

## Способ иммобилизации гиалуронидазы для получения пероральной лекарственной формы

А.М. Швецова<sup>1</sup>, К.И. Ершов<sup>1,2</sup>, М.А. Королев<sup>1</sup>, П.Г. Мадонов<sup>1,2</sup>, Л.В. Трубина<sup>3</sup>

<sup>1</sup> НИИ клинической и экспериментальной лимфологии – филиал ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН  
630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

<sup>2</sup> Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России  
630091, г. Новосибирск, Красный пр., 52

<sup>3</sup> Омский государственный медицинский университет Минздрава России  
644099, г. Омск, ул. Ленина, 12

### Резюме

Гиалуронидаза – фермент, который способствует поддержанию оптимального баланса гиалуроновой кислоты в соединительной ткани и обеспечивает полноценную регенерацию тканей. В настоящее время лекарственные препараты гиалуронидазы используют в различных областях медицины. Между тем пероральных препаратов на ее основе на фармацевтическом рынке нет ввиду низкой биодоступности при данном способе введения. Одним из вариантов повышения биодоступности гиалуронидазы является электронно-лучевое пегилирование, которое предполагает получение лекарственных средств, у которых изменен фармакокинетический профиль в сторону увеличения энтеральной биодоступности, а также обладающих дополнительной защитой от действия протеолитических ферментов. Цель исследования – используя метод электронно-лучевого пегилирования, получить лабораторную партию препарата на основе высокоочищенной гиалуронидазы, которую в дальнейшем можно использовать при разработке перорального лекарственного препарата. **Материал и методы.** Использовали гиалуронидазу, которая была выделена из бычьей тестикулярной гиалуронидазы, и полиэтиленгликоли разной молекулярной массы. Проведены эксперименты с использованием импульсного линейного ускорителя ИЛУ-10 по электронно-лучевой иммобилизации фермента на водорастворимой полимерной матрице молекул полиэтиленгликолей. Образование конъюгатов гиалуронидазы и полиэтиленгликолей подтверждали методом эксклюзионной хроматографии. **Результаты.** В результате облучения ускоренными электронами гиалуронидазы и полиэтиленгликоля молекулярной массой 1500 Да образовывались конъюгаты фермента и полимерной матрицы. После электронно-лучевого пегилирования специфическая активность фермента сохранялась. **Заключение.** Получена лабораторная партия прототипа фармацевтической субстанции на основе иммобилизированной гиалуронидазы на полиэтиленгликоле.

**Ключевые слова:** гиалуронидаза, полиэтиленгликоль, электронно-лучевое пегилирование.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Автор для переписки:** Швецова А.М., e-mail: aleksa-2904@mail.ru

**Для цитирования:** Швецова А.М., Ершов К.И., Королев М.А., Мадонов П.Г., Трубина Л.В. Способ иммобилизации гиалуронидазы для получения пероральной лекарственной формы. *Сибирский научный медицинский журнал.* 2024;44(2):73–79. doi: 10.18699/SSMJ20240209

## Method of hyaluronidase immobilization to produce an oral dosage form

A.M. Shvetsova<sup>1</sup>, K.I. Ershov<sup>1,2</sup>, M.A. Korolev<sup>1</sup>, P.G. Madonov<sup>1,2</sup>, L.V. Trubina<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics of SB RAS  
630060, Novosibirsk, Timakova st., 2

<sup>2</sup> Novosibirsk State Medical University of Minzdrav of Russia  
630091, Novosibirsk, Krasny ave., 52

<sup>3</sup> Omsk State Medical University of Minzdrav of Russia  
644099, Omsk, Lenina st., 12

