На правах рукописи

ГРЕБЕНКИН

ДМИТРИЙ ЮРЬЕВИЧ

РАЗРАБОТКА АНАЛИТИЧЕСКИХ МЕТОДИК ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ФАКТОРОВ, ВЛИЯЮЩИХ НА КИШЕЧНУЮ АБСОРБЦИЮ И БИОТРАНСФОРМАЦИЮ ФОСФАЗИДА

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата фармацевтических наук

Москва – 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Российский университет дружбы народов» (РУДН)

Научный руководитель:

Доктор химических наук, профессор **Станишевский Ярослав Михайлович**

Научный консультант:

Доктор фармацевтических наук **Шохин Игорь Евгеньевич**

Официальные оппоненты:

Потанина Ольга Георгиевна, доктор фармацевтических наук, директор Центра научных исследований и разработок Центра коллективного пользования (Научно-образовательного центра) Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов» (РУДН).

Краснюк Иван Иванович, доктор фармацевтических наук, профессор, заведующий кафедрой аналитической, физической и коллоидной химии Института фармации Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет).

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится «30» января 2020 г. в __ час. __ мин. на заседании диссертационного совета ПДС 0300.001 на базе федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования "Российский университет дружбы народов" по адресу: 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.8.
С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» по адресу: 117198, ул. Миклухо-Маклая, д.6 и на сайте http://dissovet.rudn.ru.

Автореферат разослан «___»_____20___ г.

Учёный секретарь
диссертационного совета ПДС 0300.001,
доктор фармацевтических наук, профессор **Успенская Елена Валерьевна**

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Распространение ВИЧ-инфекции является важнейшей проблемой здравоохранения Российской Федерации. Одним из важных шагов по борьбе с ВИЧ и СПИД является развитие и широкое внедрение антиретровирусной терапии.

Фосфазид (АЗТ-фосфонат, коммерческое название Никавир®) – является одним из наиболее эффективных и безопасных лекарственных препаратов из группы нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы ВИЧ. Это оригинальный отечественный препарат, удостоенный Государственной премии Российской Федерации в области науки и техники в 2000-м году. Лекарственный препарат Никавир® (таблетки 200 мг и 400 мг) входит в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов, утверждённый распоряжением Правительства Российской Федерации от 07.12.2011 № 2199-р. Согласно клиническим рекомендациям «ВИЧ-инфекция и СПИД» (М, ГЕОТАР-Медиа, 2016 г.), ФФЗ характеризуется как препарат, пригодный для терапии больных ВИЧ-инфекцией в составе предпочтительных и альтернативных схем АРВТ первого ряда, для лечения беременных женщин, для лечения больных хроническими вирусными гепатитами, туберкулезом и другими заболеваниями. Отдельный интерес представляет процесс превращения ФФЗ в АЗТ организме человека. Отметим, что АЗТ является препаратом с высокой токсичностью. Наиболее опасными нежелательными явлениями при приёме АЗТ являются миозит, а также различные проявления миелосупрессии (анемия, нейтропения, лейкопения), и в случае ухудшения гематологических показателей больного необходимо снизить дозу или прекратить лечение. Для ФФЗ, согласно современным данным, эти нежелательные явления не характерны, что позволяет применять его в продолжительной терапии сложных больных, в том числе беременных женщин. Однако, риски, связанные с превращением

ФФЗ в АЗТ в ЖКТ, с нашей точки зрения, требуют отдельного детального изучения.

Степень разработанности темы исследования. Фосфазид успешно прошёл комплекс доклинических и клинических испытаний, на основании которых зарегистрирован и применяется в клинической практике на территории Российской Федерации. В предыдущих исследованиях других авторов были сделаны важные шаги на пути понимания механизмов метаболизма фосфазида: были предприняты попытки изучить его взаимодействие с некоторыми ферментами *in vitro* (Куханова М.К. и др. Гидролиз 5'-фосфонатов и фосфатов нуклеозидов фосфатазами различного происхождения и сыворотками крови человека и теленка. Мол.Биол., 1992), на животных (Зайцева Т.М. Изучение фармакокинетики и биоэквивалентности фосфазида. Отчет, ФГБУ «РК-НПК» Минздрава РФ, М., 1994), а также распределение продуктов его метаболизма по органам с использованием изотопно-меченых молекул (Skoblov Y., et al. Intracellular metabolism and pharmacokinetics of 5'-hydrogenphosphonate of 3' azido-2',3'-dideoxythymidine/ a prodrug of 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine. Antivir. Res., 2004). Тем не менее, взаимодействия фосфазида с кишечником не исследованы. Также нельзя не отметить появление в последние годы возможностей для более детального изучения соответствующих процессов: специальных клеточных культур, более совершенных методов анализа проб (ВЭЖХ-МС/МС), позволяющих обнаруживать существенно более низкие количества веществ. В рамках данной работы мы предлагаем оригинальный метод оценки деструкции фосфазида у поверхности кишечника при помощи модели вывернутого тонкого кишечника крысы. Новые, полученные таким образом данные, могут существенно дополнить современные представления о терапии фосфазидом и помочь в разработке новых препаратов АРВТ.

Цель исследования - разработать аналитические методики определения фосфазида *in vivo* и *in vitro* для изучения факторов, влияющих на его кишечную абсорбцию и биотрансформацию.

Задачи исследования:

1. Разработать методики анализа и изучить биофармацевтическую растворимость и стабильность ФФЗ в модельных средах, имитирующих основные отделы ЖКТ: pH 1,2, pH 4,5, pH 6,8.

2. Разработать методики анализа и оценить степень кишечной проницаемости ФФЗ и его сродство к активному эффлюкс-транспортёру Pgp *in vitro* с использованием монослоя культуры клеток Caco-2 и сравнить полученные экспериментальные данные с аналогичными данными из литературы для АЗТ.

3. Разработать оригинальный метод, пригодный для изучения трансформаций веществ в пристеночном пространстве тонкого кишечника *in vitro*, продемонстрировать с его помощью превращение ФФЗ в АЗТ и 6НР в АЗТ или его отсутствие.

