ФАРМАКОКИНЕТИКА

DOI: 10.30906/0869-2092-2021-84-5-22-26

ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ СУБСТАНЦИ НИОХ-14 — НОВОГО ПРОТИВООСПЕННОГО ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОГО ВЕЩЕСТВА

О. Ю. Мазурков[1], Л. Н. Шишкина[1], Н. И. Бормотов[1], М. О. Скарнович[1], О. А. Серова[1], Н. А. Мазуркова[1], М. А. Скарнович[1], А. А. Черноносов[2], А. Я. Тихонов[3], Б. А. Селиванов[3]

Изучена фармакокинетика субстанции нового противооспенного препарата НИОХ-14 (аналога разработанного в США соединения ST-246) у мышей после однократного перорального введения в дозе 50 мкг/г и перорального введения в течение 10 сут в дозах 50 и 5 мкг/г. Концентрацию активного метаболита (то есть ST-246), в который НИОХ-14 превращается в сыворотке крови и гомогенатах органов мышей, определяли методом LC-MS/MS (тандемной масс-спектрометрии — MS/MS и жидкостной хроматографии — LC). На основании фармакокинетических параметров была определена тканевая доступность субстанции НИОХ-14 для разных органов мыши, которая составила 100; 69,6; 20,3; 26,8 и 63,3 % для легких, печени, селезенки, головного мозга и почек, соответственно.

Ключевые слова: фармакокинетика; тканевая доступность; противооспенные препараты; НИОХ-14; мыши.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время, несмотря на то, что оспа была ликвидирована после успешной кампании всеобщей вакцинации [1], есть основания опасаться преднамеренного или случайного повторного внедрения вируса натуральной оспы в человеческую популяцию [4]. Кроме того, существуют другие виды ортопоксвирусов, которые способны заражать людей и вызывать у них серьезные заболевания и смерть [5, 7, 8].

Применение вакцины для защиты от ортопоксвирусной инфекции ограничено из-за высокой частоты серьезных нежелательных явлений, связанных с вакцинацией [12]. В июле 2018 г. в США был зарегистрирован единственный препарат, предназначенный для лечения натуральной оспы — тековиримат (tecovirimat, TPOXX), созданный на основе химического соединения ST-246 (4-трифторметил-N-(3,3a,4,4a,5,5a,6,6a-октагидро-1,3-диоксо-4,6-етеноциклопроп [f]изоиндол-2(1H)-ил)-бензамид) [9]. Для экстренного использования в США был создан стратегический национальный резерв этого препарата (около 28 млн доз). Однако для обеспечения защиты населения России от возможных вспышек оспы необходимо наличие отечественного противооспенного препарата. В связи с этим, проблема создания эффективных отечественных лекарственных средств экстренной профилактики и лечения инфекционных болезней, вызываемых ортопоксвирусами, является по-прежнему актуальной.

Совместно с Новосибирским институтом органической химии Сибирского отделения Российской академии наук (НИОХ СО РАН) нами было получено новое химическое соединение НИОХ-14 (7-[N′-(4-трифторметилбензоил)-гидразинокарбонил]-трицикло[3.2.2.02,4]нон-8-ен-6-карбоновая кислота), являющееся аналогом разработанного в США соединения ST-246 и обладающее, как ранее нами было показано, сравнимой с ним, активностью в отношении ортопоксвирусов [10].

Целью данной работы являлось изучение фармакокинетических показателей субстанции отечественного противооспенного препарата НИОХ-14 в экспериментах на мышах.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали химическое соединение НИОХ-14, синтезированное в Новосибирском институте органической химии (НИОХ) им. Н. Н. Ворожцова СО РАН. Это соединение является близким структурным аналогом ST-246, обладает патентной чистотой и проявляет высокую, сравнимую с ST-246, антиортопоксвирусную активность *in vitro* и *in vivo* [3]. Чистота

[1] ФБУН “Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор” Роспотребнадзора, Россия, Новосибирская область, 630559, р. п. Кольцово; e-mail: mazurkov_oyu@vector.nsc.ru

[2] ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Россия, 630090, Новосибирск.