## Abstract

Hyaluronidase is an enzyme that helps maintain an optimal balance of hyaluronic acid in connective tissue and ensures full tissue regeneration. Currently, hyaluronidase drugs are used in various fields of medicine. Meanwhile, there are no oral preparations based on hyaluronidase on the pharmaceutical market due to its low bioavailability in this method of administration. One of the options to increase enzyme bioavailability is electron-beam pegylation, which involves obtaining drugs with a modified pharmacokinetic profile in the direction of increasing enteral bioavailability, as well as having additional protection from the action of proteolytic enzymes. Aim of the study was using the electron beam pegylation method to obtain a laboratory batch of a preparation based on highly purified hyaluronidase, which can be further used in the development of an oral drug product. **Material and methods.** Hyaluronidase, which was isolated from bovine testicular hyaluronidase and polyethylene glycols of different molecular weight, was used in the experimental study. Experiments were carried out using a pulsed linear accelerator ILU-10 for enzyme electron beam immobilization on a water-soluble polymer matrix of polyethylene glycol molecules. The formation of hyaluronidase and polyethylene glycols conjugates was confirmed by exclusion chromatography. **Results.** As a result of accelerated electron irradiation of hyaluronidase and polyethylene glycol of molecular mass 1500 Da conjugates of enzyme and polymer matrix were formed. After electron-beam pegylation, the specific activity of the enzyme was retained. **Conclusions.** A laboratory batch of prototype pharmaceutical substance based on immobilised hyaluronidase on polyethylene glycol was obtained.

**Key words:** hyaluronidase, polyethylene glycol, electron beam pegylation.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Correspondence author:** Shvetsova A.M., e-mail: aleksa-2904@mail.ru

**Citation:** Shvetsova A.M., Ershov K.I., Korolev M.A., Madonov P.G., Trubina L.V. Method of hyaluronidase immobilization to produce an oral dosage form. *Sibirskij nauchnyj medicinskij zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2024;44(2):73–79. [In Russian]. doi: 10.18699/SSMJ2024020

## Введение

Гиалуронидаза (гиалуронат-эндо- $\beta$ -N-ацетилгексозаминидаза) представляет собой группу ферментов, вызывающих распад гиалуроновой кислоты (гликозаминогликан, входящий в состав межклеточного матрикса тканей, гликокаликса клеток и рецепторов к разнообразным биологически активным веществам [1]) до глюкозамина глюкуроновой кислоты, что способствует снижению ее вязкости и увеличению проницаемости тканей для жидкостей, которым облегчается движение в межтканевых пространствах. Гиалуронидаза относится к тестикулярной гиалуронидазе и проявляет свою ферментативную активность в диапазоне pH 4,0–7,0, способствует поддержанию оптимального баланса гиалуроновой кислоты в соединительных тканях [2]. В настоящее время гиалуронидаза применяется только в виде инъекций и свечей. Известен также препарат конъюгированной гиалуронидазы – лонгидаза (гиалуронидаза + водорастворимый катионный полимер азоксимер), выпускающийся в виде флаконов для парентерального введения и суппозиторий [3]. Зарегистрированных средств на основе гиалуронидазы, применяемой *per os*, в данное время нет. Это обстоятельство инициирует проведение экспериментальных исследований по созданию пероральной готовой лекарственной формы гиалуронидазы.

В мире накоплен опыт по получению конъюгатов лекарственных веществ путем присо-

единения инертной молекулы полиэтиленгликоля (ПЭГ), у которых улучшен профиль фармакокинетики, переносимости, а также обладающих дополнительной защитой от действия протеолитических ферментов [4–8]. ПЭГ – нетоксичные водорастворимые полимеры, представленные в виде образцов с широким набором молекулярной массы. Важным преимуществом ПЭГ по сравнению с другими гидрофильными полимерами является расположение реакционных групп на концах цепи, что обеспечивает получение телехеликов – производных со строго определенной локализацией функциональных групп [9]. Показаны способы иммобилизации белков посредством химического пегилирования для увеличения конечной молекулярной массы лекарственного препарата с целью снижения его фильтрации через клубочковый аппарат почки. Примером является химически пегилированный интерферон альфа-2а (пегасис, F. Hoffmann-La Roche Ltd, Швейцария), представляющий собой концевой химический конъюгат белка и ПЭГ с молекулярной массой 40 кДа. Химическое пегилирование существенно улучшило фармакокинетический профиль интерферона при парентеральном введении и не предполагает преодоление гистогематических барьеров для обеспечения энтеральной абсорбции.

