

На правах рукописи

СУЧКОВ ЕВГЕНИЙ АЛЕКСАНДРОВИЧ

**МЕТОД КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ В БИОЛОГИЧЕСКОМ
МАТЕРИАЛЕ И ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НОВОГО
ПРОИЗВОДНОГО АДЕНИНА, ОБЛАДАЮЩЕГО ПРОТИВОВИРУСНОЙ
АКТИВНОСТЬЮ**

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

14.04.02 Фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Волгоград – 2014

Работа выполнена в лаборатории фармакологической кинетики, НИИ Фармакологии ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор биологических наук

Смирнова Людмила Андреевна

Научный консультант:

доктор химических наук, профессор

Озеров Александр Александрович

Официальные оппоненты:

Каленикова Елена Игоревна

доктор фармацевтических наук, доцент, заведующая кафедрой фармацевтической химии, фармакогнозии и организации фармацевтического дела факультета фундаментальной медицины федерального государственного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

Оковитый Сергей Владимирович

доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой фармакологии и клинической фармакологии государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия» Минздрава России

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова» РАМН

Защита состоится «___» _____ 2014 г. в _____ ч на заседании Диссертационного Совета Д 208.008.02 при ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России (400131, Россия, г.Волгоград, пл.Павших борцов,1).

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной библиотеке и на сайте www.volgmu.ru ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России по адресу: 400131, Россия, г.Волгоград, пл.Павших борцов,1.

Автореферат разослан «___» _____ 2014 г.

Ученый секретарь

Диссертационного Совета,

доктор биологических наук

Любовь Ивановна Бугаева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Разработка и внедрение в практическое здравоохранение новых лекарственных средств является одной из актуальных и приоритетных задач. Процесс разработки новых препаратов, начиная с момента поиска перспективных биологически активных соединений и заканчивая клинической, апробацией является длительным, сложным и требует привлечения значительных ресурсов (Bjarnsholt T., 2013). Неудовлетворительные результаты, связанные как с объективными причинами, так и с различными ошибками и несоблюдением регламентов в ходе исследований, приводит к значительным потерям и замедлением развития средств и методов фармакотерапии (Песков К.В., 2013). Поэтому необходимо проводить исследования, на всех стадиях разработки нового лекарственного средства, основываясь на правилах и нормативах проведения доклинических и клинических испытаний, разработки и выполнения аналитических методов, принципах доказательной медицины и биоэтики (Летов О. В., 2009, Петров В.И., 2009, Миронов А.Н. 2012, Миронов А.Н. 2012).

Проведение фармакокинетических и биофармацевтических исследований является обязательным этапом проведения как доклинической, так и клинической стадии испытаний. Получаемые в ходе исследования данные о фармакокинетики изучаемого лекарственного средства служат основанием для планирования следующих стадий его разработки (Chen B., Dong J.Q., Pan W.J. et al, 2012). Проведение такого рода исследований невозможно без использования современных высокоточных аналитических методов количественного определения изучаемого биологически активного вещества в различных объектах, в том числе в биологическом материале (Хуе Y.J., Melo B., Vallejo V. et al, 2012).

Степень разработанности

Многие из применяемых сегодня противовирусных препаратов либо имеют не слишком высокую эффективность, либо характеризуются наличием значительного числа нежелательных побочных реакций. Соответственно, поиск новых безопасных средств фармакотерапии с высокой противовирусной

активностью остается актуальной проблемой. Перспективным направлением ее решения является разработка ингибиторов вирусной репликации ненуклеозидной природы. Большой интерес представляют 9-производные аденина, проявляющие высокую противовирусную активность. Проведение направленного синтеза в сочетании со скрининговыми исследованиями позволило выделить ряд соединений-лидеров по эффективности и безопасности, что требует дополнительных, более широкомасштабных исследований.

Цель исследования

Разработка метода количественного определения нового производного аденина, обладающего противовирусной активностью, и изучение его фармакокинетических и биофармацевтических свойств.

Задачи исследования

1. Разработать и валидизировать метод высокоэффективной жидкостной хроматографии количественного определения соединения VMA-99-82 в биологическом материале.
2. Провести фармакокинетическое исследование и рассчитать фармакокинетические параметры соединения VMA-99-82 при внутривенном и пероральном путях введения.
3. Изучить распределение исследуемого соединения по органам и тканям при внутривенном и пероральном путях введения.
4. Изучить экскрецию соединения VMA-99-82 при внутривенном и пероральном путях введения.
5. Провести биофармацевтический анализ таблетированной лекарственной формы VMA-99-82 – адепрофена.

Научная новизна

Впервые разработан и валидизирован метод высокоэффективной жидкостной хроматографии количественного определения соединения VMA-99-82 в биологическом материале. Впервые проведено фармакокинетическое исследование нового производного аденина, обладающего противовирусной

активностью. Впервые проведено биофармацевтическое исследование таблетированной лекарственной формы соединения VMA-99-82 – адепрофена.

Теоретическая и практическая значимость работы

Работа носит фундаментальный и прикладной характер. В результате проведенных исследований определены аналитические свойства нового производного аденина соединения VMA-99-82, изучены его фармакокинетические и биофармацевтические характеристики, что легло в основу создания таблетированной лекарственной формы – адепрофена.

Диссертационная работа выполнена по ФЦП «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» в рамках госконтракта № 11411.1008700.13.077 с Минпромторгом России.

