

Исследование фармакокинетики оригинального лекарственного средства для лечения ВИЧ-1 инфекции

В.М. Косман¹, Д.В. Демченко¹, Е.А. Джайн (Корсакова)²,
В.Г. Макаров³, В.Ю. Балабаньян²

¹Санкт-Петербургский институт фармации, Российская Федерация, 188663, Ленинградская обл., Всеволожский р-н, г.п. Кузьмоловский, Заводская ул., д. 3, к. 245;

²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Российская Федерация, 119991, Москва, Ломоносовский проспект, д. 27, корп. 1;

³Научно производственное объединение «Дом Фармации», Российская Федерация, 188663, Ленинградская обл., Всеволожский р-н, г.п. Кузьмоловский, Заводская ул., д. 3, к. 245

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Косман Вера Михайловна – руководитель группы химико-аналитических исследований, старший научный сотрудник Санкт-Петербургского института фармации (СПБИФ), кандидат фармацевтических наук. Тел.: +7 (921) 740-49-24. E-mail: kosman.vm@doclinika.ru. ORCID: 0000-0001-9690-1935

Демченко Дмитрий Валентинович – руководитель группы готовых лекарственных средств, старший научный сотрудник, СПБИФ, кандидат фармацевтических наук. Тел.: +7 (812) 603-74-28. E-mail: demchenko.dv@doclinika.ru. ORCID: 0000-0003-3856-3936

Джайн (Корсакова) Екатерина Александровна – аспирант кафедры фармацевтической химии, фармакогнозии и организации фармацевтического дела факультета фундаментальной медицины Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова (МГУ). Тел.: +7 (916) 910-17-12. E-mail: ekaterina.korsa@gmail.com. ORCID: 0000-0003-0283-8598

Макаров Валерий Геннадиевич – заместитель директора «Научно производственного объединения «ДОМ ФАРМАЦИИ», доктор медицинских наук, профессор. Тел.: +7 (911) 934-14-35. E-mail: makarov.vg@doclinika.ru. ORCID: 0000-0002-2447-7888

Балабаньян Вадим Юрьевич – доцент кафедры фармацевтической технологии факультета фундаментальной медицины МГУ, доктор фармацевтических наук. Тел.: +7 (916) 293-54-85. E-mail: bal.pharm@mail.ru. ORCID: 0000-0002-5744-7060

РЕЗЮМЕ

Введение. Для лечения ВИЧ-1 инфекций предложен оригинальный лекарственный препарат 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил в виде таблеток. Необходимым этапом доклинического исследования оригинального лекарственного препарата является изучение его фармакокинетики.

Цель исследования: оценка фармакокинетики на двух видах животных лекарственного средства на основе пиримидинового производного бензофенона, предназначенного для лечения ВИЧ-1 инфекции.

Материал и методы. Исследование проводили на половозрелых самцах крыс и кроликов при однократном внутривенном (для крыс) и пероральном (для кроликов) введении препарата в трех дозах, многократном введении крысам в двух дозах. Концентрации 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила в плазме крови, тканях и органах, а также экскретах определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с ультрафиолетовым (УФ) детектированием. Фармакокинетические параметры рассчитывали внемодельным методом статистических моментов.

Результаты. Разработанная нами ранее методика количественного определения 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила в плазме крови кроликов адаптирована для анализа плазмы крови и тканей и органов (на примере печени) крыс. Установлено, что фармакокинетика исследуемого препарата не являлась линейной в диапазоне доз 20–100 мг/кг – для крыс и 10–50 мг/кг – для кроликов. Время достижения максимальной концентрации (T_{max}) составило около 5–6 ч, среднее время удержания (MRT) составило около 30–50 ч для крыс и около 16–17 ч для кроликов, период полувыведения ($T_{1/2}$) составил около 31–36 ч для крыс и около 11–13 ч – для кроликов. При сопоставлении данных, полученных для двух биологических видов (крысы и кролики), отмечены более высокие уровни значений ряда фармакокинетических параметров (C_{max} и AUC_{0-48} , MRT и $T_{1/2}$) для крыс, что могло свидетельствовать о наличии видоспецифичности фармакокинетики исследуемого препарата. Многократное введение препарата крысам в течение 3 дней в дозах 60 и 100 мг/кг не привело к кумуляции действующего вещества.

Действующее вещество распределялось в сильно васкуляризованные органы, отвечающие за выведение – печень и почки. Поступление 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила в сердце и селезенку, а также способность анализируемого соединения проникать через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) и поступать в мозг не установлены. С калом вывелось около 9% действующего вещества в неизменном виде; в моче анализ не обнаружен.

Заключение. Изучены параметры фармакокинетики оригинального лекарственного средства на животных двух видов. Методики валидированы в соответствии с современными требованиями.

Ключевые слова: 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил, таблетки, пероральное введение, фармакокинетика, распределение, выведение, кролики, крысы, плазма, ткани и органы, экскреты, ВЭЖХ-УФ.

Для цитирования: Косман В.М., Демченко Д.В., Джайн (Корсакова) Е.А., Макаров В.Г., Балабаньян В.Ю. Исследование фармакокинетики оригинального лекарственного средства для лечения ВИЧ-1 инфекции. Фармация, 2021; 70 (4): 48–56. <https://doi.org/10.29296/25419218-2021-04-08>

INVESTIGATION OF THE PHARMACOKINETICS OF AN ORIGINAL DRUG FOR THE TREATMENT OF HIV-1 INFECTION

V.M. Kosman¹; D.V. Demchenko¹, E.A. Jain (Korsakova)², V.G. Makarov³; V.Yu. Balabaniyan²¹Saint Petersburg Institute of Pharmacy, 3, Zavodskaya St., Build. 245, Kuzmolovsky Urban-Type Community, Vsevolzhsky District, Leningrad Region 188663, Russian Federation;²M.V. Lomonosov Moscow State University, 27, Lomonosovsky Prospect, Build. 1, Moscow 119991, Russian Federation;³PHARMACY HOUSE Research and Production Association, 3, Zavodskaya St., Build. 245, Kuzmolovsky Urban-Type Community, Vsevolzhsky District, Leningrad Region 188663, Russian Federation