Электронно-лучевое пегилирование изначально предполагает изменение фармакокинетического профиля в сторону увеличения энтеральной биодоступности. Фактором, оказывающим

воздействие на молекулу, является энергия ионизирующего излучения. После применения направленного потока ускоренных электронов при использовании широкого диапазона энергии электронов (1–5 МэВ) и доз (0,5–6 Мрад) гамма-излучения происходит иммобилизация биологически активных веществ на водорастворимых носителях, в молекуле полимера активируются реакционные группы (карбонильные, пероксидные, карбоксильные). Их взаимодействие с атомами азота  $\epsilon$ -аминогруппы лизина или имидазольной группы гистидина в белковых молекулах приводит к образованию ковалентных связей, стойких к гидролизу трипсином и другими протеиназами. Изменяя и варьируя дозу облучения, можно получить конъюгаты с разной массой и стехиометрической структурой. Весь процесс получения конъюгатов лекарственных препаратов занимает 2–10 минут, протекает в одну или две стадии: если лекарственное вещество стабильно, то процесс облучения смеси проводят совместно, если же оно при облучении теряет свои фармакологические свойства, проводится двухстадийный вариант: полимерный носитель облучают и далее смешивают с активной формой лекарственного соединения.

В связи с вышесказанным представляется весьма перспективным произвести электронно-лучевое пегилирование гиалуронидазы с целью получения прототипа фармацевтической субстанции для перорального лекарственного препарата.

Цель исследования – используя метод электронно-лучевого пегилирования получить конъюгат гиалуронидазы с ПЭГ и изготовить лабораторную партию прототипа фармацевтической субстанции для дальнейшей разработки перорального лекарственного препарата на ее основе.

## Материал и методы

Проведены эксперименты по определению оптимальной композиции для производства фармацевтической субстанции на основании исследования химических свойств конъюгата гиалуронидазы с ПЭГ. В качестве материалов были использованы фермент, выделенный из бычьей тестикулярной гиалуронидазы (БТГ) производства ООО «Самсон-Мед» (г. Санкт-Петербург), молекулярная масса 53 кДа, и ПЭГ различной молекулярной массы (1500, 10000, 20000, 40000 Да) производства «Завод Синтанолов» (г. Дзержинск).

Электронно-лучевое пегилирование осуществлялось в Центре электронно-лучевой обработки Сибирского центра фармакологии и биотехнологии (г. Новосибирск). Технология электронно-

## Технические характеристики ускорителя ИЛУ-10

### Technical characteristics of the ILU-10 booster

Параметр	Значение
Энергия электронов, МэВ	2,5–5,0
Средняя мощность пучка, кВт	50
Средний ток пучка, мА	15
Потребляемая мощность, кВт	150
Вес ускорителя, т	2,9

лучевого синтеза разработана при совместном участии Института ядерной физики СО РАН, Института цитологии и генетики СО РАН и Сибирского центра фармакологии и биотехнологии (г. Новосибирск) [8]. Реакция пегилирования происходила под пучком ускоренных электронов, создаваемым ускорителем ИЛУ-10, характеристики которого представлены в таблице. Эксперименты по электронно-лучевой иммобилизации БТГ на ПЭГ проведены в количестве 216 проб, по 9 проб на образец; использованные дозы облучения: 0,5 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 и 3,0 Мрад.

При выполнении эксклюзионной хроматографии молекулы веществ разделяются по размеру за счет их разной способности проникать в поры неподвижной фазы. Порядок элюирования связан с молекулярной массой: первыми элюируются из колонки наиболее крупные молекулы, способные проникать в минимальное число пор стационарной фазы. Однако механизм эксклюзионной хроматографии в действительности основан на различии размеров самих молекул в растворе: большинство молекул обладает компактной формой, но присутствуют молекулы и цилиндрической формы, которые имеют больший гидродинамический радиус в растворе и поэтому элюируются раньше [10]. Методом эксклюзионной хроматографии проводили оценку иммобилизации БТГ на матрице ПЭГ по изменению профиля элюции. В качестве подвижной фазы (элюента) был использован 20 мМ ацетатный буферный раствор с 0,1 М NaCl, детекцию выполняли на проточном ВЭЖХ-спектрофотометре (Sykam, Германия) при длине волны 280 нм, скорость потока элюента 1 мл/мин, в качестве неподвижной фазы – колонка TSK-GEL G3000SWxl (Tosoh, Япония) (пределы фракционирования 10000–500000 Да по глобулярным белкам).

