентрации, достигаемой в эритроците при работе биореактора, но принципиально не изменил сделанного ранее вывода о том, что аланин не способен накапливаться в клетке в концентрациях, которые могли бы угрожать ее целостности из-за повышения осмотического давления внутри клетки. На Рисунке 25 приведено сравнение кинетики накопления аланина в аммоците при расчете скорости его транспорта по упрощенной (черная кривая) и уточненной (красная кривая) модели. Рассчитанный с помощью уточненной модели максимальный уровень стационарной концентрации аланина составил около 1,15 ммоль/л клеток, что явно недостаточно для разрушения эритроцита из-за повышения внутриклеточной осмоляльности (что возможно только при концентрации аланина в эритроцитах более 50-60 мМ [158]).

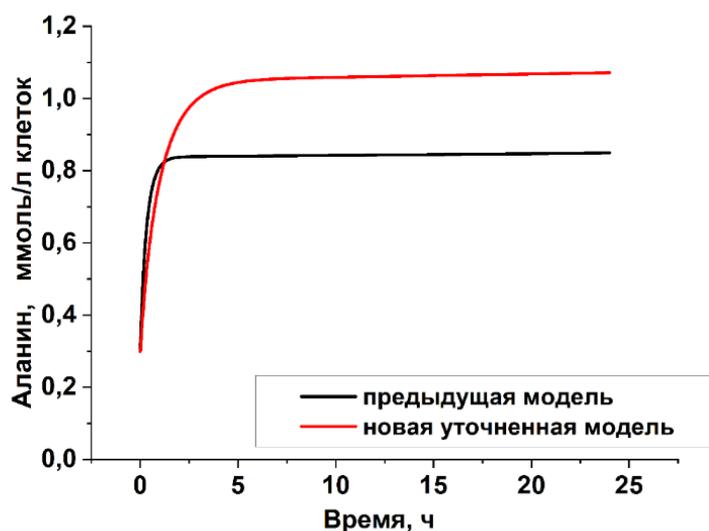


Рисунок 25 — Накопление аланина в аммоцитах. Теоретическое моделирование накопления аланина внутри эритроцитов при работе аммоцитов, проведенное с использованием упрощенных уравнений транспорта аланина и других метаболитов (черная линия) [158] и уточненной модели с использованием уравнений, описывающих реальные механизмы транспорта (красная линия) [189]. Расчет сделан для активностей ГДГ из *Proteus* sp. и АЛТ равных 8 и 40 МЕ/мл эритроцитов, соответственно. Концентрацию аммония в среде считали постоянной и равной 0,5 мМ.

Усредненные результаты показали, что удаление аммония биореакторами сопровождалось образованием пропорционального количества аланина (Рисунок 26).

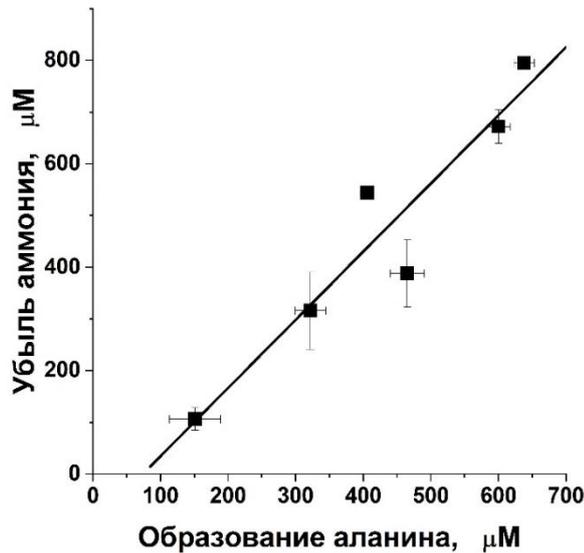


Рисунок 26 — Взаимосвязь между потреблением аммония и образованием аланина. Представлены данные для экспериментов, проведенных с аммоцитами, полученными из эритроцитов разных доноров, с разной активностью инкапсулированных ферментов. Измерения аланина проводили после инкубации суспензии аммоцитов (гематокрит 23%, 3 мл) *in vitro* при 25°C в течение 120–140 мин в присутствии 1 мМ NH_4Cl . Представлены средние значения \pm стандартное отклонение. Для всех точек число повторов $n=2$, кроме первой, где $n=4$.

Это доказывает, что ГДГ и АЛТ функционируют взаимосвязано (в тандеме), и аммоний превращается в аланин в соответствии с уравнениями (1) и (2).

Была также показана зависимость скорости удаления аммония из среды *in vitro* в присутствии аммоцитов от активности ГДГ в клетках (Рисунок 27). При увеличении этой активности наблюдается тенденция к увеличению скорости убыли аммония из среды.

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

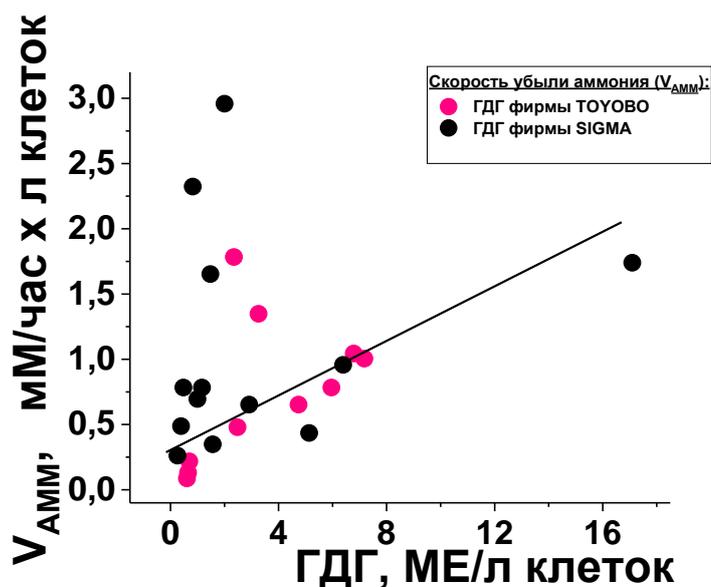


Рисунок 27 — Зависимость скорости потребления аммония в суспензии аммоцитов от активности ГДГ. Гематокрит суспензии 23%, температура 25 °С, добавлены 1 мМ NH_4Cl и 10 мМ ПИР. Активность АЛТ во всех опытах в 2-3 раза превышала соответствующую активность ГДГ. Разным цветом обозначены точки, полученные с использованием ГДГ из *Proteus* sp. от разных производителей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящая работа была посвящена разработке новых лекарственных форм на основе эритроцитов в качестве носителей лекарственных препаратов. Было показано, что биореакторы, созданные путем включения в эритроциты с помощью гипоосмотических методов целевых ферментов, способны удалять из кровотока определенные метаболиты. В работе рассмотрены ЭБР для удаления из кровотока двух различных низкомолекулярных метаболитов: аспарагина и аммония. Первый играет важную роль в противоопухолевой терапии при ОЛЛ у взрослых и детей, а также при некоторых других онкологических патологиях, т.к. его отсутствие препятствует синтезу белков и, соответственно, делению опухолевых клеток. Повышение концентрации аммония в кровотоке может быть следствием целого ряда различных патологий (от наследственных и приобретенных в результате патологий печени дефицитов определенных ферментов, участвующих в выводе аммония, до кишечных инфекций). Так как аммоний обладает сильной нейротоксичностью, состояние гипераммониемии требует быстрой коррекции, которая практически не может быть осуществлена современными медикаментозными средствами. Таким образом, рассмотренные в работе примеры ЭБР актуальны для современной медицины.

Для оптимизации процесса получения ЭБР с высокой эффективностью загрузки необходимыми ферментами, в работе были сравнены различные гипоосмотические методы загрузки ферментов в эритроциты. Были изучены также свойства полученных загруженных лекарством фармакоцитов. В результате было показано, что наиболее эффективным методом включения исследованных ферментов (аспарагиназы, или ГДГ совместно с АЛТ) является метод проточного гипоосмотического диализа. Свойства полученных фармакоцитов не уступают свойствам ранее полученных в других работах эритроцитов, загруженных различными лекарственными препаратами, причем как сразу после получения, так и после хранения этих фармакоцитов при 4°C в течение 1-2 недель.

Были подобраны параметры проведения процедуры гипоосмотического проточного диализа, которые обеспечивали наибольшую эффективность включения ферментов и наименьшие потери эритроцитов в ходе процедуры. В дальнейшем все подобранные параметры были использованы в созданной и запатентованной автоматической установке для включения различных биологически активных компонентов в эритроциты. Существование такой установки, которая позволяет проводить процесс инкапсуляции фермента стерильно и обеспечивает оптимальные условия прохождения этого процесса, исключая возможные ошибки, связанные с работой оператора, является очень важной вехой для использования эритроцитов-носителей лекарственных препаратов в клинической практике.

С помощью разработанного метода включения (но пока без использования полной автоматике) были созданы эритроциты с аспарагиназой, для которых были начаты клинические испытания безопасности, а также была измерена фармакокинетика эритроцитарной формы аспарагиназы в организме и фармакодинамика ее действия (по уровню снижения аспарагина в плазме). Полученные результаты показали отсутствие побочных эффектов после введения фармакоцитов с аспарагиназой, а также их эффективность в необходимом для терапии снижении концентрации аспарагина, которое зависело от уровня включенной в клетки аспарагиназы.