INFORMATION ABOUT AUTHORS

Kosman Vera Mikhaylovna – Head of chemical-analytical research group, senior researcher of the Sankt-Petersburg Institute of Pharmacy (SPbIPf), PhD. Tel.: +7 (921) 740-49-24. E-mail: kosman.vm@doclinika.ru. ORCID: 0000-0001-9690-1935**Demchenko Dmitry Valentinovich** – Head of formulation technology, senior researcher of the SPbIPf, PhD. Tel.: +7 (812) 603-74-28. E-mail: demchenko.dv@doclinika.ru. ORCID: 0000-0003-3856-3936**Jain (Korsakova) Ekaterina Aleksandrovna** – Post-graduate student of the department of pharmaceutical chemistry, pharmacognosy and organization of pharmaceutical business of the Faculty of Medicine of the Lomonosov Moscow State University (MSU). Tel.: +7 (916) 910-17-12. E-mail: ekaterina.korsa@gmail.com. ORCID: 0000-0003-0283-8598**Makarov Valeriy Gennadievich** – Depute of director of the "RMC "HOME OF PHARMACY", Doctor of Medical Sciences, Professor. Tel.: +7 (911) 934-14-35. E-mail: makarov.vg@doclinika.ru. ORCID: 0000-0002-2447-7888**Balaban'yan Vadim Yur'evich** – Associate professor of the Department of pharmaceutical technology of the Faculty of Medicine of the MSU, Doctor of Pharmaceutical Sciences. Tel.: +7 (916) 293-54-85. E-mail: bal.pharm@mail.ru. ORCID: 0000-0002-5744-7060

SUMMARY

Introduction. HIV-1 infections have been proposed to be treated with the original drug 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil as tablets. The necessary stage of preclinical trials of the original drug is to investigate its pharmacokinetics.**Objective:** to evaluate the pharmacokinetics of the drug based on the benzophenone derivative of pyrimidine for the treatment of HIV-1 infection in two animal species.**Material and methods.** The investigation was conducted with sexually mature male rats and rabbits after single intragastric administration (in rats), oral administration as three doses (in rabbits), and multiple administration as two doses to the rats. The concentrations of 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil in plasma, tissues, organs, and feces were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled with ultraviolet (UV) detection. The pharmacokinetic parameters were calculated by the extramodel method of statistical moments.**Results.** The authors' previously developed procedure for the quantitative determination of 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil in rabbit plasma is adapted for the analysis of rat plasma, tissues and organs (for example, the liver). It was found that the pharmacokinetics of the test drug was nonlinear in the dose range of 20–100 mg/kg for rats and 10–50 mg/kg for rabbits. The time to maximum concentration (T_{max}) was about 5–6 h; the mean retention time (MRT) was about 30–50 h for rats and about 16–17 h for rabbits; the half-life ($T_{1/2}$) was about 31–36 h for rats and about 11–13 h for rabbits. Comparison of the data obtained for two biological species (rats and rabbits) revealed the higher values of a number of pharmacokinetic parameters (C_{max} and AUC_{0-48} , MRT and $T_{1/2}$) for rats, which could indicate the species-specific pharmacokinetics of the test drug. Repeated administration of the drug at the doses of 60 and 100 mg/kg to the rats for 3 days did not result in the accumulation of an active ingredient.

The active ingredient was distributed to the highly vascularized organs responsible for excretion, such as the liver and kidneys. The supply of 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil to the heart and spleen, as well as the ability of the analyzed compound to penetrate the blood-brain barrier and to enter the brain have not been established. About 9% of the active ingredient was excreted unchanged in the feces; no analyte was detected in the urine.

Conclusion. Pharmacokinetic parameters of original drug were evaluated. The procedures are validated in accordance with the present-day requirements.**Key words:** 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil, tablets, oral administration, pharmacokinetics, distribution, excretion, rabbits, rats, plasma, tissues and organs, excreta, HPLC-UV.**For reference:** Kosman V.M., Demchenko D.V., Jain (Korsakova) E.A., Makarov V.G., Balabaniyan V.Yu. Investigation of the pharmacokinetics of an original drug for the treatment of HIV-1 infection. Farmatsiya, 2021; 70 (4): 48–56. <https://doi.org/10.29296/25419218-2021-04-08>

Введение

Лекарственный препарат в готовой лекарственной форме (ГЛФ) таблетки [1–3] на основе 1-[2-(2-бензоилфенокс)этил]-6-метилурацила – оригинальной субстанции синтетического пиримидинового производного бензофенона [4, 5], предложен для лечения ВИЧ-1 инфекций.

Изучение фармакокинетики, включающее оценку кинетики всасывания, распределения и элиминации фармакологических средств в организме, является необходимой частью доклинических исследований оригинального лекарственного препарата, необходимых для его регистрации и регламентируется требованиями нормативных документов [6].

Целью настоящего исследования являлась оценка фармакокинетики лекарственного сред-

ства на основе 1-[2-(2-бензоилфенокс)этил]-6-метилурацила – пиримидинового производного бензофенона, предназначенного для лечения ВИЧ-1 инфекции, на двух видах животных (крысы и кролики).

Материал и методы

Объектом исследования служила ГЛФ 1-[2-(2-бензоилфенокс)этил]-6-метилурацил, 50 мг, таблетки, наработанные в АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ» (Россия) по оригинальной технологии [1, 2].

