

УДК 57.017

## ФАРМАКОКИНЕТИКА ДВУХ ФОРМ РЕКОМБИНАНТНОГО ИНСУЛИНОПОДОБНОГО ФАКТОРА РОСТА 1 В КРОВИ МЫШЕЙ

© 2019 г. И. В. Духовлинов<sup>1</sup>, О. А. Добровольская<sup>2</sup>, И. В. Евсюков<sup>1, \*</sup>, Е. Г. Богомолова<sup>2</sup>, Н. Н. Колмаков<sup>2</sup>, А. А. Луковенко<sup>3</sup>, Е. А. Фёдорова<sup>3</sup>, С. А. Ищук<sup>2</sup>, А. И. Орлов<sup>4</sup>, Е. В. Воробейчиков<sup>5</sup>, А. С. Симбирцев<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ООО “АТГ Сервис Ген”, Санкт-Петербург, 199034 Россия

<sup>2</sup>Институт Экспериментальной Медицины, Санкт-Петербург, 197376 Россия

<sup>3</sup>ООО “Биохимический Агент”, Санкт-Петербург, 190005 Россия

<sup>4</sup>ООО “Дакра Медикал”, Санкт-Петербург, 197101 Россия

<sup>5</sup>ООО “Полифарм”, Санкт-Петербург, 197101 Россия

\*E-mail: evsyukov007@mail.ru

Поступила в редакцию 04.04.2019 г.

После доработки 22.04.2019 г.

Принята к публикации 24.04.2019 г.

В работе рассматривается фармакокинетика двух субстанций, содержащих в качестве активного вещества рекомбинантный инсулиноподобный фактор роста 1 (ИФР1). Первая субстанция (ИФР<sub>1</sub>) содержит собственно рекомбинантный ИФР1, вторая (ИФР<sub>2</sub>) – ИФР1, транслируемый с плазмидной ДНК, кодирующей ген этого белка *IGF-1*. Установлено, что при внутримышечном введении ИФР<sub>1</sub> время задержки его поступления в кровоток составляет 1.5–2 ч, а ИФР<sub>2</sub> – 24–25 ч. Это свидетельствует о наличии различных механизмов накопления данных веществ в системном кровотоке. Максимальное значение концентраций ИФР<sub>1</sub> в крови определяется через 5 ч после введения, ИФР<sub>2</sub> – через 125 ч после введения. Максимальные значения концентраций этих веществ сопоставимы между собой. Концентрация ИФР<sub>1</sub> в крови снижается до исходного значения через 12 ч после его введения, а концентрация ИФР<sub>2</sub> – через 216 ч. Параметры клиренса (Cl) и константы элиминации (*Ke*) рассматриваемых субстанций также имеют существенные различия, что подтверждает наличие быстрой и медленной динамики снижения их максимальных концентраций после внутримышечного введения. Различная динамика накопления субстанций в крови и их элиминация из кровотока после введения, а также различные значения параметров площади под фармакокинетической кривой (*AUC<sub>t</sub>*, *AUC<sub>∞</sub>*) демонстрируют, что ИФР<sub>2</sub> более продолжительное время находится в системном кровотоке, чем ИФР<sub>1</sub>. Это имеет существенное значение для формирования и выраженности фармакодинамических эффектов.

**Ключевые слова:** фармакокинетика, инсулиноподобный фактор роста, рекомбинантный белок, плазмидная ДНК, ген *IGF-1*, внутримышечное введение

DOI: 10.1134/S0041377119070034

Способность чужеродной ДНК осуществлять синтез кодируемых ею белков применяется в фундаментальной науке, медицине и биотехнологии (Davis et al., 1996; Tsurumi et al., 1997; Romero et al., 2002). Например, при внутримышечном введении плазмидной ДНК, содержащей белок-кодирующий ген под контролем промотора, происходит поглощение ее мышечными клетками, которые индуцируют синтез этого белка (Wolff et al., 1990). В условиях *in vivo* процесс синтеза белка увеличивает время его накопления в системном кровотоке, что пролонгирует вза-

имодействие его молекул со специфическими рецепторами (Bonadio et al., 1999). Поэтому медленная кинетика изменений концентрации этого класса веществ в кровотоке представляет перспективной для терапии заболеваний, т.к. длительный процесс накопления и снижения активного вещества в крови повышает выраженность фармакодинамического эффекта.