4. Разработать и валидировать аналитические методики и исследовать с их помощью динамику поступления ФФЗ в системный кровоток, оценить степень его превращения в АЗТ при однократном пероральном приёме здоровыми добровольцами. Сравнить экспериментально полученные фармакокинетические параметры ФФЗ с аналогичными данными из литературы для АЗТ и оценить возможный вклад превращения ФФЗ в АЗТ до абсорбции в интенсивность поступления активной молекулы в системный кровоток.

5. Обобщить и систематизировать полученные данные, предположить их значение с точки зрения клинической практики и разработки новых лекарственных препаратов.

Научная новизна. Предложен авторский метод для изучения трансформаций веществ в пристеночном пространстве тонкого кишечника

in vitro – модель вывернутого кишечника крысы (заявка на патент, регистрационный № 2019113240). При помощи данного метода впервые экспериментально продемонстрирован процесс превращения ФФЗ в АЗТ при контакте с поверхностью кишечника. Вещество 6НР, являющееся модифицированным по фосфонатной группе аналогом ФФЗ, в тех же условиях оказалось устойчиво к превращению в АЗТ.

Впервые исследована кишечная проницаемость ФФЗ *in vitro* с использованием монослоя культуры клеток Caco-2 в апикально-базолатеральном (A-B) и базолатерально-апикальном (B-A) направлениях с добавлением и без добавления ингибитора трансмембранного эффлюкс-транспортёра Pgp циклоспорина А.

Показано, что ФФЗ является хорошо растворимой субстанцией с точки зрения биофармации, молекула ФФЗ стабильна в жидкостях, имитирующих среды ЖКТ.

В исследованиях на здоровых добровольцах при помощи чувствительного аналитического метода показано, что ФФЗ обнаруживается в крови человека в виде АЗТ.

Теоретическая и практическая значимость. Следует подчеркнуть, что ФФЗ является препаратом пожизненного применения, в то время как кишечник испытывает влияние самых различных факторов в повседневности: изменения рациона, приём лекарств, алкоголя, заболевания и инфекции ЖКТ, всё перечисленное может тем или иным образом влиять на физиологические параметры кишечника и оказать влияние на превращение ФФЗ в АЗТ в кишечнике и, как следствие, на абсорбцию ФФЗ в виде АЗТ. Таким образом, новые данные способны помочь усовершенствовать клинические рекомендации в отношении существующих препаратов ФФЗ, в том числе комбинированных.

Использование модели вывернутого кишечника крысы может оказать помощь в разработке препаратов, представляющих из себя модифицированные аналоги тимидина и других природных нуклеозидов.

Дальнейшее изучение механизмов взаимодействия ФФЗ с ЖКТ позволит не только улучшить понимание природы клинических различий между ФФЗ и АЗТ, но также использовать полученные данные в разработке и регистрации новых препаратов, пролонгированных форм ФФЗ.

Положения, выносимые на защиту:

1. Результаты исследования с использованием модели вывернутого тонкого кишечника крысы, демонстрирующие биотрансформацию фосфазида в азидотимидин.

2. Результаты исследования биофармацевтической растворимости и стабильности в модельных средах (pH 1,2, 4,5, 6,8) фосфазида.

3. Результаты исследования кишечной проницаемости фосфазида *in vitro* при помощи модели Caco-2: коэффициент кажущейся проницаемости P_{app}, соотношение P_{app} $\frac{B \to A}{A \to B}$, характеризующее сродство к эффлюкс-транспортеру Pgp.

4. Параметры фармакокинетических кривых концентраций азидотимидина в плазме крови здоровых добровольцев (C_{max}, T_{max}, $T_{1/2}$) после однократного приёма пероральных препаратов фосфазида Фосфаладин®, таблетки, покрытые пленочной оболочкой 150 мг + 400 мг (ООО «АЗТ ФАРМА К.Б.», Россия) Никавир®, таблетки 400 мг (ООО «АЗТ ФАРМА К.Б.», Россия) в рамках исследования биоэквивалентности.

5. Разработанные методики аналитики и пробоподготовки фосфазида и азидотимидина при помощи ВЭЖХ-МС/МС, ВЭЖХ-УФ (в плазме крови человека, в пробах модели Caco-2, в пробах модели вывернутого кишечника крысы, в модельных растворах pH 1,2, 4,5, 6,8).

Методология и методы исследования.

Для оценки растворимости и стабильности ФФЗ в средах, моделирующих жидкости ЖКТ, использовались стандартные для биофармацевтических исследований подходы (встряхивание в буферных растворах pH 1,2, 4,5, 6,8 при 37°C), количественное определение проводилось при помощи ВЭЖХ-УФ.

Для оценки всасываемости ФФЗ использовались стандартные подходы к работе с монослоем культуры клеток Caco-2, количественное определение проводили при помощи ВЭЖХ-МС/МС.

Для получения вывернутого кишечника использовались лабораторные крысы. Количественное определение и идентификация исследуемых веществ проводились при помощи ВЭЖХ-УФ.

Исследования фармакокинетики ФФЗ и его продуктов в плазме крови здоровых добровольцев соответствовали всем этическим и методологическим правилам, действующим в настоящее время на территории России. Концентрация веществ в плазме крови человека определялась валидированным методом при помощи ВЭЖХ-МС/МС.

Достоверность научных положений и выводов. Диссертационная работа выполнена на современном научно-методологическом уровне. В ходе выполнения исследования использованы современные методы (ВЭЖХ-УФ, ВЭЖХ-МС/МС, монослой культуры клеток Caco-2), соответствующие поставленным целям и задачам. Экспериментальные данные, полученные автором, достоверны, обработаны с применением методов современной статистики. Научные положения и выводы, сформулированные в диссертационной работе, обоснованы, достоверны и логично вытекают из полученных автором экспериментальных данных. Первичная документация исследования проверена и полностью соответствует материалам, содержащимся в работе.

Апробация результатов исследования. Материалы научных исследований по теме диссертации были представлены на X конкурсе проектов молодых ученых, Москва, 20 сентября 2016 года, Второй научно-практической конференции с международным участием «Разработка и регистрация лекарственных средств в соответствии с принципами надлежащих практик GxP», Москва, 29 ноября 2017 года и на Второй научно-практической конференции «Международная интеграция в сфере химической и фармацевтической промышленности», Москва, 27-28 декабря 2017 года.

