

# ФАРМАКОКИНЕТИКА

DOI: 10.30906/0869-2092-2018-81-12-20-24

## ФАРМАКОКИНЕТИКА ИННОВАЦИОННОГО ЛИПОСОМАЛЬНОГО ПРЕПАРАТА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ГЕПАТИТА С

В. В. Смирнов, Г. В. Раменская, Л. М. Красных, О. О. Колоскова,  
В. И. Ковчина, И. П. Шиловский, М. Р. Хаитов<sup>1</sup>

Главными преимуществами использования препаратов на основе малых интерферирующих РНК (миРНК) являются их высокая специфичность и эффективность, так как вводимые миРНК способны действовать в крайне низких концентрациях. Возможность доставки миРНК в клетки достигается путём её заключения в комплекс с липопептидами. Сложность изучения фармакокинетики препаратов, содержащих миРНК и липопептиды, заключается в том, что в организме млекопитающих присутствует большое количество соединений, сходных по природе, что создает сложности для селективной детекции именно компонентов самого лекарственного средства. Авторами разработан подход к изучению фармакокинетики инновационного препарата для лечения вируса гепатита С, представляющего собой комплекс молекул миРНК и носителя – катионного липопептида, при нанесении флуоресцентных меток с различной длиной волны испускания.

**Ключевые слова:** гепатит С; РНКи; миРНК; олигонуклеотид; флуориметрия; новый метод.

### ВВЕДЕНИЕ

Вследствие повсеместной распространенности и высокой заболеваемости вирусные гепатиты представляют серьезную медико-социальную проблему для здравоохранения. По данным ВОЗ, 1/3 населения мира инфицирована различными видами гепатотропных вирусов. По экспертным оценкам имеется 400 млн носителей вируса гепатита В (ВГВ) и 300 млн носителей вируса гепатита С (ВГС). В России, соответственно, 5 и 2 млн носителей, из которых до 97,8 % – это лица в возрасте от 19 до 39 лет [1]. Несмотря на отсутствие адекватных моделей исследования, за 25 лет, прошедших с момента открытия ВГС, был достигнут значительный прогресс в понимании процессов жизненного цикла вируса и разработке новых противовирусных препаратов.

Помимо противовирусных препаратов прямого действия, разрабатываются препараты, направленные на элементы клетки-хозяина, участвующие в репликации вируса. Так как они влияют на элементы клетки-хозяина, а не на вирусные факторы, то они обладают широким спектром действия в отношении различных генотипов вируса, а также высоким порогом формирования резистентности [4]. В настоящее время 2 препарата такого рода проходят клинические испытания – это

специфический ингибитор циклофилина А (алиспори-вир) и антагонист microRNA-122 (миравирсен). Действующее вещество последнего препарата – синтетические молекулы малых интерферирующих РНК (миРНК), направленных к клеточной microRNA-122 [5].

Интерференция РНК – это естественный механизм регуляции экспрессии генов в клетке. Препараты на основе миРНК разрабатываются для лечения рака, инфекционных заболеваний и других патологических процессов, которые ассоциированы с нарушениями в функциях специфических генов [2]. Короткие двухцепочечные (ДЦ) РНК и их гены привлекают внимание как действующие вещества перспективных лекарственных препаратов [1]. Кроме того, привлекательной является сравнительная дешевизна методики получения лекарственных средств (ЛС). Синтез олигонуклеотидов в настоящее время вполне доступен и прост в масштабировании. Этот факт дает препаратам, созданным на базе миРНК, важное конкурентное преимущество, например, по сравнению с моноклональными антителами [3].

Разработанный препарат “У14/siUTR” для лечения гепатита С представляет собой комплекс молекул миРНК, подавляющих репликацию вирусной РНК и носителя – катионного липопептида, способствующего проникновению синтетических молекул миРНК внутрь клеток-мишеней.

Для количественного определения лекарственного препарата в биологических жидкостях среди большого

<sup>1</sup> ФГБУ “Научный центр экспертизы средств медицинского применения” Министерства здравоохранения Российской Федерации, Россия, 127051, Москва, Петровский бульвар, д. 8, стр. 2.