Внедрение результатов исследования

Результаты исследования и перспективы внедрения в практику соединения VMA-99-82 включены в материал лекций и практических занятий для студентов, слушателей факультета постдипломного образования и факультета усовершенствования врачей ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России.

Результаты исследования внесены в комплексный отчет по проделанной работе в рамках госконтракта № 11411.1008700.13.077 с Минпромторгом России.

Методология и методы исследования

Дизайн исследования и полученные практические результаты согласуются с основными положениями и принципами проведения доклинических испытаний, а так же разработки и валидации аналитических методов. Работа проводилась с соблюдением правил научных исследований и основывалась на принципах биоэтики.

Теоретической и методологической основой исследования послужили фундаментальные и прикладные исследования отечественных и зарубежных ученых по данной проблеме, публикации в периодических изданиях, методические рекомендации. Теоретический анализ обзора литературы подкреплялся экспериментальными лабораторными данными.

Положения, выносимые на защиту

1. Разработан и валидизирован метод высокоэффективной жидкостной хроматографии, позволяющий определять соединение VMA-99-82 в биологическом материале с достаточной чувствительностью, селективностью и точностью.
2. Установлена высокая абсолютная биодоступность при пероральном пути введения, неоднородность распределения по органам и тканям, низкое содержание неизменной субстанции в экскретах, что позволяет сделать предположение о активном метаболизме.
3. Разработанная таблетированная лекарственная форма является оптимальной, так как выявлена ее высокая относительная биодоступность.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных в данной работе результатов обусловлена однородностью выборки объектов эксперимента, использованием валидизированного метода количественного анализа биологических проб, применением адекватных методов биомедицинской статистики, согласованностью с результатами опубликованных ранее исследований, теоретическим обоснованием полученных экспериментальных данных.

Основные положения диссертации представлены на 71-ой открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов ВолгГМУ с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» (Волгоград, 2013); 72-ой открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов ВолгГМУ с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» (Волгоград, 2014).

По теме диссертации опубликовано 17 работ, в том числе 12 в журналах, рецензируемых ВАК.

Личный вклад автора

Автором самостоятельно проведен поиск и анализ зарубежных и отечественных источников литературы по теме работы. Вклад автора является определяющим и заключается в непосредственном участии на всех этапах исследования по разработке метода количественного определения и изучению фармакокинетических свойств нового производного аденина – соединения VMA-99-82: решения поставленных задач, обсуждения результатов, разработке практических рекомендаций. Автору принадлежит ведущая роль в проведении экспериментальных исследований на всех его этапах. При написании диссертационной работы автором лично выполнен сбор первичных данных, статистическая обработка, анализ и обобщение полученных результатов, формулировка выводов и практических рекомендаций, оформление рукописи.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 155 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, 3 глав собственных исследований, обсуждения результатов, заключения и списка литературы, включающего 111 отечественных и 91 зарубежный источник. Работа иллюстрирована 20 таблицами и 36 рисунками.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В первой главе (обзор литературы) представлен анализ отечественной и зарубежной научной литературы на тему разработки новых лекарственных средств и проведения фармакокинетических и биофармацевтических исследований. В первом разделе рассмотрено значение фармакокинетических исследований при разработке новых лекарственных средств. Во втором разделе описана роль биофармацевтических исследований. Третий раздел посвящен аналитическим методам количественного определения, применяемым при проведении фармакокинетических и биофармацевтических исследований. В четвертом разделе рассматривается перспективное направление в создании новых

эффективных противовирусных препаратов – разработка средств ненуклеозидной природы, в частности 9-производных аденина.

Во второй главе представлены результаты разработки и валидация метода количественного определения соединения VMA-99-82. Исследование проводили на субстанции VMA-99-82 (Рисунок 1), синтезированной в лаборатории синтеза противовирусных средств НИИ фармакологии Волгоградского государственного медицинского университета*.

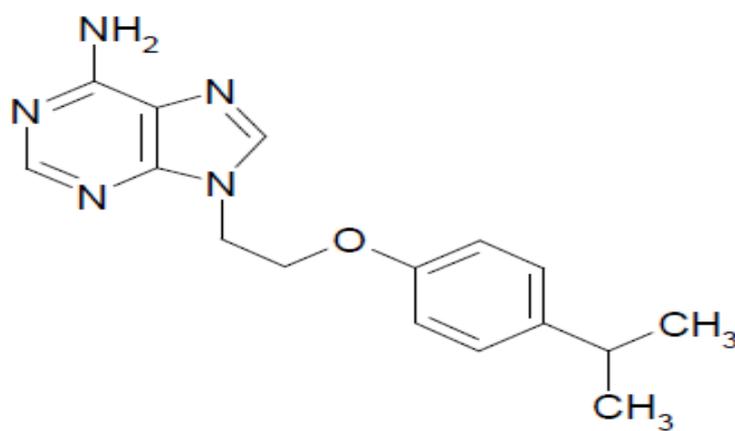


Рисунок 1. Структурная формула соединения VMA-99-82.

Количественное определение соединения VMA-99-82 проводили на жидкостном хроматографе Shimadzu LC-10 (Япония). Хроматографическое разделение осуществлялось на аналитической колонке SUPELCOSIL LC-18 10 см*4,6 мм, размер частиц сорбента - 5 мкм (США).