Личный вклад автора. Диссертантом проведён анализ степени разработанности темы научной работы, сформулирована гипотеза, определены цели и задачи исследования, осуществлён поиск ресурсов для их решения. Все этапы теоретической и экспериментальной работы осуществлялись при непосредственном участии диссертанта. Автором осуществлены обобщение и систематизация полученных данных, сформулированы выводы.

Внедрение результатов исследования. Разработанные аналитические методики внедрены в работу ООО «АЗТ ФАРМА К.Б.», ООО «Центр фармацевтической аналитики», ООО «Экзактэ Лабс» и Федерального государственного учреждения науки «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства».

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Диссертация соответствует формуле специальности 14.04.02-фармацевтическая химия, фармакогнозия, а именно пункту 3 (разработка методов контроля качества) и пункту 4 (разработка методов анализа лекарственных веществ и их метаболитов в биологических объектах для фармакокинетических исследований) паспорта специальности.

Публикации результатов исследования. Содержание и результаты диссертационного исследования отражены в 7 печатных работах, в том числе 2 статьи в изданиях, индексированных в международной базе данных Scopus,

3 статьи в журналах, входящих в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные результаты исследований в рамках диссертации, представляемых к защите диссертационных советах РУДН, тезисы доклада, одна зарубежная монография.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 134 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, выводов и списка литературы из 108 источников (74 из которых зарубежные). Работа иллюстрирована 22 рисунками и содержит 24 таблицы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты исследования. Объектами исследования являлись образцы субстанции лекарственного препарата фосфазида и образцы субстанции 6НР, предоставленные ООО «АЗТ ФАРМА К.Б.».

Объектами исследования фармакокинетики фосфазида являлись образцы плазмы, полученные в рамках изучения биоэквивалентности препаратов: комбинированный препарат ламивудина и фосфазида Фосфаладин®, таблетки, покрытые пленочной оболочкой 150 мг + 400 мг (ООО «АЗТ ФАРМА К.Б.», Россия) и препарат фосфазида Никавир®, таблетки 400 мг (ООО «АЗТ ФАРМА К.Б.», Россия). Образцы предоставлены клиническим центром Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Городская клиническая больница №1 им. Н.И. Пирогова» Департамента здравоохранения города Москвы (ГБУЗ «ГКБ№1 им. Н.И. Пирогова» ДЗМ). Результаты представленного эксперимента в качестве исследований биоэквивалентности вошли в регистрационное досье препарата Фосфаладин® (производитель: ООО «АЗТ ФАРМА К.Б.», Россия, регистрационный номер ЛП 004720 - 280218).

Материалы и методы исследования. Оценка растворимости и стабильности фосфазида в средах, моделирующих жидкости ЖКТ, разработка методик анализа осуществлялась на базе ООО «Центр

Фармацевтической Аналитики». Анализ проб осуществлялся при помощи ВЭЖХ-УФ на приборе Agilent 1260, (Agilent, США), ПО Agilent Chemstation (Agilent, США). Оценка всасываемости фосфазида с монослоем культуры клеток Caco-2, а также количественный анализ проб осуществлялись на базе ООО «Экзактэ Лабс». В работе использовали коммерчески доступный набор American Type Culture Collection (Кат.№ HTB-37). Анализ проб осуществлялся при помощи ВЭЖХ-МС/МС на приборах Acquity I-class UPLC (Waters, США) с детектором Sciex 4500 (Sciex, США), ПО Analyst (Sciex, США). Для получения вывернутого кишечника использовались лабораторные крысы, предоставленные виварием Факультета фундаментальной медицины Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова. Для изучения ферментативной реакции использовали коммерчески доступный образец экто-5'-нуклеотидазы, Sigma Merck, cat N1665. Количественное определение и идентификация исследуемых веществ проводились при помощи ВЭЖХ-УФ на приборе Acquity I-class UPLC (Waters, США), программное обеспечение Empower 3.0 (Waters, США). Исследования фармакокинетики ФФЗ и его продуктов в плазме крови здоровых добровольцев соответствовали всем этическим и методологическим правилам, принятым на территории России. Концентрация веществ в плазме крови определялась валидированным методом при помощи ВЭЖХ-МС/МС на приборе Dionex ultimate 3000 (Dionex, Германия) с детектором Bruker micrOTOF-Q II (Bruker, Германия). Концентрация ФФЗ при исследовании стабильности в плазме крови определялась валидированным методом при помощи ВЭЖХ-МС/МС на приборе LCMS-8040 (Shimadzu corp., Япония).

ИЗУЧЕНИЕ БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ РАСТВОРИМОСТИ ФОСФАЗИДА

В исследовании использовали буферные растворы, моделирующие основные отделы ЖКТ (0,1 М раствор HCl pH 1,2 – желудок, ацетатный

буферный раствор pH 4,5 – двенадцатиперстная кишка, фосфатный буферный раствор pH 6,8 – тонкий кишечник), а также глициновый буфер с pH 9,0 вне физиологического диапазона. Анализ проводили при помощи оригинальной методики с использованием ВЭЖХ-УФ для исследования содержания вещества в анализируемых растворах. Пример калибровочной кривой в среде pH 6,8 представлен на Рисунке 1. Контроль пригодности аналитических серий осуществляли по показателям линейности ($r^2 > 0,99$), точности и прецизионности контрольных образцов, селективности.

