

**НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика**

# **Глиферон**

---

**(биомодифицированный интерферон альфа-2b)**

**Торговое название препарата:** Глиферон

**Международное непатентованное название (МНН):** отсутствует

**Лекарственная форма:** лиофилизат для приготовления раствора для подкожного введения

**Фармакотерапевтическая группа:** Цитокины

**Код АТХ** отсутствует

**Активное вещество:** Глиферон - 3 млн МЕ.

Глиферон представляет собой биомодифицированный интерферон альфа-2b, удлинённый с NH<sub>2</sub> конца аминокислотной последовательностью с неупорядоченной пространственной структурой S(G<sub>4</sub>S)<sub>20</sub>, где S – остаток серина, G – остаток глицина. Средняя молекулярная масса составляет 25660 дальтон. Биомодификация достигается в процессе биосинтеза в штамме дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, в которую методами генной инженерии введен ген человеческого интерферона альфа-2b с последовательностью S(G<sub>4</sub>S)<sub>20</sub>.

Биологическая активность препарата Глиферон обусловлена основной частью молекулы - интерфероном альфа-2b. Интерферон альфа-2b обладает противовирусным, иммуномодулирующим и антипролиферативным действием. Противовирусное действие обусловлено связыванием со специфическими рецепторами на поверхности клеток и инициацией последовательности внутриклеточных реакций, включающих индукцию определенных ферментов (протеинкиназа R, 2'-5' олигоаденилатсинтетаза, белки Mx). Это ведет к подавлению транскрипции вирусного генома и ингибированию синтеза вирусных белков. Иммуномодулирующее действие связано с увеличением цитотоксичности Т-лимфоцитов и естественных киллеров и фагоцитарной активности макрофагов. Кроме того, интерферон альфа-2b способствует дифференцировке Т-хелперов, защищает Т-клетки от апоптоза и влияет на продукцию ряда цитокинов (интерлейкинов, интерферона гамма). Все эти эффекты могут опосредовать терапевтическую активность препаратов интерферона альфа-2b, и, в частности, Глиферона.

Удлинение молекулы интерферона альфа-2b аминокислотной последовательностью S(G<sub>4</sub>S)<sub>20</sub>, имеющей неупорядоченную пространственную структуру приводит к увеличению гидродинамического объема молекулы, что обеспечивает увеличение объема распределения и уменьшение клиренса.

Дополнительно механизм пролонгирования действия Глиферона основан на эффекте «депо» - замедлении выхода препарата в кровь при подкожном введении.

Применение Глиферона позволит снизить частоту инъекций, что обеспечит повышение качества жизни пациентов. Кроме того, внедрение данного препарата в

медицинскую практику позволит снизить стоимость терапии такого заболевания, как хронический гепатит С.

Основой молекулы Глиферона является молекула человеческого лейкоцитарного интерферона альфа 2b. Все интерфероны, как нативные, так и рекомбинантные, являются видоспецифичными, поэтому только на этапе клинического исследования можно получить достоверную информацию о препарате Глиферон. На I этапе клинических исследований необходимо объективно доказать безопасность нового лекарственного средства. Для дальнейшей эффективной разработки Глиферона необходимо идентифицировать фармакокинетические характеристики исследуемого лекарства и планировать последующую разработку, основанную на этом профиле.

Начальные исследования 1 фазы КИ должны обеспечить оценку кратковременной безопасности и переносимости у здоровых добровольцев и должны предоставить информацию по фармакодинамике и фармакокинетики, необходимую для выбора необходимого диапазона дозировок и схемы введения, намечаемых для первых исследований по терапевтической оценке (2 фаза КИ).

### **Теоретические вопросы пролонгирования действия.**

Из физиологии почек хорошо известно, что эффективность фильтрации в почках макромолекул из плазмы крови зависит от их размера и заряда. При этом быстрому извлечению из плазмы подвергаются небольшие белки и пептиды путем фильтрации сквозь поры почечных канальцев. Это объясняется размером пор, расположенных в почечных клубочках. Эти поры имеют средний размер 3–5 нм. Для них характерен верхний порог пропускания около 60Å (что соответствует размеру глобулярного белка, имеющему молекулярный вес около 70 кДа), а также отрицательный поверхностный заряд, как следствие присутствия кислого протеогликана в структуре внеклеточного матрикса в составе базальной мембраны. Таким образом, большие кислые белки подобные сывороточному альбумину, имеющему диаметр 90Å и  $pI = 5$ , являются в существенной степени (хотя и не полностью) устойчивыми к почечной фильтрации. То же справедливо и в отношении иммуноглобулинов, имеющих даже больший размер молекул, чем альбумин, причем для этих белков (альбумина и иммуноглобулинов) характерен биологический механизм эндосомального рециклинга, специфически увеличивающего продолжительность их циркуляции в плазме. С другой стороны для белков и пептидов, имеющих размер меньший, чем нижняя граница диаметра почечных пор (примерно 36Å), характерен коэффициент просеивания, равный 1. Это означает, что концентрация таких

