

Волгоградский государственный медицинский университет
НИИ фармакологии, лаборатория фармакологической кинетики

На правах рукописи

Сучков Евгений Александрович

**МЕТОД КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ В БИОЛОГИЧЕСКОМ
МАТЕРИАЛЕ И ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НОВОГО
ПРОИЗВОДНОГО АДЕНИНА, ОБЛАДАЮЩЕГО ПРОТИВОВИРУСНОЙ
АКТИВНОСТЬЮ**

14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук Л.А. Смирнова
Научный консультант:
доктор химических наук, профессор А.А. Озеров

Волгоград

2014

Оглавление

Введение	4
Глава 1. Фармакокинетические и биофармацевтические исследования при создании новых лекарственных средств (обзор литературы)	9
1.1. Фармакокинетические исследования при создании новых лекарственных средств	10
1.2. Значение биофармацевтических исследований при создании новых лекарственных средств	16
1.3. Аналитические методы количественного определения, применяемые при проведении фармакокинетических и биофармацевтических исследований	22
1.4. Противовирусные средства – перспективные направления поиска новых высокоэффективных препаратов	28
Глава 2. Разработка и валидация метода количественного определения соединения VMA-99-82	31
2.1. Материалы и методы.....	32
2.2. Разработка хроматографических условий метода количественного определения соединения VMA-99-82	35
2.3. Разработка метода количественного извлечения соединения VMA-99-82 из биологического материала	39
2.4. Валидация метода количественного определения соединения VMA-99-82	45
2.5. Заключение.....	65
Глава 3. Фармакокинетические свойства нового производного аденина – соединения VMA-99-82	67
3.1. Материалы и методы	68
3.2. Фармакокинетика VMA-99-82 при внутривенном введении	71
3.3. Фармакокинетические свойства соединения VMA-99-82 при внутрижелудочном введении	87

3.4. Оценка возможных путей метаболизма соединения VMA-99-82 и изменений физико-химических свойств предполагаемых метаболитов с использованием специализированной компьютерной программы PALLAS	103
3.5. Заключение	107
Глава 4. Биофармацевтическое исследование адепрофена – таблетированной лекарственной формы соединения VMA-99-82 и анализ межвидовых различий фармакокинетических параметров изучаемого соединения	111
4.1. Материалы и методы	112
4.2. Результаты исследования	113
4.2.1. Фармакокинетические и биофармацевтические свойства таблеток адепрофен	113
4.2.2. Межвидовые различия фармакокинетических свойств соединения VMA-99-82	115
4.3. Заключение	119
Глава 5. Обсуждение результатов	121
Заключение	129
Список литературы	132

Введение

Актуальность темы

Разработка и внедрение в практическое здравоохранение новых лекарственных средств является одной из актуальных и приоритетных задач. Процесс разработки новых препаратов, начиная с момента поиска перспективных биологически активных соединений и заканчивая клинической, апробацией является длительным, сложным и требует привлечения значительных ресурсов [119]. Неудовлетворительные результаты, связанные как с объективными причинами, так и с различными ошибками и несоблюдением регламентов в ходе исследований, приводит к значительным потерям и замедлением развития средств и методов фармакотерапии [56]. Поэтому необходимо проводить исследования, на всех стадиях разработки нового лекарственного средства, основываясь на правилах и нормативах проведения доклинических и клинических испытаний, разработки и выполнения аналитических методов, принципах доказательной медицины и биоэтики [46, 61, 73, 74, 134].

Проведение фармакокинетических и биофармацевтических исследований является обязательным этапом проведения как доклинической, так и клинической стадии испытаний. Получаемые в ходе исследования данные о фармакокинетики изучаемого лекарственного средства служат основанием для планирования следующих стадий его разработки [124]. Проведение такого рода исследований невозможно без использования современных высокоточных аналитических методов количественного определения изучаемого биологически активного вещества в различных объектах, в том числе в биологическом материале [194].

Степень разработанности

Многие из применяемых сегодня противовирусных препаратов либо имеют не слишком высокую эффективность, либо характеризуются наличием значительного числа нежелательных побочных реакций. Соответственно, поиск новых безопасных средств фармакотерапии с высокой противовирусной активностью остается актуальной проблемой. Перспективным направлением ее решения является разработка ингибиторов вирусной репликации нуклеозидной

природы. Большой интерес представляют 9-производные аденина, проявляющие высокую противовирусную активность. Проведение направленного синтеза в сочетании со скрининговыми исследованиями позволило выделить ряд соединений-лидеров по эффективности и безопасности, что требует дополнительных, более широкомасштабных исследований.

Все вышесказанное определило цели и задачи данного исследования.

Цель и задачи исследования

Целью настоящего исследования является разработка метода количественного определения нового производного аденина, обладающего противовирусной активностью, и изучение его фармакокинетических и биофармацевтических свойств.

Для реализации вышеуказанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Разработать и валидизировать метод высокоэффективной жидкостной хроматографии количественного определения соединения VMA-99-82 в биологическом материале.
2. Провести фармакокинетическое исследование и рассчитать фармакокинетические параметры соединения VMA-99-82 при внутривенном и пероральном путях введения.
3. Изучить распределение исследуемого соединения по органам и тканям при внутривенном и пероральном путях введения.
4. Изучить экскрецию соединения VMA-99-82 при внутривенном и пероральном путях введения.
5. Провести биофармацевтический анализ таблетированной лекарственной формы VMA-99-82 – адепрофена.

Научная новизна

Впервые разработан и валидизирован метод высокоэффективной жидкостной хроматографии количественного определения соединения VMA-99-82 в биологическом материале. Впервые проведено фармакокинетическое исследование нового производного аденина, обладающего противовирусной

активностью. Впервые проведено биофармацевтическое исследование таблетированной лекарственной формы соединения VMA-99-82 – адепрофена.

Теоретическая и практическая значимость работы

Работа носит фундаментальный и прикладной характер. В результате проведенных исследований определены аналитические свойства нового производного аденина соединения VMA-99-82, изучены его фармакокинетические и биофармацевтические характеристики, что легло в основу создания таблетированной лекарственной формы – адепрофена.

Диссертационная работа выполнена по ФЦП «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» в рамках госконтракта № 11411.1008700.13.077 с Минпромторгом России.

Внедрение результатов исследования

Результаты исследования и перспективы внедрения в практику соединения VMA-99-82 включены в материал лекций и практических занятий для студентов, слушателей факультета постдипломного образования и факультета усовершенствования врачей ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России.

Результаты исследования внесены в комплексный отчет по проделанной работе в рамках госконтракта № 11411.1008700.13.077 с Минпромторгом России.

Методология исследования

Дизайн исследования и полученные практические результаты согласуются с основными положениями и принципами проведения доклинических испытаний, а так же разработки и валидации аналитических методов. Работа проводилась с соблюдением правил научных исследований и основывалась на принципах биоэтики.

Теоретической и методологической основой исследования послужили фундаментальные и прикладные исследования отечественных и зарубежных ученых по данной проблеме, публикации в периодических изданиях, методические рекомендации. Теоретический анализ обзора литературы подкреплялся экспериментальными лабораторными данными.

Положения выносимые на защиту

1. Разработан и валидизирован метод высокоэффективной жидкостной хроматографии, позволяющий определять соединение VMA-99-82 в биологическом материале с достаточной чувствительностью, селективностью и точностью.
2. Установлена высокая абсолютная биодоступность при пероральном пути введения, неоднородность распределения по органам и тканям, низкое содержание неизменной субстанции в экскретах, что позволяет сделать предположение об активном метаболизме.
3. Разработанная таблетированная лекарственная форма является оптимальной, так как выявлена ее высокая относительная биодоступность.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных в данной работе результатов обусловлена однородностью выборки объектов эксперимента, использованием валидизированного метода количественного анализа биологических проб, применением адекватных методов биомедицинской статистики, согласованностью с результатами опубликованных ранее исследований, теоретическим обоснованием полученных экспериментальных данных.

Основные положения диссертации представлены на 71-ой открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов ВолгГМУ с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» (Волгоград, 2013); 72-ой открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов ВолгГМУ с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» (Волгоград, 2014).

Личный вклад автора

Автором самостоятельно проведен поиск и анализ зарубежных и отечественных источников литературы по теме работы. Вклад автора является определяющим и заключается в непосредственном участии на всех этапах

исследования по разработке метода количественного определения и изучению фармакокинетических свойств нового производного аденина – соединения VMA-99-82: решения поставленных задач, обсуждения результатов, составлении практических рекомендаций. Автору принадлежит ведущая роль в проведении экспериментальных исследований на всех его этапах. При написании диссертационной работы автором лично выполнен сбор первичных данных, статистическая обработка, анализ и обобщение полученных результатов, формулировка выводов и практических рекомендаций, оформление рукописи.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 155 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, 3 глав собственных исследований, обсуждения результатов, заключения и списка литературы, включающего 111 отечественных и 91 зарубежный источник. Работа иллюстрирована 20 таблицами и 36 рисунками.

Глава 1. Фармакокинетические и биофармацевтические исследования при создании новых лекарственных средств

Поиск и изучение новых биологически активных веществ, способных стать эффективными средствами фармакотерапии различных заболеваний, является одной из важнейших задач современной медицины [119, 124, 160].

Полученные в результате синтеза или выделенные из различного сырья, отобранные в результате скрининговых исследований или при помощи методов *in silico*, перспективные биологически активные вещества после ряда предварительных исследований направляется на стадию доклинических испытаний [17].