В качестве мобильной фазы использовали смесь ацетонитрила (Россия) и буферной системы, состоящей из однозамещенного фосфата калия 50 мМоль, pH 5,65 (Россия) в соотношении 40%:60% v/v.

*Выражаем благодарность профессору Озерову А.А. и сотрудникам лаборатории синтеза противовирусных средств НИИ фармакологии Волгоградского государственного медицинского университета

Детектирование соединения VMA-99-82 проводили при длине волны 205 нм. Скорость подачи мобильной фазы в хроматографическую систему составила 1 мл/мин. Температура проведения разделения на аналитической колонке – 40°C.

В работе использовались аналитические весы Adventurer (США). Смешивание растворов проводили на магнитной мешалке LT 30 (Германия). Контроль pH осуществляли на pH-метре Hanna (Германия).

Для извлечения соединения VMA-99-82 из биологического материала применяли смесь ацетонитрила (Россия) и этилового спирта (Россия) в соотношении 50%:50% v/v. Для проведения экстракции и преципитации белков использовали горизонтальный шейкер и ультразвуковую ванну «Сапфир» (Россия). Супернатант получали на центрифуге CM-50 (Россия).

Получение гомогената органов, тканей и кала, проводили на гомогенизаторе Silent Crusher (Германия). Гомогенат откручивали на центрифуге Eppendorf (Германия).

Идентификацию исследуемого вещества и расчет концентрации проводили по методу абсолютных стандартов. Зависимость площадей пиков от концентрации соединения VMA-99-82 анализировалась методом регрессионного анализа.

Валидация метода ВЭЖХ количественного определения соединения VMA-99-82 проводилась в соответствии с ГОСТ 5725-1-2002 и Guideline on bioanalytical method validation EMEA 2012.

Статистическая обработка данных проводилась при помощи компьютерной программы Microsoft Excel.

В результате проведенных исследований разработаны следующие хроматографические условия метода количественного определения соединения VMA-99-82: аналитическая колонка SUPELCOSIL LC-18 15 см*4,6 мм, размер частиц 5 мкм. Мобильная фаза, состоящая из 50 mM р-ра однозамещенного фосфата калия (pH 5,65) и ацетонитрила в соотношении 60%:40% v/v. Скорость потока элюента 1 мл/мин. Температура хроматографирования 40 °C. Длина волны детекции 205 нм. Условия подобраны оптимально и обеспечивают

достаточные чувствительность и селективность (Смирнова Л.А., Сучков Е.А., Рябуха А.Ф. и др., 2014).

Детекция изучаемого соединения осуществляется ультрафиолетовым детектором на основе диодной матрицы. Чувствительность метода, обеспечиваемая ультрафиолетовым детектором, вполне отвечает поставленным задачам, что позволяет использовать этот наиболее распространенный и доступный вид детектора. Преимущество диодноматричных детекторов заключается в возможности сканирования широкого диапазона длин волн за один анализ, что обеспечивает значительное сокращение времени подбора оптимальной длины волны детекции. Еще одним плюсом детекторов на основе диодной матрицы является возможность идентификации веществ по их спектральным характеристикам.

Проведен подбор условий экстракции изучаемого соединения из различных видов биологического материала. Был опробован ряд экстрагентов и, в итоге была выбрана смесь спирт этиловый : ацетонитрил (50%:50% v/v), обеспечивающая одновременно высокий уровень извлечения аналита из биоматериала и достаточный уровень очистки пробы. Степень экстракции соединения VMA-99-82 составила не менее 90%. В ходе экспериментов по извлечению соединения VMA-99-82 из различного биологического материала было установлено, что при определении изучаемого вещества в крови необходимо проводить экстракцию из цельной крови. Извлечение аналита из гомогенатов органов и тканей, а также экскретов проводилось аналогичным образом и давало сопоставимые результаты по степени экстракции.

Таким образом, способ количественного извлечения соединения VMA-99-82 из биологического материала подобран оптимально и практически не влияет на среднюю ошибку измерения хроматографического метода.

После подбора хроматографических условий и способа извлечения из биологического материала проведена валидация разработанного метода высокоэффективной жидкостной хроматографии количественного определения соединения VMA-99-82. На основании серии измерений были построены

калибровочные кривые зависимости площади под хроматографическим пиком от концентрации изучаемого соединения, в результате установлено, что они носят линейный характер. Далее провели расчет валидационных характеристик метода. Повторяемость (внутридневные колебания) в среднем 14%, воспроизводимость (междневные колебания) – 10%. Показатель точности – 97,8%. Прецизионность – 4,55. На основании измерения серии разведений были определены предел обнаружения (200нг/мл) и предел количественного определения (1мкг/мл). Аналитические характеристики метода не выходят за пределы установленных нормативов, что подтверждает его воспроизводимость и эффективность (Таблица 1).

Таблица 1.

Основные аналитические параметры метода ВЭЖХ количественного определения соединения VMA-99-82.

Внутридневные колебания (Повторяемость)	14%
Междневные колебания (воспроизводимость)	10%
Точность	97,8%
Чувствительность	1 мкг/мл
Предел обнаружения	200 нг/мл
Прецизионность	4,55%

Также была оценена стабильность. При повторном проведении анализа, после 72 часов хранения стандартных растворов соединения при комнатной температуре, а также после заморозки/таяния средние абсолютные процентные колебания находились в тех же пределах, что свидетельствует о стабильности вещества под влиянием данных факторов.