Исследование фармакокинетики (эксперименты *in vivo*) проводили на самцах кроликов, полученных от КФХ Нера (Санкт-Петербург, Россия), и самцах крыс (АО «НПО «Дом Фармации», Россия). Эксперименты выполнены согласно методи-

ческим руководствам [6, 7] и нормативным документам (ГОСТ 33044-2014 «Правила лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ»; Директива 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского Союза от 22.09.2010 по охране животных, используемых в научных целях и др.), регулирующим проведение доклинических исследований с использованием лабораторных животных, и одобрены на заседании биоэтической комиссии (№1.9/19).

Препарат (таблетки) вводили крысам однократно внутривентрикулярно (с помощью зонда для внутривентрикулярного введения) в дозах 20, 60 и 100 мг/кг и многократно в дозах 60 и 100 мг/кг (1 раз в день в течение 3 дней), кроликам – однократно перорально в дозах 10, 30 и 50 мг/кг в виде суспензии в инертном носителе – 1% растворе крахмала. Объем для введения крысам составил 0,5 мл на 100 г массы тела при концентрации суспензии 4, 12 и 20 мг/мл для доз 20 мг/кг, 60 и 100 мг/кг соответственно. Объем для введения кроликам составил 1 мл на 1000 г массы тела при концентрации суспензий 10, 30 и 50 мг/мл для доз 10, 30 и 50 мг/кг соответственно. Объем введения корректировали в соответствии с данными массы тела, полученными непосредственно перед началом исследования. Распределение животных по экспериментальным группам выполнено методом модифицированной блочной рандомизации [8].

Образцы крови крыс и кроликов отбирали через 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 24, 32 и 48 ч после введения, в качестве антикоагулянта использовали гепарин. Образцы центрифугировали для получения плазмы крови (15 мин, 3000 об/мин), полученную плазму замораживали и хранили при -20°C . Перед началом количественного определения образцы размораживали.

Для оценки распределения в органы и ткани, а также распределения и выведения у крыс, получавших препарат однократно в дозе 100 мг/кг, осуществляли также отбор 5 органов и тканей (печень, почки, мозг, селезенка, сердце) на 10 временных точках (одновременно с отбором крови, манипуляция сопровождалась эвтаназией животных) и 2 видов экскретов (моча и кал, на 9 временных интервалах, отбор осуществляли с помощью метаболических клеток). Полученные образцы органов, тканей, кала помещали в грипперы, взвешивали и замораживали. У образцов мочи измеряли объем, образцы замораживали. Перед анализом пробы размораживали.

Для определения концентрации 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила разрабо-

танная и валидированная нами ранее методика анализа действующего вещества препарата в плазме крови кроликов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с УФ-детектированием [3] была адаптирована для анализа плазмы крови и тканей и органов (на примере печени) крыс.

Для определения аналита в биологических жидкостях (плазме крови крыс и кроликов, моче) 0,2 мл плазмы крови обрабатывали 0,6 мл ацетонитрила для осаждения белков, после центрифугирования (при 3000 об/мин 15 мин), надосадочную жидкость отделяли, растворитель удаляли; к сухому остатку прибавляли 0,2 мл метанола для растворения аналита и дозировали в ВЭЖХ-систему.

Для анализа тканей и органов размороженные органы, ткани и твердые экскреты (печень, почки, мозг, селезенку, сердце, кал) взвешивали, помещали в пластиковую пробирку, прибавляли воду очищенную в соотношении масса/объем 1:1 и гомогенизировали с помощью измельчителя тканей. К 0,4 мл полученного гомогената прибавляли 1,2 мл ацетонитрила для осаждения белков. Затем пробы центрифугировали и проводили процедуру замены растворителя аналогично обработке проб плазмы крови. Для ряда проб, полученных из гомогенатов кала, для обеспечения попадания измеряемых значений концентраций 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила в линейный диапазон методики потребовалось дополнительное разведение перед ВЭЖХ-анализом (в 20 и 200 раз), разбавление в дальнейшем учтено при расчете содержания аналита.

Анализ выполняли на хроматографе высокого давления LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония) с диодно-матричным детектором и колонкой Luna C18 (2) 4,6×150 мм (размер частиц сорбента 5 мкм) и предколонкой (3 мм) заполненной тем же сорбентом (Phenomenex, США) в изократическом режиме элюирования смесью 0,03% раствора трифторуксусной кислоты (ТФУ) и ацетонитрила в соотношении 60:40, скорость подачи элюента 1 мл/мин, дозируемый объем проб 20 мкл, длина волны детектирования 254 нм. Регистрация и обработка хроматограмм выполнена с помощью программного обеспечения LabSolutions LCSolution Version 1.25 (Shimadzu, Япония).

Статистическая обработка результатов выполнена с помощью программного обеспечения Microsoft Office Excel 2007 и Statistica 10.0 (Statsoft, США). Параметры фармакокинетики рассчитаны внемоделльным методом статистических моментов [9, 10] с использованием приложения PKSolver

для Microsoft Office Excel; рассчитаны средние арифметические значения (\bar{X}), соответствующие им стандартные отклонения (SD), стандартные ошибки среднего значения ($S\bar{x}$).

Результаты и обсуждение

1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил предложен в качестве субстанции для получения ГЛФ в виде таблеток для лечения ВИЧ-инфекции [2]. Для стандартизации фармацевтической субстанции и ГЛФ, содержащей 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил, а также для определения целевого соединения в плазме крови кроликов предложено использовать метод ВЭЖХ с УФ-детектированием [3, 11].

При адаптации методики определения 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила в плазме крови к анализу плазмы крыс не потребовалось внесения каких-либо существенных изменений по сравнению с процедурой, предусмотренной для анализа плазмы крови кроликов. Адаптация и ревалидация методики определения 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила в тканях и органах крыс выполнена на примере печени. Из видов биоматериала, выбранных для проведения фармакокинетических испытаний, печень является органом с наибольшей массой, возможно получение биологического материала от интактных животных в количестве, достаточном для выполнения всего комплекса валидационных испытаний. При разработке методики определения 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила в печени крыс изменения по сравнению с анализом плазмы касались процедуры подготовки проб биологического материала. Для тканей лабораторных животных в пробо-

подготовке необходима дополнительная предварительная стадия – гомогенизации в присутствии воды очищенной.

