

УДК 577.6

## Технология ПАСилирования позволяет улучшить фармакокинетические свойства рекомбинантного интерферона $\beta$ -1b человека *in vivo*

© 2018 Е.А. ЗВОНОВА<sup>1,2,\*</sup>, О.А. ЕРШОВА<sup>1</sup>, А.В. ЕРШОВ<sup>1</sup>, А.А. КАЗАРОВ<sup>1</sup>, Е.С. БЕЛЯНИНА<sup>1</sup>, М.В. ЛЫКОВ<sup>1</sup>, А.Ю. ВИШНЕВСКИЙ<sup>1</sup>, А.П. КАРПОВ<sup>3</sup>, С.В. РУЧКО<sup>3</sup>, А.М. ШУСТЕР<sup>1</sup>, А.А. СОЛОВЬЕВ<sup>2</sup>, И.В. ГОЛДЕНКОВА–ПАВЛОВА<sup>4</sup>

<sup>1</sup>ООО Международный биотехнологический центр «Генериум», Владимирская обл., Петушинский район, пос. Вольгинский, 601125

<sup>2</sup>Российский государственный аграрный университет – Московская сельскохозяйственная академия им. К.А. Тимирязева, Москва, 127550

<sup>3</sup>ООО «Селлтера фарм», Владимирская обл., Петушинский район, пос. Вольгинский, 601125

<sup>4</sup>ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской Академии наук, Москва, 127276

e-mail: berkovich@ibcgenerium.ru\*

Поступила 17.01.2018 г.

Принята в печать 26.02.2018 г.

Для преодоления ограничений, связанных с короткой экспозицией интерферона  $\beta$ -1b в системном кровотоке из-за небольшого размера белка, была получена его модифицированная форма с использованием технологии ПАСилирования (PASylation®). Рекомбинантный ПАС-полипептид IFN $\beta$ 1b-PAS200 был синтезирован путем присоединения аминокислотного биополимера ПАС размером 200 аминокислот к молекуле интерферона  $\beta$ -1b на уровне ДНК методами генной инженерии. Проведено сравнительное фармакокинетическое исследование данного полипептида при однократном введении крысам Sprague Dawley. Показано, что интродукция ПАС-полипептида приводит к тому, что период полувыведения препарата увеличивается вдвое по сравнению с немодифицированным IFN $\beta$ -1b, а  $AUC_{last}$  – в три раза. При этом не наблюдается серьезного изменения в биодоступности препарата при подкожном или внутримышечном введении. Полученные результаты свидетельствуют о положительном влиянии ПАС-биополимера на фармакокинетические свойства терапевтического белка и подтверждают целесообразность использования технологии PASylation® для получения пролонгированной формы IFN $\beta$ -1b, включая теоретическую возможность применения ПАС-полипептидов большего размера (600 а.к.).

**Ключевые слова:** интерферон  $\beta$ -1b, ПАСилирование, исследование фармакокинетики.

**doi:** 10.21519/0234-2758-2018-34-2-37-46

---

*Список сокращений:* а.к. – аминокислота(ы); ИПТГ – изопропил- $\beta$ -D-1-тиогалактопиранозид; КЖ – культуральная жидкость; МЕ – международная единица активности интерферона; ПААГ – полиакриламидный гель; ПАС-последовательность – аминокислотная последовательность размером 200 а.к., состоящая из остатков пролина, аланина и серина, ПЭГ – поли(этилен)гликоль; среда LB – среда Луриа–Бертани;  $AUC_{last}$  – площадь под кривой зависимости концентрации препарата в кровотоке от времени с момента его введения до последней измеряемой концентрации; EU (Endotoxin Unit) – единица активности эндотоксина; IFN $\beta$ -1b – интерферон  $\beta$ -1b; IFN $\beta$ 1b-PAS200 – интерферон  $\beta$ -1b, модифицированный ПАС-последовательностью; PBS – фосфатно-солевой буфер; SDS – додецилсульфат натрия.

Интерфероны представляют собой важный класс терапевтических белков, которые эффективно используются в лечении широкого спектра заболеваний, в том числе вирусных инфекций, злокачественных новообразований и рассеянного склероза [1]. Согласно их структуре, функциональной активности и специфичности к рецепторам, интерфероны подразделяют на три основные группы: тип I (IFN- $\alpha$  и IFN- $\beta$ ), тип II (IFN- $\gamma$ ) и тип III (IFN- $\lambda$ ) [2]. IFN $\beta$ -1b имеет выраженные противовоспалительные свойства [3], а лекарственные препараты на его основе используются в основном для лечения рассеянного склероза [4].

Рекомбинантный интерферон  $\beta$ -1b (IFN $\beta$ -1b) является гидрофобным белком и от других терапевтических цитокинов отличается трудностью выделения и очистки, связанной с его склонностью к образованию агрегатов в растворе [5]. Белок производят путем гетерологичной экспрессии в *Escherichia coli*, вследствие чего его последовательность не гликозилирована. Помимо этого, для упрощения процесса очистки после ренатурации цистеин в положении 17 последовательности белка заменен на серин (IFN $\beta$ -1b (Ser17)), что предотвращает образование нежелательной дисульфидной связи в молекулах белка [6]. IFN $\beta$ -1b (Ser17) – полипептид, состоящий из 165 а.к. с молекулярной массой 18,5 кДа и изоэлектрической точкой 9,6.

Несмотря на терапевтический потенциал IFN $\beta$ -1b, есть ряд проблем, затрудняющих его использование, и в первую очередь это неоптимальные фармакокинетические характеристики препарата. По причине небольшого размера (18,5 кДа) белок крайне быстро выводится из кровотока через почечный клиренс: период полувыведения IFN $\beta$ -1b составляет лишь 5 ч. Следствием этого является необходимость частого введения: так, препарат Бетаферон вводят подкожно через день в дозе 8 млн. МЕ (0,25 мг). Это существенно осложняет использование белка как лекарственного средства, ухудшает его переносимость пациентом, а также может приводить к ускоренному образованию антител к интерферону. В связи с этим высока потребность в получении формы рекомбинантного интерферона, характеризующейся увеличенным временем экспозиции в крови.