Доклинические исследования – это испытания, проводимые обычно на различных моделях в условиях *in vitro* и *in vivo*, до начала клинического этапа. Они являются начальным этапом в разработке новых лекарственных средств. На доклинической стадии изучаются соединения, продемонстрировавшие перспективность в ходе предварительных исследований. Доклинические испытания являются переходом от открытия нового биологически активного вещества к клиническим испытаниям и дальнейшему внедрению лекарственного средства в практику. При проведении доклинических исследований лекарственного препарата выделяют три основных направления: изучение фармакологической активности, токсикологических свойств и фармакокинетических свойств действующего вещества и лекарственной формы и проведение биофармацевтического исследования [10, 73].

После прохождения этого этапа возможно начало клинических испытаний. Это изучение лекарственного препарата при приеме его добровольцами (пациентами или здоровыми добровольцами), что позволяет более полно оценить его эффективность и безопасность, а также изучить и подтвердить его свойства, провести оценку всасывания, распределения, метаболизма, выведения и взаимодействия с другими лекарственными средствами [44, 74, 164].

Соответственно, этот этап также требует проведения фармакокинетических и биофармацевтических исследований [137, 181].

1.1. Фармакокинетические исследования при создании новых лекарственных средств

Методическая основа фармакокинетики – количественный анализ и математическое моделирование кинетики изменения концентраций лекарственного средства в биосредах организма, создание аналитических методов измерения микро- и нанограммовых концентраций изучаемых препаратов и продуктов их биотрансформации (метаболизма) в сложных многокомпонентных системах [79].

Кинетика основных процессов взаимодействия лекарственного средства с организмом составляет предмет исследования, цель которого – выяснение природы этих взаимодействий, а задачи – поиск зависимости от свойств препарата и организма. В результате таких исследований появляется возможность решения прикладных задач, связанных с избирательностью действия, использованием особенностей фармакокинетики при лечении, созданием оптимальных по эффективности и безопасности лекарственных средств и их лекарственных форм [19, 50, 101, 173].

Для обработки и интерпретации данных применяют методы математического моделирования, начиная с выбора структурной схемы моделируемого явления на уровне упрощения реальной системы. В камерных моделях схему «организм/лекарственное средство» рассматривают как совокупность абстрактных камер, между которыми и внутри которых происходят процессы распределения, превращения (метаболизма) и выведения. Самая простейшая модель – однокамерная. При более сложных схемах фармакокинетики, когда анализ данных показывает невозможность их описания в рамках просто однокамерной модели, могут применяться двух- и многокамерные, для описания которых используется более сложный математический аппарат [177].

В последнее время при проведении фармакокинетических исследований все более широкое распространение получает физиологический подход. Он предусматривает использование математических моделей, основанных на реальных анатомических структурах и физиологических функциях организма [146,

183]. Однако построение таких моделей весьма сложно и по ограниченному числу измерений концентрации изучаемого препарата в биологическом материале проблематично описать все параметры. В таких ситуациях используется модельнонезависимый подход, который не требует построения специальной математической модели, а позволяет рассчитать ряд физиологически обусловленных фармакокинетических параметров по имеющимся результатам измерений. Немодельный подход основан на теории статистических моментов [132, 195]. Основные соотношения немодельного подхода аналогичны таковым модельным, при условии линейности системы [128, 198].

Фармакокинетические исследования проводятся как на доклиническом, так и на клиническом этапах разработки новых лекарственных средств, а также при подборе оптимальной лекарственной формы и разработке технологии ее изготовления [26, 149, 196].

При создании нового лекарственного средства на этапе доклинических испытаний изучением процессов всасывания, распределения и выведения лекарственных веществ, возможностей и схем связывания препарата с транспортными белками и форменными элементами крови, путей биотрансформации изучаемого соединения и выявлением его возможных активных метаболитов, прояснением вклада активных метаболитов в динамику развития эффекта занимается экспериментальная фармакокинетика.

Непосредственно изучением закономерностей всасывания, распределения и выведения лекарств в организме пациента, развития терапевтического эффекта, влияния дозы и особенностей макроорганизма занимается клиническая фармакокинетика [40]. Еще одним важным и активно развивающимся в последние годы направлением клинической фармакокинетики является терапевтический лекарственный мониторинг [60]. Во многих случаях назначение средних доз без контроля концентрации лекарственного средства в крови может приводить к непредсказуемым последствиям. Изменение концентрации лекарственного препарата в крови может быть вызвано: взаимодействием с другими препаратами, пищей, депонированием в тканях, изменением метаболизма. Своевременная

информация об изменении концентрации лекарственного препарата в крови или других биологических жидкостях позволит скорректировать схему фармакотерапии [5, 78, 139, 164, 198].

Фармакокинетический процесс можно представить в виде следующих взаимосвязанных параллельно протекающих этапов:

- Высвобождение лекарственных средств из лекарственных форм и/или места введения (например, мышечная ткань при внутримышечном введении).
- Абсорбция лекарственных средств – проникновение через биологические мембраны в сосудистое русло, связывание с белками плазмы.
- Распределение лекарственных средств в биологических жидкостях, органах и тканях организма, взаимодействие со специфическими рецепторами.
- Биотрансформация лекарственных средств – биохимические процессы превращения (метаболизма) с изменением фармакологических свойств и образованием активных/неактивных метаболитов.
- Экскреция лекарственных средств – процессы, направленные на элиминацию метаболитов и неизмененного лекарственного вещества из организма.

Стадия распределения лекарственного средства и взаимодействия со специфическими рецепторами, по сути, является стадией наступления терапевтического эффекта. Продолжительность и сила его во многом зависят от уровня концентрации препарата в крови и длительности его циркуляции, а также от выраженности и скорости процессов биотрансформации и элиминации [29].

На все стадии фармакокинетического процесса оказывают значительное влияние ряд факторов, которые необходимо учитывать при проведении фармакокинетических исследований:

1. Внешние факторы – окружающая среда (сезон, температура, парциальное давление кислорода); физико-химические свойства

лекарственного средства (растворимость, полярность, наличие радикалов, изомерия и т.д.); характеристики поступления препарата в организм (лекарственная форма, путь введения, дозировка, длительность приема и т.д.)

2. Внутренние факторы – характеристики организма (видовые и этнические характеристики, пол, возраст, генотип и фенотип); физиологические параметры организма (режим питания, физические нагрузки, стрессы, циркадные ритмы, состояния беременности и лактации); патологические состояния (различные заболевания, в особенности патологии печени и почек, алкоголизм, курение и т.д.) [55, 153, 186].

Все стадии взаимодействия лекарственного средства с организмом количественно характеризуются фармакокинетическими параметрами. Это величина максимальной концентрации (C_{max}) и время ее достижения (T_{max}), клиренс (Cl), константа элиминации (K_{el}), период полувыведения ($T_{1/2}$), объем распределения (V_d), площадь под фармакокинетической кривой (AUC), биодоступность (F). Наибольшее практическое значение имеют показатели клиренса, характеризующего процессы элиминации лекарственного средства из организма; константа элиминации и период полувыведения - используемые для расчета режима дозирования; объем распределения, характеризующий интенсивность распределения препарата в органы и ткани и указывающий на возможность депонирования лекарственного средства. Биодоступность является также весьма важной характеристикой отражающей интенсивность поступления лекарственного средства в системный кровоток. Различают абсолютную биодоступность, когда сравнивают значения AUC при внесосудистом пути введения с аналогичными данными при внутривенном введении и относительную биодоступность когда сравниваются показатели AUC только при внесосудистом введении (например сравнение субстанции и лекарственной формы или различных лекарственных форм) [82, 118, 131].

Для наступления терапевтического эффекта необходимо чтобы

лекарственное средство поступило в кровоток и, соответственно скорость и сила развития эффекта во многом зависят от пути введения и лекарственной формы препарата [140, 150].

После попадания лекарственного средства в организм и всасывания начинается распределение состоящее из следующих основных элементов:

- Связывание с белками и форменными элементами крови
- Поступление в эффекторные органы и ткани
- Поступление в органы, осуществляющие биотрансформацию и выведение

Большинство лекарственных средств находятся в крови в свободном виде лишь частично, большая часть связана с белками переносчиками. Степень связывания лекарственного средства с белками крови значительно влияет на силу и скорость наступления терапевтического эффекта, так как лишь свободная фракция препарата вступает во взаимодействие с эффекторными системами. Лишь для части лекарственных средств существуют специфические транспортные белки, основная масса взаимодействует с неспецифическими альбуминами плазмы. Функция белков-переносчиков не ограничивается только транспортом лекарственного средства, они также оказывают значительное влияние на проникновение его в клетки-мишени. Так, например, наиболее широко изученный транспортный белок гликопротеин Р является насосом, удаляющим во внеклеточное пространство молекулы различных ксенобиотиков [92, 107]. Локализуясь в энтероцитах, осуществляет выброс чужеродных веществ, в том числе различных лекарств, в просвет кишечника. Гликопротеин Р гепатоцитов осуществляет экскрецию лекарственных средств в желчь; также он локализован на мембранах различных гистогематических барьеров [110, 127, 178, 179, 185].

Распределение лекарственных средств по органам и тканям, как правило, носит неравномерный характер и зависит главным образом от степени васкуляризации и функционирования гистогематических барьеров. В общем виде распределение препарата будет активнее в органы и ткани с высоким уровнем кровоснабжения (мозг, почки, легкие), уменьшаясь при среднем (мышцы) и

низком (жировая ткань) уровне. Указанная закономерность соблюдается лишь при свободном доступе лекарственных средств в органы и ткани, чему препятствуют гистогематические барьеры. Так, например, в зависимости от способности проникать через гематоэнцефалический барьер можно судить о наличии у препарата центрального действия и степени его выраженности [52, 100, 120, 122, 159, 178, 202].