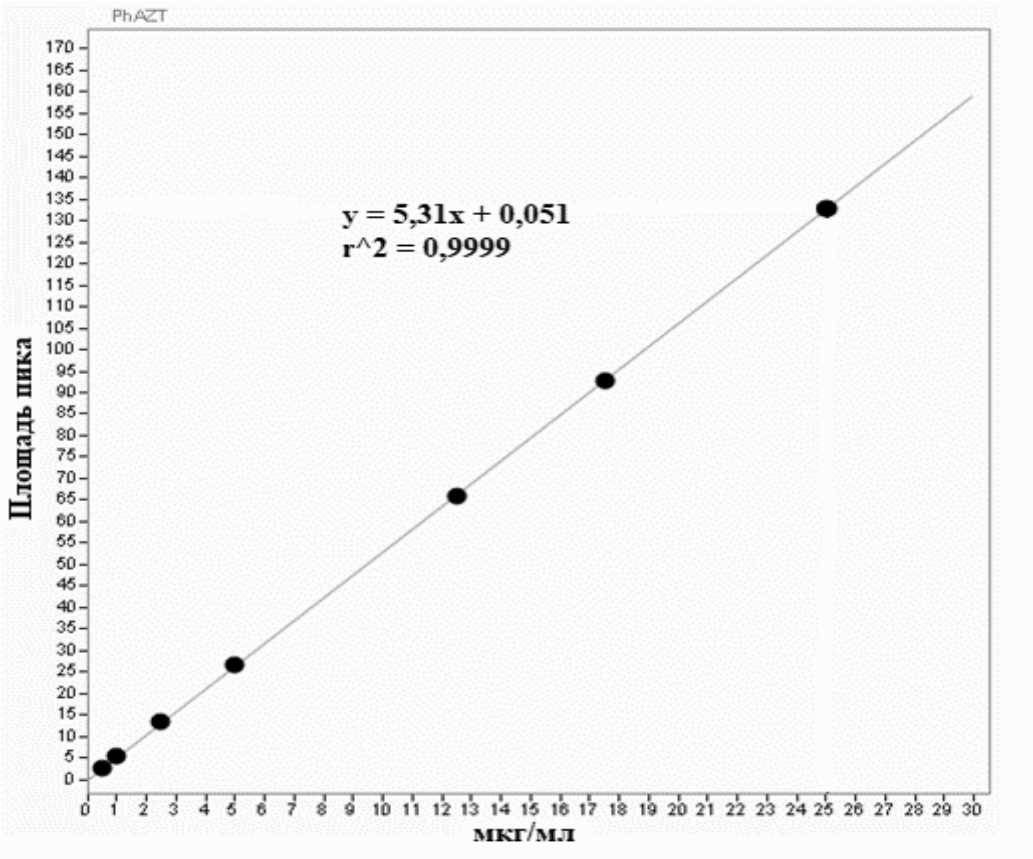

Рисунок 1 – Калибровочный график ФФЗ, автоматически обработанный программным обеспечением Chemstation Open lab

По прошествии 24 ч наблюдалось полное растворение субстанции ФФЗ во всех средах растворения без остатка, что позволило однозначно классифицировать её как «хорошо растворимую» в рамках БКС.

В исследованиях стабильности было показано, что значимой деградации ФФЗ не происходит в средах pH 1,2, pH 4,5, pH 6,8 во временных точках 1

час, 2 часа, 5 часов, по прошествии 24 ч – не более 15%. В среде pH 9,0 деградация составляла не более 12,1% за 2 часа. Это позволяет судить о том, что физико-химические свойства жидкостей ЖКТ не играют значимой роли в процессе превращения ФФЗ в АЗТ.

ИССЛЕДОВАНИЕ КИШЕЧНОЙ ПРОНИЦАЕМОСТИ И Pgp-ТРАНСПОРТА ФОСФАЗИДА С ПРИМЕНЕНИЕМ МОДЕЛИ CACO-2

Изучена кишечная всасываемость ФФЗ *in vitro* с использованием монослоя культуры клеток Caco-2 в апикально-базолатеральном (A-B) и базолатерально-апикальном (B-A) направлениях с добавлением и без добавления ингибитора трансмембранного эффлюкс-транспортёра Pgp циклоспорина А. В качестве контрольных веществ использовались: ранитидин и пропранолол. Методика эксперимента основывалась на рекомендациях для использования коммерческих наборов MultiScreen® Caco-2 Assay System.

Полученные растворы анализировали при помощи оригинальной методики с использованием ВЭЖХ-МС/МС, установлена её применимость для исследования проб, контроль пригодности аналитической серии осуществляли по показателям линейности, точности, прецизионности контрольных образцов, селективности и соотношению сигнал/шум.

В результате эксперимента были получены величины коэффициентов кажущейся кишечной проницаемости P_{app} для исследуемого и контрольных веществ. Отметим, что для ФФЗ результаты данного эксперимента получены впервые. В Таблице 1 приводятся результаты эксперимента в четырёх вариантах (разное направление транспорта в условиях отсутствия или добавления ингибитора Pgp). В Таблицах 2 и 3 приводятся аналогичные данные для контрольных веществ – ранитидина (низкая проницаемость) и пропранолола (высокая проницаемость). Полученные показатели кажущейся кишечной проницаемости P_{app} исследуемого и контрольных веществ были сопоставлены с соответствующими величинами (A) log P, рассчитанными на

основании анализа структур их молекул при помощи онлайн калькулятора ALOGPS 2.1 (Таблица 4). Между величинами и наблюдается значимая корреляция (r^2 = 0,853), позволяющая достоверно разделить вещества с высокой и низкой кишечной проницаемостью. По результатам исследования может быть сделано обоснованное заключение о ФФЗ как о веществе с низкой всасываемостью по БКС.

Таблица 1 – Кажущаяся кишечная проницаемость ФФЗ в модели Caco-2

Фосфазид				
Номер ячейки	**P_{app}, x 10^{-6} см/с**			
	[A-B]	**[B-A]**	**[A-B] + ингибитор Pgp**	**[B-A] + ингибитор Pgp**
1	3,0	7,5	5,5	0,8
2	1,1	8,7	0,8	0,6
3	2,0	0,9	1,9	0,4
Среднее	2,0	5,7	2,8	0,6
SD	0,9	4,2	2,5	0,2
RSD, %	46,8	73,6	88,7	37,9

Таблица 2 – Кажущаяся кишечная проницаемость ранитидина в Caco-2

Ранитидин	
Номер ячейки	**P_{app} A-B, x 10^{-6} см/с**
1	1,5
2	13,1 (данные исключены из расчётов)
3	1,2
Среднее	1,4
SD	0,2
RSD, %	15,7

Таблица 3 – Кажущаяся кишечная проницаемость Papp пропранолола в модели Caco-2

Пропранолол	
Номер ячейки	**P_{app} A-B, x 10^{-6} см/с**
1	22,8
2	23,6
3	20,0
Среднее	22,1
SD	1,9
RSD, %	8,4

Таблица 4 – Корреляция кажущейся кишечной проницаемости P_{app} и (A) LogP

Вещество	**Функция**	**P_{app}, 10^{-6} см/с**	**(A) LogP**	**CV**
Фосфазид	Исследуемое в-во	2,0	0,68	46,8 %
Ранитидин	Стандарт низкой проницаемости по БКС	1,4	0,79	15,7 %
Пропранолол	Стандарт высокой проницаемости по БКС	22,1	3,03	8,4 %
r^2	0,853			

По результатам сравнения полученных значений кажущейся кишечной проницаемости P_{app} для ФФЗ с контрольными веществами можно сделать следующие выводы:

1) Всасываемость ФФЗ сопоставима с всасываемостью ранитидина, стандарта низкой кишечной проницаемости (P_{app} 2,0 и 1,4 соответственно).