Таким образом, разработанный метод количественного определения является высокоселективным и высокочувствительным, что позволяет

использовать его для проведения фармакокинетических и биофармацевтических исследований соединения VMA-99-82.

В третьей главе представлены результаты изучения фармакокинетических свойств соединения VMA-99-82. Эксперименты выполнены на 100 белых беспородных крысах – самцах массой 180-220 г, которые содержались в условиях вивария на стандартной диете с соблюдением всех правил и Международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях. На момент проведения исследований животные были здоровыми, изменений поведения, аппетита, режима сна и бодрствования обнаружено не было. За двенадцать часов до проведения экспериментов животных лишали доступа к пище без ограничения потребления воды.

Внутривенное введение лекарственного вещества, растворенных в изотоническом растворе, производилось с помощью шприца в хвостовую вену крыс. Пероральное введение производили с помощью зонда. Контрольной группе животных вводили изотонический раствор в аналогичном объёме.

Распределение соединения в организме крыс изучали в тканях с сильной васкуляризацией – сердце, мозге, легких и селезенке; с умеренной васкуляризацией – мышце (*musculus quadriceps femoris*) и слабой васкуляризацией - сальнике, а также в органах, обеспечивающих элиминацию - печени и почках.

Содержание изучаемого соединения определяли также в моче и кале. Сбор проб мочи и кала осуществляли в метаболических камерах «Термопласт» (Италия).

Кровь стабилизировали 5% раствором натрия цитрата. Зависимость концентрации соединения от времени изучалась в цельной крови. Из органов и кала готовили 20% гомогенаты в дистиллированной воде.

Соединение VMA-99-82 вводили крысам внутривенно в дозе 50 мг/кг. Забор проб крови и органов производился через 5, 15, 30 минут, 1, 2, 4, 8, 12 часов после введения и через 5 минут в контрольной группе животных.

Для изучения абсолютной биодоступности субстанции VMA-99-82 вводили крысами интрагастрально в дозе 50 мг/кг. Забор проб крови у животных производили через 30 минут, 1, 2, 4, 8, 12 часов и через 5 минут в контрольной группе животных.

Для оценки фармакокинетических свойств изучаемого соединения рассчитывали ряд параметров: площадь под фармакокинетической кривой “концентрация – время” (AUC); общий (кажущийся) клиренс (cl); константа элиминации (K_{el}); общий (кажущийся) объём распределения (V_d); период полувыведения ($T_{1/2}$); среднее время удерживания, характеризующее среднее время пребывания в организме молекулы препарата (MRT).

Для оценки интенсивности проникновения вещества в ткани использовалось вычисление тканевой доступности (ft), определяемой отношением значения AUC в ткани к соответствующей величине AUC в крови.

Абсолютная биодоступность рассчитывалась как отношение AUC при пероральном введении к AUC при внутривенном введении лекарственного вещества крысам. Экспериментальные данные обсчитывались с помощью t-критерия Стьюдента. Статистическая обработка данных проводилась при помощи компьютерной программы Microsoft Excel.

Расчет предполагаемых схем метаболизма соединения VMA-99-82 и физико-химических свойств возможных метаболитов проводился при помощи компьютерной программы PALLAS.

Выполнено фармакокинетическое исследование нового производного аденина – соединения VMA-99-82. На основании экспериментальных данных получены усредненные фармакокинетические профили аналита и рассчитаны числовые показатели основных фармакокинетических параметров, а также проанализирован характер распределения по органам и тканям. Было проведено исследование процессов экскреции исследуемого соединения с мочой и калом (Смирнова Л.А., Сучков Е.А., Рябуха А.Ф. и др., 2014).

Фармакокинетические кривые при обоих путях введения достаточно сходны. Максимальная концентрация соединения VMA-99-82 (5,71 мкг/мл) при

внутривеном пути наблюдается на пятой минуте после введения. При интрагастральном введении - максимальная концентрация ананта (9,3 мкг/мл) достигается через 30 минут, что свидетельствует о том, что соединение VMA-99-82 очень быстро всасывается из ЖКТ. После этого и там и там концентрация снижается, причем снижение носит биэкспоненциальный характер, предполагая быструю первую фазу распределения, сменяющуюся более медленной фазой элиминации. Первая фаза элиминации заканчивается к 2 часам и начинается вторая «медленная» фаза до 12 часов исследования.

По зависимости концентрации соединения в плазме крыс от времени рассчитаны основные фармакокинетические параметры (Таблица 2). Из особенностей следует отметить значительные различия в показателях периода полувыведения ($T_{1/2}$ (час) = 11,03 для внутривеного и $T_{1/2}$ (час) = 6,11 для перорального пути, соответственно) и системного клиренса (Cl (л/(час*кг)) = 0,67 и 1,01, соответственно). Аналогично разнятся и показатели площади под фармакокинетической кривой (AUC (мкг*час/мл) = 74,96 и 49,43, соответственно).

Таблица 2.