На стадии биотрансформации с лекарственными средствами происходят различные химические превращения под действием соответствующих ферментов. Как правило, это сложные многостадийные процессы с последовательным задействованием различных ферментов биотрансформации. Все это направлено на изменение фармакологической активности и скорейшее выведение из организма (то есть снижение липофильности и увеличение гидрофильности) [88, 89, 116, 188]. Изменение активности лекарственных средств протекает в трех основных направлениях:

- Лекарственное средство теряет активность.
- Образуется метаболит, сохраняющий активность исходного вещества или приобретающий другой вид фармакологической активности.
- Неактивное лекарственное средство приобретает в результате превращений в организме активность (пролекарства).

Учитывая возможность образования фармакологически активных метаболитов, необходимо оценивать возможные пути метаболизма и изучать фармакокинетику не только исходного вещества, но и активных метаболитов [41, 138, 163, 189, 201].

Основной орган, отвечающий за процессы биотрансформации, это печень. Выделяют две группы лекарственных средств, метаболизирующихся в печени – вещества с высоким печеночным клиренсом и с низким. Градация веществ зависит от активности ферментных систем и от скорости печеночного кровотока в зависимости от преобладания одного из этих факторов препарат и относят к одной из этих групп. Для веществ с высоким печеночным клиренсом характерен ярко выраженный эффект «первого прохождения» через печень. Помимо печени в

процессах биотрансформации играют довольно значимую роль ферментные системы, локализованные в кишечнике, легких и почках [39, 112, 144, 147, 168, 154].

Экскреция – это завершающая часть многоэтапного процесса удаления ксенобиотиков из организма. Лекарственные вещества элиминируются из организма через все органы и ткани, но основная роль принадлежит печени и почкам. Через почки наиболее просто элиминируются гидрофильные лекарственные средства или метаболиты. В экскреции через почки липофильных веществ активную роль играют различные транспортные системы. В печени лекарственные вещества экскретируются с желчью при активном участии различных транспортных систем, в зависимости от их липофильности и молекулярной массы. При таком пути выведения может иметь место гепатодуоденальная циркуляция препарата, когда экскретированное лекарственное средство повторно всасывается в кишечнике, что удлиняет время нахождения его в организме и, соответственно, длительность эффекта [86, 98, 123, 165, 169, 170, 192, 197, 199].

1.2. Значение биофармацевтических исследований при создании новых лекарственных средств

Клиническую эффективность фармакотерапии распространенных заболеваний человека можно повысить за счет создания принципиально новых лекарственных форм даже хорошо известных, всесторонне изученных и апробированных лекарственных средств. Активная работа в данном направлении диктуется потребностью современной медицины в эффективных и безопасных препаратах, сочетающих специфичность действия при определенных заболеваниях с широким терапевтическим спектром, позволяющими одним и тем же лекарственным средством осуществлять фармакотерапию различных патологических состояний. Помимо этого к важнейшим характеристикам современных лекарственных средств относятся безопасность,

продолжительность действия, возможность индивидуального подхода к дозированию [16, 57].

Биофармация – относительно недавно появившийся раздел фармацевтической науки, предметом исследования которой являются взаимодействия лекарственных веществ в лекарственных формах, обусловленные их физико-химическими свойствами; взаимосвязи самих лекарственных форм и терапевтического действия. В связи с тем, что фармакотерапевтическая эффективность препаратов определяется процессами их абсорбции (всасывания), распределения и элиминации (выведения) из макроорганизма, биофармация уделяет особое внимание изучению этих процессов, как и влиянию на них физико-химических свойств лекарственных форм [93, 96].

Главной задачей биофармации является увеличение действенности лекарственных веществ и сведение к минимуму возможных нежелательных побочных реакций [80]. Соответственно, в фармацевтический комплекс знаний, где ранее единственными критериями качества лекарств служили их физико-химические константы, вводятся новые положения, имеющие биологическое, медицинское обоснование. Согласно современным биофармацевтическим представлениям, процессы получения (выделения) лекарственных веществ, способы их очистки, сушки, измельчения, получение лекарственных форм, методы введения в организм и т. д. могут существенным образом повлиять на терапевтический эффект. Строгое и подробное изучение всех аспектов получения и назначения лекарственных средств и составляет основное содержание биофармацевтического исследования. Исходя из вышесказанного, биофармацию можно определить как науку, занимающуюся изучением влияния фармацевтических факторов на терапевтическую эффективность лекарственных препаратов.

Основной задачей биофармации является изучение зависимости терапевтической эффективности лекарственных средств от следующих групп фармацевтических факторов.

1. Химические свойства лекарственных веществ.

2. Физическое состояние лекарственных веществ.
3. Природа и количество вспомогательных веществ.
4. Вид лекарственной формы и путь введения препарата в организм.
5. Технологические операции, проводимые при получении лекарственных средств.

Первая группа факторов учитывается в случаях внесения некоторых незначительных корректировок в основную химическую структуру препарата, при отсутствии значительных изменений последней, что может изменить фармакотерапевтическое действие препарата. Соответственно, следует с особым вниманием относиться к возможным, даже незначительным, изменениям в химической структуре молекулы лекарственного вещества, что иногда выглядит перспективно по технологическими или экономическими показателям [81].

Факторы второй группы - физическое состояние лекарственных веществ. Наиболее существенными по влиянию из них являются степень измельчения и полиморфизм.

Степень измельченности частиц лекарственного вещества имеет не только технологическое значение. От размера частиц во многом зависят скорость и полнота всасывания лекарственного вещества при любых способах введения, исключая внутривенный, а также его концентрация в крови.

Полиморфизм – способность одного и того же вещества давать разные по форме кристаллы. Полиморфные модификации образуют многие химические, в том числе и лекарственные вещества. При этом в случае образования полиморфных модификаций одно и то же в химическом отношении вещество обладает различными физическими свойствами. Многие лекарственные вещества имеют три - пять и более полиморфных модификаций, которые характеризуются отличающимися значениями константы стабильности, температуры фазового перехода, растворимости и прочее, что в конечном итоге определяет как сохранность самого препарата, так и его фармакологическую активность. При этом особое значение имеет факт различной растворимости, так как абсорбция лекарственных веществ сильно зависит от данного параметра [11, 12, 45].

Полиморфные превращения лекарственных веществ возможны как при их получении (выделении), очистке и сушке, так и при изготовлении лекарственных форм. Также это может происходить в процессе хранения и в таком случае полиморфные превращения зависят от условий и сроков хранения, от вида применяемых при изготовлении лекарственных форм вспомогательных веществ. Явления полиморфизма может быть использовано и с пользой, что невозможно без знания полиморфных превращений различных фармакологически активных соединений [13].

Огромную роль в технологии лекарственных форм играет правильный выбор вспомогательных веществ. Ни один фармацевтический фактор не оказывает столь значительного и сложного влияния на действие препарата. Вспомогательные вещества – это большая группа веществ природного и синтетического происхождения, помогающих получить определенные лекарственные формы с необходимыми физико-химическими и терапевтическими свойствами [48, 108].

Вспомогательные вещества являясь основой действующих веществ, в свою очередь обладают определенными физико-химическими свойствами, которые в зависимости от природы лекарственного вещества и технологических процессов получения лекарственной формы способны вступать в многообразные сложные взаимодействия, как с препаратами, так и с факторами внешней среды. Вспомогательные вещества не являются полностью индифферентными и практически во всех случаях их применения, так или иначе, оказывают воздействие на систему фармакологическое средство – макроорганизм. В зависимости от фармакотерапевтического случая и состава лекарственного средства они даже могут играть роль действующего вещества и, наоборот [94, 103, 105].

При использовании вспомогательных веществ требуется основываться на знании их возможного влияния не только на физико-химические свойства лекарственных форм, но и на терапевтическую эффективность лекарственных средств [30, 95].

Еще одной из важнейших задач биофармации является теоретическое обоснование лекарственной формы, выяснение ее роли и места в фармакотерапии. Максимальная эффективность любого препарата достигается только назначением его в рациональной, научно обоснованной лекарственной форме. Ее выбор определяет путь введения лекарственного средства в организм. От этого будет зависеть, промежуточные этапы препарата до того как попадет в кровь и его эффективность [31, 37, 109].

Процессы всасывания и выведения препаратов из организма в весьма значительной степени зависят от вида используемой лекарственной формы. На основании результатов современных биофармацевтических исследований доказано, что лекарственная форма оказывает ощутимое, измеримое количественно влияние на вышеуказанные процессы [22, 57].

Пятая группа фармацевтических факторов включает в себя разнообразные стадии технологических процессов получения лекарственных веществ (очистка, сушка, измельчение, просеивание, смешение, растворение и т. д.), а также применение каких-либо специальных технологических операций при изготовлении частных лекарственных форм. Результаты биофармацевтических исследований подводят строгий научный базис под объяснение влияния технологических процессов, способов получения лекарственных средств на развитие фармакотерапевтического эффекта.

В настоящее время доказано, что способ получения лекарственных форм во многом определяет стабильность препарата, скорость его высвобождения из лекарственной формы, интенсивность всасывания и его терапевтическую эффективность [31].

Современная фармация уделяет большое внимание разработке рациональных, научно обоснованных методов получения лекарственных средств с учетом положений биофармации о возможном влиянии самих технологических процессов на активность препаратов [22, 23].

Еще одним немаловажным направлением биофармации является проведение исследований биоэквивалентности генерических препаратов.

