

УДК 615.453.6

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ФАРМАКОКИНЕТИКА И ОТНОСИТЕЛЬНАЯ БИОДОСТУПНОСТЬ ТАБЛЕТИРОВАННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ НОВОГО АНКСИОЛИТИКА ГМЛ-1

А.А. Новицкий¹, А.А. Литвин^{1*}, Р.В. Шевченко¹, П.О. Бочков¹, О.Г. Грибакина¹,
Г.Б. Колыванов¹, В.П. Жердев¹, К.В. Алексеев¹, Е.В. Блынская¹, Д.В. Юдина¹,
В.В. Смирнов²

(¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова» РАН; ² ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет); e-mail: litbiopharm@yandex.ru)

Проведено изучение фармакокинетики и определение относительной биодоступности ГМЛ-1 (*N*-бензил-*N*-метил-1-фенилпирроло[1,2-*a*]пирозин-3-карбоксамид) на кроликах после его однократного, перорального введения в виде субстанции и таблеточной массы в дозе 50 мг/кг. Рассчитаны фармакокинетические параметры: максимальная концентрация ГМЛ-1 в плазме крови, время ее наступления, площадь под фармакокинетической кривой, период полувыведения ГМЛ-1, относительная биодоступность. Концентрацию ГМЛ-1 определяли в плазме крови с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (тип «ионная ловушка») по дочерним молекулярным ионам. Относительная биодоступность таблеточной массы ГМЛ-1 в сравнении с субстанцией составила 101,72±19,96%.

Ключевые слова: анксиолитики, ГМЛ-1, фармакокинетика, ВЭЖХ-МС.

Ранее были описаны синтез и доклинические исследования нового биологически активного соединения ГМЛ-1 (лиганд транслокаторного белка (TSPO)), обладающего анксиолитической активностью. По химической структуре соединение ГМЛ-1 представляет собой *N*-бензил-*N*-метил-1-фенилпирроло[1,2-*a*]пирозин-3-карбоксамид [1].

Практически любая готовая лекарственная форма (ЛФ) предполагает наличие вспомогательных веществ (ВВ), что служит одним из основных факторов, влияющих на степень и скорость всасывания лекарственного вещества (ЛВ) из желудочно-кишечного тракта в системный кровоток [2]. Известно, что ВВ, вводимые в состав ЛФ, могут взаимодействовать как между собой, так и непосредственно с ЛВ. Как следствие, такие взаимодействия сопровождаются изменением химических свойств, стабильности, фармакокинетики, биотрансформации и фармакологической активности препарата [3].

Цель данного исследования – изучение фармакокинетики и определение относительной биодоступности ГМЛ-1. Препарат изучали на кроликах путем его однократного перорального введения в виде субстанции и таблеточной массы.

Материалы и методы

Фармацевтическая субстанция ГМЛ-1 представляет собой гомогенный порошок белого (или белого с зеленоватым оттенком) цвета без запаха. Производитель: Отдел химии лекарственных средств ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова».

Для проведения фармакокинетических исследований использовали фармацевтическую субстанцию ГМЛ-1 (серия 20122016) и содержащую ее таблеточную массу (серия 640617). Производитель: Опытно-технологический отдел ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова».

Состав таблеточной массы
на 1 таблетку, г

Действующее вещество: ГМЛ-1 (0,010).

Вспомогательные вещества: МСС-101 (0,088), Kolidon 25 (0,006), Poliplasdone XL (0,004), Магния стеарат (0,001).

При использовании данных соотношений средняя масса таблетки в исследуемой партии составила 0,109 г.

Организация экспериментов соответствовала этическим нормам, регламентирующим опыты

на животных. Животные содержались в соответствии с правилами надлежащей лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ. Исследование выполнено согласно требованиям «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств» и стандартным операционным процедурам (СОП) лаборатории фармакокинетики ФГБНУ НИИ фармакологии имени В.В. Закусова [4]. Проведение экспериментов с животными одобрено Комиссией по биоэтической этике ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова».