Фармакокинетические параметры соединения VMA-99-82 в плазме крови крыс при внутривеном и пероральном введении в дозе 50 мг/кг

Параметры	Внутривеном введение	Пероральное введение
AUC (мкг*час/мл)	74,96	49,43
Kel (час ⁻¹)	0,063	0,11
$T_{1/2}$ (час)	11,03	6,11
MRT (час)	9,55	8,52
Cl (л/(час*кг))	0,67	1,01
Vd (л/кг)	10,61	8,91

Распределение соединения VMA-99-82 по органам и тканям носит неоднородный характер и осуществляется следующим образом (Таблица 3).

Наибольшую тропность VMA-99-82 проявляет к легким, в них концентрация достигает на максимуме через 1 час после введения 24693,5 мкг/г. Тканевая доступность составила 1111,18. Пероральный путь введения при более низких абсолютных значениях (744,64 мкг/кг) демонстрирует аналогично высокую, на фоне прочих органов, тропность к легким. Тканевая доступность составила 8.14.

Распределение VMA-99-82 в органы с высокой васкуляризацией соответствует или превосходит уровень его в крови. Для сердца характерной особенностью является значительное отличие между внутривенным и пероральным путями введения.

Таблица 3.

Фармакокинетические параметры распределения препарата VMA-99-82 в органах и тканях при внутривенном и пероральном введении крысам в дозе 50 мг/кг

Орган	Внутривенное введение		Пероральное введение	
	AUC, мкг×час/мл	Ft	AUC, мкг×час/мл	Ft
Мозг	32,46	0,43	13,58	0,28
Сердце	87,17	1,16	16,94	0,34
Селезенка	272,05	3,63	30,97	0,63
Легкие	83299,4	1111,18	402,42	8,14
Мышцы	38,2	0,51	32	0,65
Почки	33,91	0,45	20,4	0,41
Печень	115,38	1,54	66,03	1,34
Сальник	37,23	0,5	25,51	0,52

В мышечной ткани VMA-99-82 определяется на уровне органов с высокой степенью васкуляризации при обоих путях введения. Максимальная концентрация (10,45 мкг/г) наблюдается через 30 минут после введения, тканевая доступность составляет 0,51 при внутривенном введении и при пероральном введении тканевая доступность – 0,65.

Наименьшее содержание отмечается в мозге, что, скорее всего, связано с транспортом через гематоэнцефалический барьер и не связано с липофильностью VMA-99-82 и высокой степенью васкуляризации мозга.

В результате проведенного сравнительного анализа фармакокинетики VMA-99-82 при внутри- и внесосудистом способах введения был рассчитан показатель абсолютной биодоступности величина, которого составила 0,66.

Проведено изучение выведения препарата. Установленное в результате проведенных исследований значительное превосходство внеренального клиренса над ренальным (почечный клиренс составляет 0,936 мл/час, внепочечный – 666,04 мл/час при внутривенном пути введения; 1,8 мл/час и 1009,72 мл/час соответственно при пероральном пути введения) коррелирует с полученными ранее данными о характере распределения соединения VMA-99-82 в органы и ткани. Препарат определялся в почках в низких концентрациях и при внутривенном и при пероральном путях введения. Тканевая доступность составила 0,452 и 0,413 соответственно.

Длительное время определения изучаемого соединения в экскретах соотносится с установленными ранее данными о длительной циркуляции в крови и довольно высоких значениях периода полувыведения (11 и 6,5 часов для внутривенного и перорального пути введения соответственно).

Низкие показатели элиминации неизменной субстанции с мочой и калом могут свидетельствовать о выраженной способности вещества подвергаться процессам биотрансформации в организме и о высоком значении эффекта «первого прохождения через печень».

Был проведен анализ предполагаемых схем метаболизма соединения VMA-99-82 и оценка физико-химических свойств возможных метаболитов при помощи методов *in silico*. На основании полученной посредством компьютерной программы предполагаемой схемы метаболизма установлено, что основные направления метаболизма протекают в виде окислительных реакций и реакций деградации.

Анализ констант липофильности и диссоциации возможных метаболитов соединения VMA-99-82 позволяет предположить довольно значительное изменение физико-химических свойств, а соответственно, и хроматографических свойств образующихся веществ. Наиболее вероятно, что потребуются внесение определенных изменений в метод количественного определения при дальнейшей идентификации и изучении свойств метаболитов.

В четвертой главе представлены результаты биофармацевтического исследования адепрофена – таблетированной лекарственной формы соединения VMA-99-82 и анализ межвидовых различий его фармакокинетических параметров. Исследование проведено на таблетированной лекарственной форме соединения VMA-99-82 – адепрофене, созданной на кафедре технологии лекарств Пятигорского медико-фармацевтического института*.

Эксперименты выполнены на 20 кроликах породы Шиншилла массой 1,5 – 2 кг, которые содержались в условиях вивария на стандартной диете с соблюдением всех правил и Международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях. На момент проведения исследований животные были здоровыми, изменений поведения, аппетита, режима сна и бодрствования обнаружено не было. За двенадцать часов до проведения экспериментов животных лишали доступа к пище без ограничения потребления воды.

Субстанцию VMA-99-82 в изотоническом растворе и таблетки адепрофена вводили животным перорально, посредством желудочного зонда, в максимальной терапевтической дозе 50 мг/кг. Контрольной группе животных вводили изотонический раствор в аналогичных объемах. Забор проб крови производили из ушной вены через 15, 30 минут и через 1, 2, 4, 8 и 12 часов после введения.