Инсулиноподобный фактор роста 1 (ИФР1), является важным эндокринным медиатором действия гормона роста (Laviola et al., 2008; O’Kusky, Ping, 2012; Dyer et al., 2016). Этот белок воздействует на все виды клеток, в том числе на нейроны, стимулирует их пролиферацию, дифференцировку и выживаемость, способен проникать в головной мозг при ин-

**Принятые сокращения:** ИФР1 – инсулиноподобный фактор роста 1, ИФР<sub>1</sub> – субстанция, содержащая рекомбинантный ИФР1, ИФР<sub>2</sub> – субстанция, содержащая ИФР1, транслируемый с плазмидной ДНК, кодирующей ген этого белка *IGF-1*.

траназальном, внутривенном и внутримышечном путях введения (Reinhardt et al., 1994; Nishijima et al., 2010). Это демонстрирует возможность его применения для терапии нейродегенеративных заболеваний (Liu et al., 2001; Kooijman et al., 2009; Vake et al., 2014). Однако, ИФР<sub>1</sub>, при указанных путях введения, имеет быструю динамику поступления и выведения из кровотока, что может снижать его комплаентность и терапевтическую эффективность.

Одним из путей улучшения его фармакокинетических параметров, обеспечивающих медленную динамику изменений его концентраций в крови после введения, является применение субстанции ИФР<sub>2</sub> (Духовлинов и др., 2017). Однако вид фармакокинетических моделей, которые с достаточной точностью описывают динамику изменений концентраций ИФР<sub>2</sub>, синтезируемого *in vivo* мышечными клетками, не определен, что не позволяет оценить его основные фармакокинетические параметры.

Целью настоящей работы является сравнительная оценка фармакокинетики субстанций ИФР<sub>1</sub> и ИФР<sub>2</sub> в крови мышей.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Для оценки фармакокинетических показателей использовали субстанцию ИФР<sub>2</sub> представляющую собой ИФР<sub>1</sub>, транслируемый с плазмидной ДНК, кодирующей ген этого белка *IGF-1*. В качестве вещества сравнения использовали субстанцию на основе рекомбинантного ИФР<sub>1</sub> (ИФР<sub>1</sub>).

**Наработка очищенного раствора плазмидной ДНК.** Музейная культура штамма *Escherichia coli/pCIGF* представляет собой ночную бульонную культуру, полученную трансформацией штамма *E. coli* DH10 В (Thermo Fisher Scientific, США) рекомбинантной плазмидной ДНК рCIGF и выращенную из отдельной колонии на среде Луриа–Бертани (LB) с добавлением ампициллина до конечной концентрации 100 мкг/мл. Культивирование вели при температуре 37°C и частоте вращения мешалки от 50 до 250 об./мин, обеспечивающей насыщение культуры кислородом не менее 30%, до достижения оптической плотности 20–40 ед., после чего осуществляли сепарирование биомассы, которая и являлась биологической субстанцией для выделения рCIGF.

Очистку плазмидной ДНК проводили по методу, предложенному Хорн с соавторами (Horn et al., 1995). Затем применяли только реактивы фармацевтической чистоты (pharmaceutical) и свободную от ЛПС деионизированную воду. Работу проводили в стерильных условиях. ДНК растворяли в буферном растворе для хроматографии, которую проводили на оборудовании АКТАexplorer (Amersham Pharmacia Biotech, Швеция) при скорости протока жидкости 0.75 мл/мин. Фракции, содержащие не менее 50% суперскрученной формы плазмидной ДНК, объединяли. ДНК осаждали этанолом и повторно наносили

на колонку SR 50/100 (Amersham Pharmacia Biotech, Швеция), наполненную Sephacryl S-1000. Объединяли фракции, содержащие не менее 90% суперскрученной формы плазмиды. ДНК осаждали этанолом и ресуспендировали в физиологическом растворе хлорида натрия.

Для оценки качества рCIGF использовали анализ изменения оптической плотности (*A*) в диапазоне длин волн 200–300 нм. Для этого проводили серию измерений оптической плотности с шагом 10 нм. Далее строили график зависимости оптической плотности от длины волны. При этом соотношения  $A_{260\text{нм}}/A_{280\text{нм}}$  и  $A_{260\text{нм}}/A_{230\text{нм}}$  характеризовали чистоту плазмидной ДНК и, соответственно, были не меньше 1.8–1.75.