Изучение которых проводится в сравнении с оригинальным лекарственным средством. Лекарственные средства считаются биоэквивалентными, если являются фармацевтическими эквивалентами и обладают одинаковыми значениями биодоступности при введении в одной дозировке [7, 9, 34, 68, 97].

Объектами исследований биоэквивалентности являются воспроизведенные лекарственные средства, предназначенные для приема внутрь, кожной аппликации, ректального введения при условии, что их действие опосредовано появлением действующего вещества в системном кровотоке. Оценка биоэквивалентности проводится для всех лекарственных форм пролонгированного действия; форм, обеспечивающих немедленное высвобождение лекарственного средства при приеме внутрь (таблетки, капсулы, суспензии и др., за исключением растворов); трансдермальных терапевтических систем; ректальных и вагинальных суппозиториях, а также комбинированных лекарственных препаратов (по основным компонентам). Исследования биоэквивалентности не проводятся для лекарственных средств, предназначенных для введения путем ингаляции [20, 32, 65, 70, 113, 125, 126].

Исследования биоэквивалентности позволяют сделать обоснованные заключения о качестве сравниваемых препаратов по значительно меньшему объему первичной информации и в более сжатые сроки, чем при проведении полномасштабных клинических испытаний. Соответственно, значительно ниже и стоимость подобных исследований [63, 87, 106, 129, 161, 191].

Оценка биоэквивалентности всех лекарственных препаратов (за исключением случаев, когда возможно развитие тяжелых нежелательных побочных эффектов при однократном приеме) проводится на здоровых добровольцах [114, 142, 145].

1.3. Аналитические методы количественного определения, применяемые при проведении фармакокинетических и биофармацевтических исследований

Необходимое условие для проведения фармакокинетических и биофармацевтических исследований – разработка методов идентификации и количественного определения лекарственных веществ и их метаболитов в различном биологическом материале [42, 174].

Можно выделить следующие особенности проведения подобных исследований:

1. Изучаемые вещества обладают сложной химической структурой с рядом возможных метаболитов и аналогов, близких по строению, что подразумевает высокие требования к селективности.

2. Концентрации аналитов невысоки, чаще всего требуется определение микро- и нанограммовых количеств.

3. Исследуемые лекарственные вещества и их метаболиты, как правило, необходимо определять в биологическом материале.

4. Метод количественного извлечения изучаемого вещества из биологической матрицы в значительной степени зависит от биологического материала, подвергаемого исследованию.

Биологический материал – очень сложный объект для исследования. Помимо аналита/аналитов содержит значительное количество прочих веществ, количество которых в значительной мере зависит от типа биологического материала, методов подготовки проб и количественного определения [75]. Еще одной характерной особенностью работы с биоматрицами является их высокая динамичность, зависящая от временных/календарных периодов, режима питания, нагрузок, патологических состояний и многого другого. Изучаемые лекарственные средства, попадая в организм, могут давать в результате реакций биотрансформации от нескольких до нескольких десятков метаболитов [76]. Таким образом, выделение нужного вещества из сложной смеси, его корректная

идентификация и количественное определение является очень сложной аналитической задачей [156, 166, 180, 187].

Низкие концентрации изучаемых веществ (микрограммовые и нанограммовые количества) обуславливают необходимость высокой чувствительности аналитических методов, применяемых для проведения данных исследований [148, 194].

Наличие значительного количества примесей в объектах исследования и необходимость четко идентифицировать исследуемое лекарственное вещества обуславливает высокие требования к селективности методов количественного определения и возможность разделения исследуемых аналитов и эндогенного фона биологического материала [38, 133].

Существует большое число самых разнообразных методов определения концентрации лекарственных веществ в биологических объектах: микробиологические, спектрофотометрические, поляриметрические, иммунологические (радиоиммунные, иммуноэнзимные и др.), радиоизотопные, хроматографические и т.д. Наиболее применимыми при проведении фармакокинетических исследований являются иммунологические и хроматографические методы [14, 141, 151].

Все более широкое распространение получают различные иммунологические методы за счет простоты и скорости проведения анализа. Данные методы основаны на взаимодействии специфических белковых антител с изучаемым соединением, выступающим в роли антигена. От концентрации аналита напрямую зависит количество образующегося в результате реакции комплекса антиген-антитело [27]. Для количественной оценки используют два основных способа: гетерогенные методы (с отделением комплекса) и гомогенные методы (без отделения комплекса). В том и другом случае определяется, сколько изучаемого вещества (антигена) оказалось связанным с антителом. Для этого пробу биологической жидкости с неизвестной концентрацией анализируемого вещества добавляют к сыворотке, в которой белок-антитело связан в комплекс с маркером (меченый аналог аналита). Аналит вытесняет из комплекса маркер в

количествах, соответствующих его концентрации в пробе. Определив сколько меченого аналога оказалось вытеснено, можно рассчитать искомый уровень вещества в пробе. Иммунологические методы различаются по видам метки в маркере: флуоресцентная метка, радиоактивная метка, свободно-радикальная метка, ферментная и т.п. [28, 130, 182, 193].

Явными преимуществами иммунологических методов является высокая чувствительность определения, хорошая селективность, простота проведения анализа, относительно малый объем образца крови для проведения анализа, экспрессность. К недостаткам этих методов можно отнести следующее: относительно высокую стоимость определения, необходимость специфического оборудования. Кроме того, иммунологические методы малоприменимы именно при изучении фармакокинетических свойств новых биологически активных веществ, т.е. в области экспериментальной фармакокинетики. Для новых, ранее не изучавшихся соединений отсутствуют готовые наборы реактивов для проведения анализа. Поэтому иммунологические методы наиболее распространены в области исследований биоэквивалентности, где изучаются уже известные лекарственные вещества, для которых разработаны схемы проведения анализа и подобраны метки и специфические антитела [190].

Также вышеуказанным требованиям к проведению количественного определения лекарственных веществ в биологическом материале в полной мере соответствует метод высокоэффективной жидкостной хроматографии, что обуславливает его стремительное развитие в последние десятилетия. Метод основан на неравномерном распределении различных веществ в слое сорбента, в зависимости от их физико-химических свойств [21, 33, 90, 104].

Хроматография – это комплексная научно-техническая дисциплина, включающая в себя:

- Теоретические разделы, посвященные законам сорбции и массопередачи в динамических условиях, межмолекулярным взаимодействиям сорбат-сорбент;

- Методологические и прикладные исследования, направленные на создание общих подходов и конкретных режимов разделения и анализа;
- Исследования по созданию материального фундамента хроматографии – приборов, сорбентов.

Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии является продолжением и развитием классической колоночной хроматографии, в котором могут использоваться самые различные методы сорбции [4]. По сути дела, высокоэффективная жидкостная хроматография является современной формой реализации классической жидкостной колоночной хроматографии, которой свойственны:

- Высокая скорость процесса, позволившая сократить продолжительность разделения от нескольких часов и суток до минут;
- Минимальная степень размывания хроматографических зон, что дало возможность разделять соединения, лишь незначительно различающиеся по константам сорбции;
- Высокая степень механизации и автоматизации разделения и обработки информации, благодаря чему колоночная жидкостная хроматография достигла нового уровня воспроизводимости и точности.

Именно эти ключевые особенности превратили ВЭЖХ в мощнейший из современных методов анализа сложных смесей [91]. Стремительное развитие метода и все более широкое производство оборудования и комплектующих, обуславливает рост числа лабораторий, делая метод достаточно рутинным и доступным в воспроизводстве [49].

Высокоэффективная жидкостная хроматография является универсальным и эффективным аналитическим методом, в связи с чем получила достаточно широкое распространение в самых различных отраслях науки и промышленного производства [2, 18, 66, 71, 99, 111]

В соответствии с преобладающим механизмом разделения веществ на аналитической колонке проводят разделение на основные типы, что является достаточно условным, так как обычно мы имеем дело со смешанным механизмом разделения аналитов. Существует несколько основных вариантов высокоэффективной жидкостной хроматографии: нормально-фазовая, обращенно-фазовая, ионообменная хроматография, хроматография на динамически модифицированных сорбентах, ион-парная хроматография, эксклюзионная хроматография [6, 53, 54, 72, 136].

Обязательным условием разработки любого аналитического метода является проведение его валидации. Валидация аналитической методики является процедурой, проводимой для подтверждения ее применимости для проведения данного анализа. Каждая аналитическая методика содержит ряд декларируемых показателей, которые называют валидационными характеристиками. Их типичный набор: специфичность, точность, прецизионность, повторяемость, воспроизводимость, предел количественного определения (чувствительность) и предел обнаружения [3, 15, 64, 69, 121, 175].

Специфичность (селективность) – это способность однозначно идентифицировать и оценить анализируемое вещество в присутствии прочих компонентов. Обычно они включают примеси, продукты разложения, компоненты матрицы и т.д. Данный параметр гарантирует точность идентификации аналита и получение достоверного результата при количественном определении [134].

Точность аналитической методики это степень близости между значением, которое принято либо как традиционно правильное, либо как абсолютное стандартное, и найденным в ходе измерений значением, выраженная в процентах. Данный параметр оценивается минимум по четырем концентрационным точкам с 5 параллельными образцами для каждой. Измеряемые значения не должны отклоняться от номинала более чем на 15% (20% для предела количественного определения) [134].

Прецизионность аналитической методики выражает степень близости (степень разброса) между сериями измерений, полученных на многих пробах одного и того же гомогенного образца в указанных условиях. Прецизионность исследуют, используя гомогенные, подлинные образцы. Оценка проводится для тех же количеств образцов, что и в случае с оценкой точности. Данный параметр выражается в виде коэффициента вариации, который не должен превышать 15% (20% для предела количественного определения) [134].