* Выражаем благодарность профессору Степановой Э.Ф. и сотрудникам кафедры технологии лекарств Пятигорского медико-фармацевтического института

Кровь стабилизировали 5% раствором натрия цитрата. Определение содержания соединения VMA-99-82 проводили в цельной крови.

Относительная биодоступность рассчитывалась как отношение AUC субстанции к AUC лекарственной формы при соответствующем введении лекарственного вещества кроликам:

Экспериментальные данные обсчитывались с помощью t-критерия Стьюдента. Статистическая обработка данных проводилась при помощи компьютерной программы Microsoft Excel.

Таким образом, в результате проведенных экспериментов получены усредненные фармакокинетические кривые зависимости концентрации соединения в крови от времени для субстанции и таблеток. Анализ полученных данных показывает, что соединение VMA-99-82 быстро всасывается в ЖКТ, так как максимум концентрации отмечается уже через 30 минут после введения. Установлено, что фармакокинетические кривые носят биэкспоненциальный характер и весьма сходны между собой.

Рассчитаны основные фармакокинетические параметры для субстанции и таблеток соединения VMA-99-82. Невысокие значения периода полувыведения ($T_{1/2} = 5,62$ и $5,6$ часа соответственно) и среднего времени удерживания в организме одной молекулы препарата ($MRT = 7,8$ и $7,72$ часа) свидетельствуют о быстром снижении концентрации препарата в крови. Это обуславливает низкое значение площади под фармакокинетической кривой ($AUC = 46,29$ и $43,05$ мкг*час/мл). Показатели системного клиренса довольно невелики ($Cl = 1,084$ и $1,164$ л/час*кг соответственно). Довольно высокие показатели общего объема распределения ($Vd = 8,77$ и $9,4$ л/кг соответственно), свидетельствуют о выраженной способности препарата интенсивно проникать в органы и ткани (Таблица 4).

Таблица 4.

Фармакокинетические параметры соединения VMA-99-82 в плазме крови кроликов при пероральном введении субстанции и таблеток в дозе 50 мг/кг.

Параметры	Субстанция	Таблетки
AUC (мкг*час/мл)	46,288	43,054
Kel (час ⁻¹)	0,1236	0,1238
T _{1/2} (час)	5,618	5,598
MRT (час)	7,796	7,718
Cl (л/(час*кг))	1,084	1,164
Vd (л/кг)	8,77	9,388
F отн., %	-	93,44

На основании полученных в ходе проведенных экспериментов данных рассчитан показатель относительной биодоступности, величина которого составила 93,44%. Столь высокие значения относительной биодоступности позволяют сделать заключение, что лекарственная форма подобрана оптимально и ее можно рекомендовать к дальнейшему производству и применению.

Также была проведена оценка межвидовых различий в фармакокинетических свойствах соединения VMA-99-82 при пероральном введении субстанции изучаемого соединения крысам и кроликам. Сравнение фармакокинетических кривых выявило их высокое сходство по характеру и абсолютным значениям концентраций в отдельные временные интервалы. В результате изучения фармакокинетических параметров у кроликов и крыс при внутрижелудочном введении было установлено, что числовые показатели не демонстрируют значительных различий (Таблица 5).

Таблица 5.

Фармакокинетические параметры соединения VMA-99-82 в плазме крови крыс и кроликов при пероральном введении в дозе 50 мг/кг.

Параметры	Крысы	Кролики
AUC (мкг*час/мл)	49,43	46,288
Kel (час ⁻¹)	0,11	0,1236
T _{1/2} (час)	6,11	5,618
MRT (час)	8,52	7,796
Cl (л/(час*кг))	1,01	1,084
Vd (л/кг)	8,91	8,77

Таким образом, в результате сравнительного анализа усредненных фармакокинетических профилей и основных фармакокинетических параметров, полученных в результате перорального введения соединения VMA-99-82 различным видам животных (крысы, кролики) не было выявлено значимых межвидовых различий.

Пятая глава (обсуждение результатов). Проводится оценка и анализ основных параметров метода количественного определения соединения VMA-99-82 и соответствия валидационных характеристик метода нормативным значениям. Разработанный метод количественного определения является высокоселективным и высокочувствительным, что позволяет использовать его для проведения фармакокинетических и биофармацевтических исследований соединения VMA-99-82. Рассмотрены основные фармакокинетические параметры изучаемого вещества при внутривенном и пероральном путях введения, характер распределения по органам и тканям, а также параметры экскреции. Методом *in silico* рассчитаны предполагаемая схема метаболизма и физико-химические свойства возможных метаболитов. Проанализированы результаты биофармацевтического исследования таблетированной лекарственной формы соединения VMA-99-82 и межвидовые различия фармакокинетических параметров изучаемого вещества. Рассчитан показатель относительной биодоступности. Высокая относительная биодоступность позволяет сделать

заклучение, что лекарственная форма подобрана оптимально. В результате сравнительного анализа усредненных фармакокинетических профилей и основных фармакокинетических параметров, полученных в результате перорального введения соединения VMA-99-82 различным видам животных (крысы, кролики) не было выявлено значимых межвидовых различий.

ЗАКЛУЧЕНИЕ

Разработанный метод количественного определения соединения VMA-99-82 в биологических пробах является валидизированным, селективным и чувствительным, что позволяет использовать его для проведения фармакокинетических исследований.