количества эндогенных соединений, сходных по природе, его компоненты (молекулы РНК и липопептида) были помечены флуоресцентными метками с различной длиной волны испускания, что позволило одновременно определять компоненты препарата в одном и том же биологическом образце [1].

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Препарат “Y14/siUTR” состоит из 2 компонентов: фармацевтической субстанции (ФС) – молекул миРНК (siUTR), активных в отношении регуляторного региона вируса (5'UTR), и вспомогательного вещества (ВВ) – липосомальной дисперсии липопептида Y14 в массовом соотношении 1/10. Антисмысловая цепь молекулы миРНК помечена флуоресцентной меткой VIC (длина волны испускания = 554 нм). Метили только антисмысловую цепь молекул миРНК, так как именно она обеспечивает эффект интерференции РНК. Y14 помечен меткой Rугене (длина волны испускания = 670 нм), который встраивался в бислой липосомы за счет гидрофобных взаимодействий. Мечение проводили на базе ФГБУ “ГНЦ Институт иммунологии” ФМБА России (лаборатория пептидных иммуногенов, заведующий – к.х.н. Андреев С. М.). Таким образом, длины волн обоих компонентов не перекрывались. Детальное описание процесса получения липосомального препарата было представлено в [1].

Данное исследование осуществляли на мышах BALB/c, полученных из НЦБМТ РАМН “Столбовая”. Возраст к началу введения составлял 8 – 9 недель, масса тела к началу введения – 20 – 22 г.

Мышей содержали в клетках из полипропилена размерами 320 × 210 × 90 мм по 6 особей. Клетки оборудованы стальными решетчатыми крышками с кормовым углублением, стальными разделителями для корма и стальными держателями этикеток.

В качестве подстилки использовали коммерческий беспылевой подстил для грызунов Лигноцель S 8/15 (Germany).

Стандартный гранулированный корм ООО “Лабораторснаб” ГОСТ Р 50258 – 92 животные получали в кормовом отсеке из стальной решетчатой крышки клетки.

Воду, согласно ГОСТ “Вода питьевая”, животные получали *ad libitum* в стандартных автоклавированных питьевых бутылочках с резиновыми крышками и стеклянными носиками.

Животных содержали в контролируемых условиях окружающей среды (18 – 24 °С и 30 – 70 % относительная влажность) при 12-часовом цикле освещения. Температуру, влажность ежедневно контролировали и документировали.

Животные были акклиматизированы в лаборатории в течение 3 дней до введения ЛС. Во время этого периода осуществлялся ежедневный осмотр внешнего состояния животных. Животные с обнаруженными в ходе осмотра отклонениями не включались в экспериментальные группы.

Отбирали животных без признаков отклонений физического состояния, причем индивидуальные различия массы тела не были более 10 %.

Исследования проведены на 286 мышах-самках линии BALB/c (НЦБМТ РАМН “Столбовая”, МО) возрастом 6 – 8 недель массой 20 – 22 г, так как данный вид является стандартным для проведения исследований фармакокинетики. Предполагаемая терапевтическая доза (ТД) для человека – 0,044 мг/кг. С учетом коэффициента пересчета (11,8) ТД для мыши – 0,520 мг/кг. Животным вводили ЛС с меткой в дозах 5,5, 2,75 и 0,5 мг/кг, что соответствует 11, 5,5 и 1 ТД для мышей, в объеме 0,25 мл внутривенно и подкожно, а через 2, 5, 10, 20, 30, 45 и 60 мин у них была взята кровь (не менее 300 мкл) для последующего получения сыворотки (не менее 50 мкл). Животные были разделены на группы, так что каждой временной точке соответствовало 6 животных. Животные, получавшие ЛС внутривенно, были выведены из эксперимента через указанные интервалы времени после введения ЛС и, помимо крови, у них были взяты внутренние органы (легкие, почки, печень, селезенка, вилочковая железа, мышца бедра, головной мозг) для изучения распределения. Те же исследования были проведены и при подкожном введении, за исключением анализа внутренних органов.