Методики определения 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила в биоматериале крыс валидированы надлежащим образом в соответствии с рекомендациями [12–15]. Основные валидационные параметры методик приведены в табл. 1. По всем показателям получены удовлетворительные результаты.

Разработанные и валидированные методики были применены для анализа биопроб, полученных при выполнении биологического экспе-

Таблица 1

Валидационные параметры методик определения 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила в биоматериале крыс и кроликов

Table 1

Validation parameters of procedures for the determination of 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil in the biomaterials of rats and rabbits

Параметр	Значение		
	Плазма крови крыс	Ткани и органы крыс (на примере печени)	Регламентируемые значения [12–15]
Калибровочный диапазон, нг/мл	100–3500	40–15000	Нет
Уравнение регрессии	$Y=66,593 \cdot X-475$	$Y=65,003 \cdot X-896$	Нет
Коэффициент корреляции (r)	0,9998	0,9996	0,9–0,99
НПКО, мкг/мл	100	40	Не регламентируется
Точность, %			
ВПКО	0,8	4,4	≤15% для ВПКО, среднего низкого КК, ≤20 % для НПКО
Средний КК	0,4	9,7	
Низкий КК	3,2	4,3	
НПКО	18,1	3,6	
Прецизионность, %			
ВПКО	1,4	0,8	≤15% для ВПКО, среднего низкого КК, ≤20 % для НПКО
Средний КК	1,6	3,1	
Низкий КК	1,1	5,1	
НПКО	2,5	13,1	

Примечание: Y – площадь пика 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила, усл. ед.; X – концентрация 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила, нг/мл%; ВПКО – верхний предел количественного определения; КК – контроль качества; НПКО – нижний предел количественного определения (для плазмы крови крыс – соответственно 3500, 1500, 200 и 100 нг/мл, для печени крыс – соответственно 15 000, 8000, 90 и 40 нг/г).
Note. * Y – the peak area of 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil, standard units; X – the concentration of 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil, ng/ml%; ** ULQ – the upper limit of quantification; medium quality control (QC), and low QC; LLQ – the lower limit of quantification; 3500, 1500, 200 and 100 ng/ml for rat plasma; 15000, 8000, 90 and 40 ng/g for the rat liver.

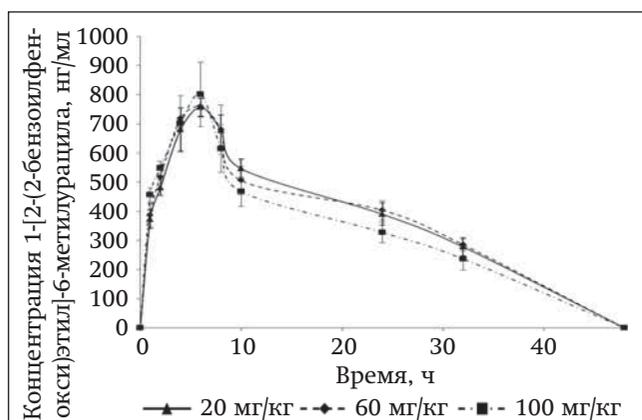


Рис. 1. Кривые «концентрация-время» 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила в плазме крови крыс после однократного внутривидового введения исследуемого препарата в 3 дозах (n=5; $\bar{X} \pm S\bar{X}$)
Fig. 1. Rat plasma concentration-time curves of 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil after single intragastric administration of the test drug at three doses (n=5; $\bar{X} \pm S\bar{X}$)

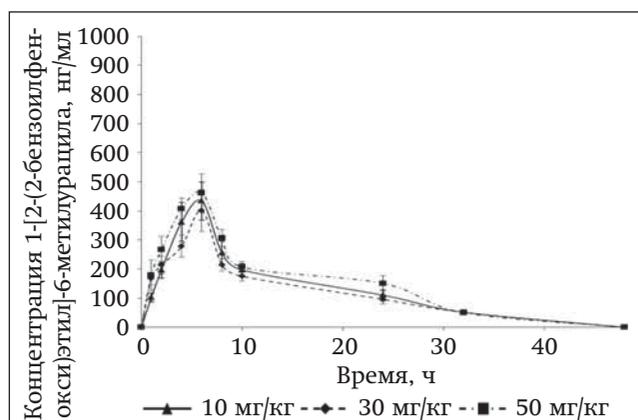


Рис. 2. Кривые «концентрация-время» 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила в плазме крови кроликов после однократного перорального введения исследуемого препарата в трех дозах (n=6; $\bar{X} \pm S\bar{X}$)
Fig. 2. Rabbit plasma concentration-time curves of 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil after single intragastric administration of the test drug at three doses (n=6; $\bar{X} \pm S\bar{X}$)

римента. Проведенное исследование охватывало все основные аспекты, необходимые для характеристики оригинального лекарственного препарата [6, 16]. Оценку абсолютной биодоступности сочли нецелесообразной, поскольку субстанция 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил является труднорастворимой, она практически нерас-

творима в воде [2] и для получения раствора для внутривенного введения необходимо отдельное исследование по фармацевтической разработке.

Концентрация 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила в плазме крови после перорального введения исследуемого препарата крысам и кроликам нарастала (рис. 1, 2), что свидетельствовало

о поступлении действующего вещества в кровь. Для исследуемого препарата в трех дозах (20, 60 и 100 мг/кг для крыс и 10, 20 и 30 мг/кг для кроликов) наблюдали схожие формы фармакокинетических кривых. Максимальную концентрацию действующего вещества в плазме крови при введении препарата крысам наблюдали через 4–8 ч (рис. 1), кроликам – через 4–6 ч (рис. 2). Через 48 ч эксперимента аналит в биопробах не обнаружен. Фармакокинетические параметры исследуемого препарата после введения крысам и кроликам представлены в табл. 2.