Что касается фармакоцитов, убирающих из кровотока избыточный аммоний, в настоящей работе впервые были получены аммоциты с ГДГ из *Proteus sp.* и АЛТ из сердца свиньи, которые отличаются от ранее описанных аммоцитов, содержащих ГДГ из бычьей печени (и АЛТ), более высокой эффективностью включения в эритроциты основного перерабатывающего аммоний фермента (ГДГ). Увеличение загрузки ГДГ в эритроциты было достигнуто не просто за счет использования метода проточного диализа, но также за счет использования ГДГ другого происхождения (бактериального фермента из *Proteus sp.*), который позволяет увеличить степень загрузки клеток ферментом, т.к. в отличие от ГДГ

животного происхождения не агрегирует при повышении его концентрации в растворе выше 0.1 мг/мл.

Кроме того, в настоящей работе впервые было доказано, что включенные в аммоциты ферменты работают совместно, а эффективность удаления аммония из среды прямо пропорциональна активности ГДГ, включенной в эритроциты.

Таким образом настоящая работа показала перспективность использования фармакоцитов в клинической практике.

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 позволяют 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°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 μM , 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 СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

Аммоцит – эритроцит-биореактор, способный утилизировать аммоний

АСПЭР – отечественный препарат аспарагиназы в эритроцитах

АДГ - аланиндегидрогеназа

АДФ – аденозиндифосфат

АДА- аденозиндезаминаза

АКГ - α -кетоглутарат;

АЛА – аланин

АЛТ – аланинтрансаминаза, аланинаминотрансфераза

АМФ –аденозинмонофосфат

АТФ – аденозинтрифосфат

ANOVA – дисперсионный анализ (analysis of variances)

АНА - аспартат- β -гидроксамат

BSA – бычий сывороточный альбумин

ГДГ - глутаматдегидрогеназа

ГОТ - глутаматоксалоацетаттрансаминаза

ГЛН – глутамин;

ГЛУ - глутаминовая кислота;

ГС – глутаминсинтетаза

МДГ - малатдегидрогеназа

ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз

ПЭГ - полиэтиленгликоль

ТР - тимидинфосфорилаза

Фармакоцит – эритроцит, нагруженный лекарственным препаратом

ЭБР – эритроцит-биореактор

ЭДТА - этилендиаминтетрауксусная кислота

N_{50} – осмоляльность, при которой лизировано 50% клеток

W – ширина распределения клеток по осмотической резистентности

HEPES - 4-(2-гидроксиэтил) пиперазин-1-этансульфоновая кислота

Ht - гематокрит

K_m – константа Михаэлиса

ЛАК - лактат;

ЛС – лекарственное соединение

ASP-se - аспарагиназа

МЕ – международная единица активности фермента

МСН – среднее клеточное содержание гемоглобина

МСНС – средняя клеточная концентрация гемоглобина

MCV – средний клеточный объем

NAD, NADH - никотинамидадениндинуклеотид в окисленной и восстановленной форме, соответственно

NADP, NADPH - никотинамидадениндинуклеотидфосфат в окисленной и восстановленной форме, соответственно

ПИР - пируват

ПФ – пиридоксаль-5'-фосфат

ПФП – пентозо-фосфатный путь

PBS – фосфатный буферный раствор

SD – стандартное отклонение

SEM – стандартная ошибка среднего

Трис - трис(гидроксиметил)аминометан

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Battistel, A.P. Allergic reactions to asparaginase: retrospective cohort study in pediatric patients with acute lymphoid leukemia / A.P. Battistel, B.S. da Rocha, M.T. dos Santos, L.E. Daudt, M.B. Michalowski // *Hematol. Transfus. Cell Ther.* – 2021. – V. 43. – № 1. – P. 9–14.
2. Burke, M.J. Hypersensitivity reactions to asparaginase therapy in acute lymphoblastic leukemia: immunology and clinical consequences. / M.J. Burke, B. Zalewska-Szewczyk // *Future Oncol.* – 2022. – V. 18. – № 10. – P. 1285–1299.
3. Chawla, J. Hyperammonemia// *Medscape* [Электронный ресурс]. URL: <https://emedicine.medscape.com/article/1174503-overview>.
4. Атауллаханов, Ф.И. Эритроцит: мешок с гемоглобином или живая, активная клетка? / Ф.И. Атауллаханов, Д.В. Борсакова, Е.С. Протасов, Е.И. Синауридзе, А.М. Зейналов // *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии.* – 2018. – V. 17. – № 1. – P. 108–116.
5. Рапопорт, С.М. Медицинская биохимия / С.М. Рапопорт / под ред. Москва. – – Москва: Москва, 1966.
6. Pretini, V. Red Blood Cells: Chasing Interactions. / V. Pretini, M.H. Koenen, L. Kaestner, M.H.A.M. Fens, R.M. Schiffelers, M. Bartels, R. Van Wijk // *Front. Physiol.* – 2019. – V. 10. – P. 945.
7. Villota, E.D. De Equality of the in vivo and in vitro oxygen-binding capacity of haemoglobin in patients with severe respiratory disease / E.D. De Villota, M.T.G. Carmona, j j Rubio // *Br. J. Anaesth.* – 1981. – V. 53. – № 12. – P. 1325–1328.
8. Singer, S.J. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes / S.J. Singer // *Science* (80-.). – 1972. – V. 175. – № 4023. – P. 720–731.
9. Wijk, R. van The energy-less red blood cell is lost: erythrocyte enzyme abnormalities of glycolysis. / R. van Wijk, W.W. van Solinge // *Blood.* – 2005. – V. 106. – № 13. – P.

4034–4042.

10. Kunkel, D. Red Blood Cells In The Rouleau Formation// Pixels. Science Photo Library [Электронный ресурс]. URL: <https://pixels.com/featured/1-red-blood-cells-in-the-rouleau-formation-dennis-kunkel-microscopyscience-photo-library.html>.

11. Ataullakhanov, F.I. The regulation of glycolysis in human erythrocytes. The dependence of the glycolytic flux on the ATP concentration. / F.I. Ataullakhanov, V.M. Vitvitsky, A.M. Zhabotinsky, A. V Pichugin, O. V Platonova, B.N. Kholodenko, L.I. Ehrlich // Eur. J. Biochem. – 1981. – V. 115. – № 2. – P. 359–365.

12. Атауллаханов, А.И. 2,3-дифосфоглицератный шунт и стабилизация уровня АТФ в эритроцитах млекопитающих. / А.И. Атауллаханов // Биохимия. – 1985. – V. 50. – № 6. – P. 1005–1011.

13. Витвицкий, В.М. Регуляция гликолиза в эритроцитах человека. Механизм стабилизации концентрации АТФ. Диссертация на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук. / В.М. Витвицкий – , 1979. – 294 с.

14. Атауллаханов, Ф.И. Метаболические изменения, ведущие к окислительному лизису эритроцитов, поддерживаемых в нормальном состоянии *in vitro*. / Ф.И. Атауллаханов, В.М. Витвицкий, А.М. Жаботинский, А.Б. Кияткин, А.В. Пичугин, Е.И. Синауридзе // Биохимия. – 1986. – V. 51. – № 9. – P. 1562–1570.

15. Бойтлер, Э. Нарушения метаболизма эритроцитов и гемолитическая анемия / Э. Бойтлер – , 1981. – 254 с.

16. Атауллаханов, Ф.И. Зависимость скорости функционирования пентозного пути в эритроцитах от степени восстановленности глутатиона / Ф.И. Атауллаханов, А.М. Жаботинский, А.В. Пичугин, Н.Ф. Толокнова // Биохимия. – 1981. – V. 46. – № 3. – P. 530–541.

17. Huisjes, R. Squeezing for life - Properties of red blood cell deformability / R. Huisjes, A. Bogdanova, W.W. van Solinge, R.M. S., L. Kaestner, R. van Wijk // Front. Physiol. – 2018. – V. 9. – P. 656.

18. Danielczok, J. Red Blood Cell Passage of Small Capillaries Is Associated with Transient Ca^{2+} -mediated Adaptations / J. Danielczok, E. Terriac, L. Hertz, P. Petkova-Kirova, F. Lautenschlaeger, M. Laschke, L. Kaestner // *Front. Physiol.* – 2017. – V. 8. – P. 979.
19. Lew, V.L. Generation of normal human red cell volume, hemoglobin content, and membrane area distributions by “birth” or regulation? / V.L. Lew, J.E. Raftos, M. Sorette, R.M. Bookchin, N. Mohandas // *Blood.* – 1995. – V. 86. – № 1. – P. 334–341.
20. Linderkamp, O. Deformability of density separated red blood cells in normal newborn infants and adults. / O. Linderkamp, P.Y. Wu, H.J. Meiselman // *Pediatr. Res.* – 1982. – V. 16. – № 11. – P. 964–968.
21. Halperin, J. Digitalis-like properties of an inhibitor of the Na^+K^+ pump in human cerebrospinal fluid / J. Halperin // *J. Neurol. Sci.* – 1989. – V. 90. – № 2. – P. 217–230.
22. Halperin, J.A. Transient Changes in Erythrocyte Membrane Permeability Are Induced by Sublytic Amounts of the Complement Membrane Attack Complex (C5b-9) / J.A. Halperin, A. Taratuska, M. Rynkiewicz, A. Nicholson-Weller // *Blood.* – 1993. – V. 81. – № 1. – P. 200–205.
23. Ataulakhanov, F.I. A possible role of adenylate metabolism in human erythrocytes. 2. Adenylate metabolism is able to improve the erythrocyte volume stabilization. / F.I. Ataulakhanov, S. V Komarova, M. V Martynov, V.M. Vitvitsky // *J. Theor. Biol.* – 1996. – V. 183. – № 3. – P. 307–316.
24. Martinov, M. V Volume stabilization in human erythrocytes: combined effects of Ca^{2+} -dependent potassium channels and adenylate metabolism. / M. V Martinov, V.M. Vitvitsky, F.I. Ataulakhanov // *Biophys. Chem.* – 1999. – V. 80. – № 3. – P. 199–215.
25. Kinoshita, K.J. Voltage-induced pore formation and hemolysis of human erythrocytes. / K.J. Kinoshita, T.Y. Tsong // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1977. – V. 471. – № 2. – P. 227–242.
26. Teissie, J. Evidence of voltage-induced channel opening in Na/K ATPase of human erythrocyte membrane. / J. Teissie, T.Y. Tsong // *J. Membr. Biol.* – 1980. – V. 55. – №

2. – P. 133–140.