Для доказательства взаимодействия между ПЭГ и ферментом хроматографические фракции, отвечающие за специфическую активность, были собраны и подвергнуты центрифугированию в ультрафильтрационных пробирках (Amicon Ultra-0,5 10K Millipore) с пределом отсечения молекулярных масс до 10 кДа. При определении

специфической гиалуронидазной активности в качестве стандарта активности был взят образец субстанции «Лидаза» производства ООО «Самсон-Мед» (серия 110621) с активностью 4120,7 УЕ/г, который в ходе испытания растворяли в ацетатном буферном растворе до конечной активности 35 УЕ/мл.

### Результаты и их обсуждение

В начале экспериментов был установлен хроматографический профиль БТГ с детекцией фракций, отвечающих за специфическую гиалуронидазную активность (рис. 1, а). Затем последовательно определялись оптимальные сочетания ПЭГ различных молекулярных масс и энергии ускоренных электронов, вызывающих формирование конъюгата БТГ с ПЭГ. Исследованы композиции БТГ с ПЭГ различной молекулярной массы (1500, 10000, 20000, 40000 Да) при всех исследуемых дозах (0,5 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 и 3,0 Мрад). Ввиду большого количества цифровых данных нами решено отказаться от их раз-

мещения в статье, а сосредоточиться только на показательных и перспективных композициях. В результате проведенных исследований установлено, что ПЭГ с высокой молекулярной массой (10000, 20000, 40000 Да) образуют конгломераты, в которые иммобилизованы фракции, отвечающие за специфическую активность фермента. В качестве демонстрации данного феномена выборочно представлены хроматограммы на рис. 1 б, в и г. Следует отметить, что ПЭГ с молекулярной массой 40000 Да образовывал конгломераты уже в дозе 0,5 Мрад (см. рис. 1, г).

Важным обстоятельством является то, что тестирование облученных препаратов показало сохранность специфической активности более 80 % от исходного значения. С одной стороны, это служит положительной характеристикой данного способа иммобилизации и может рассматриваться как достижение ожидаемого результата, так как электронно-лучевая иммобилизация активных фракций БТГ на водорастворимой полимерной матрице ПЭГ не приводит к снижению специфи-