Повторяемость является выражением точности измерения в одних и тех же условиях в течение определенного, небольшого промежутка времени (внутридневные колебания). Рассчитывается параллельно с точностью и прецизионностью по аналогичному набору стандартных образцов. Данный параметр не должен выходить за пределы 15% [69].

Воспроизводимость это степень сходимости результатов, полученных анализом одних и тех же образцов при различных нормальных условиях. Разные лаборатории, операторы оборудования, инструменты, партии реактивов, температура окружающей среды, различное время проведения анализов и т.п. В условиях одной лаборатории, как правило, оценивается в течении трех дней (междневные колебания). Данный параметр не должен выходить за пределы 15% [69].

Предел обнаружения – минимальная концентрация аналита в образце, которая может быть обнаружена, но не определена количественно в условиях анализа. Этот предел оценивается анализом образцов с известными концентрациями аналита и установлением минимального уровня исследуемого вещества, при котором оно может быть достоверно обнаружено [134].

Предел количественного определения (чувствительность) – наименьшая концентрация анализируемого вещества в образце, которую можно количественно определить с необходимой точностью и прецизионностью. Значение данного параметра устанавливается анализом серии образцов, начиная от предела обнаружения, с дальнейшим расчетом прочих валидационных характеристик [134].

Проведение валидации является завершающей стадией разработки любого аналитического метода и после подтверждения, что валидационные характеристики находятся в пределах нормы, он может быть использован для дальнейшей исследовательской работы [25, 67, 77, 117, 143, 176, 184].

1.4. Противовирусные средства – перспективные направления поиска новых высокоэффективных препаратов

Рост числа заболеваний вирусной природы, а также высокая изменчивость вирусов под влиянием факторов среды, обуславливающая вероятность появления различных осложнений и развития резистентности, ставят задачу поиска и внедрения в практику новых эффективных противовирусных средств. Это одна из актуальнейших проблем современной медицины. Противовирусный препарат должен обладать высокой избирательностью действия, подавляя репликацию вирусов, но не оказывая негативного побочного действия на организм человека [47, 152].

Для решения этой задачи проводится как направленный синтез аналогов уже существующих биологически активных веществ с противовирусным действием, так и групповой синтез потенциально активных соединений с проведением последующих скрининговых исследований. Большое значение при работе по данной проблематике имеет изучение уже имеющихся данных о зависимости активности и избирательности действия от структуры соединения, а так же сведения о возможных негативных побочных эффектах и путях их нейтрализации [24, 115].

В свете необходимости избирательного действия и сведения к минимуму нежелательных побочных реакций противовирусных средств значительное развитие получила группа нуклеотид/нуклеозидных аналогов. Действие этой группы препаратов опосредовано через угнетение специфических вирусных ферментов, в меньшей степени затрагивая функционирование аналогичных энзимов клеток макроорганизма. В результате наблюдается подавление репликации вируса, без значительного воздействия на человека.

Учитывая накопленную информацию, на сегодняшний день весьма перспективно выглядит поиск новых противовирусных средств ненуклеозидной природы, которые в отличие от своих нуклеозидных аналогов не требуют метаболической активации и способны к прямому взаимодействию со специфическими вирусными ферментами [43]. Из ненуклеозидных производных аденина высокую противовирусную активность в сочетании с довольно высоким спектром действия продемонстрировали 9-производные аденина. На основе анализа полученных данных, а также учитывая уже имеющуюся информацию о противовирусной активности в том числе и нуклеозидных/нуклеотидных аналогов аденина, например аденин-арабинозид-5-монофосфат, использовавшийся в 90-х гг XX века [155] или более современный препарат адефовир дипивоксил [135], были проведены скрининговые исследования ряда серий 9-производных аденина.

Результаты скрининговых исследований показали, что 9-производные аденина содержащие ароматическую группу [58] представляют большой интерес в качестве потенциальных высокоэффективных противовирусных соединений [167].

Очень высокая противовирусную активность *in vitro* была выявлена для ряда 9-(2-феноксипропил) производных (Рисунок 1). Незамещенный 9-(2-феноксипропил)-аденин по величине ингибиторной концентрации ИК50 был в 15-20 раз более активен, чем ганцикловир. Однако, соединение обладало относительно высокой цитотоксичностью. Введение различных заместителей (H, алкил, алкоксил, Ph, CN, NO₂, CF₃, Ac, галоген) оказывало более или менее выраженное влияние на противовирусную активность. Так, например, введение метильной группы в мета-положение мало влияло на ингибиторные свойства, тогда как орто-замещение заметно их ухудшало. В случае же пара-замещения у 9-[2-(4-метилфеноксипропил)аденина антицитомегаловирусная активность возросла на порядок и селективность противовирусного действия достигла 1000. При увеличении размеров алкильного заместителя вплоть до изопропильного наблюдался рост антицитомегаловирусной активности. Дальнейшее увеличение размеров заместителя вело к ухудшению противовирусных свойств.

Высокоактивными оказались также соединения, содержащие в пара-положении атомы хлора, брома и NO₂-группу [62].

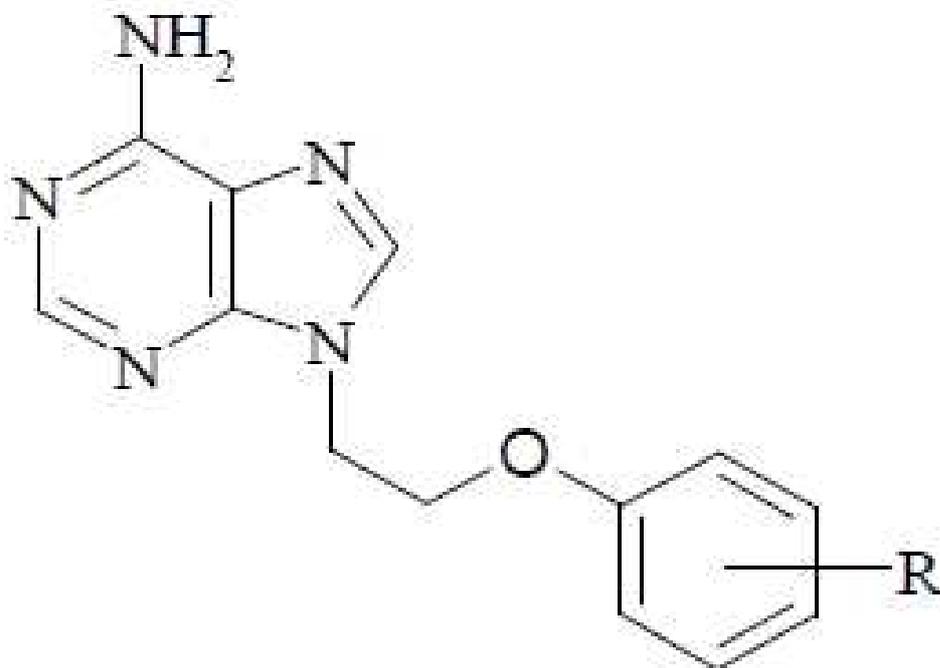


Рисунок 1. Общая структурная формула 9-(2-феноксиэтил) производных аденина.

На основании проведенных исследований противовирусной активности и токсичности вышеуказанных соединений было принято решение о дальнейшем изучении 9-[2-(4-изопропилфенокси)-этил]аденина, имеющего кодовое обозначение VMA-99-82 (Рис.2). Соединение VMA-99-82 не только продемонстрировало высокие показатели противовирусной активности, но и обладает низкой токсичностью, подтвержденной при различных путях введения [59]. Таким образом, именно данное вещество было признано целесообразным направить на дальнейшее изучение. В результате соединение VMA-99-82 перешло на стадию доклинических испытаний в рамках государственного контракта № 11411.1008700.13.077 с Минпромторгом России.

Глава 2. Разработка и валидация метода количественного определения соединения VMA-99-82

Поиск и внедрение в практику новых биологически активных соединений является одной из актуальных проблем современной медицины. Одним из важнейших этапов при работе по данной проблематике является проведение фармакокинетических исследований. Их проведение позволяет определить эффективные концентрации препарата в крови, обуславливающие терапевтический эффект, провести оценку эффективности различных путей введения и лекарственных форм, изучить основные фармакокинетические параметры [157, 172].

Для проведения фармакокинетических исследований необходим адекватный метод количественного определения исследуемых соединений в биологическом материале. Он должен быть высокочувствительным, селективным, надежным, воспроизводимым и универсальным. Данным требованиям отвечает высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), являющаяся одним из основных аналитических методов при проведении фармакокинетических исследований [133, 174].

Обязательным условием разработки любого аналитического метода является проведение его адекватной валидации. Корректная оценка определенных аналитических характеристик является подтверждением работоспособности и воспроизводимости метода и соответственно правильности полученных его посредством результатов. Помимо этого, проведение валидации в ряде случаев может способствовать устранению недостатков и недоработок валидируемого метода количественного определения [69, 175].

2.1. Материалы и методы

Исследование проводили на субстанции VMA-99-82 (Рисунок 2), синтезированной в лаборатории синтеза противовирусных средств НИИ фармакологии Волгоградского государственного медицинского университета*.