Одним из наиболее распространенных подходов к повышению стабильности, растворимости и улучшению фармакокинетических свойств терапевтических белков является технология ПЭГиляции [7], суть которой заключается в

химическом присоединении (конъюгации) полиэтиленгликоля (ПЭГ) к молекуле целевого белка [8]. По имеющимся на сегодня данным, эта технология была использована для получения пролонгированных форм интерферона альфа, аспарагиназы, эритропоэтина и ряда других терапевтических белков [9]. Вместе с тем многолетний опыт применения технологии ПЭГиляции выявил ряд присущих ей ограничений [10; 11]. Среди них следует отметить высокую цену компонентов для химической конъюгации ПЭГ с целевыми белками, проблемы, связанные с выделением и характеристикой финального продукта из-за полидисперсности полимера, риск накопления ПЭГ в органах (в результате его поглощения клетками и отсутствия эффективного пути его метаболизма [8, 12]), а также возможная иммуногенность ПЭГ [13]. Эти недостатки особенно актуальны при длительных курсах терапии ПЭГилярованными белками.

Недавно в качестве альтернативы ПЭГиляции была предложена группа технологий, использующих так называемые ПЭГ-миметики. Одна из них – это метод ПАСилирования, разработанный компанией XL-Protein [14, 15]. Суть его заключается в слиянии терапевтического белка с полипептидом, состоящим из остатков пролина, аланина и серина (так называемая ПАС-последовательность). Она представляет собой гидрофильный незаряженный биологический полимер, который имитирует позитивные биофизические свойства химического ПЭГ-полимера, в частности увеличенный гидродинамический радиус. Однако в отличие от ПЭГ, слияние ПАС-последовательности с рекомбинантными белками можно запрограммировать на уровне ДНК, что позволяет продуцировать модифицированные рекомбинантные белки непосредственно в культуре клеток без дополнительных этапов химического соединения компонентов, как это происходит при модификации *in vitro* [16, 17]. Кроме того, ПАС-последовательность способна к биоразложению и при этом не обладает токсичностью или иммуногенностью для мышей [17]. В настоящее время технология ПАСилирования успешно апробирована для модификации целого ряда терапевтических белков: рекомбинантный Fab-фрагмент антитела (Трастузумаб) [18]; суперагонист интерферона I типа [19]; гормон роста человека (соматропин, hGH) [14]; лептин [20]; ингибитор C5-комплемента [21]; эритропоэтин [22]. Соответствующие препараты находятся на различных этапах доклинических испытаний.

Ранее нами было проведено конструирование ПАСилированного варианта IFN $\beta$ -1b – IFN $\beta$ 1b-PAS200 – с присоединением ПАС-биополимера размером 200 аминокислот к С-концу IFN $\beta$ -1b. Была продемонстрирована эффективная экспрессия соответствующего гена у *E. coli* с продукцией целевого белка, присутствующего в основном в нерастворимой фракции. Показано, что ПАСилирование положительно сказывается на стабильности, растворимости и функциональной активности IFN $\beta$ -1b [23].

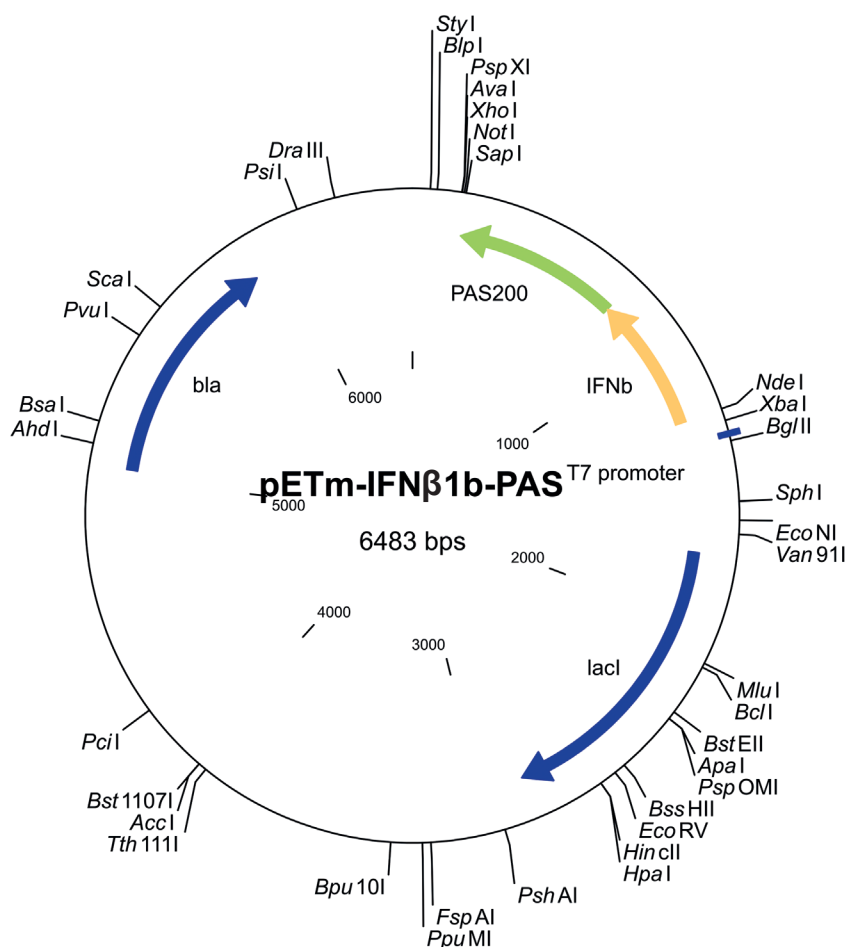
Целью настоящей работы было изучение роли модификации IFN $\beta$ -1b ПАС-последовательностью в улучшении фармакокинетических характеристик терапевтического белка, таких как экспозиция в системном кровотоке, а также влияния указанной модификации на биодоступность IFN $\beta$ -1b при подкожном и внутримышечном введении модельным животным.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

### Продукция, выделение и очистка белка IFN $\beta$ 1b-PAS200

Для получения рекомбинантного IFN $\beta$ 1b-PAS200 использовали плазмиду pETm-IFN $\beta$ 1b-PAS (рис. 1), конструирование которой подробно описано в публикации [23].