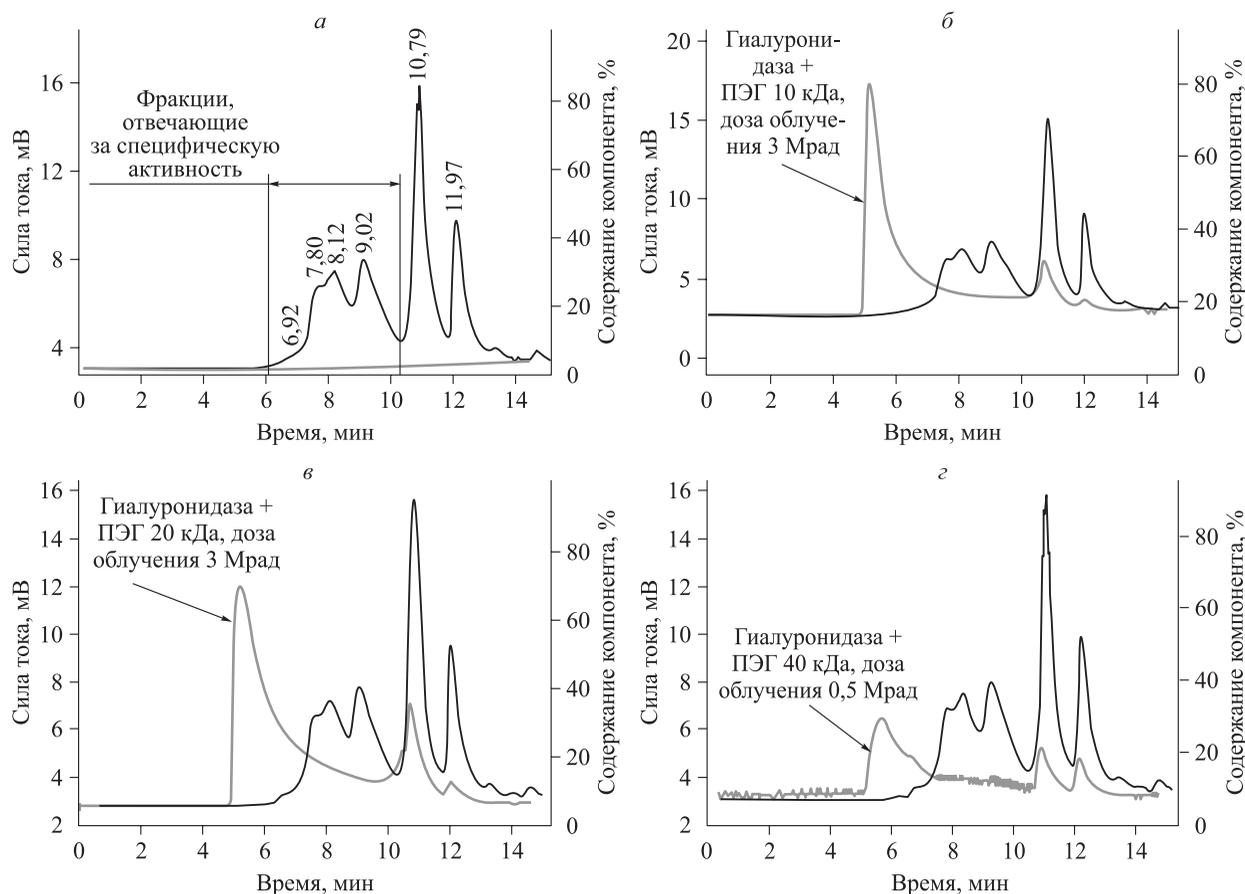


Рис. 1. Профиль элюции БТГ на TSK-GEL G3000SWxl (а) и после совместного облучения с ПЭГ 10000 Да в дозе 3 Мрад (б), с ПЭГ 20000 Да в дозе 3 Мрад (в), с ПЭГ 40000 Да в дозе 0,5 Мрад (г)

Fig. 1. Elution profile of the BTG substance on TSK-GEL G3000SWxl (a) and after co-irradiation with PEG 10000 Da at a dose of 3 Mrad (б), with PEG 20000 Da at a dose of 3 Mrad (в), with PEG 40000 Da at a dose of 0,5 Mrad (г)

ческой активности фермента. При этом необходимо отметить, что размер полученных комплексов значительно превышал верхний предел достоверного фракционирования выбранной колонки, что, по-видимому, было связано с формированием предгелевой сетки, состоящей из поперечно сшитых между собой крупных молекул ПЭГ (межмолекулярный радиационный кросслинкинг, МРК), в которую включалась белковая составляющая. В данном режиме иммобилизации возникающий МРК позволит создавать лекарственные формы, преимущественно местного и парентерального применения, но исключит прохождение конъюгата БТГ с ПЭГ через энтеральный гистогематический барьер.

Для получения комплексов, которые могут обладать высокой энтеральной биодоступностью, оптимальной является композиция, созданная на ПЭГ 1500 при использовании облучения в дозе 1,5 Мрад. Результаты эксперимента по совместному облучению БТГ и 5%-го водного раствора ПЭГ 1500 Да (доза заведомо ниже дозы возможного МРК) представлены на рис. 2. Установлено, что не наблюдалось принципиального изменения во времени выхода фракций, входящих в состав фермента. Это наглядно демонстрирует отсутствие в данном случае процесса межмолекулярного кросслинкинга, приводящего к формированию водорастворимого предгеля. Собранные после ультрафильтрации концентрат и пермеат (параметры ультрафильтрации представлены в

[11]) протестированы на специфическую активность и наличие ПЭГ (качественная реакция по ТУ 9154-027-59230155-10). Ферментативная активность полученного препарата составляет не менее 10000 усл. ед./г белка.