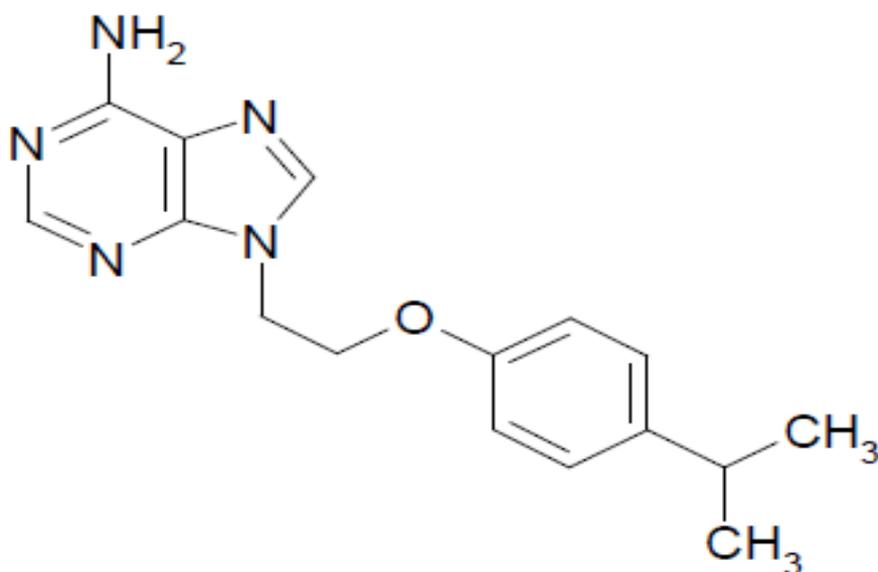


Рисунок 2. Структурная формула соединения VMA-99-82.

Количественное определение соединения VMA-99-82 проводили на жидкостном хроматографе Shimadzu LC-10 (Япония) следующей комплектации:

- Контроллер SCL-10Avp
- Диодноматричный ультрафиолетовый детектор SPD-M10Avp
- Термостат CTO-10ASvp
- 2 насоса высокого давления LC-10ADvp
- Дегазатор DGU-14A

*Выражаем благодарность профессору Озерову А.А. и сотрудникам лаборатории синтеза противовирусных средств НИИ фармакологии Волгоградского государственного медицинского университета

- Аналитическая колонка SUPELCOSIL LC-18 (октадецильная привитая фаза) 10 см*4,6 мм, размер частиц сорбента - 5 мкм (США)

В качестве мобильной фазы использовали смесь ацетонитрила (Россия) и буферной системы, состоящей из однозамещенного фосфата калия 50 мМоль, рН 5,65 (Россия) в соотношении 40%:60% v/v.

В работе использовались аналитические весы Adventurer (США). Смешивание растворов проводили на магнитной мешалке LT 30 (Германия). Контроль рН осуществляли на рН-метре Hanna (Германия).

Детектирование соединения VMA-99-82 проводили при длине волны 205 нм. Скорость подачи мобильной фазы в хроматографическую систему составила 1 мл/мин. Температура проведения разделения на аналитической колонке – 40°C.

Для извлечения соединения VMA-99-82 из биологического материала применяли смесь ацетонитрила (Россия) и этилового спирта (Россия) в соотношении 50%:50% v/v. Для проведения экстракции и преципитации белков использовали горизонтальный шейкер и ультразвуковую ванну «Сапфир» (Россия). Супернатант получали на центрифуге CM-50 (Россия).

Получение гомогената органов, тканей и кала, проводили на гомогенизаторе Silent Crusher (Германия). Гомогенат откручивали на центрифуге Eppendorf (Германия).

Введение проб в хроматографическую систему осуществлялось посредством ручного инжектора Rheodyne (США) с объемом петли 20 мкл при помощи хроматографического шприца Hamilton на 100 мкл.

Идентификацию исследуемого вещества и расчет концентрации проводили по методу абсолютных стандартов. Зависимость площадей пиков от концентрации соединения VMA-99-82 анализировалась методом регрессионного анализа.

Валидация метода ВЭЖХ количественного определения соединения VMA-99-82 осуществлялась в соответствии с ГОСТ 5725-1-2002 и Guideline on bioanalytical method validation EMEA 2012.

Для валидации проводились калибровки по стандартным растворам соединения VMA-99-82 и по биологическому материалу (плазма крови крыс) с построением калибровочных кривых.

Калибровку строили, готовя из матричного раствора концентрацией 1000 мкг/мл серию последовательных разведений до получения следующих концентраций – 0,5; 1; 5; 25 и 50 мкг/мл.

Матричный раствор соединения VMA-99-82 – навеску субстанции в 1 мг растворяли в 1 мл смеси ацетонитрил : этанол 96% (50%:50% v/v).

Калибровка по биологическому материалу осуществлялась по пяти параллельным сериям в течение трех дней.

На основании полученных результатов измерений рассчитывались площадь хроматографического пика по следующей формуле:

$\frac{1}{2} l \cdot h$, где

l – длина основания пика

h – высота пика.

Затем рассчитывались: среднее значение площади хроматографического пика для параллельных измерений, стандартное отклонение от среднего значения, средняя ошибка.

Определялись внутридневные процентные колебания (повторяемость метода) и междневные процентные колебания (воспроизводимость метода).

Повторяемость рассчитывали по формуле:

$(C_d - C_n) / C_n \cdot 100\%$, где

C_d – действительная концентрация соединения VMA-99-82, рассчитанная по калибровочному графику;

C_n – номинальная концентрация соединения VMA-99-82, добавленная к биологическому материалу.

Воспроизводимость бралась как среднее отклонение в процентах по всем трем дням измерений.

Также рассчитывали показатели прецизионности и точности.

Прецизионность рассчитывали по формуле:

$C_o/C_p3*100\%$, где

C_o – стандартное отклонение серии параллельных измерений.

C_p3 – Среднее значение серии параллельных измерений.

Точность рассчитывалась по формуле:

$C_d/C_n*100\%$, где

C_d – действительная концентрация соединения VMA-99-82, рассчитанная по калибровочному графику;

C_n – номинальная концентрация соединения VMA-99-82, добавленная к биологическому материалу.

Статистическая обработка данных проводилась при помощи компьютерной программы Microsoft Excel.

2.2. Разработка хроматографических условий метода количественного определения соединения VMA-99-82

Соединение VMA-99-82 хорошо растворимо в диметилсульфоксиде. Но данный растворитель в силу его физико-химических свойств невозможно ввести в хроматографическую систему.

В ходе предварительных экспериментов было установлено, что соединение VMA-99-82 малорастворимо в большинстве применяемых в хроматографии растворителей. Таким образом, первой аналитической проблемой при разработке метода количественного определения соединения VMA-99-82 стал подбор подходящего сольвента.

После ряда испытаний в качестве растворителя для субстанции соединения VMA-99-82 была выбрана смесь ацетонитрил : спирт этиловый (50%:50% v/v). Данная смесь позволила получить истинный раствор изучаемого вещества необходимой концентрации и ее можно вводить в хроматографическую систему. Еще одним преимуществом данной смеси в качестве сольвента явилось то, что в дальнейшем ей также проводилась экстракция соединения VMA-99-82 из

биологического материала, так как это позволяло одновременно очищать пробу от примесей и проводить экстракцию аналита.

В ходе разработки метода ВЭЖХ подбор хроматографических условий количественного определения осуществлялся по следующим ключевым параметрам:

1. Параметры детекции.

Определение соединения VMA-99-82 проводилось с использованием ультрафиолетового детектора на основе диодной матрицы.

Для изучаемого вещества был определен оптимум условий детекции – на длине волны 205 нм (Рисунок 3).

2. Характеристики мобильной фазы

При разработке метода количественного определения соединения VMA-99-82 было изучено влияние следующих буферных систем со значением рН от 3 до 6 с шагом в 0,5 единиц:

- а) 0,05 М и 0,1 М растворы однозамещенного фосфата калия;
- б) 0,05 М и 0,1 М растворы двузамещенного фосфата калия
- в) смесь 0,2 М растворов ацетата натрия и уксусной кислоты;
- г) смесь 0,05 М растворов одно- и двузамещенного фосфата калия.

При использовании ацетатной буферной системы пик определяемого вещества был несимметричным, кроме того, наблюдалась нестабильность времени удерживания. Буферная система из двузамещенного фосфата калия в данных условиях продемонстрировала крайне длительные периоды стабилизации аналитической колонки при смене мобильной фазы, что значительно удлиняло время проведения исследования. Р-р однозамещенного фосфата калия и смесь одно- и двузамещенного фосфата калия давали сопоставимые результаты, обеспечивая необходимые селективность и чувствительность. В итоге была выбрана буферная система из 50 мМ р-ра однозамещенного фосфата калия как более стабильная при хранении и простая в изготовлении.