[3] ФГБУН Новосибирский институт органической химии им. Н. Н. Ворожцова Сибирского отделения Российской академии наук, Россия, 630090, Новосибирск.

субстанции составляла не менее 94 % и была определена методом кислотно-основного титрования в неводных средах в соответствии с требованиями ГФ XIV, ОФС.1.2.3.0014.15.

Исследование проводили на 102 аутбредных мышах ICR, самцах и самках массой 12 – 14 г, полученных из питомника ФБУН ГНЦ ВБ “Вектор” Роспотребнадзора (р.п. Кольцово Новосибирской области). Мышей на заключительной стадии выводили из эксперимента методом дислокации шейных позвонков. Протокол-заявка № ИМБТ/5-07.12 от 13.07.2012 г. на данную работу был утвержден Биоэтической комиссией ГНЦ ВБ “Вектор” по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных. Работу с лабораторными животными проводили в соответствии с требованиями соответствующих Приказов Минздрава России и ГОСТ 33215-2014 Руководства по содержанию и уходу за лабораторными животными, а текде Правилами оборудования помещений и организации процедур.

Суспензию соединения НИОХ-14 вводили мышам в дозе 50 мкг/г однократно перорально в 0,2 мл раствора метилцеллюлозы с твином-80 и в дозах 50 и 5 мкг/г в течение 10 сут. Через 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 24, 48 и 72 ч после прекращения введения НИОХ-14 производили забор крови (для получения сыворотки) и органов: легких, селезенки, почек, печени и мозга (для получения гомогенатов). Затем в образцах сыворотки крови и 50 % гомогенатах органов мышей определяли концентрацию активного вещества.

Соединение НИОХ-14 не растворяется в воде и характеризуется очень плохой растворимостью в растворителях, обычно используемых в масс-спектрометрии (ацетонитрил, спирты) [3, 6, 11, 13]. В концентрациях, необходимых для построения калибровочных кривых НИОХ-14 растворяется в 10 % ДМСО в ацетонитриле. В процессе исследования выяснилось, что в таком растворителе, а также в сыворотке крови, гомогенатах органов НИОХ-14 превращается в активный метаболит ST-246 и вторичный (неактивный) метаболит K (4-трифторметилбензойная кислота). При условии превращения НИОХ-14 в активный метаболит ST-246 менее чем за 1 ч, и регистрации первой временной точки фармакокинетической кривой через 1 ч, последний может выступать в качестве первичного (активного) продукта метаболизма НИОХ-14 и характеризовать его дальнейшие превращения в организме. В данной работе фармакокинетические показатели вторичного метаболита K в крови мышей не приведены по причине их неинформативности для оценки тканевой доступности НИОХ-14.