Для обработки полученных данных использовали методы описательной статистики. Фармакокинетиче-

Таблица 1. Параметры фармакокинетики ЛС “Y14/siUTR” в сыворотке крови мышей после внутривенного введения при использовании однокамерной модели, рассчитанные по средней концентрации

Компонент ЛС	Доза, мг/кг	$C_{max}$ , нг/мл	$AUC_{0-t}$ , нг/мл × мин	$AUC_{0-\infty}$ , нг/мл × мин	$t_z$	$T_{max}$ , ч	$T_{1/2}$ , ч	$V_d$ , л	$MRT$ , ч
siUTR	0,50	35,3	3,87	3,87	9,46	0	0,073	272,9	0,10
	2,75	173,9	17,50	17,50	7,29	0	0,095	430,9	0,13
	5,50	182,4	319,6	322,3	8,24	0	0,084	40,2	0,16
Y14	0,50	72,9	10,2	10,2	11,35	0	0,061	86,6	0,12
	2,75	346,7	104,2	104,2	9,51	0,2	0,073	55,5	0,20
	5,50	1546,8	319,6	322,3	6,87	0	0,101	45,2	0,18

Здесь и в табл. 2 и 3: для каждой временной точки использовали по 6 мышей.

ские показатели рассчитывали по среднему значению концентраций, полученных от 6 исследуемых мышей.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования приведены в табл. 2 – 3.

Максимальная концентрация компонентов ЛС в крови выявлена сразу после внутривенного введения препарата (через 2 мин), а через 60 мин после введения компоненты ЛС не определялись в крови (рис. 1). Период полувыведения для обоих компонентов ЛС был сходен и составлял от 0,078 до 0,095 ч для siUTR и от 0,061 до 0,101 ч для Y14, что свидетельствует об устойчивости комплекса Y14/siUTR в крови.

При изучении распределения компонентов ЛС в органе-мишени (печени) было установлено, что  $T_{\max}$  для

siUTR приходится на 30 мин после внутривенного введения, а  $T_{\max}$  для Y14 достигается несколько раньше – 20 мин. Период полувыведения siUTR из печени составляет примерно 0,25 ч и не зависит от вводимой дозы ЛС, а для Y14 период полувыведения колеблется от 0,15 до 0,34 ч в зависимости от дозы.