Для экспрессии целевого гена использовали штамм *E. coli* BL21 (DE3) (Sigma-Aldrich, Германия), трансформированный плазмидой pETm-IFN $\beta$ 1b-PAS. Биомассу выращивали в ферментере Sartorius Twin plus (Sartorius, Германия) объемом 2 л в 1 л питательной среды LB. Экспрессию гибридного гена IFN $\beta$ 1b-PAS200 индуцировали добавлением 0,5 мМ ИПТГ. Через 5 ч после индукции клетки отделяли от среды и собирали центрифугированием при 6000 г. Выделение белка IFN $\beta$ 1b-PAS200 осуществляли согласно методике,



**Рис. 1.** Схематическое изображение генно-инженерной конструкции pETm-IFN $\beta$ 1b-PAS ([23]). Изображение получено с использованием ПО Clone Manager

**Fig. 1.** Scheme of pETm-IFN $\beta$ 1b-PAS gene-engineered construct ([23]). The image is obtained using Clone Manager software

подробно описанной ранее [23]. Вкратце, она состоит в следующем: тельца включения получают путем дезинтеграции бактериальной биомассы с использованием ультразвукового гомогенизатора Digital Sonifier 450 (Branson, Канада) и затем осаждают путем центрифугирования. Далее их обрабатывают ультразвуком и проводят рефолдинг целевого белка при температуре 4 °С в течение 48 ч. Очистку белка IFN $\beta$ 1b-PAS200 осуществляют путем комбинации методов ВЭЖХ: на первой стадии проводят тандемную хроматографию на носителях типа Q-SP-sepharose; на второй – фракцию пика элюата с предыдущей стадии разделяют на сорбенте Zn<sup>+2</sup>IMAC-sepharose FF. Полученные фракции концентрируют путем ультрафильтрации с использованием Amicon Ultra centrifugal filter units (10 000 или 30 000 MWCO; Millipore, США) до концентрации 1 мг белка/мл. В качестве заключительной стадии для удаления высокомолекулярных агрегатов и низкомолекулярных примесей, а также для перевода рекомбинантного белка в PBS-буфер используют гель-эксклюзионную хроматографию на Superdex200 (рис. 2).

#### Аналитическая характеристика очищенного белка IFN $\beta$ 1b-PAS200 и оценка его антипролиферативной активности *in vitro*

SDS-ПААГ-электрофорез проводили в 12%-ном полиакриламидном геле с окрашиванием Coomassie R-250 (Sigma Aldrich, США). Концентрацию белка определяли по Брэдфорд [24], используя сывороточный альбумин быка (Sigma-Aldrich) для построения калибровочной кривой. Для вестерн-блот-гибридизации в качестве первичных антител использовали антитела козы anti-huIFN- $\beta$  (ab10740, Abcam, Великобритания), а в качестве вторичных – антитела кролика к иммуноглобулинам козы, конъюгированные с пероксидазой хрена (ab6741, Abcam). После промывки PVDF-мембрану (Bio-Rad, США) окрашивали ECL (GE, США). Хемилюминесценцию детектировали на приборе Fusion FX5 (Vilber Lourmat, Франция).

Анализ биологической активности проводили *in vitro* при использовании клеточной линии лимфомы Беркитта человека (Daudi, ATCC, # CCL-213), согласно методике, описанной ранее [23]. Клетки помещали в планшеты в количестве 10 000 на лунку и добавляли исследуемые образцы IFN $\beta$ -PAS200 или референс-препарат интерферона  $\beta$  (NIBSC code 00/574). Далее клетки растили 102 ч, после чего добавляли краситель престо-блю (PrestoBlue, Thermo Fisher Scientific, США) и оценивали интенсивность флуоресценции с помо-