27. Mitchell, D.H. Bioactivity of electric field-pulsed human recombinant interleukin-2 and its encapsulation into erythrocyte carriers. / D.H. Mitchell, G.T. James, C.A. Kruse // *Biotechnol. Appl. Biochem.* – 1990. – V. 12. – № 3. – P. 264–275.

28. Ginn, F.L. Membrane alterations in hemolysis: Internalization of plasmalemma induced by primaquine. / F.L. Ginn, P. Hochstein, B.F. Trump // *Science.* – 1969. – V. 164. – № 3881. – P. 843–845.

29. Ben-Bassat, I. Drug-induced erythrocyte membrane internalization. / I. Ben-Bassat, K.G. Bensch, S.L. Schrier // *J. Clin. Invest.* – 1972. – V. 51. – № 7. – P. 1833–1844.

30. Yamagata, K. Encapsulation of concentrated protein into erythrocyte porated by continuous-wave ultrasound. / K. Yamagata, E. Kawasaki, H. Kawarai, M. Iino // *Ultrasound Med. Biol.* – 2008. – V. 34. – № 12. – P. 1924–1933.

31. Mulholland, S.E. Cell loading with laser-generated stress waves: the role of the stress gradient. / S.E. Mulholland, S. Lee, D.J. McAuliffe, A.G. Doukas // *Pharm. Res.* – 1999. – V. 16. – № 4. – P. 514–518.

32. Kitao, T. Erythrocyte entrapment of daunomycin by amphotericin B without hemolysis. / T. Kitao, K. Hattori // *Cancer Res.* – 1980. – V. 40. – № 4. – P. 1351–1353.

33. Bourgeaux, V. Drug-loaded erythrocytes: On the road toward marketing approval / V. Bourgeaux, J.M. Lanao, B.E. Bax, Y. Godfrin // *Drug Des. Devel. Ther.* – 2016. – V. 10. – P. 665–676.

34. Yang, B. Erythrocyte water permeability and renal function in double knockout mice lacking aquaporin-1 and aquaporin-3. / B. Yang, T. Ma, A.S. Verkman // *J. Biol. Chem.* – 2001. – V. 276. – № 1. – P. 624–628.

35. Pribush, A. Kinetics of erythrocyte swelling and membrane hole formation in hypotonic media. / A. Pribush, D. Meyerstein, N. Meyerstein // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2002. – V. 1558. – № 2. – P. 119–132.

36. Seeman, P. Transient holes in the erythrocyte membrane during hypotonic hemolysis

and stable holes in the membrane after lysis by saponin and lysolecithin. / P. Seeman // *J. Cell Biol.* – 1967. – V. 32. – № 1. – P. 55–70.

37. Bodemann, H. Factors controlling the resealing of the membrane of human erythrocyte ghosts after hypotonic hemolysis. / H. Bodemann, H. Passow // *J. Membr. Biol.* – 1972. – V. 8. – № 1. – P. 1–26.

38. Калягина, Н.В. Математическая модель осморегуляции объема эритроцита с учетом механических характеристик мембраны: дис. ... канд. физ-мат. наук: 03.01.02 / Калягина Надежда Вячеславовна. / Н.В. Калягина – , 2015. – 151 с.

39. Perutz, M.F. Proteins and nucleic acids-structure and function / M.F. Perutz – , 1962. – 211 с.

40. Ponder, E. The escape of hemoglobin from the red cell during hemolysis / E. Ponder, D. Marsland // *J. Gen. Physiol.* – 1935. – V. 19. – № 1. – P. 35–44.

41. Heedman, P.A. Hemolysis of individual red blood cells; an interferometer microscopic investigation. / P.A. Heedman // *Exp. Cell Res.* – 1958. – V. 14. – № 1. – P. 9–22.

42. Danon, D. Osmotic hemolysis by a gradual decrease in the ionic strength of the surrounding medium. / D. Danon // *J. Cell. Comp. Physiol.* – 1961. – V. 57. – P. 111–117.

43. Canham, P.B. The area and volume of single human erythrocytes during gradual osmotic swelling to hemolysis. / P.B. Canham, D.R. Parkinson // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* – 1970. – V. 48. – № 6. – P. 369–376.

44. Hoffman, J.F. Physiological characteristics of human red blood cell ghosts. / J.F. Hoffman // *J. Gen. Physiol.* – 1958. – V. 42. – № 1. – P. 9–28.

45. Erickson, H.P. Size and shape of protein molecules at the nanometer level determined by sedimentation, gel filtration, and electron microscopy / H.P. Erickson // *Biol. Proced. Online.* – 2009. – V. 11. – № 1. – P. 32–51.

46. M.I Harel, A.B. Proteopedia.org// Asparaginase [Электронный ресурс]. URL:

<https://proteopedia.org/wiki/index.php/Asparaginase>.

47. Colman, R.F. Glutamate Dehydrogenase (Bovine Liver) / под ред. S.A. Kuby. Boston, MA: C.R.C. Press, 1991. – 173–192c.
48. Updike, S.J. Infusion of red blood cell-loaded asparaginase in monkey. Immunologic, metabolic, and toxicologic consequences. / S.J. Updike, R.T. Wakamiya // J. Lab. Clin. Med. – 1983. – V. 101. – № 5. – P. 679–691.
49. Ihler, G.M. Enzyme loading of erythrocytes. / G.M. Ihler, R.H. Glew, F.W. Schnure // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 1973. – V. 70. – № 9. – P. 2663–2666.
50. Mambrini, G. Ex vivo encapsulation of dexamethasone sodium phosphate into human autologous erythrocytes using fully automated biomedical equipment. / G. Mambrini, M. Mandolini, L. Rossi, F. Pierige, G. Capogrossi, P. Salvati, S. Serafini, L. Benatti, M. Magnani // Int. J. Pharm. – 2017. – V. 517. – № 1–2. – P. 175–184.
51. Magnani, M. Erythrocyte engineering for drug delivery and targeting. / M. Magnani, L. Rossi, M. D'ascenzo, I. Panzani, L. Bigi, A. Zanella // Biotechnol. Appl. Biochem. – 1998. – V. 28. – № 1. – P. 1–6.
52. Bax, B. Treatment for mitochondrial neurogastrontestinal encephalomyopathy (MNGIE) / B. Bax, M. Bain. – 2014. – P. 29.
53. Moran, N.F. Carrier erythrocyte entrapped thymidine phosphorylase therapy for mngie / N.F. Moran, M.D. Bain, M.M.K. Muqit, B.E. Bax // Neurology. – 2008. – V. 71. – № 9. – P. 686–688.
54. Dale, G.L. High-efficiency entrapment of enzymes in resealed red cell ghosts by dialysis. / G.L. Dale // Methods Enzymol. – 1987. – V. 149. – P. 229–234.
55. Deloach, J.R. A dialysis procedure for loading erythrocytes with enzymes and lipids / J.R. Deloach, G.M. Ihler // Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj. – 1977. – V. 496. – № 1. – P. 136–145.
56. Sinauridze, E.I. A new chemotherapeutic agent: L-asparaginase entrapped in red blood cells. / E.I. Sinauridze, V.M. Vitvitsky, A. V. Pichugin // Adv Exp Med Biol. –

1992. – V. 326. – P. 203–6.

57. Teisseire, B. Encapsulation of a hemoglobin allosteric effector in erythrocytes: in vivo results. / B. Teisseire, C. Ropars, C. Vieilledent, M.O. Vallez, D. Laurent // *Life Support Syst.* – 1984. – V. 2. – № 4. – P. 277–280.

58. Teisseire, B. Enhancement of P50 by inositol hexa phosphate entrapped in resealed erythrocytes in piglets. / B. Teisseire, C. Ropars, C. Nicolau, M.O. Vallez, M. Chassaigne // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 1984. – V. 180. – P. 673–677.

59. Teisseire, B. Long-term physiological effects of enhanced O₂ release by inositol hexaphosphate-loaded erythrocytes. / B. Teisseire, C. Ropars, M.C. Villereal, C. Nicolau // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1987. – V. 84. – № 19. – P. 6894–6898.

60. Gay, F. Methionine tumor starvation by erythrocyte-encapsulated methionine gamma-lyase activity controlled with per os vitamin B₆ / F. Gay, K. Aguera, K. Sénéchal, A. Tainturier, W. Berlier, D. Maucort-Boulch, J. Honnorat, F. Horand, Y. Godfrin, V. Bourgeaux // *Cancer Med.* – 2017. – V. 6. – № 6. – P. 1437–1452.