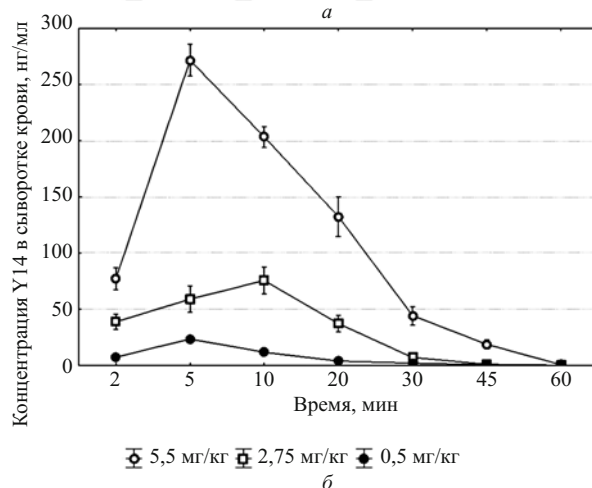
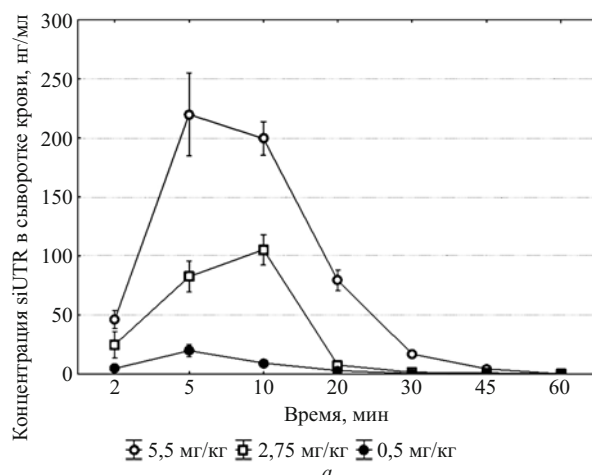
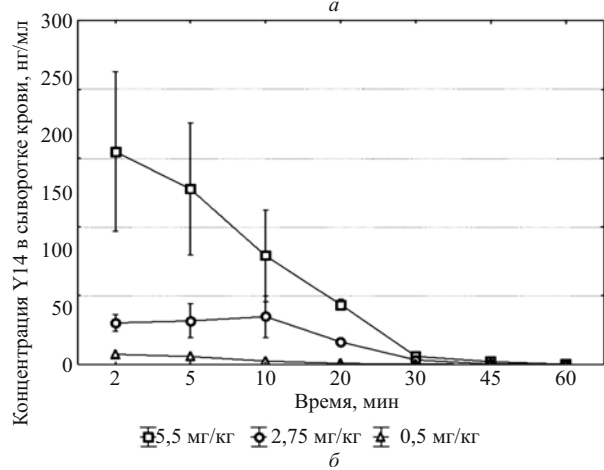
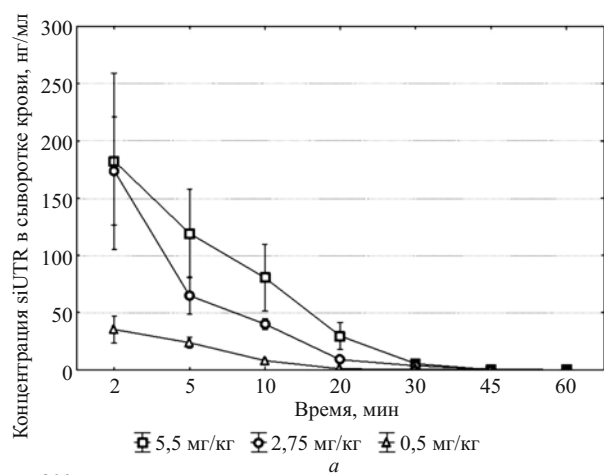
При изучении распределения препарата по различным органам были рассмотрены иммунные органы – вилочковая железа и селезенка, и неиммунные органы – легкие, головной мозг и мышца бедра, а также органы выведения – почки и печень. При изучении распределения компонентов ЛС в органах было установлено, что оба компонента ЛС максимально накапливаются в селезенке с  $T_{\max}$  в среднем 20 мин. Однако выводятся siUTR и Y14 из селезенки быстрее, чем из печени: 0,17 против 0,25 ч для siUTR и 0,15 против 0,24 ч для

Таблица 2. Параметры фармакокинетики ЛС “Y14/siUTR” в сыворотке крови мышей после подкожного введения при использовании однокамерной модели, рассчитанные по средней концентрации

Компонент ЛС	Доза, мг/кг	$C_{\max}$ , нг/мл	$AUC_{0-t}$ , нг/мл × мин	$AUC_{0-\infty}$ , нг/мл × мин	$l_z$	$T_{\max}$ , ч	$T_{1/2}$ , ч	$V_d$ , л	MRT, ч
siUTR	0,50	19,7	2,9	3,0	9,4	0,1	0,07	359,0	0,17
	2,75	105,268	17,963	18,072	8,037	0,2	0,086	378,6585	0,17
	5,50	219,9	55,6	56,2	6,8	0,1	0,10	289,3	0,22
Y14	0,50	46,7	8,3	8,5	5,6	0,1	0,12	209,3	0,217
	2,75	150,955	42,809	43,001	8,969	0,2	0,077	142,604	0,221
	5,50	543,5	158,6	158,7	6,9	0,1	0,10	100,9	0,262

Таблица 3. Параметры фармакокинетики ЛС “Y14/siUTR” в органах мышей после внутривенного введения (при использовании двухкамерной модели), рассчитанные по средней концентрации