Контроль структуры плазмидной ДНК оценивали при помощи электрофореза. При этом содержание суперскрученной формы плазмиды в растворе было не менее 95%, а присутствие РНК не детектировали. Контроль идентичности целевого гена проводили секвенированием. Содержание в растворе бактериального эндотоксина определяли LAL-тестом. Раствор плазмидной ДНК хранили при 4°C в защищенном от света месте.

**Выделение и очистка рекомбинантного ИФР-1.** Клетки *E. coli* BL21, трансформированные плазмидой рET28-IGF-1, выращенные в условиях индукции синтеза белка лактозой, осаждали центрифугированием при 10000 g. Осадок ресуспендировали в однократном физиологическом растворе PBS в соотношении 5 мл на 1 г влажной биомассы, после чего клетки разрушали с помощью генератора ультразвуковых волн (Heidolph Sonik 100, Германия) и центрифугировали при 10000 g в течение 12 мин при 4°C. Полученный осадок ресуспендировали в исходном объеме промывочного раствора, содержащего 2 М мочевины, 20 мМ Tris-HCl pH 7.6, инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре, а затем центрифугировали 10000 g в течение 12 мин при температуре 4°C. Супернатант удаляли, осадок отмытых телец включения растворяли в солюбилизирующем растворе (8 М мочевины, 20 мМ Tris-HCl pH 8.0).

Рефолдинг проводили разбавлением солюбилизованного белка в 8 раз раствором, содержащем 20 мМ Tris-HCl pH 8.0, 0.01% Tween 20, после чего фильтровали через фильтр с размером пор 0.2 мкм. Полученный раствор наносили на металлохелатную колонку объемом 5 мл (His-Trap Chelating), уравновешенную стартовым буфером (20 мМ Tris pH 8.0, 0.01% Tween 20). Использовали хроматограф Discovery 100 (Bio Rad, США). После промывки колонки 10 объемами стартового буфера элюцию сорбированного белка проводили в градиенте имидазола (0–200 мМ) в стартовом буфере. Фракции, содержащие целевой белок, объединяли, доводили pH раствора белка до значения 8.8 добавлением 10 мМ NaOH и повторно фильтровали через фильтр 0.2 мкм. Раствор белка наносили на колонку с SP Sepharose Fast

Flow GE Healthcare, уравновешенную стартовым буфером 2 (20 мМ Tris-HCl pH 8.8, 0.01% Tween 20). После нанесения и промывки колонки стартовым буфером 2 элюцию белка проводили в линейном градиенте NaCl. Фракции, содержавшие целевой белок, объединяли и диализовали против 1-кратного PBS. Содержание в растворе бактериального эндотоксина определяли LAL-тестом. Раствор белка хранили при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  с добавлением глицерина до 10%.

**Изучение фармакокинетики субстанций ИФР<sub>1</sub>, ИФР<sub>2</sub> в крови мышей.** В экспериментах использовали мышей линии Balb/C весом 16 г, которые были получены из питомника РАМН “Рапполово” Ленинградской области. Животных содержали в условиях вивария при искусственном освещении. Рацион животных состоял из гранулированного корма и питьевой воды *ad libitum*. Основные правила содержания и ухода соответствовали “Санитарным правилам по содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)”, утвержденным МЗ СССР 06.07.73 г. и Приказу МЗ СССР № 755 от 12.08.77, а также правилам, принятым Европейской конвенцией по защите позвоночных животных (Страсбург, 1986 г.). Номер ветеринарного регистрационного удостоверения 78-07095 от 31.05.2016. Эвтаназию мышей и взятие образцов крови проводили методом декапитации, когда животные достигали бессознательного состояния в результате их предварительного размещения в камере с CO<sub>2</sub>.

Животным группы 1 (32 животных) внутримышечно и однократно вводили препарат ИФР<sub>1</sub> в дозе 100 мкг на мыш. Взятие образцов крови проводили до введения препарата (контроль) и после его введения через 1, 2, 4, 6, 8, 10 и 12 ч. В каждой временной точке взятие крови осуществляли у 4-х животных. Животным группы 2 (174 животных) внутримышечно и однократно вводили препарат ИФР<sub>2</sub> в той же дозе, что и ИФР<sub>1</sub> (100 мкг на мыш). Взятие образцов крови проводили до введения препарата (контроль) и после его введения в 57 временных точках, находящихся в интервале 216 ч. В каждой временной точке взятие крови осуществляли у 3-х животных.