В соответствии с маршрутной картой по ГОСТ Р 52537-2006 «Производство лекарственных средств. Система обеспечения качества» разработаны протоколы анализа полученных образцов, содержащие информацию об анализируемом материале, используемых реактивах, о контрольно-измерительном оборудовании, подготовке проб, данных измерения и обработке результатов. Подлинность полученного препарата подтверждается по показателям «Гиалуронидазная активность» и «Качественная реакция на полиэтиленоксид» – препарат должен обладать гиалуронидазной активностью, при добавлении к раствору субстанции танина раствор должен стать молочно-мутным (ТУ 9154-027-59230155-10). Цветность раствора по Государственной фармакопее (ГФ XII, ч.1, с. 93) – интенсивность окраски раствора препарата не более эталона ВУ1. Прозрачность (ГФ XII, ч.1, с.98) – не более эталона № 4. Микробиологическая чистота (ГФ XII, ч.1, с. 160) – категория 3.2. Для проведения экспериментальных исследований по определению специфической фармакологической активности полученный препарат фасовали по флаконам с последующей заморозкой при  $-18^{\circ}\text{C}$ .

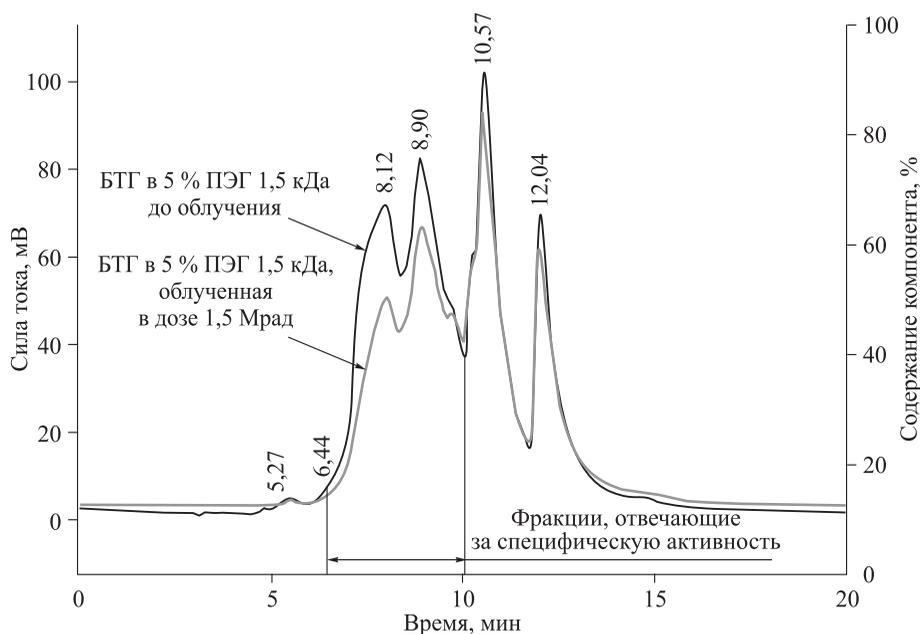


Рис. 2. Профиль элюции БТГ после совместного облучения с ПЭГ 1500 в дозе 1,5 Мрад

Fig. 2. Elution profile of BTG after co-irradiation with PEG 1500 at a dose of 1,5 Mrad

## Заключение

В результате проведенных экспериментов нами разработаны два варианта получения фармацевтической субстанции на основе конъюгата БТГ с ПЭГ. Крупномолекулярные ПЭГи (10000, 20000, 40000 Да) позволят создавать лекарственные препараты на основе БТГ для местного и парентерального введения. ПЭГ с молекулярной массой 1500 Да при дозе облучения 1,5 Мрад обеспечивает иммобилизацию каждой белковой фракции, отвечающей на специфическую ферментативную активность. Данный режим электронно-лучевого пегилирования будет обеспечивать хорошую энтеральную биодоступность [4–8]. Таким образом, нами определен технологический режим иммобилизации БТГ на ПЭГ различной молекулярной массы и получены лабораторные партии прототипов фармацевтической субстанции, которую можно в дальнейшем использовать для разработки готовых лекарственных форм на ее основе и проведения доклинических исследований.