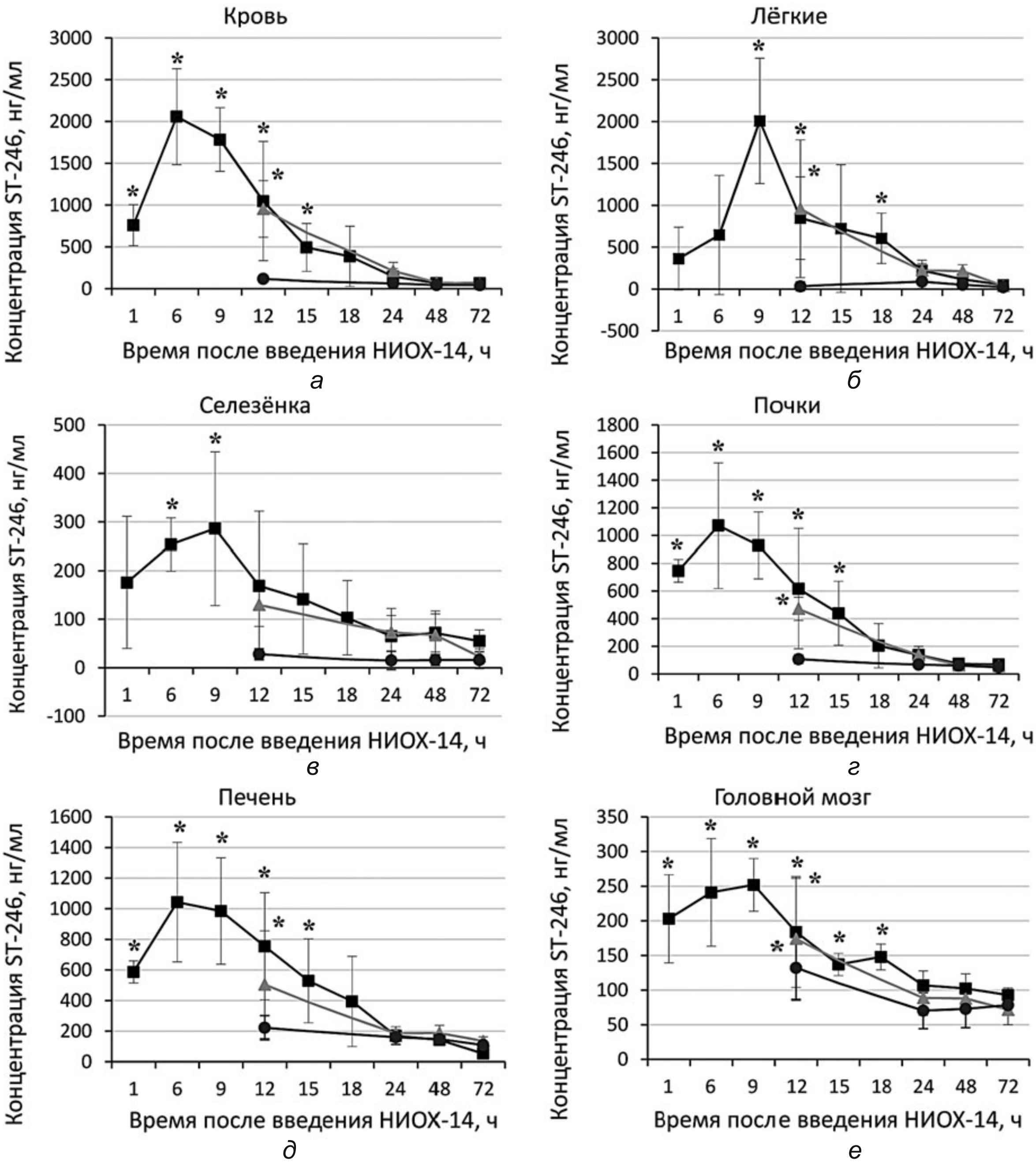
Концентрацию активного метаболита НИОХ-14, а именно ST-246, в сыворотке крови и гомогенатах органов мышей определяли методом LC-MS/MS (тандемной масс-спектрометрии — MS/MS и жидкостной хроматографии — LC) с использованием жидкостного хроматографа Agilent-1200 (фирма Agilent) и масс-спектрометра Agilent 6410 QQQ (Agilent Technologies). Получение фармакокинетических данных основано на построении зависимости изменения концентрации активного метаболита ST-246 от времени и расчете фармакокинетических параметров в программе PK Solver [14]. Масс-спектрометрический анализ проводили в режиме SRM (selected reaction monitoring) для ионов с m/z 375 (ST-246) и 337 (внутренний стандарт N-98). Концентрация внутреннего стандарта N-98 в сыворотке крови мышей составляла 5 мкг/мл, а в гомогенатах органов — 10 мкг/мл.

Построение калибровочной кривой зависимости концентрации ST-246 и интенсивности его сигнала (соотношение площадей пиков ионной плотности ST-246 и внутреннего стандарта) в сыворотке крови и гомогенатах органов мышей производили в диапазоне 0 – 40 мкг/мл (соотношение концентраций ST-246 и внутреннего стандарта). Статистическую обработку данных и построение графиков зависимости проводили в программе Origin 8.1 и Excel.