Компонент ЛС	Орган	Доза, мг/кг	$C_{\max}$ , нг/мл	$AUC_{0-t}$ , нг/мл × мин	$AUC_{0-\infty}$ , нг/мл × мин	$l_z$	$T_{\max}$ , ч	$T_{1/2}$ , ч	$V_d$ , л	MRT, ч
siUTR	Легкие	0,50	0,50	7,3	3,30	3,69	2,79	0,3	0,248	0,508
		2,75	2,75	14,8	7,72	7,72	1,19	0,3	0,583	0,393
		5,50	5,50	59,9	34,20	57,26	1,02	0,2	0,681	1,065
	Почки	0,50	0,50	6,3	2,19	2,43	3,88	0,5	0,179	0,638
		2,75	2,75	18,1	10,97	14,23	2,60	0,5	0,267	0,776
		5,50	5,50	36,2	27,17	57,18	0,74	0,3	0,931	1,493
	Печень	0,50	0,50	8,1	4,83	6,12	2,89	0,5	0,240	0,778
		2,75	2,75	39,8	18,76	22,22	2,81	0,5	0,247	0,685
		5,50	5,50	65,8	37,76	43,85	2,74	0,5	0,253	0,642
Селезенка	0,50	0,50	18,3	6,58	6,58	10,24	0,5	0,068	0,398	
	2,75	2,75	61,5	26,34	26,34	2,66	0,3	0,261	0,427	
	5,50	5,50	85,5	35,85	37,62	3,80	0,3	0,182	0,467	
Y14	Легкие	0,50	54,9	24,79	24,97	7,11	0,2	0,10	0,369	0,50
		2,75	159,4	83,21	109,74	1,78	0,2	0,39	0,709	2,75
		5,50	439,6	258,34	339,82	1,70	0,2	0,41	0,721	5,50
	Почки	0,50	30,5	10,08	10,08	8,41	0,5	0,08	0,45	0,50
		2,75	156,8	53,04	53,153	7,62	0,3	0,09	0,45	2,75
		5,50	365,1	90,48	90,48	4,55	0,3	0,15	0,37	5,50
	Печень	0,50	8,2	4,83	6,12	2,89	0,5	0,24	0,78	0,50
		2,75	176,4	47,40	48,65	4,61	0,3	0,15	0,431	2,75
		5,50	519,0	225,70	277,60	2,07	0,3	0,34	0,68	5,50
	Селезенка	0,50	54,6	13,20	13,20	6,86	0,3	0,10	0,35	0,50
		2,75	348,1	126,41	127,46	5,57	0,3	0,12	0,40	2,75
		5,50	681,8	274,76	300,21	3,11	0,3	0,22	0,52	5,50



**Рис. 1.** Концентрации компонентов лекарственного средства “Y14/siUTR” в сыворотке крови мышей в различные периоды времени после внутривенного введения (среднее ± стандартное отклонение): а – изменение концентрации siUTR; б – изменение концентрации Y14.

**Рис. 2.** Концентрация компонентов лекарственного средства “Y14/siUTR” в сыворотке крови мышей в различные периоды времени после внутривенного введения (среднее ± стандартное отклонение): а – изменение концентрации siUTR; б – изменение концентрации Y14.

Y14 (табл. 3). Вероятно, селезенка является органом-мишенью для ЛС, что важно учитывать при проведении последующих доклинических исследований данного ЛС на иммуотоксичность. В другом органе иммунной системы – вилочковой железе – не определяли ни Y14, ни siUTR.

Следующими органами, в которых наблюдались высокие концентрации компонентов ЛС, были печень, почки и легкие. По-видимому, выведение метаболитов (или пустой флуоресцентной метки) производится почками, т.к. обе метки определяются в моче.

В мышце бедра и головном мозге компоненты ЛС не определялись. Это свидетельствует о том, что препарат не проходит гематоэнцефалический барьер и не накапливается в мышечной ткани, следовательно, не следует ожидать токсического влияния ЛС на центральную нервную систему.

Изучали также фармакокинетику ЛС “Y14/siUTR” при подкожном введении, рекомендованном для клинического использования. Подкожно вводили 3 дозы препарата – 5,5, 2,75 и 0,5 мг/кг, что соответствовало 11, 5,5 и 1 ТД (для мышей). В результате были получе-

ны следующие данные. Максимальная концентрация компонентов ЛС в крови выявлялась через 5 мин (для доз 5,5 и 0,5 мг/кг) и 10 мин (для дозы 2,75 мг/кг) после введения препарата, а через 60 мин после введения компоненты ЛС не определялись в крови (рис. 2). Период полувыведения для обоих компонентов ЛС был сходен и составлял в среднем порядка 0,1 ч (6 мин), что свидетельствует об устойчивости комплекса Y14/siUTR в крови.