2) Всасываемость ФФЗ значительно ниже всасываемости пропранолола, стандарта высокой кишечной проницаемости (P_{app} 2,0 и 22,1 соответственно).

Таким образом, ФФЗ может быть классифицирован как субстанция с низкой всасываемостью по классификации БКС.

По результатам сравнения полученных значений кажущейся кишечной проницаемости P_{app} для ФФЗ в разных направлениях транспорта в отсутствии и с добавлением ингибитора эффлюкс-транспортёра Pgp можно сделать следующие выводы:

1) ФФЗ, как показано в эксперименте [B-A], является субстратом эффлюкс-транспортёра Pgp и активно выводится из клетки в нормальных условиях, в то время как в присутствии ингибитора этого транспортёра интенсивность транспорта заметно снижается (P_{app} 5,7 и 0,6 соответственно).

2) ФФЗ также может быть охарактеризован как субстрат эффлюкс-транспортёра Pgp на основании расчёта отношения P_{app} $\frac{B \to A}{A \to B}$, которое составило 2,85 (для подобного заключения отношение должно быть больше 2).

3) При обнаруженном в эксперименте уровне погрешности не представляется возможным сравнить интенсивность транспорта [A-B] в отсутствии и с добавлением ингибитора Pgp.

Также полученные данные были сопоставлены с аналогичными данными в отношении зидовудина из литературы. P_{app} АЗТ для метода Caco-2 по различным источникам составляет 5,2 - 8,7 · 10^{-6} см/с, по некоторым данным достигает 10,8 · 10^{-6} см/с, то есть, в 3-5 раз больше, чем обнаруженный P_{app} ФФЗ. Далее, отношение P_{app} $\frac{B \to A}{A \to B}$ для АЗТ составляет 1,35 – 2,00, для ФФЗ оно составило 2,85, что может говорить о большей активности эффлюкс-транспорта в отношении последнего. Как видно, данные, полученные при помощи модели Caco-2, указывают на то, что кишечная всасываемость АЗТ может быть в значительно выше, чем ФФЗ. Из этого можно сделать вывод о том, что превращение ФФЗ в АЗТ в полости кишечника могло бы существенно облегчить и в несколько раз ускорить попадание АФИ в системный кровоток, влияя таким образом на клинические свойства препарата.

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТАБОЛИЗМА ФОСФАЗИДА НА МОДЕЛИ ВЫВЕРНУТОГО КИШЕЧНИКА КРЫСЫ

Впервые продемонстрирована возможность превращения ФФЗ в АЗТ при контакте с поверхностью тонкого кишечника. Для этого использована авторская модель вывернутого кишечника крысы в среде фосфатного буферного раствора pH 6,8. Количественный анализ проводили с использованием оригинальной методики ВЭЖХ-УФ. Контроль пригодности аналитических серий осуществляли по показателям линейности (r^2 > 0,99), точности и прецизионности контрольных образцов, селективности. Идентификация АЗТ после инкубирования проводилась при помощи трёхмерного хроматографического УФ-спектра (Рисунок 2).

Для эксперимента использовали растворы с концентрацией ФФЗ 20 мкг/мл и 2 мкг/мл в двух дубликатах каждый. В растворах с концентрацией 2

мкг/мл реакция протекала в полном объёме за 2 часа, в растворах с концентрацией 20 мкг/мл реакция была оценена по степени превращения ФФЗ в АЗТ за временные интервалы менее 1 мин, 120 мин и 300 мин, по выходу реакции и значению RSD между пробами. Соответствующие результаты представлены в Таблице 5.

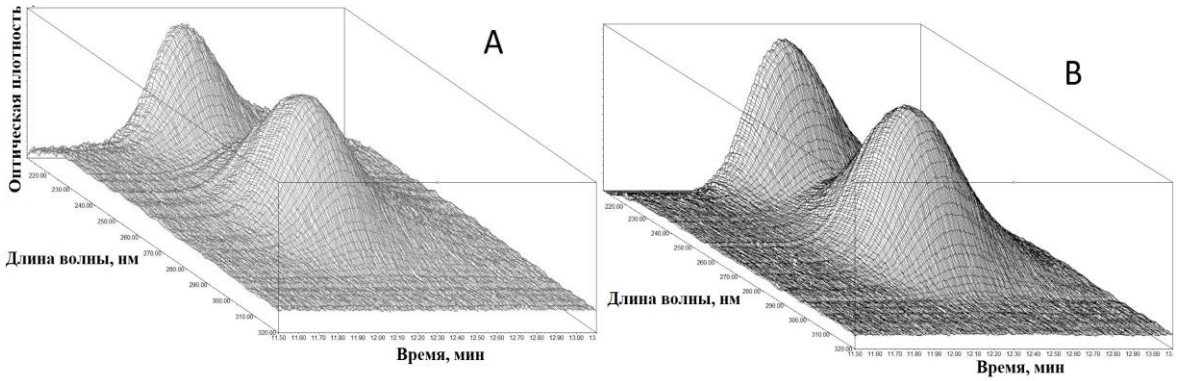

Рисунок 2 - Идентификация АЗТ при помощи трёхмерного хроматографического УФ-спектра (А – испытуемый раствор, В – стандартный раствор АЗТ, ось Y – оптическая плотность, ось X – время в минутах, ось Z – длина волны, нм)

Таблица 5 – Оценка динамики реакции превращения ФФЗ в АЗТ на модели вывернутого кишечника крысы