молекул с обеих сторон почечных канальцев, то есть в плазме и в почечном фильтрате, уравнивается при каждом прохождении молекул через почку, что ведет к быстрому сокращению времени их циркуляции в плазме до нескольких минут.

Представления о том, что задержка белков в плазме в ходе почечной фильтрации напоминает обычный диализ или ультрафильтрацию, позволили сформулировать идею увеличения времени циркуляции белков путем механического увеличения их молекулярного размера. В результате впервые проблема пролонгирования действия низкомолекулярных белков была решена путем химического присоединения к молекулам белка структурно неупорядоченных производных полиэтиленгликоля (ПЭГ). При этом за счет увеличения молекулярных размеров белков до величин, превышающих размер пор почечных клубочков, удалось увеличить время жизни белков в плазме крови от нескольких часов до нескольких дней у человека.

Стратегия пролонгирования действия фармакологически активных белков путем химической конъюгации с синтетическими полимерами ПЭГ позволила создать несколько одобренных к применению лекарственных препаратов, например, ПЭГ-ИФН- $\alpha 2a$  (Pegasys<sup>®</sup>), ПЭГ-GCSF (Neulasta<sup>®</sup>) и совсем недавно – ПЭГ-anti-TNF $\alpha$ -Fab (Cimzia<sup>®</sup>).

На сегодняшний день препараты на основе ПЭГ-ИФН (в комбинации с рибавирином) являются стандартом лечения больных, страдающих хроническим гепатитом С. Однако, несмотря на это, терапия ПЭГ-ИФН имеет два серьезных недостатка:

1) высокая стоимость производных ПЭГ, низкая эффективность ПЭГилирования, высокий расход биологической субстанции, необходимость дополнительной очистки ПЭГилированных форм, - все это значительно удорожает стоимость препаратов ПЭГ-ИФН и, соответственно, стоимости лечения, и в значительной степени затрудняет массовое применение пэгилированных препаратов;

2) существенным фактором лечебного процесса является величина разовой дозировки препаратов. Поскольку в случае ПЭГ-ИФН она до 10 раз выше обычных дозировок за счет снижения активности в процессе химической стадии ПЭГилирования, с течением времени это приводит к накоплению в почках и печени слабо метаболизируемых производных ПЭГов, что оказывает негативное влияние на функциональное состояние этих органов. В частности одним из известных побочных эффектов длительного применения ПЭГилированных белков является вакуоляция почечного эпителия.

Таким образом, несмотря на то, что границы безопасности и профиль побочных эффектов ПЭГ-ИФН в настоящее время хорошо известны, и препараты на основе ПЭГ-ИФН являются на сегодняшний день стандартом лечения гепатита С, около половины больных пока не излечиваются ПЭГ-ИФН, а многие другие не выдерживают

необходимый режим лечения: примерно 10% пациентов вынуждены прекращать лечение из-за побочных эффектов и от 32% до 42% должны уменьшать дозировку вследствие появления цитопении. Несмотря на то, что, на основании богатого клинического опыта была оптимизирована стратегия лечения, и это позволило управлять побочными эффектами и минимизировать их влияние на качество жизни пациентов, сохраняется значительная потребность сделать лечение с помощью препаратов группы ИФН более безопасным и эффективным.

### **Технология пролонгирования действия, основанная на имитации ПЭГ.**

Революционная пептидная технология, обеспечивающая имитацию ПЭГ без химической конъюгации с синтетическими полимерами основана на создании гибридных белков, являющихся продуктами клонированных совместно двух или более кодирующих последовательностей из разных генов и представляющих собой одну полипептидную цепь. Генетически сконструированный гибридный комплекс фармакологически активного белка со структурно неупорядоченным полипептидом, значительно увеличивающим гидродинамический объем молекулы получается в процессе биосинтеза и обеспечивает увеличение продолжительности циркуляции гибридного белка в плазме крови по тому же механизму, что и у ПЭГилированных белков, чем обеспечивается пролонгирование действия при введении в организм. (табл. 1.).