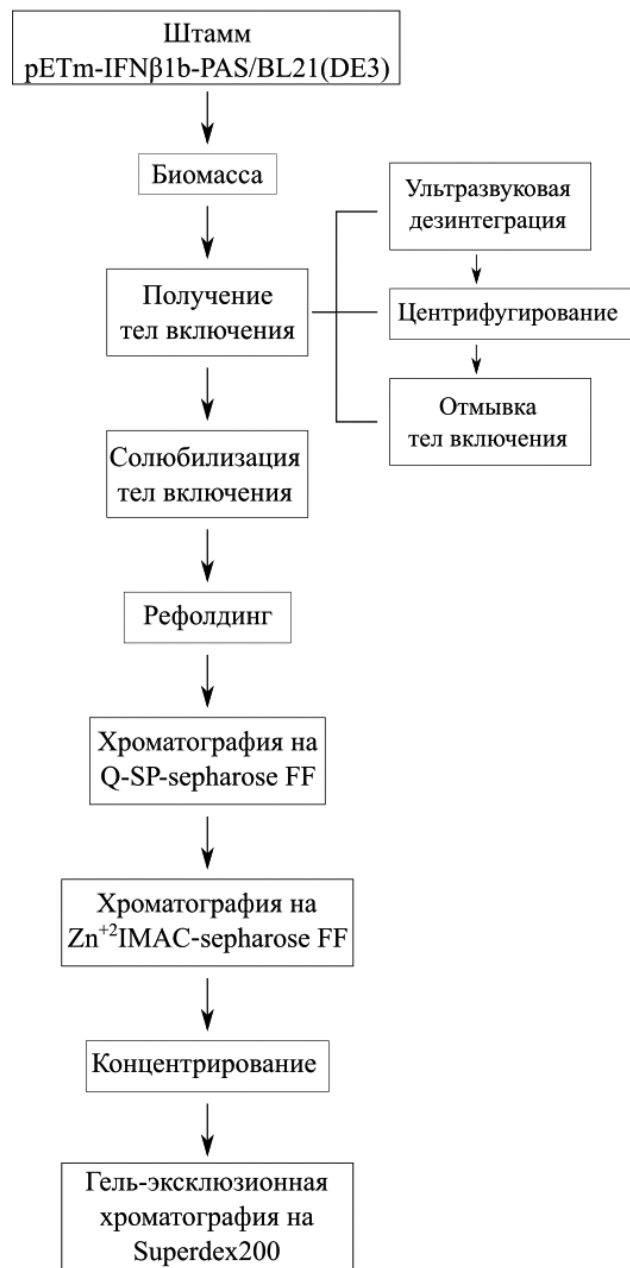


Рис. 2. Блок-схема стадий рефолдинга и очистки целевого гибридного белка IFN $\beta$ 1b-PAS200

Fig. 2. Block scheme of refolding and purification of IFN $\beta$ 1b-PAS200 target hybrid (fused) protein

щью планшетного спектрофотометра Multiskan Spectrum (Thermo Fisher Scientific), используя длину волны 560 нм (возбуждения) и 590 нм (испускания). Полученные данные о концентрационно-зависимом падении флуоресценции использовали для оценки антипролиферативной активности исследуемых образцов в сравнении со стандартом. Содержание эндотоксинов в образцах анализировали с помощью набора Endosafe-PTS (Charles River Laboratories, США) с использованием картриджей с чувствительностью 0,03 EU/мл.

**Исследование фармакокинетики IFN $\beta$ 1b-PAS200 при внутривенном, подкожном и внутримышечном введении модельным животным**

Исследования проводили на SPF (Specific-Pathogen-Free) крысах-самцах Sprague-Dawley (по 5 животных в группе) в возрасте 10 нед. массой 561 $\pm$ 20 г. Перед введением образец IFN $\beta$ 1b-PAS200 разводили до концентрации 0,3 мг/мл, а препарат сравнения Инфибета® (IFN $\beta$ 1b, «Генериум», Россия) – восстанавливали согласно инструкции производителя, после чего вводили каждый из них однократно в эквивалентной дозе внутривенно, подкожно или внутримышечно. Забор проб крови осуществляли из хвостовой вены через 5, 15, 30 мин и через 1, 2, 3, 4, 8 и 24 ч после введения. Концентрацию препаратов в разное время после инъекции анализировали в плазме, которую получали центрифугированием крови животных при 600 g в течение 15 мин. Анализ проводили методом ИФА при использовании набора VeriKine™ human IFN $\beta$  ELISA kit, согласно рекомендациям производителя.

**Статистическая обработка данных**

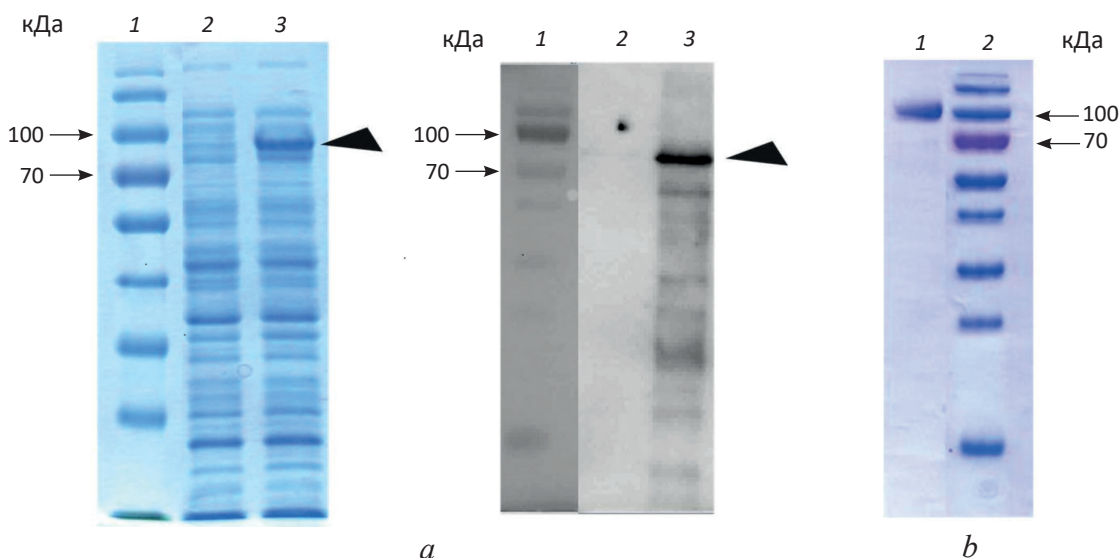
Все эксперименты проводили как минимум в трех биологических и пяти аналитических по-

вторностях. Для каждой временной точки рассчитывали медианные внутригрупповые значения концентрации препарата (внутригрупповой разброс значений оценивали по межквартильному расстоянию). Полученные значения концентрации для каждого препарата и каждого способа введения использовали для вычисления основных фармакокинетических параметров с помощью ПО PKSolver на базе MS Excel 2010 и с применением некомпартментной модели распределения [25].

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

**Получение и характеристика целевого белка IFN $\beta$ 1b-PAS200**

На первом этапе проводили препаративное получение рекомбинантного белка IFN $\beta$ 1b-PAS200 в количестве, требуемом для проведения фармакокинетических исследований. Продукцию целевого белка в клетках штамма *E. coli* BL21(DE3), несущего плазмиду pETm-IFN $\beta$ 1b-PAS (см. рис. 1), индуцировали добавлением ИПТГ. Первоначальная оценка эффективности экспрессии была проведена с использованием SDS-ПААГ с окраской Coomassie R-250 и вестерн-блот-гибридизации с антителами, специфичными к IFN $\beta$ 1b. Как видно из рис. 3a, индукция ИПТГ приводит к эффективному накоплению целевого белка в клеточных лизатах.