В полученных образцах крови определяли концентрацию ИФР<sub>1</sub> методом иммуоферментного анализа (Human IGF-I ELISA Kit, Sigma-Aldrich, США). Для оценки зависимости изменений концентрации ИФР<sub>1</sub> и ИФР<sub>2</sub> ([ИФР<sub>1</sub>] и [ИФР<sub>2</sub>]) соответственно в крови животных от времени ( $t$ ), прошедшего после их введения, использовали некомпартментный подход на основе нелинейного регрессионного анализа (Draper, Smith, 2016). В этом случае фармакокинетический профиль исследуемых препаратов базируется на получении зависимостей в виде: [ИФР<sub>1</sub>]( $t$ ) и [ИФР<sub>2</sub>]( $t$ ) соответственно с последующим определением интеграла от начального момента времени до бесконечности, что соответствует площади под фармакокинетической кривой ( $AUC$ ,  $AUC_{\infty}$ ) и позволяет

рассчитать основные фармакокинетические параметры.

**В работе использовали следующие реактивы:** вектор pET28a(+) (Novagen, США); электрокомпетентные клетки *Escherichia coli* DH10 B (Thermo Fisher Scientific, США) и электрокомпетентные клетки *Escherichia coli* BL21 Star (DE3) (Invitrogen, США); среду LB (Thermo Fisher Scientific, США); Sephacryl S-1000, имидазол, гидроксид натрия, фосфатный буфер PBS и Tween-20 (Sigma, США); ампициллин (Gibco, США); глицерин и трисгидрохлорид (Panreac, Испания); лактозу (AppliChem, Германия); мочевины (Вектон, Россия); металлохелатную колонку His-Trap Chelating и колонку SP Sepharose Fast Flow (GE Healthcare, США); хлористый натрий (Вектон, Россия); LAL-тестовую систему (GeneScript, США), human IGF-I ELISA Kit (Sigma-Aldrich, США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В табл. 1 и 2 представлены статистические характеристики коэффициентов для нелинейных регрессионных моделей, описывающих изменения концентрации ИФР<sub>1</sub> в крови мышей после внутримышечного введения субстанций в равных дозах в виде:

$$[\text{ИФР}_1](t) = A_0 + A_1 t^P \exp(-t/\tau) \quad (1)$$

и

$$[\text{ИФР}_2](t) = A_0 + A_1 (t/\tau)^{P1} \exp\left(-\left(t/\tau\right)^{P2}\right), \quad (2)$$

где:  $A_0$ ,  $A_1$ ,  $P$ ,  $P1$ ,  $P2$  и  $\tau$  – коэффициенты для выражений (1) и (2), полученные на основе методов нелинейной регрессии (Draper, Smith, 2016);  $t$  – время (ч), прошедшее после введения субстанции.

Коэффициент корреляции ( $r$ ) между экспериментальными и расчетными значениями составил для [ИФР<sub>1</sub>] 0.998 ( $P < 0.01$ ), а для [ИФР<sub>2</sub>] – 0.987 ( $P < 0.01$ ). Результаты расчетов показывают, что между экспериментальными и расчетными значениями концентраций исследуемых субстанций установлены высокие и статистически значимые коэффициенты корреляции. Это означает, что для описания изменений в крови животных концентраций [ИФР<sub>1</sub>] и [ИФР<sub>2</sub>] при их внутримышечном однократном введении могут использоваться выражения (1) и (2), которые обладают достаточной информативностью. Графическая интерпретация выражений (1) и (2) представлена на рис. 1а и 1б соответственно.