61. Thomas, X.G. GRASPA-AML 2012-01 study (NCT01810705): A multicenter, open, randomized phase 2b trial evaluating ERY001 (L-asparaginase encapsulated in red blood cells) plus low-dose cytarabine vs low-dose cytarabine alone, in treatment of newly diagnosed acute myeloid / X.G. Thomas, E. Tavernier Tardy, R. Guieze, P. Chevallier, J. pierre Marolleau, F. Orsini, I. Hitchcock, I. El-Hariry // *J. Clin. Oncol.* – 2015. – V. 33. – № 15_suppl. – P. TPS7099–TPS7099.

62. Plisson, C. L-Asparaginase Loaded Inside Red Cells Has An Acceptable Tolerability Profile On Bilirubin Value / C. Plisson, M. Hunault, X. Thomas, T. Legay, Y. Bertrand, T. Andre // *Blood.* – 2013. – V. 122. – № 21. – P. 2642.

63. Hammel, P. A phase 2b of eryaspase in combination with gemcitabine or FOLFOX as second-line therapy in patients with metastatic pancreatic adenocarcinoma (NCT02195180), 2017. – 211c.

64. Thomas, X. Erythrocyte encapsulated l-asparaginase (GRASPA) in acute leukemia. / X. Thomas, C. Le Jeune // *Int. J. Hematol. Oncol.* – 2016. – V. 5. – № 1. – P. 11–25.

65. Dern, R.J. Studies on the preservation of human blood. II. The relationship of erythrocyte adenosine triphosphate levels and other in vitro measures to red cell storageability. / R.J. Dern, G.J. Brewer, J.J. Wiorkowski // *J. Lab. Clin. Med.* – 1967. – V. 69. – № 6. – P. 968–978.
66. Beutler, E. Storage of red cell concentrates in CPD-A2 for 42 and 49 days. / E. Beutler, C. West // *J. Lab. Clin. Med.* – 1983. – V. 102. – № 1. – P. 53–62.
67. Heaton, A. In vivo regeneration of red cell 2, 3-diphosphoglycerate following transfusion of DPG-depleted AS-1, AS-3 and CPDA-1 red cells / A. Heaton, T. Keegan, S. Holme // *Br. J. Haematol.* – 1989. – V. 71. – № 1. – P. 131–136.
68. Martinov, M. V. Deficiencies of glycolytic enzymes as a possible cause of hemolytic anemia / M. V. Martinov, A.G. Plotnikov, V.M. Vitvitsky, F.I. Ataullakhanov // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2000. – V. 1474. – № 1. – P. 75–87.
69. Эрлих, Л.И. Анализ с помощью математической модели связи дефицитов ферментов гликолиза с наследственными гемолитическими анемиями / Л.И. Эрлих, Ф.И. Атауллаханов // *Известия Академии Наук СССР. Серия Биологическая.* – 1985. – V. 5. – P. 754–766.
70. Robert, M. Multiparametric characterization of red blood cell physiology after hypotonic dialysis based drug encapsulation process / M. Robert, B. Laperrousaz, D. Piedrahita, E.F. Gautier, T. Nemkov, F. Dupuy, E. Nader, V. Salnot, P. Mayeux, A. D'Alessandro, C. Lavazec, P. Joly, A. Scheer, P. Connes, A. Cibiel // *Acta Pharm. Sin. B.* – 2022. – V. 12. – № 4. – P. 2089–2102.
71. Prudinnik, D.S. Filterability of Erythrocytes in Patients with COVID-19. / D.S. Prudinnik, E.I. Sinauridze, S.S. Shakhidzhanov, E.A. Bovt, D.N. Protsenko, A.G. Rumyantsev, F.I. Ataullakhanov // *Biomolecules.* – 2022. – V. 12. – № 6. – P. 782.
72. Sternberg, N. Surface-modified loaded human red blood cells for targeting and delivery of drugs / N. Sternberg, R. Georgieva, K. Duft, H. Bäumler // *J. Microencapsul.* – 2012. – V. 29. – P. 9–20.
73. Favretto, M.E. Human erythrocytes as drug carriers: Loading efficiency and side

effects of hypotonic dialysis, chlorpromazine treatment and fusion with liposomes / M.E. Favretto, J.C.A. Cluitmans, G.J.C.G.M. Bosman, R. Brock // *J. Control. Release.* – 2013. – V. 170. – № 3. – P. 343–351.

74. Sayyadipour, F. Red Blood Cells are Appropriate Carrier for Coagulation Factor VIII / F. Sayyadipour, N. Amirizadeh, A. Oodi, M. Khalili, F. Saba // *Cardiovasc. Hematol. Disord. Targets.* – 2019. – V. 20. – № 2. – P. 131–137.

75. Laczkó, J. Discocyte--echinocyte reversibility in blood stored in CPD over a period of 56 days. / J. Laczkó, C.J. Feó, W. Phillips // *Transfusion.* – 1979. – V. 19. – № 4. – P. 379–388.

76. Kravtsoff, R. Improved pharmacodynamics of L-asparaginase-loaded in human red blood cells. / R. Kravtsoff, I. Desbois, J.P. Lamagnere, J.P. Muh, C. Valat, M. Chassaigne, P. Colombat, C. Ropars // *Eur. J. Clin. Pharmacol.* – 1996. – V. 49. – № 6. – P. 465–470.

77. Castro, M. Long-term treatment with autologous red blood cells loaded with dexamethasone 21-phosphate in pediatric patients affected by steroid-dependent Crohn disease / M. Castro, L. Rossi, B. Papadatou, F. Bracci, D. Knafelz, M. Ambrosini, A. Calce, S. Serafini, G. Isacchi, F. D'Orio, G. Mambrini, M. Magnani // *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* – 2007. – V. 44. – P. 423–426.

78. Rossi, L. Erythrocyte-mediated delivery of dexamethasone in patients with chronic obstructive pulmonary disease. / L. Rossi, S. Serafini, L. Cenerini, F. Picardi, L. Bigi, I. Panzani, M. Magnani // *Biotechnol. Appl. Biochem.* – 2001. – V. 33. – № Pt 2. – P. 85–9.

79. Barshtein, G. Is It Possible to Reverse the Storage-Induced Lesion of Red Blood Cells? / G. Barshtein, D. Arbell, L. Livshits, A. Gural // *Front. Physiol.* – 2018. – V. 9. – P. 914.

80. Sparrow, R.L. Time to revisit red blood cell additive solutions and storage conditions: a role for “omics” analyses. / R.L. Sparrow // *Blood Transfus.* – 2012. – V. 10 Suppl 2. – № Suppl 2. – P. s7-11.

81. Koleva, L. Erythrocytes as carriers : from drug delivery to biosensors / L. Koleva, E.

Bovt, F. Ataullakhanov, E. Sinauridze // *Pharmaceutics*. – 2020. – V. 12. – № 3. – P. 276:1-276:44.

82. Brähler, M. Magnetite-loaded carrier erythrocytes as contrast agents for magnetic resonance imaging / M. Brähler, R. Georgieva, N. Buske, A. Müller, S. Müller, J. Pinkernelle, U. Teichgräber, A. Voigt, H. Bäumlner // *Nano Lett.* – 2006. – V. 6. – № 11. – P. 2505–2509.

83. Ferrauto, G. Lanthanide-loaded erythrocytes as highly sensitive chemical exchange saturation transfer MRI contrast agents / G. Ferrauto, D. Delli Castelli, E. Di Gregorio, S. Langereis, D. Burdinski, H. Grüll, E. Terreno, S. Aime // *J. Am. Chem. Soc.* – 2014. – V. 136. – № 2. – P. 638–641.

84. Pierigè, F. Reengineering red blood cells for cellular therapeutics and diagnostics / F. Pierigè, N. Bigini, L. Rossi, M. Magnani // *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* – 2017. – V. 9. – № 5. – P. e1454.

85. Kruse, C.A. Methotrexate loading of red cell carriers by osmotic stress and electric-pulse methods: ultrastructural observations. / C.A. Kruse, G.W. Mierau, G.T. James // *Biotechnol. Appl. Biochem.* – 1989. – V. 11. – № 6. – P. 571–580.

86. Kruse, C.A. Mouse erythrocyte carriers osmotically loaded with methotrexate. / C.A. Kruse, C.L. Freehauf, K.R. Patel, J.D. Baldeschwieler // *Biotechnol. Appl. Biochem.* – 1987. – V. 9. – № 2. – P. 123–140.

87. Lucas, A. Doxorubicin-loaded red blood cells reduced cardiac toxicity and preserved anticancer activity / A. Lucas, D. Lam, P. Cabrales // *Drug Deliv.* – 2019. – V. 26. – № 1. – P. 433–442.

88. Gasparini, A. Pharmacokinetics of Doxorubicin Loaded and Glutaraldehyde Treated Erythrocytes in Healthy and Lymphoma Bearing Dogs / A. Gasparini, M. Tonetti, B. Astroff, L. Rowe, W. Satterfield, R. Schmidt, J.R. DeLoach / под ред. M. Magnani, J.R. DeLoach. – Boston, MA: Springer US, 1992. – 299–304 с.

89. Ataullakhanov, F.I. Pharmacokinetics of doxorubicin in patients with lymphoproliferative disorders after infusion of doxorubicin-loaded erythrocytes / под

ред. U. Sprandel, J.L. Way. Boston, MA: Springer US, 1997. – 137–142с.