**Рис. 3.** Оценка продукции целевого белка IFN $\beta$ 1b-PAS200 штаммом *E. coli* BL21(DE3), несущим плазмиду pETm-IFN $\beta$ 1b-PAS: *a* – бактериальный лизат (слева – SDS-ПААГ-электрофорез, окраска кумасси; справа – вестерн-блоттинг); 1 – маркеры молекулярной массы (Thermo Scientific, США); 2 – анализ до и 3 – анализ после индукции экспрессии целевого гена. Треугольником отмечен целевой белок IFN $\beta$ 1b-PAS200. *b* – очищенный препарат (SDS-ПААГ-электрофорез, окраска кумасси); 1 – целевой белок; 2 – маркеры молекулярной массы

**Fig. 3.** Assessment of target IFN $\beta$ 1b-PAS200 protein production in *E. coli* BL21(DE3) strain bearing pETm-IFN $\beta$ 1b-PAS plasmid: (*a*), bacterial lysate (SDS-PAGE, staining by Coomassie, on the left; Western-blotting, on the right); (1), MM markers (Thermo Scientific, USA); analysis before (2) and after (3) induction of target gene expression. Triangle indicates position of target protein IFN $\beta$ 1b-PAS200; and (*b*), purified preparation (SDS-PAGE, staining by Coomassie); (1), target protein; and (2), MM markers

Необходимо отметить, что для IFN $\beta$ 1b-PAS200 характерно изменение электрофоретической подвижности по сравнению с исходным IFN $\beta$ -1b, вызванное слабым взаимодействием гидрофильной ПАС-последовательности с SDS. За счет этого белок мигрирует в SDS-ПААГ значительно медленней, чем ожидается исходя из его расчетной молекулярной массы: кажущийся размер белка соответствует  $\sim 75$  кДа, в то время как теоретически рассчитанная ММ составляет 36,6 кДа (см. рис. 3). Данный феномен описан нами ранее [23]; он характерен и для других гибридных белков, слитых с ПАС-последовательностью [18, 19].

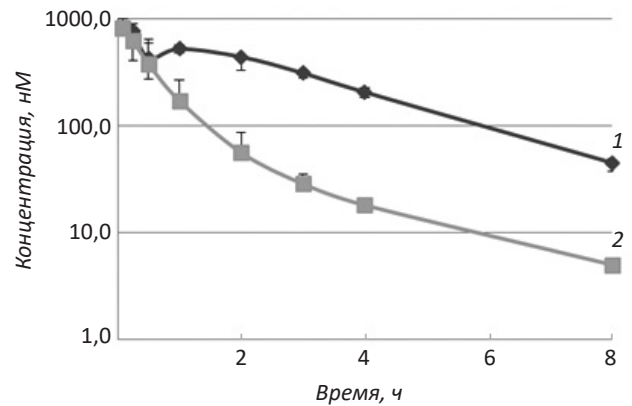
Далее были проведены выделение и очистка белка IFN $\beta$ 1b-PAS200 с использованием разработанных нами протоколов солюбилизации, рефолдинга и комбинации различных вариантов ВЭЖХ (см. рис. 2). Показано, что очищенный препарат белка IFN $\beta$ 1b-PAS200 характеризуется более, чем 90% чистотой (результаты SDS-ПААГ; см. рис. 3b). При этом содержание эндотоксинов в очищенном препарате по данным системы Endosafe-PTS с использованием картриджей чувствительностью 0,03 EU/мл составило лишь 4 EU/мг белка, что является допустимым для проведения фармакокинетических исследований IFN $\beta$ 1b *in vivo* [4, 7].

Функциональная активность очищенного белка IFN $\beta$ 1b-PAS200 была подтверждена в исследовании его антипролиферативной биологической активности *in vitro* с использованием клеточной линии лимфомы Беркитта человека. Так, концентрация препарата, при котором происходит 50%-ное ингибирование роста клеток, составила 0,265 нг/мл, что практически в 2 раза ниже соответствующего значения для коммерческого IFN $\beta$ 1b (0,524 нг/мл) [23].

Таким образом, для фармакокинетических исследований нами был получен биологически активный целевой белок IFN $\beta$ 1b-PAS200 с высокой степенью чистоты.

#### Сравнительное исследование фармакокинетики IFN $\beta$ 1b-PAS200 и рекомбинантного референс-белка IFN $\beta$ 1b (Инфибета®) при однократном внутривенном введении в организм крыс

Первоначально для оценки основных фармакокинетических параметров проведено сравнительное исследование двух указанных рекомбинантных препаратов при их внутривенном введении. Кривые зависимости концентрации препарата в плазме крови крыс от времени после введения каждого из препаратов показаны на рис. 4.



**Рис. 4.** Динамика концентрации препаратов IFN $\beta$ 1b-PAS200 (1) и Инфибета® (2) в плазме крови крыс при внутривенном введении. График построен по медианным значениям в полулогарифмической форме; в качестве погрешности указаны межквартильные интервалы

**Fig. 4.** Dynamics of concentrations in rats' blood serum of IFN $\beta$ 1b-PAS200 (1) and Infibeta® (2) preparations after their intravenous injections. Curves are plotted on the basis of median values in semilog form; interquartile intervals are indicated as errors

На основании полученных данных рассчитаны основные фармакокинетические параметры с использованием модели некомпартментного распределения по медианным значениям концентрации (табл. 1).

Как следует из данных, представленных в табл. 1, добавление ПАС-последовательности достоверно увеличивает экспозицию целевого белка в системном кровотоке, а именно, приводит к 2-кратному увеличению периода полувыведения ( $t_{1/2}$ ), к 3-кратному увеличению  $AUC_{last}$ , а также к 4-кратному уменьшению системного клиренса (Cl). Следует отметить, что полученные значения для немодифицированного интерферона- $\beta$  согласуются с данными литературы [7]. Таким образом, приведенные результаты позволяют заключить, что присоединение биополимера ПАС значительно улучшает фармакокинетические свойства интерферона- $\beta$  *in vivo*.