Результаты на рис. 1 демонстрируют, что до введения ИФР<sub>1</sub> и ИФР<sub>2</sub> (при  $t = 0$ ) в крови животных определяются фоновые значения инсулиноподобного фактора роста, концентрации которых не равны 0 и находятся на уровне 0.19–0.20 мкг/мл. Наличие в крови ненулевых концентраций инсулиноподобного фактора роста ограничивает применение традиционных камерных фармакокинетических моделей, которые базируются на предположении об от-

**Таблица 1.** Статистические параметры коэффициентов для выражения (1)

Коэффициент	Значение коэффициента	Ошибка коэффициента	95%-ный доверительный интервал	
			нижняя граница	верхняя граница
$A_0$	0.185	0.019	0.124	0.246
$A_1$	0.016	0.008	-0.009	0.042
$P$	5.307	0.661	3.204	7.410
$tau$	0.997	0.119	0.618	1.375

**Таблица 2.** Статистические параметры коэффициентов для выражения (2)

Коэффициент	Значение коэффициента	Ошибка коэффициента	95%-ный доверительный интервал	
			нижняя граница	верхняя граница
$A_0$	0.199	0.006	0.187	0.211
$A_1$	0.897	0.057	0.783	1.010
$P1$	2.327	0.201	1.923	2.732
$tau$	147.234	3.648	139.910	154.559
$P2$	5.0	0.503	4.343	6.362

сутствии концентраций веществ в крови до их введения. Поэтому необходимо использовать нелинейные регрессионные модели в виде выражений:

$$[ИФР_1](t) = 0.185 + 0.016t^{5.307} \exp(-t/0.997) \quad (3)$$

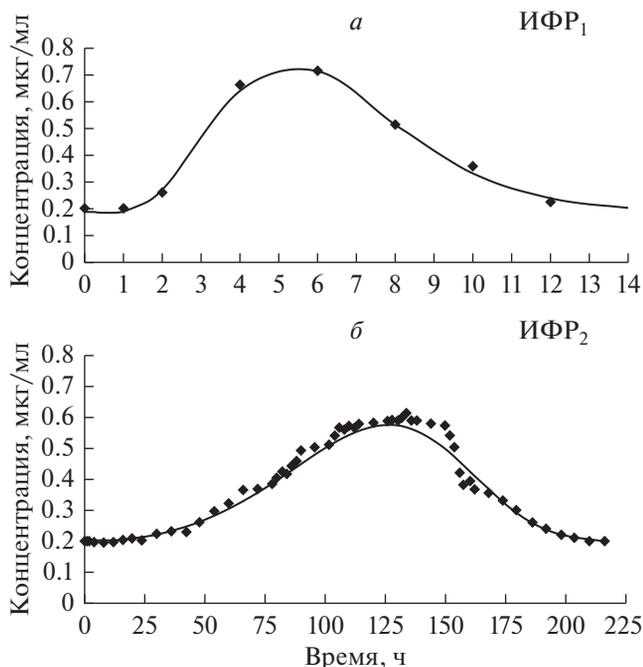
и

$$[ИФР_2](t) = 0.199 + 0.897(t/147.234)^{2.327} \exp(-(t/147.234)^{5.0}), \quad (4)$$

где:  $[ИФР_1]$  и  $[ИФР_2]$  концентрации препаратов, мкг/мл;  $t$  – время (ч), прошедшее после введения препаратов.

Дальнейший анализ изменений в крови  $[ИФР_1]$  показывает, что через 1 ч после введения  $ИФР_1$  значения концентраций остаются на уровне фона и только через 1.5–2 ч происходит увеличение концентрации субстанции в кровотоке, которая достигает максимума через 5 ч ( $[ИФР_1]_{max} = 0.728$  мкг/мл). Это означает, что при внутримышечном введении  $ИФР_1$  в интервале 1.5–2 ч отмечается распределенная во времени задержка его поступления в кровоток. Анализ изменений в крови концентраций  $ИФР_2$  показывает, что распределенная во времени задержка его поступления в кровоток имеет более выраженные значения и находится в интервале 24–25 ч. Через 25 ч после введения  $ИФР_2$  наблюдается медленная динамика увеличения его концентрации в крови, которая достигает максимума через 125 ч ( $[ИФР_2]_{max} = 0.576$  мкг/мл).

Установленные различия во времени задержки поступления  $ИФР_1$  и  $ИФР_2$  в кровоток и различия в динамике повышения их концентраций до максимальных значений достаточно очевидны, что свидетельствует о существовании различных механизмов накопления этих субстанций в крови животных после введения. Однако полученные максимальные



**Рис. 1.** Зависимость изменений концентрации субстанций  $ИФР_1$  (а) и  $ИФР_2$  (б) в крови мышей линии Balb/C после их внутримышечного введения. *Сплошная линия* – расчетные значения концентрации препарата, полученные на основе нелинейной регрессии. *Квадраты* – экспериментальные значения концентрации препарата.