90. Skorokhod, O.A. Doxorubicin pharmacokinetics in lymphoma patients treated with doxorubicin-loaded erythrocytes / O.A. Skorokhod, E. V. Kulikova, N.M. Galkina, P. V. Medvedev, E.E. Zybunova, V.M. Vitvitsky, A. V. Pivnik, F.I. Ataulakhanov // *Haematologica*. – 2007. – V. 92. – № 4. – P. 570–571.

91. Trineeva, O. V. Study of Desorption and Exemption of Terpeno-indole Alkaloids of Vinkristin and Vinblastin from Erythrocytic Cell Carriers / O. V. Trineeva, A.D. Khalahakun // *Drug Dev. Regist.* – 2019. – V. 8. – № 2. – P. 16–21.

92. Тринеева, О.В. Изучение десорбции и высвобождения терпено-индольных алкалоидов винкристина и винбластина из эритроцитарных клеточных носителей / О.В. Тринеева, А.Д. Халахакун // *Поиск и разработка новых лекарственных средств*. – 2019. – V. 8. – № 2. – P. 16–21.

93. Халахакун, А.Д. Морфологические и физико - химические свойства эритроцитарных носителей , инкапсулированных терпеноиндольными алкалоидами / А.Д. Халахакун, А.И. Сливкин, П.М. Карлов, Е.Е. Чупандина // *Вестник ВГУ*. – 2017. – № 4. – P. 141–146.

94. Annese, V. Erythrocytes-mediated delivery of dexamethasone in steroid-dependent IBD patients-a pilot uncontrolled study. / V. Annese, A. Latiano, L. Rossi, G. Lombardi, B. Dallapiccola, S. Serafini, G. Damonte, A. Andriulli, M. Magnani // *Am. J. Gastroenterol.* – 2005. – V. 100. – № 6. – P. 1370–1375.

95. Rossi, L. Erythrocytes as pharmacological carriers for corticosteroids and other drugs in patients with inflammatory bowel diseases / L. Rossi, F. Pierigè, A. Andriulli, M. Magnani – , 2011. – 135–145 с.

96. Coker, S.A. A Study of the Pharmacokinetic Properties and the In Vivo Kinetics of Erythrocytes Loaded With Dexamethasone Sodium Phosphate in Healthy Volunteers / S.A. Coker, Z.M. Szczepiorkowski, A.H. Siegel, A. Ferrari, G. Mambrini, R. Anand, R.D. Hartman, L. Benatti, L.J. Dumont // *Transfus. Med. Rev.* – 2018. – V. 32. – № 2. – P. 102–110.

97. Исаев, В.Г. Применение иммобилизованных форм даунорубицина у больных острыми лейкозами / В.Г. Исаев, Г. Т.Ц., А.А. Скороход, Е.Н. Паровичникова, Н.Г. Тюрина, Р.А. Кучер, В.М. Витвицкий, Ф.И. Атауллаханов, В.Г. Савченко // *Терапевтический архив*. – 1999. – № 10. – P. 32–37.
98. Rossi, L. Low doses of dexamethasone constantly delivered by autologous erythrocytes slow the progression of lung disease in cystic fibrosis patients / L. Rossi, M. Castro, F. D’Orio, G. Damonte, S. Serafini, L. Bigi, I. Panzani, G. Novelli, B. Dallapiccola, S. Panunzi, P. Di Carlo, S. Bella, M. Magnani // *Blood Cells, Mol. Dis.* – 2004. – V. 33. – № 1. – P. 57–63.
99. Bossa, F. Erythrocytes-mediated Delivery of Dexamethasone 21-phosphate in Steroid-dependent Ulcerative Colitis: A Randomized, Double-blind Sham-controlled Study / F. Bossa, V. Annese, M.R. Valvano, A. Latiano, G. Martino, L. Rossi, M. Magnani, O. Palmieri, S. Serafini, G. Damonte, E. De Santo, A. Andriulli // *Inflamm. Bowel Dis.* – 2013. – V. 19. – № 9. – P. 1872–1879.
100. Castro, M. Periodic treatment with autologous erythrocytes loaded with dexamethasone 21-phosphate for fistulizing pediatric Crohn’s disease: Case report / M. Castro, D. Knafelz, L. Rossi, M.I. Ambrosini, B. Papadatou, G. Mambrini, M. Magnani // *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* – 2006. – V. 42. – № 3. – P. 313–315.
101. EryDel Announces Top-line Results from Phase 3 ATTeST Trial Demonstrating Significant Clinical Benefit of EryDex in Ataxia Telangiectasia [Электронный ресурс]. URL: <https://www.erydel.com/News/news-dettaglio.php?id=29>.
102. Chiarantini, L. Modulated red blood cell survival by membrane protein clustering / L. Chiarantini, L. Rossi, A. Fraternali, M. Magnani // *Mol. Cell. Biochem.* – 1995. – V. 144. – № 1. – P. 53–59.
103. Bratosin, D. Molecular mechanisms of erythrophagocytosis. Characterization of the senescent erythrocytes that are phagocytized by macrophages. / D. Bratosin, J. Mazurier, J.P. Tissier, C. Slomianny, J. Estaquier, F. Russo-Marie, J.J. Huart, J.M. Freyssinet, D. Aminoff, J.C. Ameisen, J. Montreuil // *C R Acad Sci III.* – 1997. – V. 320. – № 10. – P.

811–818.

104. Magnani, M. Red Blood Cells as Carriers of Drugs Against Retroviruses / M. Magnani, L. Rossi, L. Chiarantini, A. Fraternali, A. Casabianca / под ред. G. Gregoriadis, B. McCormack, G. Poste. – Boston, MA: Springer US, 1994. – 147–152 c.

105. Magnani, M. Feline Immunodeficiency Virus Infection of Macrophages: In Vitro and in Vivo Inhibition by Dideoxycytidine-5'-triphosphate-Loaded Erythrocytes / M. Magnani, L. Rossi, A. Fraternali, L. Silvotti, F. Quintavalla, G. Piedimonte, D. Matteucci, F. Baldinotti, M. Bendinelli // AIDS Res. Hum. Retroviruses. – 1994. – V. 10. – № 9. – P. 1179–1186.

106. Magnani, M. Inhibition of HIV-1 and LP-BM5 replication in macrophages by dideoxycytidine and dideoxycytidine 5'-triphosphate / M. Magnani, A. Casabianca, L. Rossi, A. Fraternali, G. Brandi, L. Silvotti, G. Piedimonte // Antivir. Chem. Chemother. – 1995. – V. 6. – № 5. – P. 312–319.

107. Franco, R. International seminar on the red blood cells as vehicles for drugs / R. Franco, E. Dufour, E. Kosenko, B.E. Bax, A. Banz, O.A. Skorokhod, M. Lanao, V. Vitvitsky, E. Sinauridze, V. Bourgeaux, K.C. Gunter // Expert Opin. Biol. Ther. – 2012. – V. 12. – № 1. – P. 127–133.

108. Rossi, L. Macrophage depletion induced by clodronate-loaded erythrocytes / L. Rossi, S. Serafini, A. Antonelli, F. Pierigé, A. Carnevali, V. Battistelli, M. Malatesta, E. Balestra, R. Calì, C.F. Perno, M. Magnani // J. Drug Target. – 2005. – V. 13. – № 2. – P. 99–111.

109. Sabatino, R. Macrophage depletion by free bisphosphonates and zoledronate-loaded red blood cells / R. Sabatino, A. Antonelli, S. Battistelli, R. Schwendener, M. Magnani, L. Rossi // PLoS One. – 2014. – V. 9. – № 6. – P. e101260.

110. Cremel, M. Innovative approach in Pompe disease therapy: induction of immune tolerance by antigen-encapsulated red blood cells / M. Cremel, N. Guerin, G. Campello, Q. Barthe, W. Berlier, F. Horand, Y. Godfrin // Int. J. Pharm. – 2015. – V. 491. – № 1–2.

– P. 69–77.

111. Cremel, M. Red blood cells as innovative antigen carrier to induce specific immune tolerance / M. Cremel, N. Guérin, F. Horand, A. Banz, Y. Godfrin // *Int. J. Pharm.* – 2013. – V. 443. – № 1–2. – P. 39–49.

112. Magnani, M. Red blood cells as an antigen-delivery system. / M. Magnani, L. Chiarantini, E. Vittoria, U. Mancini, L. Rossi, A. Fazi // *Biotechnol. Appl. Biochem.* – 1992. – V. 16. – № 2. – P. 188–194.

113. Chiarantini, L. Red blood cells as delivery system for recombinant HSV-1 glycoprotein B: immunogenicity and protection in mice / L. Chiarantini, R. Argnanit, S. Zucchinit, L. Stevanatot, M.P. Grossi, M. Magnani, R. Manservigi // *Vaccine.* – 1997. – V. 15. – № 3. – P. 276–280.

114. Dominici, S. Red blood cell-mediated delivery of recombinant HIV-1 Tat protein in mice induces anti-Tat neutralizing antibodies and CTL / S. Dominici, M.E. Laguardia, G. Serafini, L. Chiarantini, C. Fortini, A. Tripiciano, A. Scoglio, A. Caputo, V. Fiorelli, R. Gavioli, A. Cafaro, B. Ensoli, M. Magnani // *Vaccine.* – 2003. – V. 21. – P. 2082–2090.

115. Banz, A. In situ targeting of dendritic cells by antigen-loaded red blood cells: A novel approach to cancer immunotherapy / A. Banz, M. Cremel, A. Rembert, Y. Godfrin // *Vaccine.* – 2010. – V. 28. – № 17. – P. 2965–2972.