#### Сравнительное исследование фармакокинетики IFN $\beta$ 1b-PAS200 и рекомбинантного препарата Инфибета® при однократном подкожном и внутримышечном введении в организм крыс

Стандартным способом введения лекарственных средств на основе IFN $\beta$ -1b является внутримышечный (например, для препарата Ребиф) или подкожный (например, для Бетаферона

**Фармакокинетические параметры IFN $\beta$ 1b-PAS200 и Инфибета<sup>®</sup> при однократном внутривенном введении модельным животным**

**Pharmacokinetic parameters of IFN $\beta$ 1b-PAS200 and Infibeta<sup>®</sup> after single intravenous administration to test animals**

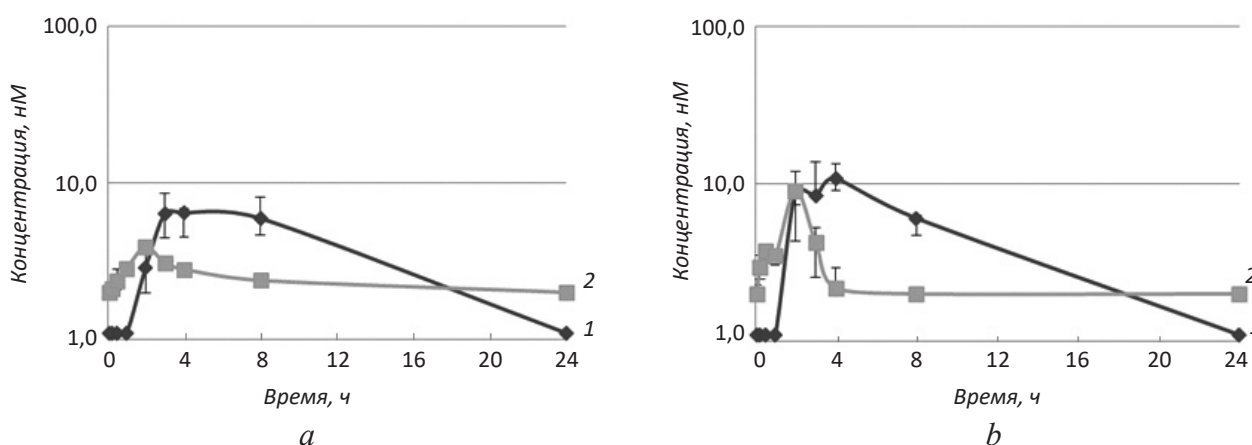
Параметр	Ед. изм.	IFN $\beta$ -PAS200	Инфибета <sup>®</sup>
Kel	1/ч	0,341	0,643
$t_{1/2}$	ч	2,03	1,08
$C_{max}$	нМ	808	820
$AUC_{last}$	нМ·ч	2192	679
$AUC_{inf}$	нМ·ч	2324	687
$AUC_{last}/AUC_{inf}$	%	94,3	98,9
Cl	л/(ч·кг)	0,0071	0,0291

*Примечание:* Kel – константа элиминации;  $t_{1/2}$  – период полувыведения препарата из системного кровотока;  $C_{max}$  – максимальная концентрация препарата в системном кровотоке;  $AUC_{inf}$  – площадь под кривой зависимости концентрации препарата в кровотоке от времени с момента его введения с экстраполяцией на бесконечность; Cl – системный клиренс.

*Footnote:* Kel, elimination constant;  $t_{1/2}$ , half-life of preparation in systemic blood flow;  $C_{max}$ , maximal concentration of compound in blood flow;  $AUC_{last}$ , area under curve of dependency of compound concentration in blood flow on time from the moment of administration till last measurable concentration;  $AUC_{inf}$ , area under curve of dependency of compound concentration in blood flow on time from the moment of administration with extrapolation to infinity; Cl, system clearance.

или Инфибеты). Ранее методом аналитической гель-эксклюзионной хроматографии (SEC) на носителе TSKgel G3000 нами было показано, что время удерживания основного пика IFN $\beta$ 1b-PAS соответствует таковому глобулярного белка с молекулярной массой около 140 кДа [23]. Эти данные свидетельствуют о том, что присоединение ПАС-последовательности к молекуле IFN $\beta$ -1b приводит к увеличению гидродинамического ра-

диуса молекулы, что, в свою очередь, может повлиять на фармакокинетические параметры, в том числе и на биодоступность препарата при подкожном и внутримышечном введении. Пилотное сравнительное исследование биодоступности IFN $\beta$ 1b-PAS200 при внутримышечном и подкожном способах введения осуществляли с использованием Инфибеты в качестве препарата сравнения.



**Рис. 5.** Динамика изменения концентрации препаратов IFN $\beta$ 1b-PAS200 и Инфибета<sup>®</sup> в плазме крови крыс при подкожном (a) и внутримышечном (b) введении. 1 – препарат IFN $\beta$ 1b-PAS200; 2 – препарат Инфибета<sup>®</sup>. График построен по медианным значениям в полулогарифмической форме; в качестве погрешности указаны межквартильные интервалы

**Fig. 5.** Dynamics of concentrations in rats' blood serum of IFN $\beta$ 1b-PAS200 (1) and Infibeta<sup>®</sup> (2) preparations after their subcutaneous (a) and intramuscular (b) administrations. Curves are plotted on the basis of median values in semilog form; interquartile intervals are indicated as errors

**Фармакокинетические параметры препаратов IFN $\beta$ 1b-PAS200 и Инфибета<sup>®</sup> при однократном подкожном и внутримышечном введении в организм крыс****Pharmacokinetic parameters of IFN $\beta$ 1b-PAS200 and Infibeta<sup>®</sup> after single subcutaneous or intramuscular administration to test animals**

Препарат	$t_{max}$ , ч	$C_{max}$ , нМ	$AUC_{last}$ , нМ·ч	$F$ , %
При подкожном введении				
IFN $\beta$ -PAS200	4	6,44	95	4,3
Инфибета <sup>®</sup>	2	3,91	22	3,3
При внутримышечном введении				
IFN $\beta$ -PAS200	4	10,77	115	5,2
Инфибета <sup>®</sup>	2	9,05	19	2,8

*Примечание:*  $t_{max}$  – время достижения максимальной концентрации препарата;  $F$  – абсолютная биодоступность. Другие обозначения см. в примечании к табл. 1 и списке сокращений.