Значения максимальной концентрации (C_{max}) в плазме крови, рассчитанные как среднее значение наибольших измеренных значений,

Фармакокинетические параметры ГЛФ 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила в плазме крови крыс и кроликов

Pharmacokinetic parameters of the ready dosage form of 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil in the plasma of rats and rabbits

Доза, мг/кг	Параметр ($\bar{X} \pm S\bar{X}$), n=5 для крыс n=6 для кроликов)				
	C_{max} , нг/мл	T_{max} , ч	AUC_{0-48} , ч·нг/мл	MRT, ч	$T_{1/2}$, ч
<i>Крысы, внутривидово, однократно</i>					
20	793±34	5,60±0,75	15 098±845	31,4±2,6	21,1±1,8
60	806±36	5,60±0,75	15114±827	51,8±15,9	26,6±11,9
100	902±110	6,00±0,89	13816±865	30,6±3,5	21,4±2,5
<i>Крысы, внутривидово, многократно</i>					
60	744±36	5,60±0,40	11102±918	21,5±1,3	14,9±2,0
100	930±114	4,80±0,49	14394±1139	41,2±12,1	29,5±8,2
<i>Кролики, перорально, однократно</i>					
10	441±62	5,33±0,42	5504±526	17,6±1,5	12,7±1,4
20	425±63	5,33±0,42	4945±415	17,7±1,8	12,5±1,5
30	499±53	5,00±0,45	6456±630	16,0±0,5	11,0±0,7

в зависимости от дозы вводимого препарата не имели статистически значимых отличий. Основной параметр, характеризующий степень биологической доступности препарата, AUC_{0-48} , также не имел статистически значимых отличий между значениями, полученными для трех исследованных доз. Для двух исследованных биологических видов (крыс и кроликов) не наблюдали линейного увеличения значений AUC_{0-48} .

Гипотезу линейности принимают, если свободный член уравнения линейной регрессии площади под фармакокинетической кривой незначимо отличается от нуля [6]. Для проверки гипотез линейности был проведен регрессионный анализ, в результате которого установлено, что уравнения линейной регрессии не являлись значимым ($p > 0,05$), свободный член уравнений незначимо отличался от нуля (абсолютное значение критерия t составило 1,10 – для крыс и 1,15 – для кроликов при критическом значении двустороннего t -критерия Стьюдента – 4,30). Полученные результаты не позволили принять гипотезу линейности для изучаемых доз препарата. Отметим, что нелинейность фармакокинетики при введении крысам установлена ранее для эфавиренза – препарата близкой фармакологической группы (ненуклеозидного ингибитора обратной транскриптазы I поколения) [17].

Время достижения максимальной концентрации (T_{max}) составило около 5–6 ч, среднее время удержания (MRT) составило около 30–50 ч – для крыс и около 16–17 ч – для кроликов, период полувыведения ($T_{1/2}$) составил около 31–36 ч – для крыс и около 11–13 ч – для кроликов. При сопоставлении данных, полученных для двух биологи-

ческих видов (крысы и кролики) отмечены более высокие уровни значений ряда фармакокинетических параметров (C_{max} и AUC_{0-48} , MRT и $T_{1/2}$) для крыс, что могло свидетельствовать о наличии видоспецифичности фармакокинетики исследуемого препарата. Полученные значения параметра T_{max} близки к данным для известных препаратов группы ненуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы, как I (невирапин, эфавиренз [18–21]), так и II (этравирин [20–22]) поколений. Значения параметра $T_{1/2}$ также согласуются с литературными данными, поскольку для препаратов этой фармакологической группы характерны достаточно высокие значения $T_{1/2} > 20-50$ ч [19–22].

Основной целью фармакокинетического исследования при многократном введении препарата является выяснение его способности накапливаться в организме. Поскольку в эксперименте при однократном введении препарата не была установлена линейность фармакокинетики, при многократном введении использовали два уровня доз – 60 и 100 мг/кг. Для исследуемого препарата в двух дозах (60 и 100 мг/кг) после однократного и многократного введения наблюдали схожую форму фармакокинетических кривых. Максимальную концентрацию действующего вещества в плазме крови при введении препарата наблюдали через 4–8 ч (рис. 3).

Значения параметров C_{max} , AUC_{0-48} , $AUC_{0-\infty}$, T_{max} , MRT и $T_{1/2}$ после многократного введения препарата близки к значениям после однократного введения (табл. 2), статистически значимых различий после однократного и многократного введения препарата для большинства параметров не выявлено (отмечено снижение значений параме-