116. Banz, A. Tumor growth control using red blood cells as the antigen delivery system and poly(I: C) / A. Banz, M. Cremel, A. Mouvant, N. Guerin, F. Horand, Y. Godfrin // *J. Immunother.* – 2012. – V. 35. – № 5. – P. 409–417.

117. Rytting, M. Toxicities in Adults with Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) Treated with Regimens Using Pegasparaginase. / M. Rytting, M. Earl, D. Douer, B. Muriera, A. Advani, A. Bleyer // *Blood.* – 2008. – V. 112. – № 11. – P. 1924 LP – 1924.

118. Rizzaria, C. Optimizing asparaginase therapy for acute lymphoblastic leukemia / C. Rizzaria, V. Contera, J. Stary, A. Colombinia, A. Moerickec, M. Schrappe // *Curr Opin Oncol.* – 2013. – V. 25. – № Suppl 1. – P. S1–S9.

119. Борсакова, Д.В. L-аспарагиназа: новые подходы к улучшению фармакологических свойств / Д.В. Борсакова, Е.И. Синауридзе // Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. – 2018. – V. 17. – № 4. – P. 82–99.
120. Вак, В.Е. A 9-yr evaluation of carrier erythrocyte encapsulated adenosine deaminase (ADA) therapy in a patient with adult-type ADA deficiency / В.Е. Вак, М.Д. Бейн, Л.Д. Фэйрбанкс, А.Д.В. Вебстер, Р.В. Инд, М.С. Хершфилд, Р.А. Чалмерс // Eur. J. Haematol. – 2007. – V. 79. – № 4. – P. 338–348.
121. Вак, В.Е. In vitro and in vivo studies with human carrier erythrocytes loaded with polyethylene glycol-conjugated and native adenosine deaminase / В.Е. Вак, М.Д. Бейн, Л.Д. Фэйрбанкс, Р.А. Чалмерс, А.Д.В. Вебстер // Br. J. Haematol. – 2000. – V. 109. – № 3. – P. 549–554.
122. Вак, В.Е. Clinical and biochemical improvements in a patient with MNGIE following enzyme replacement. / В.Е. Вак, М.Д. Бейн, М. Скарпелли, М. Филосто, Р. Тонин, Н. Моран // Neurology. – 2013. – V. 81. – № 14. – P. 1269–71.
123. Флинн, А.М. Adenosine deaminase deficiency : a review / А.М. Флинн, А.Р. Геннери // Orphanet J. Rare Dis. – 2018. – V. 13. – № 1. – P. 65–72.
124. Гаспар, В. Pegademase bovine (PEG-ADA) for the treatment of infants and children with severe combined immunodeficiency (SCID) / В. Гаспар, С. Бутх // Biol. Targets Ther. – 2009. – V. 3. – P. 349.
125. Ломбес, Д.А. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy [Электронный ресурс]. URL: https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Lng=GB&Expert=298.
126. Халтер, Ж. Allogeneic hematopoietic SCT as treatment option for patients with mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE): a consensus conference proposal for a standardized approach. / Ж. Халтер, В. Шупбах, С. Касали, Р. Эльхасид, К. Фэй, С. Хамманс, И. Илла, Л. Кэппелер, С. Крахенбухл, Т. Лехманн, Н. Мандел, Р. Марти, Н. Маттле, К. Орчард, Д. Сэвэдж, С.М. Сюэ, Д. Валькарсел, А.

- Gratwohl, M. Hirano // *Bone Marrow Transplant.* – 2011. – V. 46. – № 3. – P. 330–337.
127. Filosto, M. Course and management of allogeneic stem cell transplantation in patients with mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. / M. Filosto, M. Scarpelli, P. Tonin, G. Lucchini, F. Pavan, F. Santus, R. Parini, M.A. Donati, M.S. Cotelli, V. Vielmi, A. Todeschini, F. Canonico, G. Tomelleri, A. Padovani, A. Rovelli // *J. Neurol.* – 2012. – V. 259. – № 12. – P. 2699–2706.
128. Rossi, L. Prolonged islet allograft survival in diabetic mice upon macrophage depletion by clodronate-loaded erythrocytes / L. Rossi, B. Migliavacca, F. Pierigé, S. Serafini, F. Sanvito, S. Olivieri, R. Nano, B. Antonioli, M. Magnani, F. Bertuzzi // *Transplantation.* – 2008. – V. 85. – № 4. – P. 648–650.
129. Trial of Erythrocyte Encapsulated Thymidine Phosphorylase In Mitochondrial Neurogastrointestinal Encephalomyopathy (TEETPIM) [Электронный ресурс]. URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03866954>.
130. Bax, B. Erythrocyte Encapsulated Thymidine Phosphorylase for the Treatment of Patients with Mitochondrial Neurogastrointestinal Encephalomyopathy: Study Protocol for a Multi-Centre, Multiple Dose, Open Label Trial / B. Bax, M. Levene, M.D. Bain, L.D. Fairbanks, M. Filosto, S.K. Uçar, T. Klopstock, C. Kornblum, H. Mandel, S. Rahman, A. Roubertie, M. Scarpelli, P.M. Sedgwick, M. Baru, M. Sellos, N. Nirmalanathan // *J. Clin. Med.* – 2019. – V. 8. – № 8. – P. 1096.
131. Filosto, M. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE-MTDPS1) / M. Filosto, S.C. Piccinelli, F. Caria, S.G. Cassarino, E. Baldelli, A. Galvagni, I. Volonghi, M. Scarpelli and, A. Padovani // *J. Clin. Med.* – 2018. – V. 7. – № 11. – P. 389:1-389:13.
132. Humphreys, J.D. Enhanced stability of erythrocyte-entrapped glucocerebrosidase activity. / J.D. Humphreys, G.M. Ihler // *J. Lab. Clin. Med.* – 1980. – V. 96. – № 4. – P. 682–692.
133. Thorpe, S.R. Enzyme therapy. V. In vivo fate of erythrocyte-entrapped β -glucuronidase in β -glucuronidase-deficient mice / S.R. Thorpe, M.B. Fiddler, R.J.

Desnick // *Pediatr. Res.* – 1975. – V. 9. – № 12. – P. 918–923.

134. Godfrin, Y. Composition of erythrocytes encapsulating phenylalanine hydroxylase and therapeutic use thereof / Y. Godfrin, E. Dufour, S.H. Cheng, N.S. Yew – 2016. – P. 7.

135. Yew, N.S. Erythrocytes encapsulated with phenylalanine hydroxylase exhibit improved pharmacokinetics and lowered plasma phenylalanine levels in normal mice / N.S. Yew, E. Dufour, M. Przybylska, J. Putelat, C. Crawley, M. Foster, S. Gentry, D. Reczek, A. Kloss, A. Meyzaud, F. Horand, S.H. Cheng, Y. Godfrin // *Mol. Genet. Metab.* – 2013. – V. 109. – № 4. – P. 339–344.

136. Fernandes, H.S. Amino acid deprivation using enzymes as a targeted therapy for cancer and viral infections / H.S. Fernandes, C.S. Silva Teixeira, P.A. Fernandes, M.J. Ramos, N.M.F.S.A. Cerqueira // *Expert Opin. Ther. Pat.* – 2017. – V. 27. – № 3. – P. 283–297.

137. Sénéchal, K. Erymethionase (methionine-gamma-lyase encapsulated into red blood cells) potentiates anti-PD-1 therapy in TNBC syngeneic mouse model [abstract]. / K. Sénéchal, S. Maubant, M. Leblanc, S. Ciré, F. Gallix, A. Andrivon, D. Olivier, Fabrice, H. Françoise, A. Scheer, V. Bourdoux // *Proc. Am. Assoc. Cancer Res. Annu. Meet. 2019; Atlanta, GA. Philadelphia AACR; Cancer Res.* – 2019. – V. 79. – № 13 Suppl. – P. Abstract nr 2258.

138. Rytting, M.E. Role of L-asparaginase in acute lymphoblastic leukemia: focus on adult patients / M.E. Rytting // *Blood Lymphat. Cancer Targets Ther.* – 2012. – V. 2. – P. 117–124.

139. Rowe, J.M. Induction therapy for adults with acute lymphoblastic leukemia: results of more than 1500 patients from the international ALL trial: MRC UKALL XII/ECOG E2993. / J.M. Rowe, G. Buck, A.K. Burnett, R. Chopra, P.H. Wiernik, S.M. Richards, H.M. Lazarus, I.M. Franklin, M.R. Litzow, N. Ciobanu, H.G. Prentice, J. Durrant, M.S. Tallman, A.H. Goldstone // *Blood.* – 2005. – V. 106. – № 12. – P. 3760–3767.

140. Asselin, B.L. Comparative pharmacokinetic studies of three asparaginase

preparations. / B.L. Asselin, J.C. Whitin, D.J. Coppola, I.P. Rupp, S.E. Sallan, H.J. Cohen // *J. Clin. Oncol.* – 1993. – V. 11. – № 9. – P. 1780–1786.

141. Batool, T. A Comprehensive Review on L-Asparaginase and Its Applications / T. Batool, E.A. Makky, M. Jalal, M.M. Yusoff // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2016. – V. 178. – № 5. – P. 900–923.

142. Minetto, P. Patient and therapy-related factors affecting the toxicity of pegylated-asparaginase for the treatment of adult acute lymphoblastic leukemia / P. Minetto, N. Bisso, F. Guolo, M. Clavio, E. Coviello, D. Guardo, F. Ballerini, M. Miglino, R.M. Lemoli, M. Gobbi // *Blood.* – 2017. – V. 130. – № Suppl 1. – P. 1297.