Исследуемое вещество циркулирует в организме животных на протяжении не менее 12 часов при внутривенном и пероральном путях введения. Соединение VMA-99-82 интенсивно распределяется по органам и тканям, при этом распределение носит неоднородный характер. Наибольшая тропность наблюдается по отношению к легочной ткани. Исследуемое вещество экскретируется на протяжении не менее 72 часов после введения при обоих путях введения. В экскретах обнаружены низкие концентрации неизменной субстанции. Эти данные могут свидетельствовать о выраженной способности вещества подвергаться процессам биотрансформации в организме. Также можно предположить выраженный эффект «первого прохождения» через печень.

При помощи компьютерной программы PALLAS был проведен анализ предполагаемого метаболизма соединения VMA-99-82 методом *in silico* с целью построения вероятной схемы метаболизма и оценки физико-химических свойств метаболитов. На основании полученных данных можно предположить, что потребуется внесение определенных изменений в метод количественного определения при дальнейшей идентификации и изучении свойств метаболитов.

В результате проведенного биофармацевтического исследования установлено, что соединение VMA-99-82 быстро всасывается в ЖКТ, так как максимум концентрации отмечается уже через 30 минут после введения.

Рассчитан показатель относительной биодоступности, величина которого составила 93,44%. Также в результате сравнительного анализа усредненных фармакокинетических профилей и основных фармакокинетических параметров, полученных в результате перорального введения соединения VMA-99-82 различным видам животных (крысы, кролики) не было выявлено значимых межвидовых различий.

На основании вышеизложенного можно сделать ряд выводов по результатам проведенного исследования.

ВЫВОДЫ

1. Разработанный метод высокоэффективной жидкостной хроматографии количественного определения обладает аналитическими характеристиками (точность 97,8%; прецизионность 4,55%; воспроизводимость 10%; повторяемость 14%; чувствительность 1 мкг/мл; предел обнаружения 200 нг/мл), позволяющими проведение определения соединения VMA-99-82 в биологическом материале.
2. Изучаемое биологически активное производное аденина обладает высокой абсолютной биодоступностью (66%), что позволяет рекомендовать к разработке пероральную лекарственную форму.
3. Установлено, что распределение по органам и тканям носит неоднородный характер, наибольшее содержание наблюдается в легких (Ft 1111,18 и 8,14 при внутривенном и пероральном введении, соответственно).
4. В ходе изучения экскреции соединения VMA-99-82 установлено значительное превосходство внеренального клиренса над ренальным (666,04 мл/час и 0,936 мл/час соответственно при внутривенном введении; 1009,72 мл/час и 1,8 мл/час соответственно при пероральном пути введения). Низкое содержание неизмененного

вещества в экскретах позволяет сделать предположение об активном метаболизме.

5. В результате проведенного биофармацевтического исследования установлено, что таблетки адепрофен имеют высокую относительную биодоступность (93,44%), что позволяет рекомендовать их к дальнейшей разработке.

Научно-практические рекомендации

1. Разработанный метод высокоэффективной жидкостной хроматографии может быть использован для разработки методов количественного определения в биологических пробах других лекарственных средств, производных аденина, а так же взят за основу при работе с малорастворимыми соединениями.
2. Полученные в ходе исследования фармакокинетические характеристики могут использоваться при дальнейших доклинических, клинических и биофармацевтических исследованиях нового производного аденина.
3. Таблетированная лекарственная форма соединения VMA-99-82 является оптимальной и может быть рекомендована для промышленного производства и дальнейшего внедрения в практическое здравоохранение.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Полученные в ходе исследования результаты могут быть использованы при последующем клиническом изучении нового производного аденина с противовирусной активностью – соединения VMA-99-82.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК РФ

1. Смирнова Л.А. Относительная биодоступность соединения VMA-99-82 – нового производного аденина, обладающего противовирусной активностью / Л.А. Смирнова, Е.А. Сучков, А.Ф. Рябуха, К.А. Кузнецов, А.А. Озеров // Вестник ВолгГМУ. – 2013. – №3 (47). – С. 78-81
2. Смирнова Л.А. Фармакокинетические свойства нового производного аденина с противовирусной активностью / Л.А. Смирнова, Е.А. Сучков, А.Ф. Рябуха, К.А. Кузнецов, А.А. Озеров // Вестник ВолгГМУ. – 2014. – №1 (49). – С. 92-93
3. Смирнова Л.А. Хроматографические условия анализа нового производного аденина, обладающего противовирусной активностью / Л.А. Смирнова, Е.А. Сучков, А.Ф. Рябуха, К.А. Кузнецов, А.А. Озеров // Вестник ВолгГМУ. – 2014. – №1 (49). – С. 94-96
4. Тюренков И.Н. Разработка хроматографического метода количественного определения фенибута в биологических пробах / И.Н. Тюренков, В.Н. Перфилова, А.Ф. Рябуха, Л.А. Смирнова, Е.А. Сучков, С.А. Лебедева // Химико-фармацевтический журнал. – 2010. – Том 44, № 12. – С 68-70.
5. Тюренков И.Н. Фармакокинетические свойства фенибута при внутривенном и пероральном введении / И.Н. Тюренков, В.Н. Перфилова, А.Ф. Рябуха, Л.А. Смирнова, Е.А. Сучков, С.А. Лебедева // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2010. – №9. – с 22-25.
6. Рябуха А.Ф. Разработка метода количественного определения биогенных аминов и их метаболитов в структурах головного мозга крыс / А.Ф. Рябуха, Л.А. Смирнова, Е.А. Сучков, А.В. Мекеня, Е.В. Дьякова, Д.Г. Ковалев // Вестник ВолгГМУ. – 2010. – №2 (34). – С. 29-31.
7. Рябуха А.Ф. Разработка хроматографического метода количественного определения аторвастатина в плазме крови больных ишемической болезнью сердца / А.Ф. Рябуха, Л.А. Смирнова, К.А. Кузнецов, Е.А. Сучков, О.В.