Из биофизики полимеров хорошо известно, что неструктурированные полипептидные цепочки имеют более рыхлую структуры и гораздо больший гидродинамический объем, чем полипептиды с таким же числом остатков, имеющие третичную структуру, или глобулярные белки.

Вследствие термического движения конформация таких неупорядоченных цепочек постоянно меняется, что приводит к постоянной усредненной ватообразной структуре, молекулярный размер которой зависит только от числа аминокислотных остатков, их собственного размера (диаметра) и конформационной гибкости. Радиус вращения такого неупорядоченного полипептида возрастает пропорционально квадратному корню от числа остатков в полимере и в водных растворах нет никакой разницы между химическим полимером, таким как ПЭГ, и неупорядоченной полипептидной цепочкой.

**Таблица 1** Обзор полипептидов способных имитировать ПЭГ.

<b>Варианты полипептидов</b>	<b>Структура полипептидов</b>	<b>Компания-разработчик</b>
SAPA repeats	[DSSAHSTPSTPA] <sub>n</sub>	–
Antigen 13 repeats	[EPKSA] <sub>n</sub>	–
Elastin - like polymers	[VPGXG] <sub>n</sub> <sup>a)</sup>	PhaseBio (www.phasebio.com)
Gelatin - like polymers	[GXZ] <sub>n</sub> <sup>b)</sup>	–
Polyanionic polymers	poly E or poly D	Cell Therapeutics (www.celltherapeutics.com)
Genetic Polymers	G, N, Q plus A, S, T, D, E	Aequus BioPharma (www.aequusbiopharma.com)
HAP	[GGGGS] <sub>n</sub>	–
HRM	P, D, S, T, A	–
XTEN	P, E, S, T, A, G	Amunix (www.amunix.com)
PAS	P, A, S	XL - protein (www.xl-protein.com)

a) X – любая аминокислота за исключением пролина.

b) X – любой остаток из группы E, K, N, P, Q или S; Z – аминокислотный остаток из группы E, K, N, P или Q.

Таким образом, данная технология основана на использовании специфических аминокислотных последовательностей, которые устойчивы к фолдингу (формированию третичной структуры), агрегации, неспецифической адсорбции и поддерживающих стабильное неупорядоченное состояние при физиологических условиях в составе гибридных белков со структурированным фармакологически активными белками. Подобные последовательности, имитирующие поведение ПЭГ, способны опосредовать намного большее увеличение гидродинамического объема молекулы, чем можно было бы предположить на основании расчетов молекулярного веса. Полипептидные полимеры, состоящие из аминокислотных остатков, имеют несколько важных преимуществ перед химическими полимерами на основе ПЭГ. Во-первых, такие биополимеры являются биodeградируемыми, они разлагаются внутриклеточными протеиназами, следовательно, токсичности у таких полимеров или накопления этих полимеров в каких-либо органах (например, в почках или печени) или клетках (например, в макрофагах) не предвидится. Во-вторых, структура аминокислотного полимера кодируется генетически, и его встраивание в состав гибридного фармакологически активного белка осуществляется непосредственно в процессе биосинтеза. Результирующий белок может быть продуцирован в каком-либо микробном хозяине и затем выделен и очищен в виде

растворимого белка без использования дополнительных трудоемких стадий, связанных с химической модификацией.

Таким образом, полипептидная технология пролонгирования действия, основанная на имитации ПЭГ обладает уникальными достоинствами, поскольку позволяет:

- за счет подбора длины пролонгирующего полипептида конструировать белки с физиологически обоснованным пролонгированием действия;
- продуцировать биомодифицированные белки внутриклеточно или секретировать в различных типах клеток, включая клетки бактерий и животных;
- вследствие инертности пролонгирующего полипептида сохранять специфическую активность белков на уровне немодифицированных молекул.