значения концентраций  $[ИФР_1]_{\max}$  и  $[ИФР_2]_{\max}$  сопоставимы между собой.

Снижение значений  $[ИФР_1]$  происходит через 6 ч после введения субстанции и достигает почти исходных значений через 12 ч эксперимента. Снижение значений  $[ИФР_2]$  отмечается через 127 ч после введения субстанции и достигает фоновых значений через 216 ч эксперимента. Соответственно продолжительность временного интервала снижения максимальных значений составляет  $lkz [ИФР_1]$  6 ч, а для  $[ИФР_2]$  – 89 ч. Это указывает на наличие значительно более медленной динамики элиминации  $ИФР_2$ , чем  $ИФР_1$ , из крови животных после внутримышечного введения.

В табл. 3 представлены отдельные фармакокинетические параметры  $ИФР_1$  и  $ИФР_2$  после их однократного внутримышечного введения.

Результаты расчетов фармакокинетических параметров в табл. 3 показывают, что среднее время удержания субстанций в крови животных ( $MRT$ ) и кажущийся объем распределения субстанций ( $Vd$ ) имеют сходные значения, которые не зависят от способа их получения и механизма их накопления в системном кровотоке.

Параметры клиренса ( $Cl$ ) и константы элиминации ( $Kel$ )  $ИФР_1$  имеют более высокие значения, чем аналогичные характеристики  $ИФР_2$ . Это означает, что выведение  $ИФР_2$  из кровотока происходит значительно медленнее, чем  $ИФР_1$  и указывает на наличие различных механизмов их элиминации. Вместе с тем, быстрая и медленная динамика элиминации исследуемых субстанций демонстрирует отсутствие выраженного эффекта их накопления в системном кровотоке после однократного внутримышечного введения.

Параметры площади под фармакокинетической кривой ( $AUC_t$ ,  $AUC_\infty$ )  $ИФР_2$  значительно превосходят аналогичные показатели  $ИФР_1$  – в 8557 раз и в 8457 раз соответственно. Это подтверждает наличие различных механизмов накопления исследуемых субстанций в крови и их элиминации. Несмотря на сопоставимые значения параметра  $MRT$ , полученные достаточно высокие значения показателей  $AUC_t$  и  $AUC_\infty$  у  $ИФР_2$  указывают на его более продолжительное время нахождения в системном кровотоке и, соответственно, более продолжительное время его контакта с определенными рецепторами. Это может иметь весьма существенное значение для развития и поддержания специфических фармакодинамических эффектов, выраженность которых предполагается определить на следующем этапе исследования.

**Выводы.** 1) Различия во времени задержки поступления в кровоток субстанций  $ИФР_1$  и  $ИФР_2$  после их внутримышечного введения указывают на различные механизмы накопления данных субстанций в системном кровотоке. 2) Максимальное зна-

**Таблица 3.** Фармакокинетические параметры препаратов  $ИФР_1$  и  $ИФР_2$  после однократного внутримышечного введения в дозе 100 мкг

Параметр	Значение параметра	
	$ИФР_1$	$ИФР_2$
$AUC_t$ , мкг/мл/ч	5.156	42785.21
$AUC_\infty$ , мкг/мл/ч	11.03	93035.21
$MRT$ , ч	2.139	2.174
$Cl$ (клиренс), мл/ч	19.39	0.002
$Vd$ , мл	497.51	505.05
$Kel$ (константа элиминации)	0.039	0.000004

Примечание.  $AUC_t$ ,  $AUC_\infty$  – площадь под фармакокинетической кривой,  $MRT$  – среднее время удержания субстанций в крови животных,  $Vd$  – кажущийся объем распределения субстанций.