Время	№ пробы	ФФЗ, мкг/мл	АЗТ, мкг/мл	Деградация, %	Выход, %
Исходный раствор	N/A	18,9	N/A	N/A	N/A
менее 1 мин	1	17,9	0,662	5,29	87,5
	2	17,9	0,696	5,29	92,0
	Среднее	**17,9**	**0,679**	**5,29**	**89,7**
	СО	0,00	0,024	0,00	3,18
	RSD, %	0,00	3,54	0,00	3,54
120 мин	1	10,6	4,77	43,9	76,0
	2	10,2	4,65	46,0	70,6
	Среднее	**10,4**	**4,71**	**45,0**	**73,3**
	СО	0,28	0,085	1,50	3,76
	RSD, %	2,72	1,80	3,33	5,13
300 мин	1	3,84	8,58	79,7	75,3
	2	5,45	8,08	71,2	79,4
	Среднее	**4,65**	**8,33**	**75,4**	**77,3**
	СО	1,14	0,35	6,02	2,90
	RSD, %	24,5	4,24	7,99	3,75

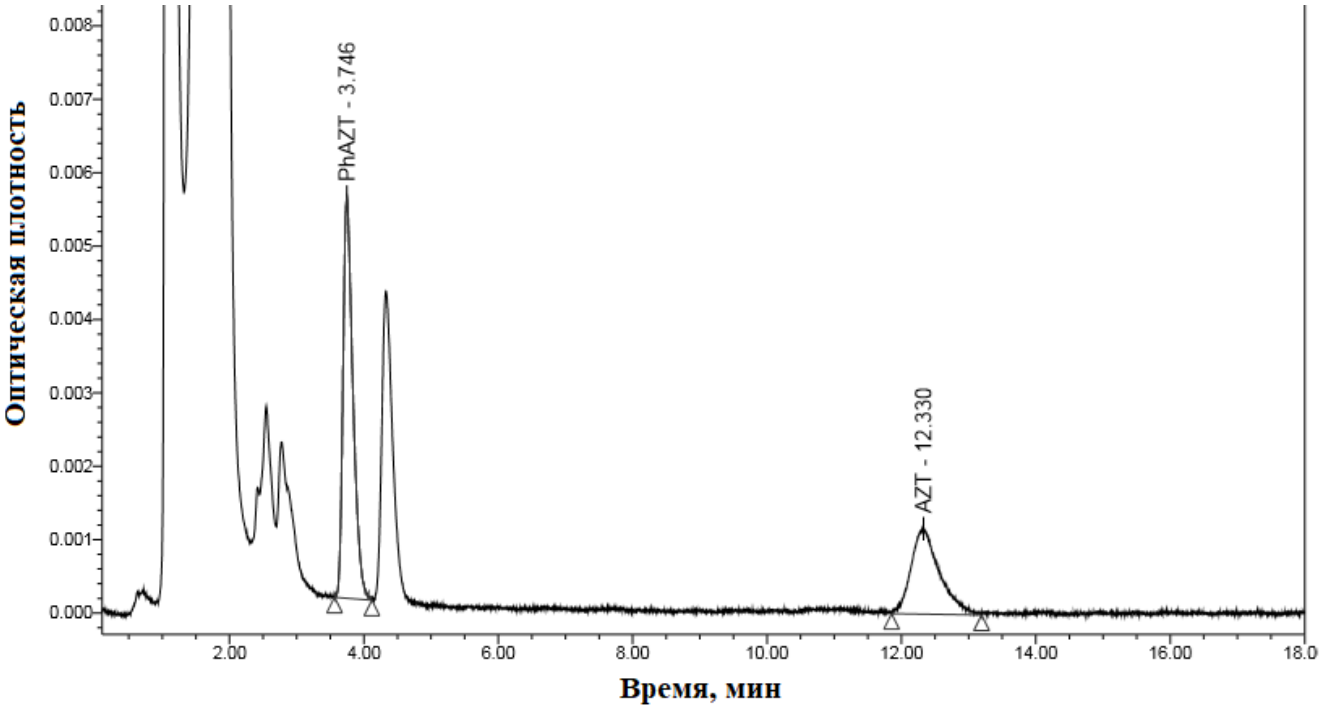

Рисунок 3 – Проба 20 мкг/мл фосфазида после 2 часов инкубации (PhAZT – фосфазид, AZT – зидовудин, ось ординат – оптическая плотность, ось абсцисс – время в минутах)

Пример хроматограммы испытуемого раствора 20 мкг/мл фосфазида после 2 часов инкубации приведён на Рисунке 3.

Также проведён ряд дополнительных исследований с использованием вывернутых кишечников крыс:

1. Описанный эксперимент был повторён для аналога ФФЗ – 6HP, структура молекулы которого содержит отличия в фосфонатной группе (Рисунок 4 иллюстрирует структуры АЗТ, ФФЗ и 6 HP). Пробы с добавлением 6HP после инкубирования с вывернутым кишечником крысы не содержали следов АЗТ, то есть реакция дефосфорилирования для 6HP не происходила, что говорит о структурной специфичности процесса.

2. Установлено, что фермент экто-5’нуклеотидаза напрямую не участвует в кишечном метаболизме ФФЗ (экто-5’-нуклеотидаза, Sigma Merck, cat N1665), он никак не влиял на реакцию в средах буферных растворов pH 9,0, pH 6,8 и при добавлении к системе с вывернутым

крысиным кишечником. Подробное описание данных экспериментов также приводится в соответствующей главе диссертации.