В настоящее время изучены несколько вариантов пролонгирующих полипептидов, среди которых по способности сохранения неупорядоченной структуры полимер глицина (Gly) обладает наибольшими перспективами. Ввиду отсутствия боковой цепи, глицин, единственная ахиральная аминокислота в природе, является наиболее гибким аминокислотным остатком, и ее полимер принимает неупорядоченную конформацию с большой энтропией и низкой тенденцией к участию в межмолекулярных взаимодействиях. Эти же свойства характерны и для полимеров глицина, в состав которых добавлено 20% остатков серина. Короткие полимерные полипептиды на основе мономера Gly<sub>3-4</sub>Ser встречаются в природных генах. Например, минорный оболочечный белок g3p нитевидных бактериофагов содержит гибкие спейсерные области, содержащие Gly<sub>3</sub>Ser повторы, перемежающиеся остатками Glu, причем эта последовательность оказывается устойчивой в жестких условиях кишечника животных. Сходная последовательность встречается и в белках человека, например, в ДНК - связывающем белке 99 (GenBank: AF125158) и МАПКК 4 (GenBank: CR536564). Наличие у человека подобных белков снижает риск возникновения негативных иммуногенных эффектов при использовании последовательности (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>n</sub>. Кроме того, линкеры (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub> продемонстрировали свою безопасность в ходе доклинических исследований в составе различных версий одноцепочечных фрагментов антител scFv.

Концепцию пролонгирования действия белков, основанную на использовании полиглициновых последовательностей, называют НАР (на основе (G<sub>4</sub>S)<sub>n</sub>) или GRS (на основе глицин-богатых полимеров).

Экспериментально было показано, что полипептиды (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>n</sub>:

- 1) способны эффективно увеличивать гидродинамический объем и могут быть использованы для пролонгирования действия с получением гибридных белков;
- 2) не оказывают существенного влияния на специфическую активность белка;

3) не опосредуют неблагоприятных эффектов при введении животным (неспецифического поглощения клетками и тканями или агрегации);

4) обеспечивают гибриднему белку существенно лучшее, более равномерное распределение между различными тканями, характерное для немодифицированного белка, по сравнению с альбумин-связывающимся вариантом, локализованным преимущественно внутри сосудов.

5) стимулируют низкую тенденцию к агрегации, особенно в случае 100-аминокислотного варианта.

## Информация о лекарственном средстве.

**Глиферон**, лиофилизат для приготовления раствора для подкожного введения

*Активное вещество:* Глиферон - 3 млн ед.

*Вспомогательные вещества:*

### **Вспомогательные вещества**

Натрия дигидрофосфат дигидрат	2,10 мг
Динатрия гидрофосфат	1,45 мг
Натрия хлорид	1,46 мг
D-трегалоза дигидрат	95,0 мг
Динатрия эдетат дигидрат	0,37 мг
L-метионин	0,10 мг
Полоксамер 188	0,10 мг

**Растворитель** Вода для инъекций (0,7 мл)

**Описание:** Лиофильно высушенная масса белого или почти белого цвета

Вода для инъекций (растворитель) – прозрачная бесцветная жидкость без запаха и вкуса.

### **Характеристика препарата:**

Глиферон представляет собой биомодифицированный интерферон альфа-2b, удлинённый с NH<sub>2</sub> конца аминокислотной последовательности с неупорядоченной пространственной структурой S(G<sub>4</sub>S)<sub>20</sub>, где S – остаток серина, G – остаток глицина. Средняя молекулярная масса составляет 25660 дальтон. Биомодификация достигается в процессе биосинтеза в штамме дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, в которую методами генной инженерии введен ген человеческого интерферона альфа-2b с последовательностью S(G<sub>4</sub>S)<sub>20</sub>.

Лекарственная форма Глиферона в виде лиофилизата для приготовления раствора для подкожного введения состоит из действующего вещества – Глиферона и вспомогательных веществ. В результате многочисленных экспериментов при фармацевтической разработке от субстанции до готовой лекарственной формы подобран оптимальный состав вспомогательных веществ, позволяющих сохранить активность Глиферона на протяжении всей технологической цепочки. Субстанция Глиферона - водорастворимый глобулярный белок с аминокислотной последовательностью с фрагментом S(G<sub>4</sub>S)<sub>20</sub> с неупорядоченной пространственной структурой - представляет собой концентрированный раствор, хранится при -20<sup>0</sup>С, затем размораживается, разливается во флаконы и лиофильно высушивается с последующим хранением готовой

лекарственной формы при 2-8<sup>0</sup>С. Основная проблема – выбор оптимального криопротектора – была решена экспериментально. Был выбран D-трегалозы дигидрат, обеспечивающий сохранность структуры молекулы Глиферона как при хранении субстанции, так и в процессе лиофильной сушки готовой лекарственной формы. Остальные компоненты обеспечивают быстрое растворение Глиферона, его стабильность в растворе и оптимальное рН для подкожного введения

### **Условия хранения**

При температуре от 2 до 8<sup>0</sup>С. Не замораживать.