## Список литературы

1. Stern R. Devising a pathway for hyaluronan catabolism: are we there yet? *Glycobiology*. 2003;13(12):105–115. doi: 10.1093/glycob/cwg112
2. Забанова В.Е., Фурсова А.Ж., Мадонов П.Г. Фармакологические свойства гиалуронидазы и возможности ее клинического применения в офтальмологии. *Сиб. науч. мед. ж.* 2020;40(4):11–19. doi: 10.15372/SSMJ20200402
3. Инструкция по медицинскому применению лекарственного препарата Лонгидаза. Регистрационное удостоверение ЛС-000764-220818. Режим доступа: [https://www.vidal.ru/drugs/longidaze\\_31621](https://www.vidal.ru/drugs/longidaze_31621)
4. Дыгай А.М., Зюзьков Г.Н., Чуринов А.А., Жданов В.В., Артамонов А.В., Бекарев А.А., Мадонов П.Г., Киншт Д.Н., Фомина А.Т., Ветошкина Т.В., ... Рейхарт Д.В. Фармакологические свойства пегилированного с помощью нанотехнологии электронно-лучевого синтеза соматотропина. *Бюл. эксперим. биол. и мед.* 2012;153(2):232–234.
5. Дыгай А.М., Зюзьков Г.Н., Гурто Р.В., Жданов В.В., Удут Е.В., Мирошниченко Л.А., Симанина Е.В., Ставрова Л.А., Чайковский А.В., Маркова Т.С., ... Бекарев А.А. Влияние пегилированной эндо-β-N-ацетилгексозаминидазы на гуморальные механизмы регуляции функций прогениторных клеток при хроническом гепатите. *Бюл. эксперим. биол. и мед.* 2013;155(2):140–143.
6. Дыгай А.М., Зюзьков Т.Н., Жданов В.В., Мадонов П.Г., Артамонов А.В., Бекарев А.А., Удут В.В. Иммобилизованный гранулоцитарный колониестимулирующий фактор. Фармакологические

свойства и перспективы использования. Томск: Печатная мануфактура, 2011. 149 с.

7. Киншт Д.Н., Кочнева Г.В., Мадонов П.Г., Ковалева Н.В. Специфическая противовирусная активность в отношении вируса гепатита С перорального лекарственного препарата на основе иммобилизованного интерферона λ-1. *Рациональная фармакотерапия: сб. тр. конф.*, Санкт-Петербург, 6–8 октября 2016 г. СПб., 2016. С. 81–83.

8. Бекарев А.А., Артамонов А.В., Верещагин Е.И. Способ иммобилизации биологически активного вещества (БАВ) на носитель (варианты) и конъюгат БАВ-носитель, полученный данными способами. Пат. 2409669 РФ; опубл. 20.01.2011.

9. Топчиева И.Н. Применение полиэтиленгликолей в биохимии. *Успехи химии*. 1980;49(3):494–517. doi: 10.1070/RC1980v049n03ABEN002458

10. Ибрагимов А.Н., Бикмуллин А.Г., Сагаева Д.А., Лопухов Л.В., Зайнуллин Л.И., Алимова Ф.К. Хроматографические методы очистки белков. Учебно-методическое пособие. Казань: ФГАОУ ВПО КФУ, 2013. 48 с.

11. Швецова А.М., Ершов К.И., Королев М.А., Мадонов П.Г. Результаты экспериментов по разработке высокоочищенной гиалуронат-эндо-β-N-ацетилгексозаминидазы в качестве фармацевтической субстанции для лекарственного препарата. *Бюл. мед. науки*. 2023;(4):68–80. doi: 10.31684/25418475-2023-4-68

## References

1. Stern R. Devising a pathway for hyaluronan catabolism: are we there yet? *Glycobiology*. 2003;13(12):105–115. doi: 10.1093/glycob/cwg112
2. Zabanova V.E., Fursova A.Z., Madonov P.G. Hyaluronidase pharmacological properties and clinical application in ophthalmology. *Sibirskij nauchnyj medicinskij zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2020;40(4):11–19. [In Russian]. doi: 10.15372/SSMJ20200402
3. Instructions for medical use of the medicine Longidaza. Registration certificate LS-000764-220818. Available at: [https://www.vidal.ru/drugs/longidaze\\_31621](https://www.vidal.ru/drugs/longidaze_31621). [In Russian].
4. Dygai A.M., Zyuzkov G.N., Churin A.A., Zhdanov V.V., Artamonov A.V., Bekarev A.A., Madonov P.G., Kincht D.N., Fomina A.T., Vetoshkina T.V., ... Reikhart D.V. Pharmacology of somatotropin pegylated by electron-beam synthesis nanotechnology. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2012;153(2):263–265.
5. Dygai A.M., Zyuzkov G.N., Gurto R.V., Zhdanov V.V., Udut E.V., Miroshnichenko L.A., Simanina E.V., Stavrova L.A., Chaikovsky A.V., Markova T.S., ... Bekarev A.A. Effect of pegylated hyaluronate-endo-β-N-acetylhexosaminidase on humoral mechanisms

regulating the functions of progenitor cells during chronic hepatitis. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2013;155(2):179–182. [In Russian].