чение концентрации  $ИФР_1$  определяется через 5 ч после внутримышечного введения, а  $ИФР_2$  – через 125 ч. Максимальные значения концентрации  $ИФР_1$  (0.728 ~ 0.70 мкг/мл) и  $ИФР_2$  (0.576 ~ 0.60 мкг/мл) сопоставимы между собой. 3) После внутримышечного введения снижение концентрации  $ИФР_1$  происходит через 5 ч и достигает исходных значений через 12 ч, а  $ИФР_2$  – через 127 ч после введения и достигает исходных значений через 216 ч. Параметры клиренса ( $Cl$ ) и константы элиминации ( $Kel$ ) исследуемых субстанций также имеют существенные различия, что подтверждает наличие быстрой и медленной динамики снижения их максимальных концентраций после внутримышечного введения. 4) Различная динамика накопления исследуемых субстанций в крови и их элиминации из кровотока, а также различные значения параметров площади под фармакокинетической кривой ( $AUC_t$ ,  $AUC_\infty$ ) показывают, что субстанция, содержащая  $ИФР_1$ , транслируемый с плазмидной ДНК, более продолжительное время находится в системном кровотоке, чем субстанция, содержащая в чистом виде рекомбинантный  $ИФР_1$ . Это имеет существенное значение для формирования и выраженности фармакодинамических эффектов.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке компании ООО “Дакра Медикал”.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все эксперименты с животными выполнены в соответствии “Санитарными правилами по содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)”, утвержденным МЗ СССР 06.07.73 г. и Приказу МЗ СССР № 755 от 12.08.77, а также правилам, принятым Европейской конвенцией по защите позвоночных животных (Страсбург, 1986 г.). Номер ветери-

нарного регистрационного удостоверения 78-07095 от 31.05.2016.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Духовлинов И.В., Богомолова Е.Г., Добровольская О.В., Федорова Е.А., Кляус А.М., Ишук С.А., Климов Н.А., Симбирцев А.С.* 2017. Продукция *in vivo* инсулиноподобного фактора роста 1 (ИФР-1), кодируемого плазмидной ДНК. Мед. академ. журнал. 17(3) : 47–52. (Dukhovlinov I.V., Bogomolova E.G., Dobrovolskaya O.A., Fedorova E.A., Klyaus A.M., Ischuk S.A., Klimov N.A., Simbirtsev A.S. 2017. Production of insulin-like growth factor 1 (IGF-1) encoded by plasmid DNA *in vivo*. Med. Acad. J. (Russ.) 17(3) : 47–52).
- Bake S., Selvamani A., Cherry J., Sohrabji F.* 2014. Blood brain barrier and neuroinflammation are critical targets of IGF-1-mediated neuroprotection in Stroke for Middle-Aged Female Rats. PLoS ONE. 9 : e91427. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091427>
- Bonadio J., Smiley E., Patil P., Goldstein S.* 1999. Localized, direct plasmid gene delivery *in vivo*: Prolonged therapy results in reproducible tissue regeneration. Nat. Med. 5 : 753–759.
- Davis H.L., McCluskie M.J., Gerin J.L., Purcell R.H.* 1996. DNA vaccine for hepatitis B: Evidence for immunogenicity in chimpanzees and comparison with other vaccines. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93 : 7213–7218.
- Draper N.R., Smith H.* 2016. Applied regression analysis. Wiley. 3rd ed. 736 p.
- Dyer A.H., Vahdatpour C., Sanfeliu A., Tropea D.* 2016. The role of insulin-like growth factor 1 (IGF-1) in brain development, maturation and neuroplasticity. Neurosci. 325 : 89–99.
- Horn N.A., Meek J.A., Budahazi G., Marquet M.* 1995. Cancer gene therapy using plasmid DNA: purification of DNA for human clinical trials. Hum Gene Ther. 6 : 565–573.
- Kooijman R., Sarre S., Michotte Y., De Keyser J.* 2009. Insulin-like growth factor I a potential neuroprotective compound for the treatment of acute ischemic stroke? Stroke. 40 : e83–e88. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.108.528356>
- Laviola L., Natalicchio A., Perrini S., Giorgino F.* 2008. Abnormalities of IGF-I signaling in the pathogenesis of diseases of the bone, brain, and fetoplacental unit in humans. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 295 : E991–E999.
- Liu X.F., Fawcett J.R., Thorne R.G., Frey W.H.* 2001. Non-invasive intranasal insulin-like growth factor-I reduces infarct volume and improves neurologic function in rats following middle cerebral artery occlusion. Neurosci. Letters. 308 : 91–94.
- Nishijima T., Piriz J., Duflot S., Fernandez A.M., Gaitan G., Gomez-Pinedo U., Verdugo J.M., Leroy F., Soya H., Nuñez A., Torres-Aleman I.* 2010. Neuronal activity drives localized blood-brain-barrier transport of serum insulin-like growth factor-I into the CNS. Neuron. 67 : 834–846.
- O’Kusky J., Ping Y.* 2012. Neurodevelopmental effects of insulin-like growth factor signaling. Front. Neuroendocrinol. 33 : 230–251.
- Reinhardt R.R., Bondy A.* 1994. Insulin-like growth factors cross the blood-brain barrier. Endocrinol. 135 : 1753–1761.
- Romero N.B., Benveniste, O., Payan C., Braun S., Squiban P., Herson S., Fardeau M.* 2002. Current protocol of a research phase I clinical trial of full-length dystrophin plasmid DNA in Duchenne/Becker muscular dystrophies. Part II: Clinical protocol. Neuromus. Disord. 12 (Suppl. 1) : S45–S48.
- Tsurumi Y., Kearney M., Chen D., Silver M., Takeshita S., Yang J., Symes J.F., Isner J.M.* 1997. Treatment of acute limb ischemia by intramuscular injection of vascular endothelial growth factor gene. Circulation. 96 (Suppl. 9) : 382–388.
- Wolff J.A., Malone R.W., Williams P., Chong W., Acsadi G., Jani A., Felgner P.L.* 1990. Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. Science. 247 : 1465–1468.