### **Инструкция по приготовлению раствора для инъекции**

Лиофилизат препарата Глиферон следует разводить только прилагаемым растворителем. Препарат Глиферон нельзя смешивать с другими медицинскими препаратами. С помощью стерильного шприца отбирают из ампулы с растворителем воду для инъекций, отмеряют 0,5 мл и вводят во флакон с препаратом Глиферон, флакон осторожно покачивают до полного растворения порошка. Дозу набирают в стерильный шприц. Для введения используют 0,5 мл раствора. Готовый раствор следует осмотреть перед введением. Раствор должен быть прозрачным, бесцветным и не содержать видимых частиц. В случае изменения цвета или появления видимых частиц, раствор использовать не следует.

## Доклинические исследования

### Введение

В ходе доклинической разработки выполнены исследования эффективности и безопасности Глиферона. Основные результаты этих исследований суммированы в табл.1-3. В табл.2 суммированы данные исследований специфической активности Глиферона, определяющие его эффективность в качестве лекарственного средства.

**Таблица 2** – Специфическая противовирусная активность Глиферона в составе ФС и ГЛФ\*

Образец	Специфическая активность, $\times 10^8$ МЕ/мг	Этап №	Соответствие требованиям ТЗ
СУБ_Глиферон_010113 (1)	$1,33 \pm 0,07$	3	Соответствует
СУБ_Глиферон_010113 (2)	$1,36 \pm 0,17$	3	Соответствует
ГЛФ_Глиферон_370813	$1,17 \pm 0,06$	4	Соответствует
ГЛФ_Глиферон_380913	$1,41 \pm 0,08$	4	Соответствует
ГЛФ_Глиферон_080214	$1,38 \pm 0,04$	5	Соответствует
Среднее значение	$1,33 \pm 0,09$	-	Соответствует

\* измерения активности выполнены в ходе указанных этапов НИОКР в лаборатории биологического контроля ООО «Фармапарк», г. Москва.

Специфическая противовирусная активность Глиферона приближается к фармакопейному значению активности стандартного интерферона (не менее  $1,4 \times 10^8$  МЕ/мг, Европейская фармакопея, изд.7) и составляет примерно 2/3 от активности стандартного интерферона, измеренного в тех же условиях ( $2 \times 10^8$  МЕ/мг, спецификация ФС препарата Альтевир, ООО «Фармапарк»).

Поскольку молекулярный вес Глиферона (25,66 кДа) превышает молекулярный вес стандартного интерферона (19,27 кДа), и в то же время каждая молекула Глиферона включает в свой состав одну молекулу зрелого интерферона, полученные данные (табл. 1) позволяют рассчитать относительную молярную активность Глиферона и стандартного интерферона.

Проведённый расчет показал, что молярная активность Глиферона составляет около 90% относительно молярной активности стандартного интерферона.

Данная величина существенно превосходит соответствующие параметры пэгилированных препаратов пролонгированного действия «Пегасис» и «Пэгинтрон» (7% и

28%, соответственно).

Это позволяет заключить, что связывание Глиферона с рецепторами происходит почти с такой же эффективностью, как и связывание стандартного интерферона, а снижение удельной активности Глиферона объясняется в основном увеличением молекулярного веса Глиферона относительно стандартного интерферона.

Основные результаты исследования фармакокинетики субстанции и готовой лекарственной формы Глиферона, в том числе сравнительные исследования Глиферона и стандартного интерферона Альтевир. суммированы в табл.3.

**Таблица 3 – Фармакокинетические отличия Глиферона от стандартного интерферона\***

Показатель	Результат оценки
T <sub>max</sub>	После п/к введения увеличение концентрации Глиферона в крови до максимальных значений происходило в 4 раза дольше, чем Альтевира, 2 ч и 0,5 ч, соответственно.
Период полувсасывания	После п/к введения параметр «период полувсасывания» Глиферона более чем в 6 раз превосходил показатель Альтевира, что также характеризует значительно более длительное поступление Глиферона в системный кровоток по сравнению с Альтевиром
T <sub>1/2</sub> , период полувыведения	Независимо от способа введения, п/к или в/в, «период полувыведения» Глиферона на моноэкспоненциальном участке более чем в 3 раза превосходил показатель Альтевира, 2,5-2,8 ч и 0,8 ч, соответственно
AUC	При условии линейности фармакокинетики Глиферона** и введении препаратов в равных по активности дозировках расчетное отношение AUC Глиферона и AUC Альтевира при п/к введении составит около 4 раз, а при в/в введении – около 3 раз
Клиренс и MRT	При п/к введении показатель клиренса Глиферона был в 2,4 раза ниже, а MRT – в 2,3 раза выше соответствующего показателя Альтевира.
Биодоступность	Абсолютная биодоступность ФС Глиферона при п/к введении составила около 62%***, а биодоступность Альтевира – 45%.