Рассчитывали основные фармакокинетические параметры НИОХ-14 в сыворотке крови и гомогенатах органах: $C_{\max}$ — максимальная концентрация вещества; $T_{\max}$ — время достижения $C_{\max}$; T1/2 — время полувыведения вещества; $AUC_{0\text{-inf}}$ — (area under the curve) площадь под кривой изменения концентрации вещества в крови (органе) от 0 до ∞; f_{T} — тканевая доступность для органов, проникновение вещества в ткани по формуле $f_{\mathrm{T}} = AUC_{0\text{-inf-T}} : AUC_{0\text{-inf-S}}$ (где $AUC_{0\text{-inf-T}}$ — площадь под кривой “концентрация — время” от 0 до ∞ в ткани органа, $AUC_{0\text{-inf-S}}$ — площадь под кривой “концентрация — время” от 0 до ∞ в сыворотке крови) [2].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунке (*а*, *б*, *в*, *г*, *д*, *е*) представлены фармакокинетические кривые активного метаболита НИОХ-14 (ST-246) после перорального однократного введения субстанции НИОХ-14 в дозе 50 мкг/г, а также после перорального введения субстанции в дозах 50 и 5 мкг/г в течение 10 сут. Как видно из рисунка, после введения субстанции НИОХ-14 в дозе 5 мкг/г в течение 10 сут концентрация активного метаболита ST-246 во всех исследованных органах животного, за исключением головного мозга (ГМ), не отличалась от порогового уровня (50 нг/мл) во все сроки после прекращения введения. В ткани ГМ (*е*) концентрация метаболита ST-246 была сравнима с показателем через 12 ч после однократного введения субстанции в дозе 50 мкг/г. Кроме того, введение субстанции НИОХ-14 в дозе 50 мкг/г в течение 10 сут, по сравнению с однократным введением не вызывало повышения концентрации активного метаболита ST-246 в сыворотке крови и органах ни до (данные не представлены), ни через 12 ч и далее после прекращения введения НИОХ-14 (рису-



Изменение концентрации активного метаболита НИОХ-14 (т.е. ST-246) в сыворотке крови (*а*), легких (*б*), селезенке (*в*), почке (*г*), печени (*д*) и головном мозге (*е*) мышей после прекращения перорального введения субстанции НИОХ-14.

Однократное введение НИОХ-14 в дозе 50 мкг/г (■). Введение НИОХ-14 по 50 мкг/г в течение 10 сут (▲). Введение НИОХ-14 по 5 мкг/г в течение 10 сут (●). Значения в каждой точке представлены как M ± SM. * – отличие от порогового уровня (50 нг/мл) по *t*-критерию Стьюдента при $p \leq 0{,}05$.

нок *а*, *б*, *в*, *г*, *д*, *е*). При этом концентрации активного метаболита ST-246 в сыворотке крови и органах после однократного и десятикратного введения субстанции НИОХ-14 в дозе 50 мкг/г достоверно отличались от порогового уровня в сроки, отмеченные на рисунке (*а*, *б*, *в*, *г*, *д*, *е*).

В результате проведения исследования были получены фармакокинетические параметры активного метаболита ST-246 субстанции НИОХ-14 в сыворотке крови и тканях органов мышей при однократном пероральном применении субстанции НИОХ-14 в дозе 50 мкг/г (таблица).

На основании полученных данных рассчитали тканевую доступность (f_T) субстанции НИОХ-14 для тканей органов — % от проникновения вещества из крови в ткани по формуле: $f_T = AUC_{0\text{-inf-T}} : AUC_{0\text{-inf-S}}$.

В таблице представлены основные фармакокинетические параметры ($t_{1/2}$, T_{max}, C_{max}, $AUC_{0\text{-inf}}$ и f_T) активного метаболита ST-246 субстанции НИОХ-14 в сыворотке крови и органах мышей.