На шести кроликах-самцах породы шиншилла (питомник «Манихино», Московская область) массой 2,75–3,10 кг проведено открытое, рандомизированное фармакокинетическое исследование. Животные содержались в стандартных условиях вивария при 12-часовом цикле освещения. За 12 ч до эксперимента животных лишали корма. Исследование относительной биодоступности таблеточной массы ГМЛ-1 проведено перекрестным методом. Каждому экспериментальному животному был присвоен индивидуальный номер. Кроликам с помощью дозатора вводили внутрижелудочно фармацевтическую субстанцию или таблеточную массу ГМЛ-1 в виде суспензии в 1%-м крахмальном клейстере. Суспензию ГМЛ-1 вводили внутрь с помощью зонда. Доза действующего вещества составила 50 мг/кг. Животным в случайном порядке сначала вводили либо субстанцию препарата, либо таблеточную массу ГМЛ-1. Через две недели (отмывочный период) проводили эксперимент в обратном порядке.

Взятие образцов крови для последующего определения содержания соединения ГМЛ-1 осуществлялось в дискретные интервалы времени: до введения препарата (0,0) и через 0,25; 0,50; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 6,0; 8,0; 12,0 и 24,0 ч после введения внутрь субстанции и таблеточной массы. Отбор образцов крови производили в пробирки, предварительно обработанные 5%-м водным раствором калиевой соли ЭДТА. Плазму крови немедленно отделяли центрифугированием в течение 10 мин при 3000 об/мин и 4 °С. Плазма крови хранилась при температуре –50 °С.

Исследуемое вещество извлекали из плазмы крови методом жидкостной экстракции. В экстракционную пробирку переносили образцы плазмы крови объемом 1,0 мл, добавляли 5,0 мл метилена хлористого и помещали на 30 мин на

встряхиватель. Полученные образцы помещали в морозильную камеру и выдерживали при –50 °С в течение 20 мин для замораживания водной фазы. Затем органический слой сливали и упаривали на водяной бане при 40 °С в токе азота. Сухой остаток растворяли в 0,5 мл метанола и переносили в хроматографические флаконы.

Исследование выполняли на высокоэффективном жидкостном хроматографе с масс-селективным детектором типа ионная ловушка модели «Agilent 1200 Series LC/MSD Ion Trap» («Agilent», США), оборудованном системой автоматического ввода пробы, внешним источником ионов с ионизацией электроспреем и управляемом компьютером с системой обработки данных «ChemStation» (v.1.0).

Хроматографическое разделение проведено на аналитической колонке «Zorbax Eclipse XDB-C18» (2,1×150 мм; 5 мкм), («Agilent», США), защищенной предколонкой «Zorbax Eclipse XDB-C8» (2,1×12,5 мм, 5 мкм); («Agilent», США).

Подвижная фаза: раствор «А» (50 мл 0,1 М раствора аммония ацетата и 5 мл муравьиной кислоты доводили водой деионизованной до общего объема 1,0 л) и раствор «Б» (50 мл 0,1 М раствора аммония ацетата и 5 мл муравьиной кислоты доводили метанолом до общего объема 1,0 л), фильтровали через мембранные фильтры с размером пор 0,22 мкм («Sartorius», ФРГ). Хроматографическое разделение проводили в изократическом режиме при соотношении компонентов «А»:«Б», равном 25:75.

Скорость потока подвижной фазы составляла 0,5 мл/мин, объем вводимой пробы – 5 мкл. Тип детектирования: масс-спектрометрия в режиме множественных молекулярных реакций по дочерним ионам с отношением массы к заряду $m/z = 285$ и $m/z = 311$, полученных изолированием и фрагментацией нативного молекулярного иона с отношением массы к заряду $m/z = 342$ (что соответствует протонированному молекулярному иону ГМЛ-1). Установленный ранее предел количественного определения вещества по данной методике составил 50 нг/мл [5]. Валидацию методики проводили в соответствии с «Руководством по валидации аналитических методик для производителей лекарств» [6].

Полученные данные были подвергнуты математической статистической обработке. Для расчетов фармакокинетических параметров был использован модельно-независимый метод [7].

В таблице представлены средние арифметические значения величин, стандартные отклонения (SD) и коэффициент вариации (CV).

Результаты и обсуждения

На рисунке представлены усредненные фармакокинетические кривые ГМЛ-1, где исследуемое соединение определяется на протяжении 24 ч после однократного введения животным фармацевтической субстанции (С) и таблеточной массы (Т) в пересчете на дозу ГМЛ-1 50 мг/кг.