\* - по результатам оценки сравнительной фармакокинетики ФС Глиферона и стандартного интерферона (Альтевира)

\*\* - линейность фармакокинетики Глиферона доказана на этапе исследования ГЛФ

\*\*\* соответствует показателю ГЛФ, измеренному на кроликах

Как показали фармакокинетические исследования ФС и ГЛФ Глиферона основой пролонгированного действия Глиферона по сравнению со стандартным интерфероном является эффект п/к депонирования Глиферона, проявляющийся в его замедленном

выходе в системный кровоток из подкожного депо. Дополнительный вклад в суммарное увеличение времени жизни Глиферона вносят пониженный клиренс и увеличенный период полувыведения препарата.

В ходе ФК исследований, выполненных с использованием ГЛФ Глиферона, было дополнительно установлено, что:

- фармакокинетика Глиферона после его в/в и п/к введения крысам линейна в изученном диапазоне доз (от 20 до 80 мкг/кг);
- после 5-кратного ежедневного п/к введения препарата крысам, уровни его концентрации практически не превышали расчетные, т.е. непрогнозируемой кумуляции препарата после его многократного введения не наблюдалось.

Результаты токсикологических исследований Глиферона обобщены в табл.4.

**Таблица 4** – Исследования безопасности ФС и ГЛФ Глиферона

Объект исследования	Показатель	Место проведения исследования	Результат оценки
Субстанция	аномальная токсичность	ФГУП ГосНИИгенетика	не выявлена
ГЛФ	острая токсичность	ФИБХ РАН*	в диапазоне тестируемых доз не вызывает токсических эффектов
	хроническая токсичность	ФИБХ РАН	не отличается от контрольного препарата сравнения, является безопасным в диапазоне терапевтических доз
	оценка канцерогенного потенциала	ФИБХ РАН	не выявлен
	иммуногенности	ФИБХ РАН и ФГУП ГосНИИгенетика	не превышает иммуногенность контрольного препарата сравнения
	аллергенность	ФИБХ РАН	аллергизирующего действия не выявлено

\* Лаборатория биологических испытаний Филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ФИБХ РАН)

*На основании полученных результатов был сделан вывод о том, что разработанный лекарственный препарат Глиферон может быть рекомендован для проведения клинических исследований.*

## Приложение

### Фармакокинетика у животных

#### **Исследование фармакокинетики субстанции Глиферона в сравнении с субстанцией «Интерферона альфа-2b человеческого рекомбинантного» производства ООО «Фармапарк».**

Проведено изучение фармакокинетических параметров субстанции Глиферона в сравнении с субстанцией «Интерферона альфа-2b человеческого рекомбинантного» производства ООО «Фармапарк» на самцах крыс линии CD при подкожном и внутривенном введении.