Фармакокинетические параметры активного метаболита НИОХ-14 (т.е. ST-246) в сыворотке крови и органах мышей при однократном пероральном применении субстанции НИОХ-14 в дозе 50 мкг/г

Параметры (размерность)	Сыворотка крови	Легкие	Печень	Селезенка	Головной мозг	Почки
$T_{1/2}$, ч	4,2	12,5	5,6	8,5	13,2	5,5
T_{max}, ч	6	9	6	9	9	6
C_{max}, нг/мл	2058 ± 641	2009 ± 1746	1043 ± 514	286,3 ± 158,2	251,9 ± 38,1	1072 ± 453
$AUC_{0\text{-inf}}$, (нг/мл) · ч	23551	23972	16391	4786	6314	14910
f_T, %	-	100	69,6	20,3	26,8	63,3

Примечание: C_{max} представлена как $M \pm SM$, число животных $n = 6$.

Что касается фармакокинетических параметров химического соединения ST-246, то ранее было показано, что при его пероральном введении мышам в дозе 30 мкг/г C_{max} в плазме крови достигала 32,5 мкг/мл при $T_{max} = 2{,}7$ ч, а $T_{1/2}$ было 2,5 ч [13]. При увеличении вводимой пероральной дозы до 100 мкг/г C_{max} в плазме крови составляла 62,2 мкг/мл через $T_{max} = 1$ ч при $T_{1/2} = 2{,}5$ ч [13]. Ранее было показано, что после перорального введения мышам ST-246 в дозе 30 мкг/г C_{max} в плазме крови составляла 38 мкг/мл, а $T_{1/2} = 2{,}4$ ч, тогда как у мышей, получавших ST-246 в дозе 100 мкг/г, C_{max} в плазме крови достигала 44 мкг/мл, а $T_{1/2}$ было 2,2 ч [6]. Сравнение величин C_{max}, T_{max} и $T_{1/2}$, полученных авторами [6, 13], с соответствующими величинами в наших исследованиях провести корректно невозможно, поскольку в данных публикациях не приведены методические тонкости анализа LC-MS/MS масс-спектрометрии, который в нашей работе проводили в режиме SRM. Кроме того, мы определили концентрации НИОХ-14 в тканях органов мышей и его тканевую доступность в соответствии с Методическими рекомендациями по изучению фармакокинетики лекарственных средств [2], тогда как с соединением ST-246 подобные исследования не проводились.

Таким образом, результаты, полученные при оценке тканевой доступности субстанции НИОХ-14, позволяют характеризовать её как биодоступную при пероральном применении в эксперименте (у мышей).

ВЫВОДЫ

1. После однократного перорального введения субстанции НИОХ-14 в дозе 50 мкг/г его активный метаболит ST-246 достигал максимальной концентрации 2,06, 1,0 и 1,1 мкг/мл в плазме крови, тканях печени и почек мыши соответственно через 6 ч, а в тканях легких, селезенки и головного мозга достигал максимальных концентраций 2,0, 0,3 и 0,3 мкг/мл через 9 ч.

2. Время, в течение которого концентрация активного метаболита ST-246 в тканях снижается на 50 % (время полувыведения) после однократного перорального введения субстанции препарата НИОХ-14 в дозе 50 мкг/г составляло 4,2 ч в сыворотке крови, 12,5 ч — в легких, 5,6 ч — в печени, 8,5 ч — в селезенке, 13,2 ч — в головном мозге и 5,5 ч — в почках.

3. Выявлена высокая тканевая доступность субстанции НИОХ-14, которая составила 100, 69,6, 20,3, 26,8 и 63,3 % для легких, печени, селезенки, головного мозга и почек мыши, соответственно.

Данные исследования были проведены при финансовой поддержке Федеральной целевой программы “Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009 – 2014 годы) и государственного задания ФБУН ГНЦ ВБ “Вектор” Роспотребнадзора.