6. Dygay A.M., Zyuzkov T.N., Zhdanov V.V., Madonov P.G., Artamonov A.V., Bekarev A.A., Udut V.V. Immobilized granulocyte colony-stimulating factor. Pharmacological properties and prospects of use. Tomsk: Pechatnaya Manufaktura, 2011.149 p. [In Russian].

7. Kinsht D.N., Kochneva G.V., Madonov P.G., Kovaleva N.V. Specific antiviral activity against hepatitis C virus oral drug based on immobilized interferon  $\lambda$ -1. *Rational Pharmacotherapy: proc. conf.*, Saint-Petersburg, October 6–8, 2016. Saint-Petersburg, 2016. 81–83. [In Russian].

8. Bekarev A.A., Artamonov A.V., Vereshchagin E.I. Method of immobilization of biologically active

substance (BAS) on a carrier (variants) and BAS-carrier conjugate obtained by these methods. Pat. 2409669 RF; published 20.01.2011. [In Russian].

9. Topchieva I.N. Biochemical applications of poly(ethylene glycol). *Uspekhi khimii = Russian Chemical Reviews*. 1980;49(3):494–517. [In Russian]. doi: 10.1070/RC1980v049n03ABEH002458

10. Ibragimov A.N., Bikmullin A.G., Sataeva D.A., Lopukhov L.V., Zainullin L.I., Alimova F.K. Chromatographic methods of protein purification. Textbook. Kazan: FGAOU VPO KFU, 2013. 48 p. [In Russian].

11. Shvetsova A.M., Ershov K.I., Korolev M.A., Madonov P.G. Experimental results on the development of highly purified hyaluronate-endo- $\beta$ -N-acetylhexosaminidase as a pharmaceutical substance for a drug product. *Byulleten' meditsinskoy nauki = Bulletin of Medical Science*. 2023;(4):68-80. [In Russian]. doi: 10.31684/25418475-2023-4-68

#### Сведения об авторах:

Швецова Александра Михайловна, ORCID: 0009-0002-7735-6032, e-mail: aleksa-2904@mail.ru

Ершов Константин Игоревич, к.б.н., ORCID: 0000-0003-4139-036X, e-mail: ershov\_k@bk.ru

Королев Максим Александрович, д.м.н., ORCID: 0000-0002-0471-652X, e-mail: kormax@bk.ru

Мадонов Павел Геннадьевич, д.м.н., ORCID: 0000-0002-1093-8938, e-mail: pmadonov@yandex.ru

Трубина Лариса Владимировна, к.фарм.н., ORCID: 0000-0002-2292-6520, e-mail: larisa\_trubina@mail.ru

#### Information about the authors:

Alexandra M. Shvetsova, ORCID: 0009-0002-7735-6032, e-mail: aleksa-2904@mail.ru

Konstantin I. Ershov, candidate of biological sciences, ORCID: 0000-0003-4139-036X, e-mail: ershov\_k@bk.ru

Maksim A. Korolev, doctor of medical sciences, ORCID: 0000-0002-4890-0847, e-mail: kormax@bk.ru

Pavel G. Madonov, doctor of medical sciences, ORCID: 0000-0002-1093-8938, e-mail: pmadonov@yandex.ru

Larisa V. Trubina, candidate of pharmacological sciences, ORCID: 0000-0002-2292-6520, e-mail: larisa\_trubina@mail.ru

Поступила в редакцию 17.08.2023

После доработки 21.09.2023

После повторной доработки 17.01.2024

Принята к публикации 18.01.2024

Received 17.08.2023

Revision received 21.09.2023

Second revision received 17.01.2024

Accepted 18.01.2024