*Footnote:*  $t_{max}$ , time of reaching maximum concentration;  $F$ , absolute bioavailability. For other designations, see Footnote to Table 1 and Abbreviations.

В результате были получены усредненные фармакокинетические профили зависимости концентрации препаратов в плазме крови крыс от времени, прошедшего после введения каждого из двух указанных препаратов (рис. 5).

На основе данных рис. 5 были рассчитаны фармакокинетические параметры исследованных препаратов. Вычисляли также их абсолютную биодоступность ( $F$ ), равную отношению значений  $AUC_{last}$  при экстравазальном и внутривенном введении (табл. 2).

При подкожном введении препаратов максимальная концентрация IFN $\beta$ 1b-PAS200 наблюдалась через 4 ч после введения и составила 6,44 нМ; для Инфибеты соответствующие значения были равны 2 ч и 3,91 нМ. При внутримышечном введении препаратов максимальная концентрация для IFN $\beta$ 1b-PAS200 наблюдалась через 4 ч после введения препарата и составила 10,77 нМ, для Инфибеты – через 2 ч и составила 9,05 нМ. Примечательно, что биодоступность исследованных препаратов при обоих способах доставки в организм была практически сопоставима и составила 4,3% и 3,3% при подкожном введении для IFN $\beta$ 1b-PAS200 и Инфибета, и 5,2% и 2,8% при внутримышечном введении, соответственно. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии значимого влияния присоединения полимера ПАС на биодоступность интерферона- $\beta$ .

Таким образом, в настоящей работе показано, что использование метода ПАСилирования позволяет улучшить как биотехнологические,

так и терапевтически важные характеристики IFN $\beta$ -1b. Присоединение ПАС-последовательности (200 а.к.) к молекуле IFN $\beta$ -1b не только увеличивает растворимость, стабильность и биологическую активность интерферона [23], но и положительным образом сказывается на ключевых фармакокинетических характеристиках, в частности, на времени экспозиции белка в системном кровотоке. Позитивный эффект применения технологии ПАСилирования с целью улучшения фармакокинетических свойств терапевтических белков продемонстрирован также для интерферона  $\alpha$ -2b человека [16] и лептина мыши [20]; в первом и во втором случае наблюдали увеличение периода полувыведения препарата в 4 и 6 раз, соответственно. Помимо этого, показано, что увеличение длины биополимера ПАС до 600 аминокислотных остатков приводит к еще более значительному эффекту пролонгирования пребывания препарата в кровотоке. Так, присоединение ПАС-последовательности (600 а.к.) к IFN $\alpha$ -2b или Fab-фрагменту антител приводит к 30-кратному и 20-кратному увеличению периода полувыведения, соответственно. При этом в обоих случаях биополимер не оказывает серьезного влияния на аффинность терапевтического белка к своей мишени [16]. С учетом этих данных есть основания предполагать, что присоединение более крупного ПАС-полипептида к молекуле IFN $\beta$ -1b окажет еще большее позитивное влияние на фармакокинетические характеристики препарата.