143. Agrawal, V. Red blood cell-encapsulated L-asparaginase: potential therapy of patients with asparagine synthetase deficient acute myeloid leukemia. / V. Agrawal, J.H. Woo, G. Borthakur, H. Kantarjian, A.E. Frankel // *Protein Pept. Lett.* – 2013. – V. 20. – № 4. – P. 392–402.

144. Hunault-Berger, M. A Phase 2 study of L-asparaginase encapsulated in erythrocytes in elderly patients with Philadelphia chromosome negative acute lymphoblastic leukemia: The GRASPALL/GRAALL-SA2-2008 study / M. Hunault-Berger, T. Leguay, F. Huguet, S. Leprêtre, E. Deconinck, M. Ojeda-Uribe, C. Bonmati, M. Escoffre-Barbe, P. Bories, C. Hemberlin, P. Chevallier, P. Rousselot, O. Reman, M.L. Boulland, S. Lissandre, P. Turlure, D. Bouscary, L. Sanhes, O. Legrand, M. Lafage-Pochitaloff, M.C. Béné, D. Liens, Y. Godfrin, N. Ifrah, H. Dombret // *Am. J. Hematol.* – 2015. – V. 90. – № 9. – P. 811–818.

145. Baruchel, A. Updated clinical activity of GRASPA versus native L-asparaginase in combination with coprall regimen in phase 3 randomized trial in patients with relapsed acute lymphoblastic leukemia / A. Baruchel, Y. Bertrand, X. Thomas, N. Blin, E. Tavernier, S. Ducassou, N. Vey, V. Gandemer, V. Cacheux, F. Mazingue, E. Raffoux, G. PLAT, J. Fernandes, P. Maryline, L. Fornecker, J.-L. Stephan, M. Hunault, A. Auvrignon, T. Leguay, D. Plantaz, S. Lepretre, A. Ferster, I. Pellier, E. Plouvier, C. Schmitt, C. Bonin, I. El Hariry // *Blood.* – 2015. – V. 126. – № 23. – P. 3723.

146. Hammel, P. Trybeca-1: A randomized, phase 3 study of eryaspase in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone as second-line treatment in patients with advanced pancreatic adenocarcinoma (NCT03665441). / P. Hammel, I. El-Hariry, T. Macarulla, R. Garcia-Carbonero, J.-P. Metges, O. Bouché, F. Portales, R.A. Pazo Cid, L. Mineur, A.M. Cubillo Gracian, I. Trouilloud, R. Guimbaud, D. Tougeron, J.J. Reina Zoilo, J. Feliu, T. Sauri, C. Fountzilas, R. Kay, H. Youssoufian, M. Hidalgo // *J. Clin. Oncol.* – 2022. – V. 40. – № 4_suppl. – P. 518.
147. Bachet, J. Asparagine synthetase expression and phase I study with L -asparaginase encapsulated in red blood cells in patients with pancreatic adenocarcinoma / J. Bachet, F. Gay, R. Maréchal, M. Galais, A. Adenis, D. Salako, J. Cros, P. Demetter, M. Svrcek, A. Bardier-dupas, J. Emile, P. Hammel, C. Ebenezer, W. Berlier, Y. Godfrin, T. André // *Pancreas.* – 2015. – V. 44. – № 7. – P. 1141–1147.
148. Awada, A.H. 381TiP - TRYbeCA-2: A randomized phase II/III study of eryaspase in combination with gemcitabine and carboplatin chemotherapy versus chemotherapy alone as first-line treatment in patients with metastatic or locally recurrent triple-negative breast cancer / A.H. Awada, J. Cortés, S. Slater, I. Macpherson, T. Csoszi, J.-B. Bertrand, A.-S. Clermont, R. Pollard, R. Chrestia-Blanchine, N. Biswas-Baldwin, H. Youssoufian, I. El-Hariry // *Ann. Oncol.* – 2019. – V. 30. – P. v138.
149. Атауллаханов, Ф.И. Проницаемость Человеческих Эритроцитов Для Аспарагина // *Биохимия.* – 1985. – Т. 50. – № 10. – 1733–1737с.
150. Auron, A. Hyperammonemia in review: Pathophysiology, diagnosis, and treatment / A. Auron, P.D. Brophy // *Pediatr. Nephrol.* – 2012. – V. 27. – № 2. – P. 207–222.
151. Sushma, S. Sodium benzoate in the treatment of acute hepatic encephalopathy: a double-blind randomized trial. / S. Sushma, S. Dasarathy, R.K. Tandon, S. Jain, S. Gupta, M.S. Bhist // *Hepatology.* – 1992. – V. 16. – № 1. – P. 138–144.
152. Honda, S. Successful treatment of severe hyperammonemia using sodium phenylacetate powder prepared in hospital pharmacy. / S. Honda, K. Yamamoto, M. Sekizuka, Y. Oshima, K. Nagai, G. Hashimoto, H. Kaneko, T. Tomomasa, Y. Konno, R.

Horiuchi // Biol. Pharm. Bull. – 2002. – V. 25. – № 9. – P. 1244–1246.

153. Kircheis, G. Therapeutic efficacy of L-ornithine-L-aspartate infusions in patients with cirrhosis and hepatic encephalopathy: results of a placebo-controlled, double-blind study. / G. Kircheis, R. Nilius, C. Held, H. Berndt, M. Buchner, R. Görtelmeyer, R. Hendricks, B. Krüger, B. Kuklinski, H. Meister, H.J. Otto, C. Rink, W. Rösch, S. Stauch // Hepatology. – 1997. – V. 25. – № 6. – P. 1351–1360.

154. Sanz, S. In vitro and in vivo study of glutamate dehydrogenase encapsulated into mouse erythrocytes by a hypotonic dialysis procedure / S. Sanz, C. Lizano, J. Luque, M. Pinilla // Life Sci. – 1999. – V. 65. – № 26. – P. 2781–2789.

155. Sanz, S. Biochemical Properties of Alcohol Dehydrogenase and Glutamate Dehydrogenase Encapsulated into Human Erythrocytes by a Hypotonic-Dialysis Procedure, 1997. – 101–108c.

156. Venediktova, N.I. Studies on ammocytes: Development, metabolic characteristics, and detoxication of ammonium / N.I. Venediktova, E.A. Kosenko, Y.G. Kaminsky // Bull. Exp. Biol. Med. – 2008. – V. 146. – № 12. – P. 730–732.

157. Kosenko, E.A. Encapsulation of glutamine synthetase in mouse erythrocytes: a new procedure for ammonia detoxification / E.A. Kosenko, N.I. Venediktova, A.A. Kudryavtsev, F.I. Ataulakhanov, Y.G. Kaminsky, V. Felipo, C. Montoliu // Biochem. Cell Biol. – 2008. – V. 86. – № 6. – P. 469–476.

158. Protasov, E.S. Erythrocytes as bioreactors to decrease excess ammonium concentration in blood / E.S. Protasov, D. V. Borsakova, Y.G. Alexandrovich, A. V. Korotkov, E.A. Kosenko, A.A. Butylin, F.I. Ataulakhanov, E.I. Sinauridze // Sci. Rep. – 2019. – V. 9. – № 1. – P. 1455.

159. Alexandrovich, Y.G. Rapid Elimination of Blood Alcohol Using Erythrocytes: Mathematical Modeling and In Vitro Study / Y.G. Alexandrovich, E.A. Kosenko, E.I. Sinauridze, S.I. Obydennyi, I.I. Kireev, F.I. Ataulakhanov, Y.G. Kaminsky // Biomed Res. Int. – 2017. – V. 2017. – P. 14.

160. Борсакова, Д.В. Способы повышения активности глутаматдегидрогеназы в

эритроцитах-биореакторах для удаления аммония / Д.В. Борсакова, Е.С. Протасов, С.В. Назаренко, Ю.Г. Александрович, А.А. Бутылин, Ф.И. Атауллаханов, Е.И. Синауридзе // Биологические мембраны. – 2019. – V. 36. – № 3. – P. 192–206.

161. Santero, E. Glutamate Dehydrogenases: Enzymology, Physiological Role and Biotechnological Relevance , 2012. – 289–318с.

162. Shimizu H. Purification and some properties of glutamate dehydrogenase from *Proteus inconstans* / Shimizu H., K. T., H. F. // J. Ferment. Technol. – 2012. – V. 57. – № 5. – P. 428–433.

163. Sanz, S. The influence of enzyme concentration on the encapsulation of glutamate dehydrogenase and alcohol dehydrogenase in red blood cells. / S. Sanz, M. Pinilla, M. Garin, K.F. Tipton, J. Luque // Biotechnol. Appl. Biochem. – 1995. – V. 22. – № 2. – P. 223–231.

164. Bang, F. Инструкция “Картриджи Endosafe PTS. Лизат амебоцитов *Limulus*.” / F. Bang – 1–6 с.

165. Lanvers, C. Analytical validation of a microplate reader-based method for the therapeutic drug monitoring of L-asparaginase in human serum. / C. Lanvers, J.P. Vieira Pinheiro, G. Hempel, G. Wuerthwein, J. Boos // Anal. Biochem. – 2002. – V. 309. – № 1. – P. 117–126.

166. Frear, D.S. Spectrophotometric Method for Determining Hydroxylamine Reductase Activity in Higher Plants / D.S. Frear, R.C. Burrell // Anal. Chem. – 1955. – V. 27. – № 10. – P. 1664–1665.