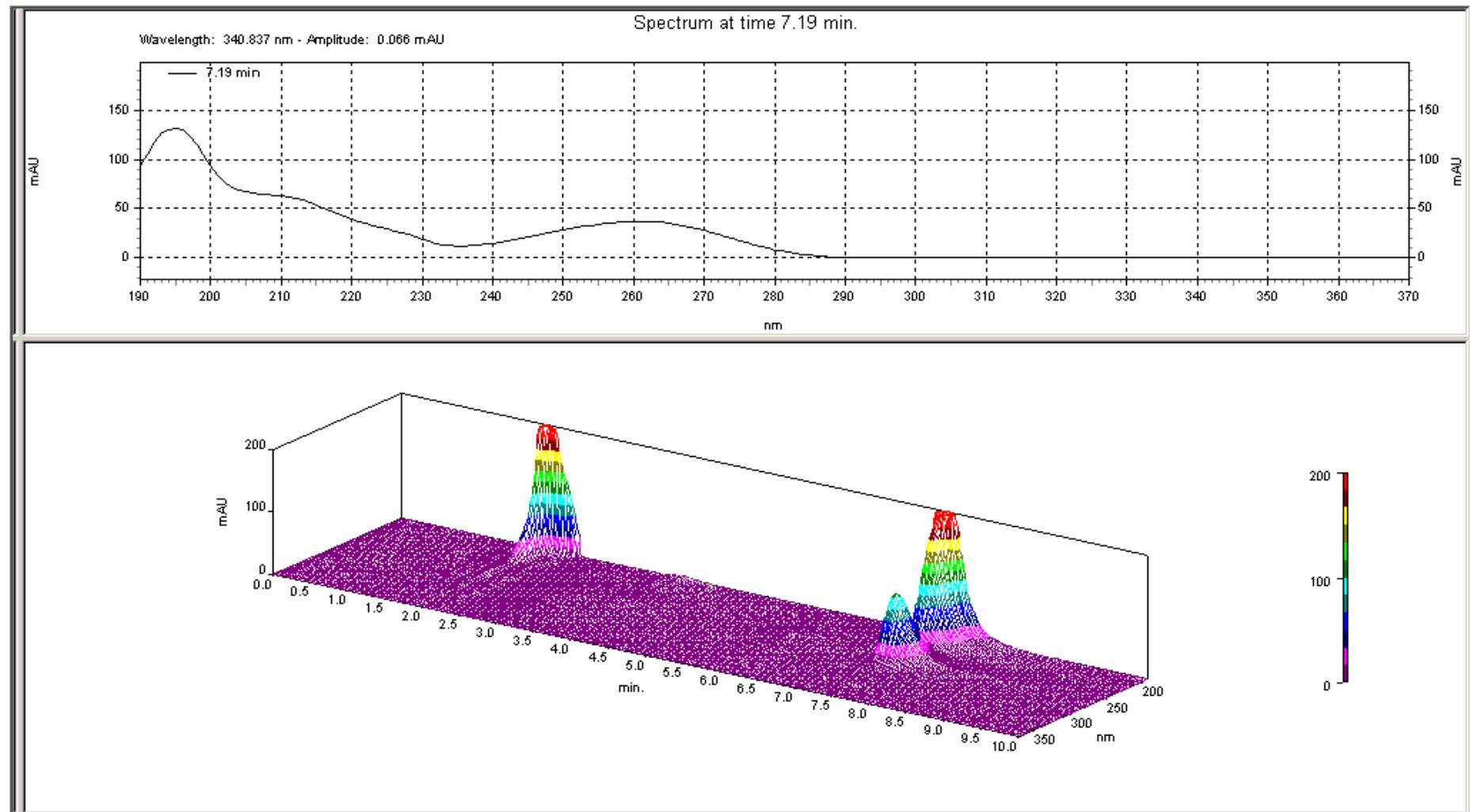


Рисунок 3. Спектр поглощения соединения VMA-99-82

Выбор был сделан в пользу именно 0,05 М фосфатного буфера, так как дальнейшее увеличение молярности до 0,1 М и 0,2 М не дало значимого улучшения, при этом сокращая срок нормального функционирования аналитической колонки.

Изучение влияние рН буферной системы, входящей в состав мобильной фазы, на время удерживания соединения VMA-99-82 дало следующие результаты. Сдвиг рН в кислую сторону вызывал увеличение времени удерживания и некоторое искажение формы хроматографического пика. Начиная со значения 4,5, наблюдалось незначительное снижение времени удерживания и отсутствие деформации пика. В результате было выбрано значение рН=5,65, при котором достигалась достаточная селективность без значимых потерь в чувствительности.

В ходе исследования влияния доли органической фазы в составе элюента на хроматографические характеристики соединения VMA-99-82 были опробованы количества ацетонитрила в диапазоне от 30% до 60%:

Увеличение доли органической фазы свыше 50 % вызывало снижение времени удерживания до 5 минут и менее, что приводило к высокой вероятности интерференции эндогенными пиками биоматериала. Значения ниже 40% демонстрировали значительное снижение чувствительности и увеличение времени анализа. Окончательно, в качестве оптимального соотношения было выбрано значение 40%.

Таким образом, оптимальными хроматографическими условиями метода количественного определения соединения VMA-99-82 являются следующие: аналитическая колонка SUPELCOSIL LC-18 (октадецильная привитая фаза) 15 см*4,6 мм, размер частиц 5 мкм. Мобильная фаза, состоящая из 50 mM р-ра однозамещенного фосфата калия (рН 5,65) и ацетонитрила в соотношении 60%:40% v/v. Скорость потока элюента 1 мл/мин. Температура хроматографирования 40 °С. Длина волны детекции 205 нм. При данных хроматографических условиях время удерживания составило около 7,0-7,5 мин.

С использованием данных условий получены хроматограммы стандартных растворов соединения VMA-99-82 (Рисунок 4).

2.3. Разработка метода количественного извлечения соединения VMA-99-82 из биологического материала

Так как метод количественного определения соединения VMA-99-82 разрабатывался для проведения полного фармакокинетического исследования, то стояла задача определения изучаемого вещества в различных типах биологического материала – крови, экскретах, гомогенате органов и тканей. Соответственно, необходимо было разработать простой и эффективный способ количественного извлечения аналита, обеспечивающий высокую степень экстракции и достаточный уровень чистоты проб.

При разработке метода извлечения исследуемого соединения из биологического материала в качестве экстрагентов были опробованы:

- спирт этиловый
- ацетонитрил
- смесь ацетонитрил : спирт этиловый (50%:50% v/v)
- концентрированная соляная кислота
- 10% раствор трихлоруксусной кислоты

К образцам добавляли экстрагент в соотношении 1:1 затем встряхивали в течение десяти минут в ультразвуковой ванне для преципитации белков и центрифугировали в течение 15 минут при 3000 об/мин, после чего надосадочную жидкость вводили в хроматографическую систему.

Была проведена оценка степеней экстракции для различных экстракционных агентов (Рисунок 5).

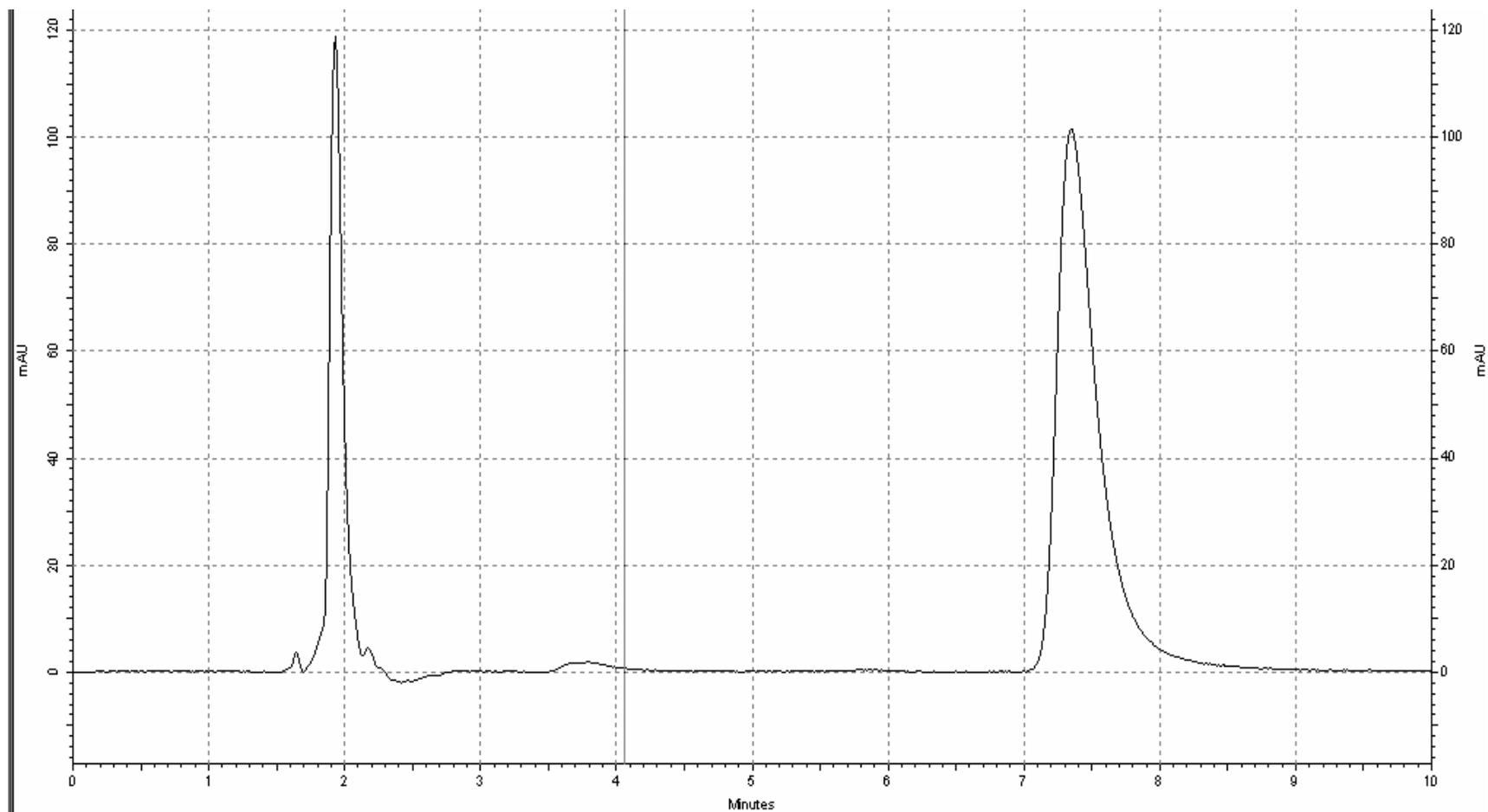


Рисунок 4. Хроматограмма стандартного раствора соединения VMA-99-82 (растворитель - смесь ацетонитрил : этанол 96% в соотношении 50%:50% v/v).