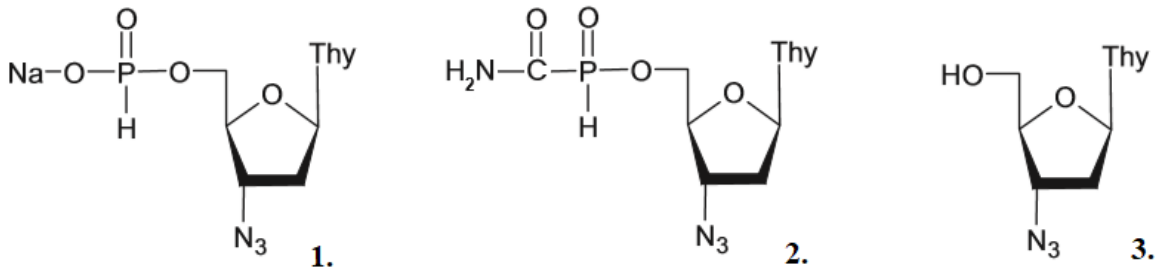

Рисунок 4 – 1 – фосфазид, 2 – АЗТ-аминокарбонилфосфонат (6НР), 3 – АЗТ

ИССЛЕДОВАНИЕ ФАРМАКОКИНЕТИКИ ФОСФАЗИДА НА ЗДОРОВЫХ ДОБРОВОЛЬЦАХ ПРИ ОДНОКРАТНОМ ПЕРОРАЛЬНОМ ПРИЁМЕ

При помощи разработанного и валидированного метода изучена фармакокинетика ФФЗ в плазме крови здоровых добровольцев. Данные получены на клинических образцах плазмы, полученных в ходе исследования по изучению биоэквивалентности при приеме однократной дозы здоровыми добровольцами натощак лекарственных препаратов Фосфаладин®, таблетки, покрытые пленочной оболочкой 150 мг + 400 мг (ООО «АЗТ ФАРМА К.Б.», Россия) и препарат фосфазида Никавир®, таблетки 400 мг (ООО «АЗТ ФАРМА К.Б.», Россия). В исследовании приняли участие 28 добровольцев (12 мужчин и 16 женщин, возраст 18-45 лет, ИМТ 18,5 – 30,0 кг/м^2).

Таблица 6 – Времена достижения в плазме максимальной концентрации АЗТ (T_{max}) и периода полувыведения ($T_{1/2}$) при приёме пероральных препаратов АЗТ (данные из литературы) и ФФЗ

Наименование препарата	T_{max}	$T_{1/2}$, ч
Зидовудин	1,0 ± 0,5	1,25 ± 0,25
Никавир®	2,8 ± 1,7	3,6 ± 1,8
Фосфаладин®	3,4 ± 1,8	3,3 ± 1,5

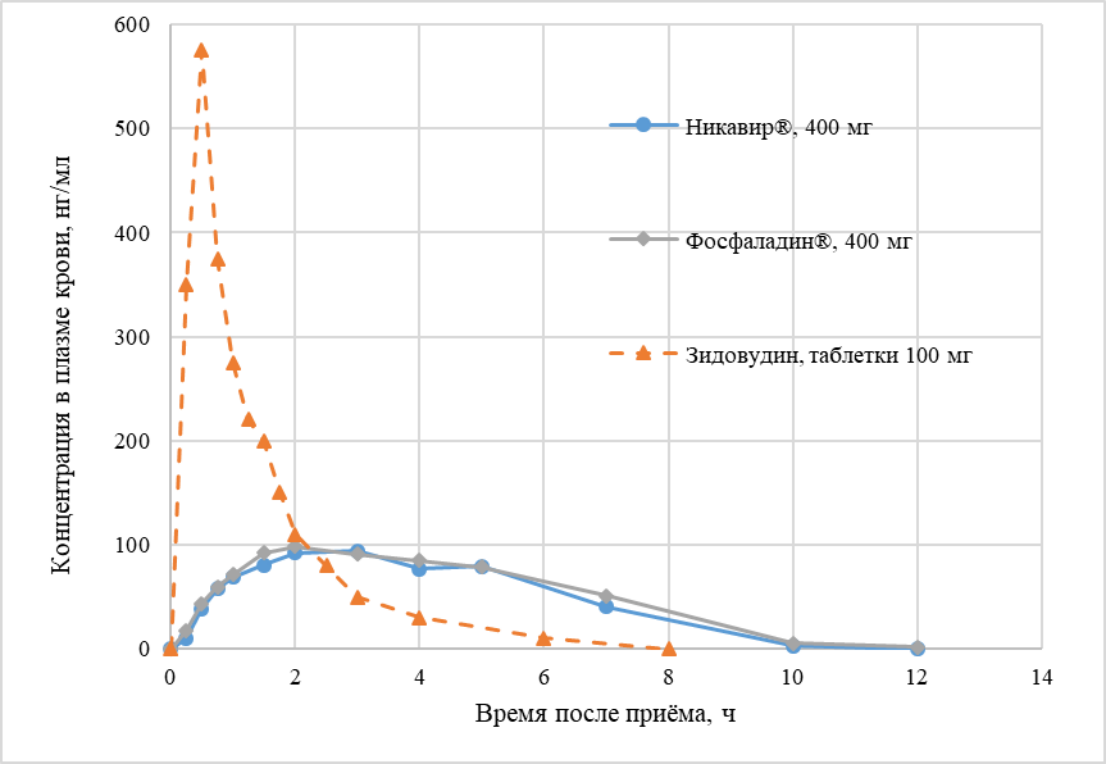

Рисунок 5 – Усреднённые фармакокинетические кривые АЗТ для пероральных препаратов фосфазида Никавир®, таблетки 400 мг, Фосфаладин®, таблетки, покрытые пленочной оболочкой 150 мг + 400 мг, Зидовудин, таблетки 100 мг (данные из литературы)

Для количественного определения ФФЗ и АЗТ в пробах был разработан и валидирован метод ВЭЖХ-МС/МС, аналитический диапазон методики составил для АЗТ 25-1000 нг/мл в плазме крови; для ФФЗ 188-18800 нг/мл (предел обнаружения 94 нг/мл) в плазме крови.

ФФЗ не обнаружен во всех образцах плазмы крови добровольцев, расчет фармакокинетических параметров проводился только по продукту его распада – АЗТ. Полученные фармакокинетические кривые, а также фармакокинетическая кривая перорального препарата АЗТ, взятая из литературы, представлены на Рисунке 5, сравнение фармакокинетических параметров представлено в Таблице 6. Выводы также в целом согласуются с выводами, сделанными при анализе кишечной всасываемости ФФЗ на модели Caco-2: превращение ФФЗ в АЗТ в кишечнике существенно увеличивает скорость абсорбции перорального препарата.

Оценка стабильности образцов плазмы с добавлением ФФЗ при 3-х циклах заморозки-разморозки (разморозка 2 ч, заморозка 12 ч) в присутствии ингибитора гидролаз (фторид натрия) и без него показала: деструкция без добавления фторида натрия составляет около 35-40% для обоих уровней, с добавлением фторида натрия деструкция уменьшается до 10%, соответствующие результаты представлены в Таблице 6. Для количественного определения ФФЗ в пробах для изучения стабильности был разработан и валидирован метод ВЭЖХ-МС/МС с аналитическим диапазоном 5 – 200 нг/мл. Из полученных данных можно заключить, что ФФЗ отсутствовал в системном кровотоке добровольцев на момент отбора крови, а не подвергся деструкции в процессе хранения образца.