В таблице представлены фармакокинетические параметры ГМЛ-1 у кроликов после введения субстанции и таблеточной массы. Статистический анализ параметра, характеризующего скорость всасывания ($C_{\text{макс}}/AUC_{0 \rightarrow t}$) показал, что ВВ, входящие в состав таблетированной ЛФ, не влияют на этот показатель, поскольку между сравниваемыми средними значениями $C_{\text{макс}}/AUC_{0 \rightarrow t}$ субстанции и таблеточной массы отсутствуют достоверно значимые различия.

Средний промежуток времени достижения максимальной концентрации ($T_{\text{макс}}$) ГМЛ-1 в плазме крови кроликов после введения субстанции и таблеточной массы составил $1,3 \pm 0,5$ ч.

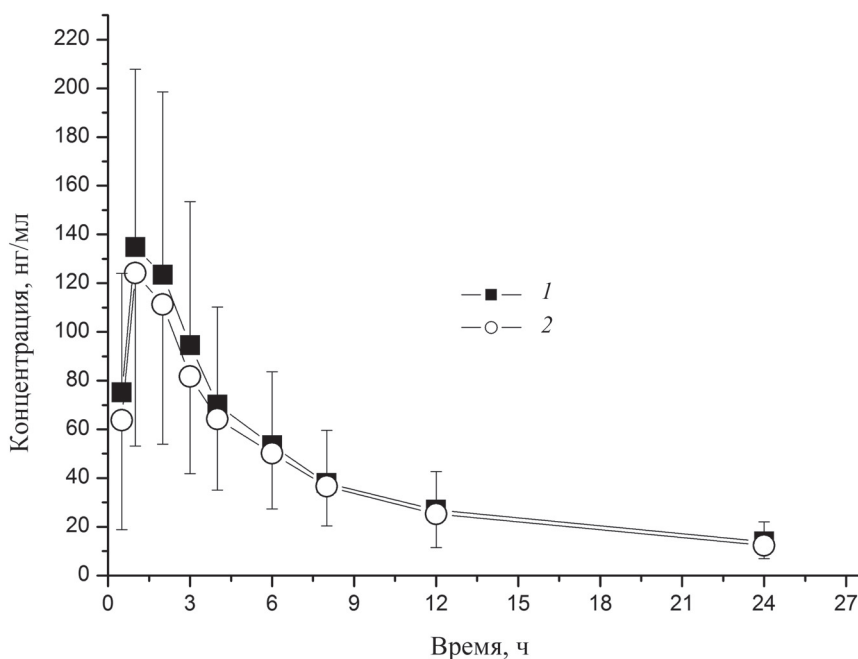
Максимальная концентрация ($C_{\text{макс}}$) ГМЛ-1 в плазме крови кроликов после введения субстанции составила в среднем $155,22 \pm 81,82$ нг/мл. После введения таблеточной массы этот параметр оказался на 12% меньше ($136,91 \pm 72,17$ нг/мл).

Вспомогательные вещества, входящие в состав таблетированной ЛФ, не оказали влияния на кинетику выведения ГМЛ-1. Так, константа скорости элиминации ($k_{\text{эл.}}$) у кроликов после введения субстанции ГМЛ-1 и таблеточной массы в среднем составила $0,1000 \pm 0,0130$ и $0,0974 \pm 0,0090$ ч⁻¹ соответственно, период полуэлиминации ($t_{1/2\text{эл.}}$) исследуемого вещества из плазмы крови после введения лекарственной формы равнялся $7,17 \pm 0,64$ ч, а после введения субстанции – $7,03 \pm 0,87$ ч. При этом среднее время удерживания (MRT) ГМЛ-1 в организме кроликов составило $11,04 \pm 1,26$ ч (таблеточная масса) и $13,20 \pm 3,91$ ч (субстанция).