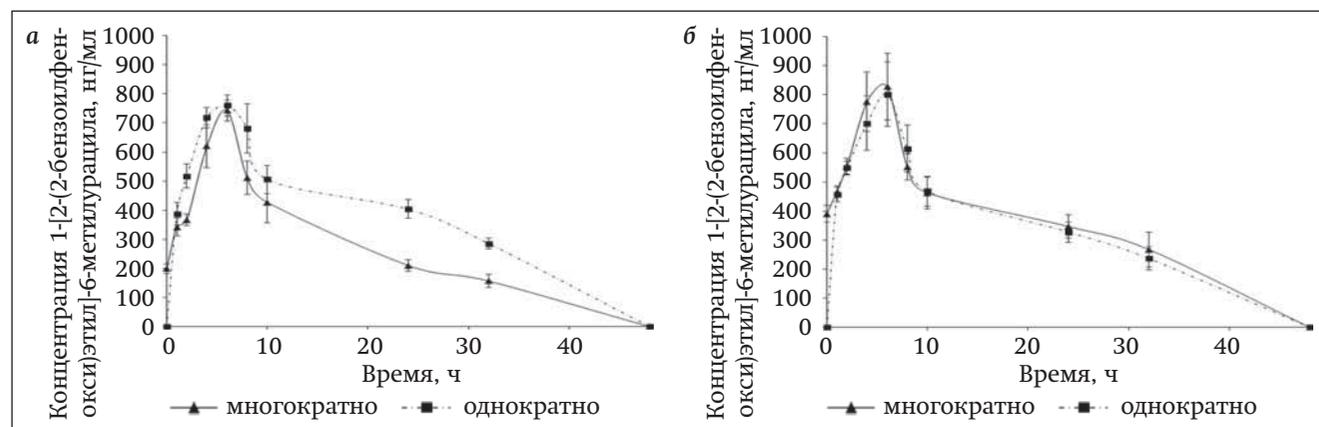


Рис. 3. Кривые «концентрация-время» 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила в плазме крови крыс после однократного и многократного внутрижелудочного введения исследуемого препарата в дозах 60 мг/кг (а) и 100 мг/кг (б) ($n=5$, $\bar{X} \pm S\bar{x}$)

Fig. 3. Rat plasma concentration-time curves of 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil after single and multiple intragastric administrations of the test drug at the doses of 60 mg/kg (a) and 100 mg/kg (b) ($n=5$, $\bar{X} \pm S\bar{x}$)

тров AUC_{0-48} , $AUC_{0-\infty}$ для дозы 60 мг/кг после многократного введения, которое может быть связано

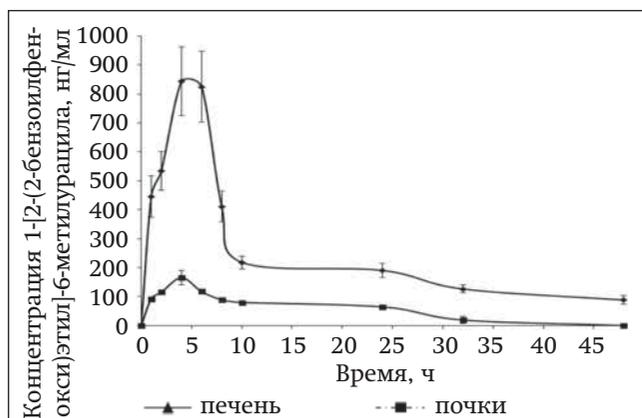


Рис. 4. Кривые «концентрация-время» 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила в печени (а) и почках (б) крыс после однократного внутрижелудочного введения исследуемого препарата в дозе 100 мг/кг (n=5, $\bar{X} \pm S\bar{X}$)

Fig. 4. Concentration-time curves of 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil in the rat liver (a) and kidneys (b) after single intragastric administration of the test drug at the dose of 100 mg/kg (n=5, $\bar{X} \pm S\bar{X}$)

Таблица 3

Основные показатели проникновения 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила в печень и почки крыс после однократного внутрижелудочного введения исследуемого препарата в дозе 100 мг/кг

Table 3

The main indicators for penetration of 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil into the rat liver and kidneys after single intragastric administration of the test drug at a dose of 100 mg/kg

Орган	AUC_{0-48} , нг·ч/г	MRT_T , ч	$T_{1/2T}$, ч
Печень	11 466±599	47,4±19,3	36,2±15,7
Почки	2290±213	57,0±15,7	41,0±11,6

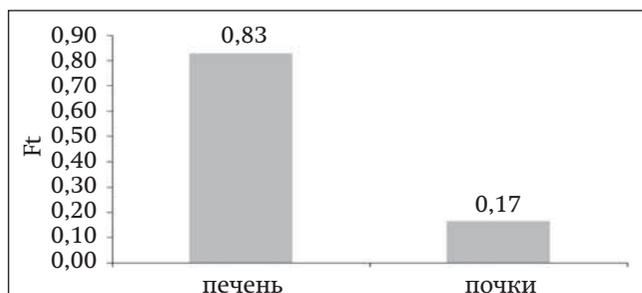


Рис. 5. Тканевая доступность (ft) 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила после однократного внутрижелудочного введения исследуемого препарата в дозе 100 мг/кг

Fig. 5. Tissue availability (ft) of 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil after single intragastric administration of the test drug at a dose of 100 mg/kg

с индивидуальными особенностями животных). Полученные данные позволили предположить отсутствие кумуляции действующего вещества после внутрижелудочного введения препарата.

Важным этапом при проведении фармакокинетических исследований является изучение тканевой доступности лекарственных средств. Основным результатом процессов распределения является транспорт лекарственного средства в зону действия, где оно взаимодействует со структурами, определяющими эффект препарата. Интенсивность проникновения фармакологического средства в периферические ткани должна быть охарактеризована тканевой доступностью (f_t), определяемой как отношение значения AUC в ткани (AUC_T) к соответствующей величине AUC в плазме, а также значением $T_{1/2}$ и среднего времени удержания ($T_{1/2T}$ и MRT_T) [6]. Для исследуемого препарата было изучено распределение действующего вещества в печени, почках, мозге, селезенке и сердце при введении в дозе 100 мг/кг. В результате анализа биопроб, полученных при выполнении эксперимента, в пробах мозга, селезенки и сердца 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил не обнаружен. Усредненные фармакокинетические кривые, характеризующие распределение изучаемого препарата в печень и почки, приведены на рис. 4, основные параметры, характеризующие степень проникновения 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила в печень и почки, приведены в табл. 3.

Величина тканевой доступности 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила (f_t) для печени составила 0,83, что свидетельствовало о среднем его распределении в ткани печени, для почек – 0,17, что свидетельствовало о низком его распределении в ткани почек. Суммарный график тканевой доступности представлен на рис. 5.

Таким образом, после введения препарата 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила действующее вещество распределялось в сильно васкуляризированные органы, отвечающие за выведение, – печень и почки. Поступление 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила в сердце и селезенку, а также способность анализируемого соединения проникать через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) и поступать в мозг не установлены.