ЛИТЕРАТУРА

1. Pestka S., Langer J.A., Zoon K.C., Samuel C.E. Interferons and Their Actions, *Ann. Rev. Biochem.*, 1987, 56, 727–777.
2. Pestka S., Baron S. Definition and classification of the interferons, *Methods Enzymol.*, 1981, 78(Pt A), 3–14.
3. Mantia L.L., Vacchi L., Rovaris M., et al. Interferon  $\beta$  for secondary progressive multiple sclerosis: a systematic review, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 2012, 84(4), 420–426. doi: 10.1136/jnnp-2012-303291
4. Dhib-Jalbut S., Marks S. Interferon- $\beta$  mechanisms of action in multiple sclerosis. *Neurology*, 2010, 74 Suppl 1, S17–24. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181c97d99
5. Lin L.S., Kunitani M.G., Hora M.S. Interferon-beta-1b (Betaseron): A model for hydrophobic therapeutic proteins. In: Pearlman R, Wang JY (ed) Formulation, characterization, and stability of protein drugs: case histories. New York: Plenum, 1996, 275–301.
6. Mark D.F., Lin L.S. Cysteine-depleted mutants of biologically active proteins, 1990, US 4959314 A.
7. Basu A., Yang K., Wang M., et al. Structure-function engineering of interferon-beta-1b for improving stability, solubility, potency, immunogenicity, and pharmacokinetic properties by site-selective mono-PEGylation, *Bioconjug. Chem.*, 2006, 17(3), 61–630.
8. Звонова Е.А., Тюрин А.А., Соловьев А.А., Голденкова-Павлова И.В. Стратегии модуляции фармакокинетики рекомбинантных терапевтических белков, *Усп. совр. биол.*, 2017, 137(4), 415–436.
9. Jevševar S., Kunstelj M. Half-Life Extension through PEGylation, in: Therapeutic Proteins: Strategies to Modulate Their Plasma Half-Lives (Ed. R. Kontermann), Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag. GmbH & Co. KGaA, 2012, 39–61. doi: 10.1002/9783527644827.ch3
10. Gaberc-Porekar V., Zore I., Podobnik, B. Menart V. Obstacles and pitfalls in the PEGylation of therapeutic proteins, *Curr. Opin. Drug. Discov. Devel.*, 2008, 11, 242–250.
11. Knop K., Hoogenboom R., Fischer D., Schubert U.S. Poly(ethylene glycol) in drug delivery: pros and cons as well as potential alternatives. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2010, 49(36), 6288–6308.
12. Bendele A., Seely J., Richey C., et al. Short Communication: renal tubular vacuolation in animals treated with polyethylene-glycol-conjugated proteins. *Toxicological sciences*, 1997, 42, 152–157.
13. Garay R.P., El-Gewely R., Armstrong J.K., et al. Antibodies against polyethylene glycol in healthy subjects and in patients treated with PEG-conjugated agents. *Expert. Opin. Drug Deliv.*, 2012, 9(11), 1319–1323.
14. Binder, U., Skerra, A. Half-Life extension of therapeutic proteins via genetic fusion to recombinant PEG mimetics. in Therapeutic Proteins: Strategies to Modulate Their Plasma Half-Lives (Ed. R. Kontermann), 1st edn., Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2012, 63–80.
15. Binder U., Skerra A. PASylation®: a versatile technology to extend drug delivery. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 2017, 31, 10–17.
16. Schlapschy M., Binder U., Börger C., et al. PASylation: a biological alternative to PEGylation for extending the plasma half-life of pharmaceutically active proteins. *Protein Eng. Des. Sel.*, 2013, 26(8), 489–501.
17. Skerra A., Theobald I., Schlapschy M. Biological active proteins having increased *in vivo* and/or *in vitro* stability. 2007, WO 2008/155134A1
18. Mendler C.T., Friedrich L., Laitinen I., et al. High contrast tumor imaging with radio-labeled antibody Fab fragments tailored for optimized pharmacokinetics via PASylation. *MAbs*, 2015, 7(1), 96–109.
19. Harari D., Kuhn N., Abramovich R., et al. Enhanced *in vivo* efficacy of a type I interferon superagonist with extended plasma half-life in a mouse model of multiple sclerosis. *J. Biol. Chem.*, 2014, 289(42), 29014–29029.
20. Morath V., Bolze F., Schlapschy M., et al. PASylation of murine leptin leads to extended plasma half-life and enhanced *in vivo* efficacy. *Mol. Pharm.*, 2015, 12(5), 1431–1442.
21. Kuhn N., Schmidt C.Q., Schlapschy M., Skerra A. PASylated coversin, a C5-specific complement inhibitor with extended pharmacokinetics, shows enhanced anti-hemolytic activity *in vitro*, *Bioconjugate Chem.*, 2016, 27 (10), 2359–2371.
22. Hedayati M.H., Norouzzian D., Aminian M., et al. Molecular design, expression and evaluation of PASylated human recombinant erythropoietin with enhanced functional properties, *Protein J.*, 2017, 36(1), 36–48. doi: 10.1007/s10930-017-9699-9
23. Zvonova E.A., Ershov A.V., Ershova O.A., et al. PASylation technology improves recombinant interferon- $\beta$ 1b solubility, stability and biological activity. *Appl. Microbiol. Biotech.*, 2017, 101, 1975–1987.
24. Bradford M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976, 72, 248–254.
25. Zhang, Y., Huo, M., Zhou, J., Xie, S. PKSolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamics data analysis in Microsoft Excel *Computer Methods and Program in Biomedicine*, 2010, 99, 306–314.

## PASylation Technology Improves Recombinant Human Interferon Beta-1b Pharmacokinetic Properties *in vivo*

E.A. ZVONOVA<sup>1,2,\*</sup>, O.A. ERSHOVA<sup>1</sup>, A.V. ERSHOV<sup>1</sup>, A.A. KAZAROV<sup>1</sup>, E.S. BELYANINA<sup>1</sup>, M.V. LYKOV<sup>1</sup>, A.Yu. VISHNEVSKII<sup>1</sup>, A.P. KARPOV<sup>3</sup>, S.V. RUCHKO<sup>3</sup>, A.M. SHUSTER<sup>1</sup>, A.A. SOLOVIEV<sup>2</sup>, and I.V. GOLDENKOVA–PAVLOVA<sup>4</sup>

<sup>1</sup>The International Biotechnology Center (IBC) Generium, 601125, Volginskii poselok, Petushinskii region, Vladimirskaya oblast Russia

<sup>2</sup>The Russian State Agrarian University–Moscow Timiriazev Agricultural Academy, 127550, Moscow Russia

<sup>3</sup>Cellthera Pharm, 601125, Volginskii poselok, Petushinskii region, Vladimirskaya oblast, Russia

<sup>4</sup>The Institute for Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, 127276 Moscow, Russia

e-mail: berkovich@ibcgenerium.ru\*

Received January 17, 2018

Accepted February 26, 2018

**Abstract**– A modified form of the IFN $\beta$ -1b protein has been obtained using the PASylation® technology to overcome the constraints associated with the short exposition of the protein in systemic circulation due to the small size of its molecule. To obtain a recombinant IFN $\beta$ 1b-PAS200 protein, a PAS polypeptide of 200 amino acid residues was appended to the IFN $\beta$ -1b protein using standard molecular biology methods. We conducted a comparative pharmacokinetic study of IFN $\beta$ 1b-PAS200 after a single administration to Sprague Dawley rats. It was shown that the introduction of the IFN $\beta$ 1b-PAS200 polypeptide in the animals' organisms resulted in the 2-fold increase in the plasma half-life of the preparation and 3-fold growth of AUC<sub>last</sub> in comparison with the unmodified IFN $\beta$ -1b. It was also shown that the PASylation had no significant influence on subcutaneous or intramuscular bioavailability of the cytokine. Our results demonstrate that PASylation® has positive impact on the IFN $\beta$ -1b pharmacokinetic properties and can be used for the development of a half-life-extended form of IFN $\beta$ -1b, possibly using even longer PAS polypeptides.

*Key words:* interferon beta-1b, PASylation, pharmacokinetic studies.

**doi:** 10.21519/0234-2758-2018-34-2-37-46