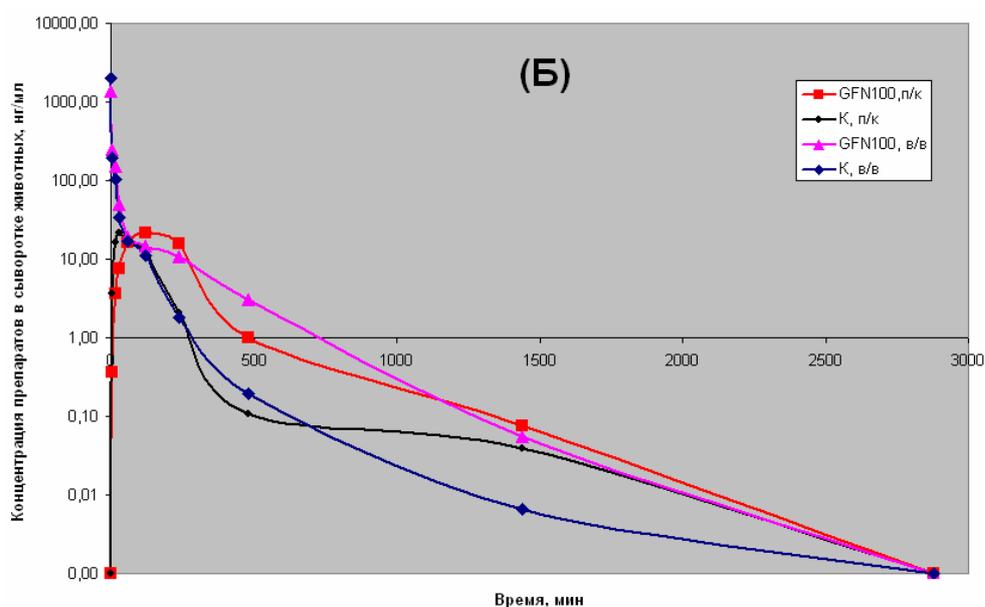
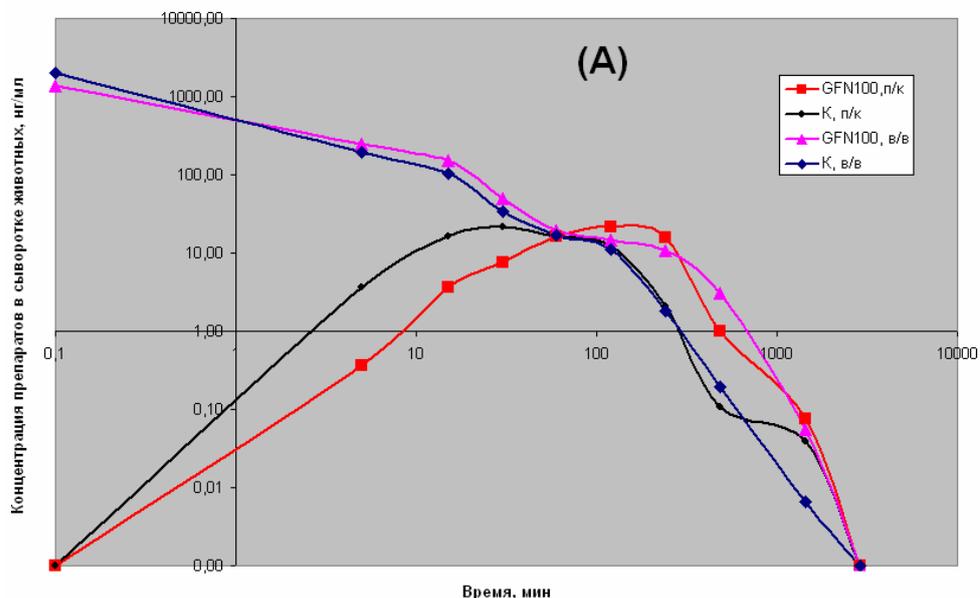
Исследование осуществлено на самцах крыс CD возраст 10-11 недель. Тестируемый препарат вводили животным однократно подкожно в межлопаточную область или однократно внутривенно в хвостовую вену. У животных отбирали образцы крови во временные точки 0 мин (до введения), 5, 15, 30 мин и 1, 2, 4, 8 и 24 и 48 часов после введения. Проведенные исследования показали, что основные фармакокинетические показатели Глиферона, характеризующие пролонгирование действия при п/к введении, (полная площадь под кривой концентраций ( $AUC_{\infty}$ ), период полувсасывания, период достижения максимальной концентрации, клиренс) превосходят соответствующие показатели контрольного препарата (нативного интерферона) в 3 и более раз. При в/в введении Глиферон продемонстрировал несколько меньшее превосходство над немодифицированным интерфероном, однако пролонгирование нахождения в крови животных также было установлено.

Таким образом, было показано, что:

- механизм пролонгирования действия Глиферона основан на эффекте «депо» - замедлении выхода препарата в кровь при п/к введении. Период  $T_{max}$  Глиферона примерно в 4 раза превышает значение контроля. Параметр «период полувсасывания» Глиферона превышает контрольное значение в 6,4 раза;
- клиренс Глиферона при п/к и в/в введении меньше клиренса контрольного препарата в 3,5 и 2,6 раза, соответственно;
- значение параметра  $AUC_{\infty}$  Глиферона при п/к и в/в введении превышает значение контрольного препарата для такой же дозы в 3,5 и 2,6 раза, соответственно;
- отношение параметров  $T_{half}$ , периодов полувыведения, при в/в введении для Глиферона и контроля составляет 3,3 раза (было 5,4 раза).