Таблица 6 – Стабильность фосфазида при трёхкратной заморозке-разморозке с добавлением и без добавления фторида натрия

Фактическая концентрация нг/мл		В присутствии фторида натрия		Без добавления фторида натрия	
		20	200	20	200
Среднее значение концентрации, нг/мл	Начало периода	20,31± 1,24	201,3 ± 5,8	20,17 ± 0,47	198,2 ± 8,3
	Окончание периода	17,82 ± 0,64	183,9 ± 7,6	12,26 ± 0,97	124,6 ± 4,7
Деструкция		10,90%	8,07%	38,68%	37,69%

ВЫВОДЫ

1. Разработаны методики анализа, с помощью которых продемонстрирована высокая растворимость субстанции фосфазида (более 10 г в 100 мл) в жидкостях ЖКТ, а также стабильность в этих жидкостях (деструкция менее 15% за 24 часа).

2. Разработана методика анализа для модели Caco-2, для фосфазида продемонстрирована низкая кишечная проницаемость (P_{app} = 2,0 x 10^{-6} см/с) и сродство к эффлюкс-транспортёру Pgp (P_{app} $\frac{B \to A}{A \to B}$ более 2), в то время как

аналогичные данные из литературы для АЗТ свидетельствуют о значимо большей кишечной проницаемости последнего (в 3-5 раз).

3. Разработан оригинальный метод для изучения трансформаций веществ в пристеночном пространстве тонкого кишечника *in vitro* – модель вывернутого кишечника крысы. При помощи данной модели впервые был экспериментально зафиксирован процесс превращения ФФЗ в АЗТ при контакте с внутренней поверхностью тонкого кишечника. В аналогичных условиях превращения 6НР в АЗТ не зафиксировано.

4. Разработаны и валидированы аналитические методики, при помощи которых показано, что при однократном пероральном приёме здоровыми добровольцами ФФЗ может быть обнаружен в системном кровотоке только в виде его метаболита АЗТ на заданном уровне чувствительности использованного аналитического метода. Динамика поступления ФФЗ в системный кровоток в виде АЗТ может быть охарактеризована следующими фармакокинетическими параметрами: C_{max} около 100 нг/мл, T_{max} = 2,8 ± 1,7 ч, $T_{1/2}$ = 3,6 ± 1,8 ч (400 мг, таблетки), что свидетельствует о существенно меньшей интенсивности абсорбции по сравнению с опубликованными аналогичными данными для пероральных препаратов собственно АЗТ.

5. Таким образом, превращение ФФЗ в АЗТ в ЖКТ способно значительно увеличить скорость абсорбции активной молекулы. Физико-химические факторы жидкостей ЖКТ не являются причиной превращения фосфазида в азидотимидин до начала абсорбции. Активное превращение фосфазида в азидотимидин в кишечнике, по-видимому, определяет скорость абсорбции активного вещества в кровь.

Практические рекомендации. Приведённые в настоящей работе данные указывают на целесообразность использования клеточной культуры Caco-2 для изучения кишечной абсорбции фосфазида и его структурных аналогов. Новая методика оценки кишечного метаболизма на модели вывернутого кишечника крысы может быть полезна на стадиях поиска и

разработки лекарственной молекулы или в изучении уже известных лекарственных средств и ксенобиотиков.

Результаты данных исследований могут быть использованы в досье на препарат фосфазид при регистрации по правилам ЕАЭС.

Перспективы дальнейшей разработки темы. Дальнейшие исследования могут быть направлены на изучение факторов, влияющих на кишечную абсорбцию и биотрансформацию других аналогов нуклеозидов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Современные подходы к проведению сравнительного теста кинетики растворения (обзор) / Д. Ю. Гребенкин, Я. М. Станишевский, И. Е. Шохин // **Разработка и регистрация лекарственных средств.** – 2016. – №.1 (14). – С. 166-171.

2. Brief Review of the FDA Dissolution Methods Database / I. E. Shohin, **D. Yu. Grebenkin**, E. A. Malashenko, Ya. M. Stanishevskii, and G. V. Ramenskaya // **Dissolution Technologies.** – 2016. – V. 23. – № 3. – P. 6-9; dx.doi.org/10.14227/DT230316P6.

3. Анализ базы данных FDA по изучению сравнительной кинетики растворения лекарственных препаратов (обзор) / **Д. Ю. Гребенкин**, Я. М. Станишевский, И. Е. Шохин // Конкурс проектов молодых ученых: тезисы докладов. РХТУ им. Д.И. Менделеева 2016. – 2016 – С. 68 – 69.

4. Ретроспектива развития науки о растворении твёрдых дозированных лекарственных форм (обзор) / **Гребёнкин Д. Ю.** [и др.] // **Разработка и регистрация лекарственных средств.** – 2016. – №. 4 (17). – С. 158-166.

5. Исследование кишечной проницаемости и Pgp-транспорта фосфазида с применением модели Caco-2 / **Д. Ю. Гребенкин** [и др.] // **Разработка и регистрация лекарственных средств.** – 2017. – №.4 (21). – С. 238-242.

6. Shohin I.E. Russia, Belarus & Kazakhstan / I. E. Shohin, D. A. Rozhdestvenskiy, V. Yu. Medvedev, T. N. Komarov, **D. Yu. Grebenkin** // Kanfer I. (ed.) Bioequivalence Requirements in Various Global Jurisdictions. – Springer. – 2017. – P. 199-297.

7. Изучение метаболизма фосфазида на модели вывернутого кишечника крысы / **Д. Ю. Гребенкин** [и др.] // **Биофармацевтический журнал.** – 2019. – № 2 (11). – С. 3-7.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АЗТ – азидотимидин (зидовудин)

АРВТ – антиретровирусная терапия

АФИ – активный фармацевтический ингредиент

БД – биодоступность

БКС – биофармацевтическая классификационная система

ВИЧ – вирус иммунодефицита человека

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ВЭЖХ-МС/МС - высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемным масс-спектрометрическим детектированием

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

ИМТ – индекс массы тела

НИОТ – нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы

ПО – программное обеспечение

ФФЗ – фосфазид, АЗТ-фосфонат натрия

6НР – АЗТ-5’-аминокарбонилфосфонат аммония

SD – стандартное отклонение

RSD – относительное стандартное отклонение