Анализ основного фармакокинетического параметра ($AUC_{0 \rightarrow t}$), характеризующего степень биодоступности действующего вещества из ЛФ, указывает на значительную вариабельность данного параметра (48–57%). Среднее значение $AUC_{0 \rightarrow t}$ составило для субстанции ГМЛ-1 и таблеточной массы $931,82 \pm 532,13$ и $898,10 \pm 432,19$ нг/мл×ч соответственно. Учитывая, что у животного под № 1 вклад экстраполированной части фармакокинетической кривой после введения субстанции

$$100 - [(AUC_{0 \rightarrow t} / AUC_{0 \rightarrow \infty}) \times 100]$$

составил 20,09%, величины относительной биодоступности рассчитывали, используя значения $AUC_{0 \rightarrow t}$.



Фармакокинетические профили ГМЛ-1 в плазме крови кроликов после однократного перорального введения фармацевтической субстанции и таблеточной массы в пересчете на дозу ГМЛ-1 50 мг/кг ($n = 6$; \pm SD): 1 – субстанция, 2 – таблеточная масса

Фармакокинетические параметры ГМЛ-1 в плазме крови кроликов после однократного перорального введения таблеточной массы (Т) и фармацевтической субстанции ГМЛ-1 (С) в дозе 50 мг/кг

Параметр	Форма	Номер подопытного кролика						Среднее	SD	CV%
		1	2	3	4	5	6			
$C_{\text{макс}}$ (нг/мл)	T	199,22	30,08	178,94	168,74	60,86	183,62	136,91	72,17	52,71
	C	219,49	32,88	188,57	198,11	71,11	221,17	155,22	81,82	52,71
$AUC_{0 \rightarrow t}$ (нг/мл×ч)	T	1124,26	216,77	1284,62	1055,22	507,03	1200,67	898,10	432,19	48,12
	C	886,34	219,98	1392,71	1121,90	413,67	1556,32	931,82	532,13	57,11
$K_{\text{эл}}$ (ч ⁻¹)	T	0,1005	0,0874	0,0937	0,1115	0,0896	0,1018	0,0974	0,0090	9,21
	C	0,0897	0,0893	0,0882	0,1048	0,1201	0,1079	0,1000	0,0130	13,03
$AUC_{0 \rightarrow \infty}$ (нг/мл×ч)	T	1285,62	263,10	1477,30	1155,46	601,37	1360,06	1023,82	482,02	47,08
	C	1109,23	260,95	1643,86	1260,90	450,38	1730,99	1076,05	607,04	56,41
$(AUC_{0 \rightarrow t} / AUC_{0 \rightarrow \infty}) \times 100$	T	87,45	82,39	86,96	91,32	84,31	88,28	86,79	3,12	3,60
	C	79,91	84,30	84,72	88,98	91,85	89,91	86,61	4,42	5,11
$t_{1/2}$ (ч)	T	6,90	7,93	7,40	6,21	7,74	6,81	7,17	0,64	9,00
	C	7,73	7,76	7,86	6,62	5,77	6,43	7,03	0,87	12,45
MRT (ч)	T	10,54	12,68	11,38	9,22	12,09	10,32	11,04	1,26	11,45
	C	15,01	12,14	12,16	9,96	20,18	9,75	13,20	3,91	29,65
$T_{\text{макс}}$ (ч)	T	1,0	1,0	2,0	1,0	2,0	1,0	1,3	0,5	38,73
	C	1,0	1,0	2,0	1,0	1,0	2,0	1,3	0,5	38,73
$C_{\text{макс}} / AUC_{0 \rightarrow t}$ (ч ⁻¹)	T	0,177	0,139	0,139	0,160	0,120	0,153	0,148	0,020	13,51
	C	0,248	0,149	0,135	0,177	0,172	0,142	0,171	0,041	23,98
$f_{\text{отл}}$ (%)		115,90	100,82	89,87	91,64	133,53	78,57	101,72	19,96	19,62

Относительная биологическая доступность (f), определяемая отношением индивидуальных значений $AUC_{0 \rightarrow t}$ для таблеточной массы (Т) по отношению к субстанции (С), колебалась от 78,57 до 133,53% и в среднем составила $101,72 \pm 19,96\%$.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что ВВ, входящие в состав таблетированной ЛФ, не оказывают влияния на степень биодоступности исследуемого соединения ГМЛ-1. Это в свою очередь

позволяет рекомендовать изученную таблетированную ЛФ ГМЛ-1 для проведения первой фазы клинических исследований.