Магницкая, А.А. Ефимова, Б.Е. Толкачёв // Ремедиум. Журнал о рынке лекарств и медицинской технике. – 2011. – №4. – С. 181.

8. Кузнецов К.А. Количественное определение ивабрадина в плазме крови методом ВЭЖХ у больных ишемической болезнью сердца / К.А. Кузнецов, А.Ф. Рябуха, О.В. Магницкая, Л.А. Смирнова, Е.А. Сучков, А.А. Ефимова // Ремедиум. Журнал о рынке лекарств и медицинской технике. – 2011. - №4. – С. 180.

9. Мекеня А.В. Влияние новых природных азотосодержащих соединений на изменение уровня биогенных аминов и их метаболизм в структурах головного мозга и продолжительность жизни крыс / А.В. Мекеня, А.Ф. Рябуха, В.С. Сергеев, Д.Г. Ковалев, Л.А. Смирнова, Е.А. Сучков // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2012. – № 9. – с.11-14.

10. Тюренков И.Н. Количественное определение цитрокарда - нового производного ГАМК в биологических пробах / И.Н. Тюренков, В.Н. Перфилова, Л.А. Смирнова, А.Ф. Рябуха, Е.А. Сучков, С.А. Лебедева // Химико - фармацевтический журнал. – 2013. – т. 47, №3. – с. 55-56.

11. Перфилова В.Н. Изучение абсолютной биодоступности нового производного ГАМК – цитрокарда / В.Н. Перфилова, И.Н. Тюренков, Л.А. Смирнова, А.Ф. Рябуха, Е.А. Сучков, С.А. Лебедева // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2013. – т. 155, № 4. – с. 450-452.

12. Тюренков И.Н. Гепатодуоденальная циркуляция и экскреция нового производного ГАМК – цитрокарда / И.Н. Тюренков, В.Н. Перфилова, Л.А. Смирнова, А.Ф. Рябуха, Е.А. Сучков, С.А. Лебедева // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2013. – №3 (76). – С. 38-40.

Другие публикации по теме диссертации

1. Смирнова Л.А. Экскреция соединения VMA-99-82 – нового производного аденина, обладающего противовирусной активностью. / Л.А. Смирнова, А.Ф. Рябуха, К.А. Кузнецов, Е.А. Сучков, А.А. Озеров, А.В. Караваяев // Фармакокинетика и фармакодинамика. – 2013. – №1 (6).

2. Тюренков И.Н. Фармакокинетические свойства нового производного ГАМК цитрокарда: распределение и тканевая биодоступность / И.Н. Тюренков, В.Н.

Перфилова, Л.А. Смирнова, А.Ф. Рябуха, Е.А. Сучков, С.А. Лебедева // Фармакокинетика и фармакодинамика. – 2012. – №2.

3. Тюренков И.Н. Количественное определение производных фенибута в биопробах / И.Н. Тюренков, В.Н. Перфилова, А.Ф. Рябуха, Л.А. Смирнова, Е.А. Сучков // Вестник ВолГМУ: приложение (Материалы III Всероссийского научно-практического семинара для молодых ученых «Методологические аспекты экспериментальной и клинической фармакологии») Волгоград: Изд-во ВолГМУ. – 2011. – С.71-74.
4. Кузнецов К.А. Сравнительная оценка расчетов фармакокинетических кривых при использовании модельных и немодельных методов / К.А. Кузнецов, А.Ф. Рябуха, О.В. Магницкая, Л.А. Смирнова, Е.А. Сучков, А.А. Ефимова // Вестник ВолГМУ: приложение (Материалы III Всероссийского научно-практического семинара для молодых ученых «Методологические аспекты экспериментальной и клинической фармакологии») Волгоград: Изд-во ВолГМУ. – 2011. – С.119-120.
5. Смирнова Л.А. Особенности разработки методов ВЭЖХ количественного определения новых лекарственных веществ в биологических пробах / Л.А. Смирнова, А.Ф. Рябуха, Е.А. Сучков, В.Н. Перфилова, О.В. Магницкая, К.А. Кузнецов, А.И. Ращенко // Вестник ВолГМУ: приложение (Мат. IV Всероссийского научно-практического семинара молодых ученых с международным участием «Современные проблемы медицинской химии, направленный поиск новых лекарственных средств») Волгоград. – 2012. – С.209-210.

На правах рукописи

СУЧКОВ ЕВГЕНИЙ АЛЕКСАНДРОВИЧ

**МЕТОД КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ В БИОЛОГИЧЕСКОМ
МАТЕРИАЛЕ И ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НОВОГО
ПРОИЗВОДНОГО АДЕНИНА, ОБЛАДАЮЩЕГО ПРОТИВОВИРУСНОЙ
АКТИВНОСТЬЮ**

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

14.04.02 Фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Волгоград – 2014