Кроме того, следует отметить, что нецелесообразно рассматривать кинетику ЛС при курсовом введении, так как из-за малого его периода полувыведения действующие вещества отсутствуют в организме испытуемого животного уже через час после введения, а следующая доза препарата должна быть принята спустя 6 – 8 ч, то есть более чем через 10 периодов полувыведения. В связи с этим кинетика при следующем введении не должна отличаться от предыдущей, а концентрация препарата при курсовом введении не выходит на равновесную. Это значит, что при терапевтическом дозировании препарата равновесная концентрация не

достигается и кинетика при многократном применении эквивалентна кинетике при однократном введении. С точки зрения механизма действия данный феномен можно объяснить тем, что препарат запускает транскрипционные механизмы, которые после запуска уже не зависят от концентрации вещества в органе-мишени.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе работы были рассчитаны фармакокинетические параметры исследованного ЛС после внутривенного и подкожного введения мышам в разных дозах. Максимальная концентрация при внутривенном введении составила 35,3, 173,9 и 182 нг/мл для мало интерферирующей РНК siUTR и 72,90, 346,7 и 1546,80 нг/мл для Y14 при внутривенном введении 0,50, 2,75 и 182,4 мг/кг испытуемого препарата соответственно. Максимальная концентрация после подкожного введения составила 19,7, 105,3 и 219,9 нг/мл для мало интерферирующей РНК siUTR и 46,70, 151,00 и 543,50 нг/мл для Y14 после внутривенного

введения 0,50, 2,75 и 182,4 мг/кг испытуемого препарата соответственно.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ “НЦЭСМП” Минздрава России № 056-00023-18-02 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР АААА-А18-118021590049-0).

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 17-04-01080.

## ЛИТЕРАТУРА

1. О. О. Колоскова, Дис. канд. биол. наук, Государственный научный центр “Институт иммунологии”, Москва (2016).
2. S. Deshayes., F. Simeoni, MC Morris, et al., *Methods Mol. Biol.*, **386**(3), 299–308 (2007).
3. P. Hahn, E. Scanlan, *Top. Cur. Chem.*, **296**, 1 – 13 (2010).
4. T. K. Kim, J. H. Eberwine, *Anal. Bioanal. Chem.*, **397**(8), 3173 – 3178 (2010).
5. S. Veldhoen, S. D. Laufer, T. Restle, *Int. J. Mol. Sci.*, **9**(7), 1276 – 1320 (2008).

Поступила 19.10.18

## STUDY OF PHARMACOKINETICS OF INNOVATIVE LIPOSOMAL DRUG FOR THE TREATMENT OF HEPATITIS C

V. V. Smirnov, G. V. Ramenskaya, L. M. Krasnykh, O. O. Koloskova, V. I. Kovchina, I. P. Shilovskiy, and M. R. Khaitov

Federal State Budgetary Institution “Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products” of the Ministry of Health of the Russian Federation, Petrovsky boulevard 8, bld. 2, Moscow, 127051, Russian Federation.

Currently, a large number of research and development of new drugs based on small interfering RNA (siRNA) for the treatment of various diseases is underway. The main advantages of using RNA-based drugs are high specificity and high efficiency, since siRNA injected can act in extremely low concentrations. The possibility of delivering siRNA to cells is achieved by its incorporation into a complex with lipopeptides. The complexity of studying the pharmacokinetics of preparations containing RNA and lipopeptides is that a large number of compounds that are similar in nature are present in the mammalian organism, which makes it difficult to selectively detect the components of the drug itself. The authors present an approach to the study of the pharmacokinetics of the developed drug for the treatment of the hepatitis C virus, which is a complex of siRNA and cationic lipopeptide molecules, by applying fluorescent labels with different emission wavelengths.

**Keywords:** hepatitis C; RNAi; siRNA; oligonucleotide; fluorimetry; new method