Для исследуемого препарата была изучена экскреция действующего вещества с мочой и калом при его однократном введении в дозе 100 мг/кг. Отбор экскретов был проведен до введения препарата для определения нативного уровня (нуле-



Рис. 6. Кривая «концентрация-время» 1-[2-(2-бензоилфенокс)этил]-6-метилурацила в кале крыс при однократном внутриведении исследуемого препарата ($n=5, \bar{X} \pm S\bar{x}$)

Fig. 6. Concentration-time curve of 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil in rat feces after single intragastric administrations of the test drug ($n=5, \bar{X} \pm S\bar{x}$)

вая точка, -2–0 ч до введения) и после введения препарата в следующие временные интервалы: 0–2, 2–4, 4–6, 6–8, 8–10, 10–24, 24–32 и 32–48 ч.

В пробах мочи 1-[2-(2-бензоилфенокс)этил]-6-метилурацил не обнаружен; максимум его концентрации в кале наблюдали в интервале 8–10 часов (рис. 6). Из всех видов биоматериала, проанализированных в данном исследовании, наибольшие концентрации определяемого вещества (до 1,4 мг/г) обнаружены в фекалиях. Суммарно из организма крыс за 48 часов эксперимента с калом было выведено около 9% 1-[2-(2-бензоилфенокс)этил]-6-метилурацила. Преимущественное выведение с фекалиями также отмечено для большинства препаратов данной фармакологической группы (невирамина, эфавиренза, этравирин) [19–22].

Закключение

Полученные результаты позволили оценить параметры фармакокинетики оригинального лекарственного препарата 1-[2-(2-бензоилфенокс)этил]-6-метилурацила для лечения ВИЧ-1 инфекции для перорального применения в виде таблеток, включая оценку всасывания при однократном введении в трех дозах на двух видах животных, распределения по органам и тканям, выведения с двумя видами экскретов, а также оценку фармакокинетики при многократном введении в двух дозах. Проведенное исследование включало практически все основные направления, необходимые для характеристики оригинального лекарственного препарата.

Работа выполнена при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России (ГК №14. N08.11.0154 от 02 июня 2017 г., Уникальный идентификатор контракта RF---N0817X0148).

The work was done with the financial support of the state in the face of the Ministry of Education and Science of Russia (Civil Code No. 14.N08.11.0154 dated June 02, 2017, Unique contract identifier RF---N0817X0148).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest

Литература

- Макаров В.Г., Макарова М.Н., Демченко Д.В., авторы; АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», патентообладатель. Способы повышения растворимости лекарственного средства на основе пиримидинового производного бензофенона. Патент РФ 2729792. 12.08.2020
- Демченко Д.В., Джайн (Корсакова) Е.А., Балабаньян В.Ю. и др. Разработка и биофармацевтическая оценка таблеток на основе труднорастворимой субстанции 1-[2-(2-бензоилфенокс)этил]-6-метилурацил. Разработка и регистрация лекарственных средств. 2020; 9 (4): 15–20. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-4-79-87
- Косман В.М., Демченко Д.В., Джайн (Корсакова) Е.А. и др. Сравнительное исследование фармакокинетики субстанции 1-[2-(2-бензоилфенокс)этил]-6-метилурацила и твердых дисперсных систем на ее основе на кроликах. Разработка и регистрация лекарственных средств. 2021; 10 (2): 19–24. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-2-00-00
- Novikov M.S., Ivanova O.N., Ivanov A.V. et al. 1-[2-(2-Benzoyl- and 2-benzylphenoxy)ethyl]uracils as potent anti-HIV-1 agents. Bioorg. Med. Chem. 2011; 19: 5794–902.
- Озеров А.А., Новиков М.С., Луганченко А.И. и др. Новые N-[2-(бензоилфенокс)этил]производные нуклеиновых оснований – синтез и анти-ВИЧ-1 активность *in vitro*. Волгоградский научно-медицинский журнал. 2012; 4: 15–8.
- Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К, 2012; 845–55.
- Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. 1. М.: Гриф и К, 2013; 6–44.
- Bland M. An Introduction to Medical Statistics (3rd edition). Oxford Medical Publications. 2000; 422.
- Пиотровский В.К. Метод статистических моментов и интегральные модельно-независимые параметры фармакокинетики. Фармакология и токсикология. 1986; 49 (5): 118–27.
- Zhang Y., Huo M., Zhou J. et al. An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel. Comput. Methods Programs Biomed. 2010; 99 (3): 306–14. DOI: 10.1016/j.cmpb.2010.01.007
- Косман В.М., Демченко Д.В., Джайн (Корсакова) Е.А. и др. Стандартизация готового лекарственного средства с оригинальной субстанцией производного бензофенона для лечения ВИЧ-1 инфекции. Вопросы биологической медицинской и

фармацевтической химии. 2021; 24 (1): 4–10.

DOI:10.29296/25877313-2021-01-01.) (In Russ.).].

12. ICH, Q2A, Harmonized tripartite guideline, text on validation of analytical procedures, IFPMA, in: Proceedings of the International Conference on Harmonization, Geneva, 1994; 1–5.
13. ICH, Q2B, Harmonized tripartite guideline, validation of analytical procedure: methodology, IFPMA, in: Proceedings of the International Conference on Harmonization, Geneva, 1996; 1–8.
14. Guideline on bioanalytical method validation. EMEA/CHMP/EWP192217/2009, London, Committee for medicinal products for human use (CHMP). 2011.
15. Guidance for Industry: Bioanalytical method for validation. – Rockville, MD, U.S. Department of Health and Human Services, FDA, Center for Drug Evaluation and Research, Center for veterinary medicine. 2018; 41.
16. Карлина М.В., Пожарицкая О.Н., Шиков А.Н. Экспериментальная фармакокинетика, современные требования, исследования *in vitro*. Международный вестник ветеринарии. 2015; 3: 98–102.
17. Balani S.K., Kauffman L.R., de Luna F.A., Lin J.H. Nonlinear pharmacokinetics of efavirenz (DMP-266), a potent HIV-1 reverse transcriptase inhibitor, in rats and monkeys. Drug Metab. Dispos. 1999; 27 (1): 41–5.
18. Mogatle S., Kanfer I. Rapid method for the quantitative determination of efavirenz in human plasma. J. Pharm. Biomed. Anal. 2009; 49 (5): 1308–12.
19. Эфавиренз. Инструкция по медицинскому применению. [Электронное издание]. Режим доступа: https://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_2757.htm (дата обращения 11.2020).
20. Кравченко А.В., Рафальский В.В. Антиретровирусные препараты. Клиническая микробиология и антимикробная терапия. 2003; 5 (4): 360–79.
21. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии. (под ред. Л.С. Страчунского, Ю.Б. Белоусова, С.И. Козлова). Смоленск: МАКМАХ, 2007; 462.
22. Этравирин. Инструкция по медицинскому применению. [Электронное издание]. Режим доступа: https://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_3802.htm (дата обращения 11.2020).