167. Toyobo. Ideas and chemistry L-Glutamic Dehydrogenase (NADP) from *Proteus* sp [Электронный ресурс]. URL: https://www.toyobo-global.com/seihin/xr/enzyme/enzyme_list/GTD_209_309/pdf/GTD_209_309.pdf.

168. L-Glutamic Dehydrogenase (NADP) from *Proteus* sp// Sigma-Aldrich [Электронный ресурс]. URL: <https://www.sigmaaldrich.com/RU/en/product/sigma/g4387>.

169. Bergmeyer, H.-U. Approved recommendation (1985) on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 3. IFCC method for alanine aminotransferase (L-alanine: 2-oxoglutarate aminotransferase, EC 2.6.1.2) / H.-U. Bergmeyer, M. Horder, R. Rej // *Clin. Chem. Clin. Biochem.* – 1986. – V. 24. – P. 481–495.
170. Nazar, B.L. An improved microfluorometric enzymatic assay for the determination of ammonia / B.L. Nazar, A.C. Schoolwerth // *Anal. Biochem.* – 1979. – V. 95. – № 2. – P. 507–511.
171. Lloyd, B. Enzymic fluorometric continuous-flow assays for blood glucose, lactate, pyruvate, alanine, glycerol, and 3-hydroxybutyrate. / B. Lloyd, J. Burrin, P. Smythe, K.G. Alberti // *Clin. Chem.* – 1978. – V. 24. – № 10. – P. 1724–1729.
172. Lisovskaya, I.L. Determination of the content of nonfilterable cells in erythrocyte suspensions as a function of the medium osmolality / I.L. Lisovskaya, E.S. Shurkhina, V.M. Nesterenko, J.M. Rozenberg, F.I. Ataulakhanov // *Biorheology.* – 1998. – V. 35. – № 2. – P. 141–153.
173. Shcherbachenko, I.M. Oxidation-induced calcium-dependent dehydration of normal human red blood cells / I.M. Shcherbachenko, I.L. Lisovskaya, V.P. Tikhonov // *Free Radic. Res.* – 2007. – V. 41. – № 5. – P. 536–545.
174. Bergmeyer, H.U. L-aspartate and L-asparagine / H.U. Bergmeyer, E. Bernt, H. Mollering, G. Pfeleiderer – , 1974. Вых. 4 – 1696–1700 с.
175. Ktvtzoff, R. Immunological Response to L-Asparaginase Loaded into Red Blood Cells Boston, MA, United States: Springer US, 1992. – 175–182с.
176. Kravtsoff, R. Tolerance evaluation of L-asparaginase loaded in red blood cells. / R. Kravtsoff, P.H. Colombat, I. Desbois, C. Linassier, J.P. Muh, T. Philip, J.Y. Blay, M. Gardenbas, P. Poumier-Gaschard, J.P. Lamagnere, M. Chassaigne, C. Ropars // *Eur. J. Clin. Pharmacol.* – 1996. – V. 51. – № 3–4. – P. 221–225.
177. Borsakova, D. V. Comparative methodological studies of L-asparaginase encapsulation into erythrocytes / D. V. Borsakova, M.E. Plakhotnik, L.D. Koleva, E.A.

Bovt, Y.G. Alexandrovich, F.I. Ataulakhanov, E.I. Sinauridze // *Oncohematology*. – 2018. – V. 13. – № 3. – P. 91–101.

178. Шевченко, Ю.Л. Приказ Минздрава РФ от 25 ноября 2002 г . № 363 " Об утверждении Инструкции по применению компонентов крови " Инструкция по применению компонентов крови утв . приказом Минздрава РФ от 2002 / Ю.Л. Шевченко – 2002.

179. Атауллаханов, Ф.И. Устройство для включения биологически активных компонентов в эритроциты способом проточного диализа / Ф.И. Атауллаханов, Д.В. Борсакова, Е.А. Бовт, А.Д. Даниелян, А.М. Зейналов, Л. Колева, Н.С. Кушнир, Е.С. Протасов, Е.И. Синауридзе, А.С. Суворова – 2022.

180. Технический регламент о требованиях безопасности крови, ее продуктов, кровезамещающих растворов и технических средств, используемых в трансфузионно-инфузионной терапии: утвержден Правительством Российской Федерации от 26. 01. 2010 г. № 29. / // Стандартиформ. – 2010. – P. 19.

181. Pieters, R. L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia: a focus on Erwinia asparaginase. / R. Pieters, S.P. Hunger, J. Boos, C. Rizzari, L. Silverman, A. Baruchel, N. Goekbuget, M. Schrappe, C.-H. Pui // *Cancer*. – 2011. – V. 117. – № 2. – P. 238–249.

182. Kravtsoff, R. In vivo activity of L-asparaginase entrapped into human and mouse red blood cells / R. Kravtsoff, I. Desbois, M. Chassaigne, J. Muh, J. Lamagnere, P. Colombat, C. Ropars // *Adv Biosci*. – 1991. – V. 81. – P. 127–139.

183. Halfon-Domenech, C. l-asparaginase loaded red blood cells in refractory or relapsing acute lymphoblastic leukaemia in children and adults: Results of the GRASPALL 2005-01 randomized trial / C. Halfon-Domenech, X. Thomas, S. Chabaud, A. Baruchel, F. Gueyffier, F. Mazingue, A. Auvrignon, S. Corm, H. Dombret, P. Chevallier, C. Galambrun, F. Huguet, F. Legrand, F. Mechinaud, N. Vey, I. Philip, D. Liens, Y. Godfrin, D. Rigal, Y. Bertrand // *Br. J. Haematol*. – 2011. – V. 153. – № 1. – P. 58–65.

184. Мамбрини, Д. Способ получения эритроцитов, нагруженных одним или

несколькими веществами, представляющими фармацевтический интерес, и полученные таким образом эритроциты (EryDel SpA, Italy) / Д. Мамбрини, Л. Бенатти, Д. Капогресси, М. Мандолини – 2014.

185. Godfrin, Y. Lysis / resealing process and device for incorporating an active ingredient , in particular asparaginase or inositol hexaphosphate , in erythrocytes / Y. Godfrin – 2019. – P. 22.

186. Lizano, C. In vitro study of alcohol dehydrogenase and acetaldehyde dehydrogenase encapsulated into human erythrocytes by an electroporation procedure / C. Lizano, S. Sanz, J. Luque, M. Pinilla // *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* – 1998. – V. 1425. – № 2. – P. 328–336.

187. Borsakova, D. V Ammonium removal by erythrocyte-bioreactors based on glutamate dehydrogenase from *Proteus* sp. jointly with porcine heart alanine aminotransferase / D. V Borsakova, L.D. Koleva, E.S. Protasov, F.I. Ataulakhanov, E.I. Sinauridze // *Sci. Rep.* – 2022. – V. 12. – № 1. – P. 5437.

188. Kravtsoff, R. Erythrocytes as carriers for L-asparaginase. Methodological and mouse in-vivo studies. / R. Kravtsoff, C. Ropars, M. Laguerre, J.P. Muh, M. Chassaigne // *J. Pharm. Pharmacol.* – 1990. – V. 42. – № 7. – P. 473–476.

189. Protasov, E. Theoretical analysis of the built-in metabolic pathway effect on the metabolism of erythrocyte-bioreactors that neutralize ammonium / E. Protasov, L. Koleva, E. Bovt, F.I. Ataulakhanov, E. Sinauridze // *Metabolites.* – 2021. – V. 11. – № 1. – P. 1–12.

190. Winter, C.G. Migration of amino acids across the membrane of the human erythrocyte / C.G. Winter, H.N. Christensen // *J. Biol. Chem.* – 1964. – V. 239. – P. 872–878.

191. Young, J.D. Amino Acid Transport in Human and in Sheep Erythrocytes / J.D. Young, S.E.M. Jones, J.C. Ellory // *Proc. R. Soc. London. Ser. B, Biol. Sci.* – 1980. – V. 209. – № 1176. – P. 355–375.

192. Whillier, S. Glutamine and alpha-ketoglutarate as glutamate sources for glutathione

synthesis in human erythrocytes. / S. Whillier, B. Garcia, B.E. Chapman, P.W. Kuchel, J.E. Raftos // FEBS J. – 2011. – V. 278. – № 17. – P. 3152–3163.

193. Ellinger, J.J. Role of aminotransferases in glutamate metabolism of human erythrocytes / J.J. Ellinger, I.A. Lewis, J.L. Markley // J. Biomol. NMR. – 2011. – V. 49. – № 3–4. – P. 221–229.

БЛАГОДАРНОСТИ

Хочу выразить глубочайшую благодарность моему научному руководителю Елене Ивановне Синауридзе и руководителю нашего отдела биофизики и системной биологии НМИЦ ДГОИ им. Рогачева — Фазоилу Иноятовичу Атауллаханову за всестороннюю помощь с постановкой задач и обсуждение результатов. Выражаю особую благодарность моим коллегам Борсаковой Д.В., Бовт Е.А., Протасову Е.С., Кушнир Н. С. и Даниелян А.Д. за участие и помощь в работе. Также благодарю коллектив врачей НМИЦ ДГОИ им. Рогачева за сотрудничество в пилотных клинических испытаниях, в частности Масчана А.А., Трахтмана П.Е., Шифрина Ю.А., Алексеева М.А., Богоявленскую А.А., Старостина Н.Н.