Работа была поддержана Министерством образования и науки (Госконтракт № 14. N08.12.0087).

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Конфликта интересов нет.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Яркова М.А., Мокров Г.В., Гудашева Т.А., Середенин С.Б. // Хим.-фарм. журн. 2016, Т. 50. № 8. С. 3.
2. Kang H.Ch., Nuh K.M., Vae Y.H. // J. Controlled Release. 2012. Vol. 164. N 3. P. 256.
3. Бардаков А.И., Литвин А.А., Сливкин А.И. Биофармацевтические подходы в разработке и оценке готовых лекарственных форм. Воронеж, 2010.
4. Фирсов А.А., Жердев В.П., Портной Ю.А. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Под общ. ред. А.Н. Миронова. Ч. 1. М., 2013.
5. Новицкий А.А., Бочков П.О., Литвин А.А., Жердев В.П., Бlynская Е.В. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2018. Т. 59. № 1. С. 43.
6. Валидация аналитических методик для производителей лекарств. Типовое руководство предприятия по производству лекарственных средств / под ред. В.В. Береговых. М., 2008.
7. Сергиенко В.И., Бондарева И.Б. Математическая статистика в клинических исследованиях. М., 2001.

Поступила в редакцию 10.03.2019

Получена после доработки 12.03.2019

Принята к публикации 14.03.2019

COMPARATIVE PHARMACOKINETICS AND RELATIVE BIOAVAILABILITY OF A NEW ANXIOLYTIC GML-1 TABLET FORM

A.A. Novitskiy¹, A.A. Litvin¹, R.V. Shevchenko¹, P.O. Bochkov¹, O. G. Gribakina¹, G.B. Kolyvanov¹, V.P. Zherdev¹, K.V. Alekseev¹, E.V. Blynskaya¹, D.V. Yudina¹, V.V. Smirnov²

¹FSBI "Zakusov Institute of Pharmacology"; ²Sechenov University, Moscow; e-mail: litbiopharm@yandex.ru

Open, single, crossover, pharmacokinetic study of GML-1 (dose 50 mg/kg) in rabbits after oral administration tablets and substance was performed. Pharmacokinetic parameters were calculated: maximum concentration of GML-1 in the rabbit blood plasma (C_{max}), the time of C_{max} , the area under "concentration-time" curve, the half-time of GML-1, the relative bioavailability. GML-1 concentrations were detected by HPLC-MS ("ion trap") by daughter ions. The relative bioavailability of GML-1 in tablets was $101,72 \pm 19,96\%$. in comparison to substance.

Key words: anxiolytics, GML-1, pharmacokinetics, HPLC-MS.

Сведения об авторах: Новицкий Александр Александрович – науч. сотр. лаборатории фармакокинетики ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» (135alex1988@rambler.ru); Кольванов Геннадий Борисович – вед. науч. сотр. лаборатории фармакокинетики ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», докт. биол. наук, (7822535@mail.ru); Литвин Александр Алексеевич – вед. науч. сотр. лаборатории фармакокинетики ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», докт. биол. наук (litbiopharm@yandex.ru); Бочков Павел Олегович – ст. науч. сотр. лаборатории фармакокинетики ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», канд. биол. наук (bok-ov@yandex.ru); Грибакина Оксана Геннадьевна – науч. сотр. лаборатории фармакокинетики ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», канд. биол. наук (rgop-ox@yandex.ru); Шевченко Роман Владимирович – науч. сотр. лаборатории фармакокинетики ФГБНУ

«НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», канд. мед. наук (saubert@gmail.com); *Жердев Владимир Павлович* – зав. лабораторией фармакокинетики ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», докт. мед. наук (zherdevpharm@mail.ru); *Алексеев Константин Викторович* – зам. директора по инновационной работе ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», докт. фарм. наук, профессор (conviack@yandex.ru); *Блынская Евгения Викторовна* – зав. лабораторией готовых лекарственных форм ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», канд. фарм. наук (eaugeus@mail.ru); *Юдина Дарья Валентиновна* – мл. науч. сотр. лаборатории готовых лекарственных форм ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» (upa_1093@mail.ru); *Смирнов Валерий Валерьевич* – доцент кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева Сеченовского университета, адрес: ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), канд. фарм. наук.