Рисунок 1 – Графики изменения концентраций исследуемых препаратов в сыворотках экспериментальных животных в логарифмических (А) и полулогарифмических (Б)

координатах. Для удобства графического отображения фармакокинетических данных: 1) нулевые значения концентраций заменены на малые величину 0,01; 2) момент времени 0 минут отображен как 0,1 мин.



### Изучение фармакокинетики препарата Глиферон на крысах

Проведено изучение фармакокинетических параметров и биодоступности лекарственной формы препарата Глиферон на самцах крыс линии CD при подкожном и внутривенном введении.

Исследование осуществлено на самцах крыс CD возраст 10-11 недель, производитель животных предоставил данные последнего контроля здоровья животных, подтверждающие их SPF-статус. Тестируемый препарат вводили животным однократно

или многократно (пять введений) подкожно в межлопаточную область или однократно внутривенно в хвостовую вену. У животных, получавших препарат подкожно, собирали образцы крови во временные точки 0 мин (до введения), 15, 30, 60, 90 мин и 2, 3, 4, 6, 8 и 24 ч после введения. У животных, получавших тестируемый препарат пятикратно, пробы крови в указанные временные точки собирали непосредственно до (0 мин) и после последнего введения. У животных, получавших препарат внутривенно, собирали образцы крови во временные точки 0 мин (до введения), 5, 15, 30, 60 мин и 2, 4, 6, 8 и 24 ч после введения. Кровь собирали в пробирки без антикоагулянта, центрифугировали для получения сыворотки, и хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$  до момента передачи на анализ.

### **Изучение фармакокинетики препарата Глиферон на кроликах**

Целью данного исследования являлось изучение фармакокинетических параметров и биодоступности лекарственной формы препарата Глиферон на самцах кроликов при подкожном и внутривенном введении.

Выбор доз для исследования основан на предполагаемой терапевтической дозе для человека. Было использовано подкожное введение препарата, поскольку это планируемый способ применения тестируемого препарата в клинической практике, а также внутривенное введение с целью изучения биодоступности исследуемого препарата. Лекарственная форма Глиферона вводилась животным однократно подкожно в межлопаточную область или внутривенно в ушную вену. Образцы крови отбирали во временные точки 0 мин (до введения), 15, 30, 60, 90 мин и 2, 3, 4, 6, 8 и 24 ч после введения. С целью уменьшения вариабельности при расчетах биодоступности препарат вводили подкожно и внутривенно одним и тем же животным. Между п/к и в/в исследованиями была сделана пауза для полного выведения препарата.

### **Оценка параметров фармакокинетики лекарственной формы препарата**

#### **Глиферон у животных**

- 1) После в/в введения препарата животным концентрации Глиферона в крови примерно в течение 1 ч снижались быстро (фаза распределения), а затем медленно (фаза выведения).
- 2) После п/к введения препарата животным Глиферон обнаруживался в системном кровотоке уже через 15 мин и достигал значений концентрации близких к максимальному через 1 – 1,5 ч у крыс и в среднем через 2,6 ч у кроликов. В дальнейшем уровень Глиферона изменялся незначительно и существенное

снижение его наблюдалось практически только через 6 ч (крысы) и 8 ч (кролики) после введения препарата.

- 3) При в/в введении препарата значения  $Cl$  составляли 1 – 1,5 мл/мин×кг (крысы) и в среднем 1,6 мл/мин×кг (кролики),  $V_{ss}$  – около 0,1 л/кг и  $MRT$  – около 1 ч.
- 4) При п/к введении препарата значения  $MRT$  составляли 3 ч (крысы) и 4 ч (кролики). Различие в значениях данного параметра после в/в и п/к введения Глиферона обусловлено длительным поступлением препарата в системный кровоток после его п/к введения
- 5) Период полувыведения Глиферона составлял у крыс около 1,5 – 2 ч, у кроликов – в среднем 2,3 ч.
- 6) Установлено, что фармакокинетика Глиферона после его в/в и п/к введения линейна в изученном диапазоне доз (от 20 до 80 мкг/кг).
- 7) Показано, что после 5-кратного ежедневного п/к введения препарата крысам, уровни его концентрации практически не превышали расчетные, т.е. непрогнозируемой кумуляции препарата после его многократного введения не наблюдалось.
- 8) Установлено, что абсолютная биодоступность Глиферона после его п/к введения крысам составляла в среднем около 25%, а после введения кроликам – 60%.