References

1. Makarov V.G., Makarova M.N., Demchenko D.V. – authors. АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», patentee. Methods for increasing the solubility of a drug based on a pyrimidine derivative of benzophenone. Patent RF 2729792. 12.08.2020 (in Russian)
2. Demchenko D.V., Jain (Korsakova) E.A., Balabanyan V.Yu. et al. Development and biopharmaceutical evaluation of tablets based on the poorly water-soluble substance 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv*. 2020; 9 (4): 15–20. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-4-79-87 (in Russian)
3. Kosman V.M., Demchenko D.V., Dzhajn (Korsakova) E.A. et al. Comparative pharmacokinetics study of 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil substance and its solid dispersion systems on rabbits. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv*. 2021; 10 (2): 19–24. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-2-00-00 (in Russian)
4. Novikov M.S., Ivanova O.N., Ivanov A.V. et al. 1-[2-(2-Benzoyl- and 2-benzylphenoxy)ethyl]uracils as potent anti-HIV-1 agents. *Bioorg. Med. Chem.* 2011; 19: 5794–902.
5. Ozerov A.A., Novikov M.S., Luganchenko A.I. et al. New N-[2-(Benzoylphenoxy)ethyl] derivatives of nucleic bases – synthesis and anti-HIV-1 activity *in vitro*. *Volgogradskiy nauchno-meditsinskiy zhurnal*. 2012; 4: 15–8 (in Russian)

6. Guidelines for conducting preclinical studies of drugs. Part 1. Moscow: Grif and K, 2012; 845–55 (in Russian)

7. Guidelines for the examination of medicines. Tom I. Moscow.: Grif and K, 2013; 6–44 (in Russian)
8. Bland M. An Introduction to Medical Statistics (3 edition). Oxford Medical Publications. 2000; 422.
9. Piotrovskij V.K. Method of statistical moments and integral model-independent parameters of pharmacokinetics. *Farmakologiya i toksikologiya*. 1986; 49 (5): 118–27 (in Russian)
10. Zhang Y., Huo M., Zhou J., Xie S. PKSolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel. *Comput. Methods Programs Biomed.* 2010; 99 (3): 306–14. DOI: 10.1016/j.cmpb.2010.01.007
11. Kosman V.M., Demchenko D.V., Dzhajn (Korsakova) E.A., et al. Standardization of the finished drug with the original substance of the benzophenone derivative for the treatment of HIV-1 infection. *Voprosy biologicheskoy medicinskoj i farmaceuticheskoy khimii*. 2021; 24 (1): 4–10. DOI: 10.29296/25877313-2021-01-01. (in Russian)
12. ICH, Q2A, Harmonized tripartite guideline, text on validation of analytical procedures, IFPMA, in: Proceedings of the International Conference on Harmonization, Geneva, 1994; 1–5.
13. ICH, Q2B, Harmonized tripartite guideline, validation of analytical procedure: methodology, IFPMA, in: Proceedings of the International Conference on Harmonization, Geneva, 1996; 1–8.
14. Guideline on bioanalytical method validation. EMEA/CHMP/EWP192217/2009, London, Committee for medicinal products for human use (CHMP). 2011.
15. Guidance for Industry: Bioanalytical method for validation. – Rockville, MD, U.S. Department of Health and Human Services, FDA, Center for Drug Evaluation and Research, Center for veterinary medicine. 2018; 41.
16. Karlina M.V., Pozharickaya O.N., Shikov A.N. Experimental pharmacokinetics, modern requirements, *in vitro* studies. *Mezhdunarodny vestnik veterinarii*. 2015; 3: 98–102 (in Russian)
17. Balani S.K., Kauffman L.R., de Luna F.A., Lin J.H. Nonlinear pharmacokinetics of efavirenz (DMP-266), a potent HIV-1 reverse transcriptase inhibitor, in rats and monkeys. *Drug Metab. Dispos.* 1999; 27 (1): 41–5.
18. Mogatle S., Kanfer I. Rapid method for the quantitative determination of efavirenz in human plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2009; 49 (5): 1308–12.
19. [Efavirenz. Instructions for medical use. [Electronic resource]. Access mode: https://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_2757.htm (circulation date 11.2020) (in Russian)
20. Kravchenko A.V., Rafal'skiy V.V. Antiretroviral drugs. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya terapiya*. 2003; 5 (4): 360–79 (in Russian)
21. A practical guide to anti-infective chemotherapy (by ed. L.S. Strachunskiy, Yu.B. Belousov, S.I. Kozlov). Смоленск: МАКМАХ, 2007; 462 (in Russian)
22. Etravirin. Instructions for medical use. [Electronic resource]. Access mode: https://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_3802.htm (circulation date 11.2020) (in Russian)

Поступила 03 марта 2020г.

Received 03 March 2020

Принята к публикации 10 июня 2021 г.

Accepted 10 June 2021