## STUDY OF PHARMACOKINETICS OF TWO RECOMBINANT INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR 1 FORMS IN BLOOD

**I. V. Dukhovlinov<sup>a</sup>, O. A. Dobrovolskaya<sup>b</sup>, I. V. Evsyukov<sup>a,\*</sup>, E. G. Bogomolova<sup>b</sup>, N. N. Kolmakov<sup>b</sup>, A. A. Lukovenko<sup>c</sup>, E. A. Fedorova<sup>c</sup>, S. A. Ishuk<sup>b</sup>, A. I. Orlov<sup>d</sup>, E. V. Vorobeychikov<sup>e</sup>, and A. S. Simbirtsev<sup>b</sup>**

<sup>a</sup>Limited Liability Company “ATG Service Gene”, St. Petersburg, 199034 Russia

<sup>b</sup>Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, 197376 Russia

<sup>c</sup>Limited Liability Company “Biochemical Agent”, St. Petersburg, 190005 Russia

<sup>d</sup>Limited Liability Company “Dakra Medical”, St. Petersburg, 197101 Russia

<sup>e</sup>Limited Liability Company “Polifarm”, St. Petersburg, 197101 Russia

\*E-mail: evsyukov007@mail.ru

The paper discusses the pharmacokinetics of two substances containing recombinant insulin-like growth factor 1 as the active agent. The first substance (IGF<sub>1</sub>) contains the recombinant IGF1 itself, the second (IGF<sub>2</sub>) – IGF1 translated from the plasmid DNA encoding the *IGF-1* gene. It has been established that with intramuscular administration of IGF<sub>1</sub>, the delay time of its entry into the bloodstream is 1.5–2 hours, whilst IGF<sub>2</sub> – 24–25 hours. This indicates the presence of various mechanisms of accumulation of these substances in the bloodstream. The maximum concentration of IGF<sub>1</sub> in the blood is determined 5 hours after the administration, and IGF<sub>2</sub> – 125 hours after the administration. The maximum values of the concentrations of these substances are comparable. The concentration

of IGF<sub>1</sub> in the blood decreases to the initial value 12 hours after its introduction, and the concentration of IGF<sub>2</sub> – after 216 hours. The clearance (Cl) and elimination constants (*kel*) parameters of these substances also have significant differences, which confirms the presence of fast and slow dynamics of their maximum concentrations decrease after intramuscular administration. The different dynamics of accumulation of substances in the blood and their elimination from the bloodstream after administration, as well as different values of the parameters of the area under the pharmacokinetic curve ( $AUC_t$ ,  $AUC_\infty$ ), demonstrate that IGF<sub>2</sub> has been in the systemic circulation for a longer time than IGF<sub>1</sub>. This is essential for the formation and severity of pharmacodynamic effects.

**Keywords:** pharmacokinetics, insulin-like growth factor, recombinant protein, plasmid DNA, *IGF-1* gene, intramuscular administration