ЛИТЕРАТУРА

1. С. С. Маренникова, С. Н. Щелкунов, Патогенные для человека ортопоксвирусы. М., КМК Scientific Press Ltd. (1998). 386 с., ил. ISBN: 5-87317-051-7.
2. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*, ч. 1, Миронов А. Н. (ред.), Гриф и К, Москва (2012). 944 с.
3. Л. Н. Шишкина, А. Н. Сергеев, А. П. Агафонов и др., Патент RU № 2543338, 27.02.2015, Бюл. № 6.
4. P. D. Anderson, G. Bokor, *J. Pharm. Pract.*, **25**, 521 – 529 (2012).
5. P. Biagini, C. Thèves, P. Balaresque, et al., *N. Engl. J. Med.*, **367**, 2057 – 2059 (2012).
6. Ya. Chen, A. Amantana, Sh. R. Tyavanagimatt, et al., *PLoS One*, **6**, 8 (2011).
7. C. R. Damaso, J. J. Esposito, R. C. Condit, et al., *Virology*, **277**, 2, 439 – 449 (2000).
8. A. L Favier, O. Flusin, S. Lepreux, et al., *Case Rep. Dermatol.*, **3**, 3, 186 – 194 (2011).
9. FDA approves the first drug with an indication for treatment of smallpox, FDA News Release. URL: https: // www.fda.gov / NewsEvents / Newsroom / PressAnnouncements / ucm613496.htm (2018).
10. O. Yu. Mazurkov, A. S. Kabanov, L. N. Shishkina, et al., *Journal of General Virology.*, **97**, 1229 – 1239 (2016); doi:10.1099 / jgv.0.000422.
11. SIGA Technologies, Inc. FDA advisory committee briefing document. Tecovirimat for the treatment of smallpox Disease. Antimicrobial Division Advisory Committee Meeting, May 1, 2018, USA. URL: https: // www.fda.gov / media / 112808 / download (2018).
12. P. H. Verardi, A. Titong, C. J. Hagen, *Hum Vaccin Immunother.*, **8**, 7, 961 – 970 (2012).
13. G. Yang, D. C. Pevear, M. H. Davies, J. Virol., 79, 20, 3139 – 13149 (2005).
14. Y. Zhang, M. Huo, J. Zhou, *Comput Methods Programs Biomed.*, **99**, 3, 306 – 314 (2010).

Поступила 28.04.20

PHARMACOKINETIC INDICATORS OF NIOCH-14 COMPOUND – NEW ANTI-SMALLPOX SUBSTANCE

O. Yu. Mazurkov[1,*], L. N. Shishkina[1], N. I. Bormotov[1], M. O. Skarnovich[1], O. A. Serova[1], N. A. Mazurkova[1], M. A. Skarnovich[1], A. A. Chernonosov[2], A. Ya. Tikhonov[3], and B. A. Selivanov[3]

[1] VECTOR State Research Center of Virology and Biotechnology, Koltsovo, Novosibirsk oblast, 630559 Russia

[2] Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia

[3] N. N. Vorozhtsov Institute of Organic Chemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia

* e-mail: mazurkov oyu@vector.nsc.ru

Pharmacokinetics of the parent substance of new anti-smallpox preparation NIOCH-14 (analog of compound ST-246 developed in the United States) was studied in mice after single oral administration at a dose of 50 mg/g body weight (BW) and chronic oral administration for 10 days at doses of 50 and 5 mg/g BW. Concentration of the active metabolite (i.e. ST-246), into which NIOCH-14 is converted in blood serum and homogenates of mouse organs, was determined by liquid chromatography (LC) in combination with tandem mass spectrometry (MS/MS). Based on the pharmacokinetic parameters, the tissue availability of the substance NIOCH-14 was determined for different organs of the mouse, which was 100, 69.6, 20.3, 26.8 and 63.3% for the lungs, liver, spleen, brain and kidneys, respectively.

Keywords: pharmacokinetics; tissue availability; anti-smallpox drugs; NIOCH-14 compound; mice.