Рисунок 5. Степени экстракции соединения VMA-99-82 из биологического материала различными экстрагентами.

Обозначения: А – спирт этиловый, В – ацетонитрил, С – смесь спирт этиловый : ацетонитрил (50%:50% v/v), D – концентрированная соляная кислота, E – 10% раствор трихлоруксусной кислоты.

На основании проведенных экспериментов и данных, полученных ранее в ходе разработки метода количественного определения соединения VMA-99-82 в качестве экстрагента была выбрана смесь спирт этиловый : ацетонитрил (50%:50% v/v), обеспечивающая высокий уровень извлечения аналита из биоматериала, а также достаточный уровень очистки пробы. Степень экстракции соединения VMA-99-82 составила не менее 90%.

Проводилось извлечение соединения VMA-99-82 из плазмы, сыворотки и цельной крови и степень экстракции из плазмы и сыворотки составила в среднем около 20 %, в то время как для цельной крови данное значение составило в среднем 90% (Рисунок 6). Таким образом, при определении изучаемого вещества в крови необходимо проводить экстракцию из цельной крови.

Используя разработанный метод количественного извлечения соединения VMA-99-82 из биологического материала и подобранные ранее хроматографические условия, были получены хроматограммы изучаемого вещества в биологическом материале (Рисунок 7).



Рисунок 6. Степени экстракции соединения VMA-99-82 из различного биологического материала.

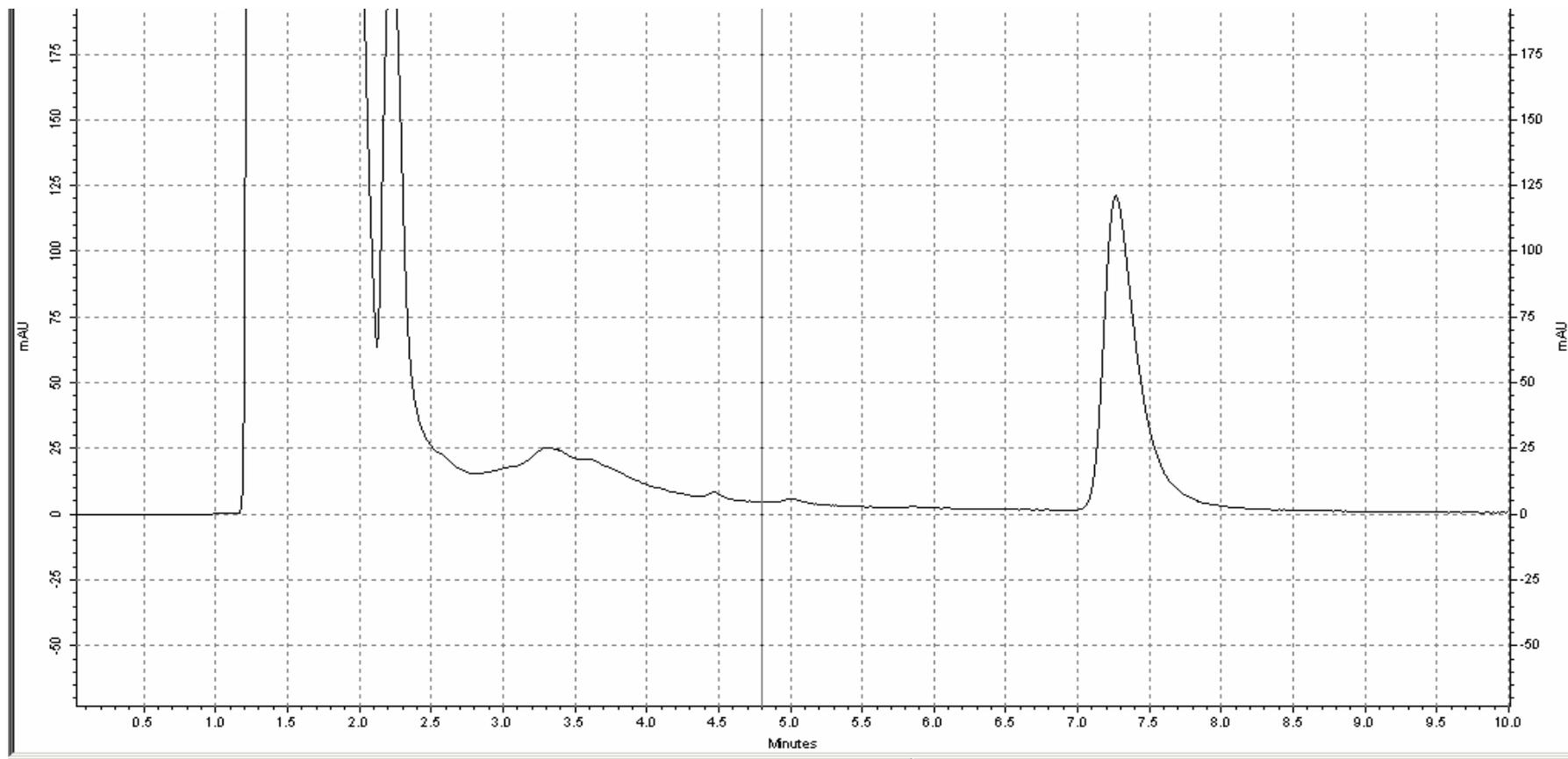


Рисунок 7. Хроматограмма соединения VMA-99-82 в биологическом материале (цельная кровь).

2.4. Валидация метода количественного определения соединения VMA-99-82

Для количественного определения изучаемого соединения использовали метод абсолютной калибровки. Зависимость площадей пиков от концентрации VMA-99-82 анализировалась методом регрессионного анализа.

Была проведена калибровка по стандартным растворам соединения VMA-99-82 известной концентрации. Для построения калибровки взяли пять точек – концентрации 0,5 мкг/мл, 1 мкг/мл, 5 мкг/мл, 25 мкг/мл и 50 мкг/мл. Для каждой точки были проведены пять параллельных измерений. На основании полученных результатов рассчитывались площадь хроматографического пика, среднее значение площади хроматографического пика для пяти параллельных измерений, стандартное отклонение от среднего значения, средняя ошибка измерения (Таблица 1).

По полученным данным построили калибровочную кривую. В результате было установлено, что она носит линейный характер, с коэффициентом аппроксимации (R^2) равным 0,9996 (Рисунок 8).

После подтверждения линейной зависимости между концентрацией соединения VMA-99-82 и площадью под хроматографическим пиком и определения диапазона линейной зависимости была проведена калибровка по биологическому материалу (плазме крови) в течение трех дней. На основании полученных данных рассчитывались площадь хроматографического пика, среднее значение площади хроматографического пика для пяти параллельных измерений, стандартное отклонение от среднего значения, средняя ошибка измерения (Таблица 2, 4, 6).

По полученным данным построили калибровочные кривые. В результате было установлено, что они носят линейный характер, с коэффициентом аппроксимации (R^2) равным 0,9983; 0,9992 и 0,9999 (Рисунок 9, 10, 11).

Используя построенный график, по уравнению регрессии были рассчитаны действительные концентрации соединения VMA-99-82 в биологическом материале.

На основании полученных данных рассчитывались среднее значение концентраций для пяти параллельных измерений, стандартное отклонение от среднего значения, средняя ошибка измерения (Таблица 3, 5, 7).

После проведения измерений в течение трех дней, на основании полученных данных были определены внутрисуточные процентные колебания (повторяемость метода) и междневные процентные колебания (воспроизводимость метода) (Таблица 8).

По полученным результатам измерений были рассчитаны точность и прецизионность. Данные представлены в таблице 9.

В результате проведенных исследований было установлено, что концентрация 0,5 мкг/мл выходит за пределы линейности. Таким образом, чувствительность метода количественного определения соединения VMA-99-82 составляет 1 мкг/мл. Предел обнаружения – 200 нг/мл.

При повторном проведении анализа, после 72 часов хранения стандартных растворов соединения при комнатной температуре, средние абсолютные процентные колебания находились в тех же пределах, показывая стабильность исследуемого вещества. При изучении влияния процессов замораживания и таяния, было обнаружено, что средние абсолютные процентные колебания для VMA-99-82 находились в тех же пределах, что определяет стабильность вещества под влиянием данных факторов.

Таким образом, в результате проведенной валидации подтверждено соответствие аналитических характеристик метода ВЭЖХ количественного определения соединения VMA-99-82 нормативным значениям. Сводные аналитические характеристики метода представлены в таблице 10.

Данные измерений калибровки по стандартным растворам соединения VMA-99-82

1	2	3	4	5	6	7
концентрация (с), мкг/мл	Ширина основания пика, мин.	Высота пика, мAU	Площадь пика (S), мAU*мин.	Среднее значение (M)	Стандартное отклонение (m)	Средняя ошибка измерения, %
0,5	0,75	1,23	0,46125	0,47431	0,020428	4,30699
0,5	0,73	1,36	0,4964			
0,5	0,7	1,33	0,4655			
0,5	0,74	1,34	0,4958			
0,5	0,73	1,24	0,4526			
1	0,7	2,9	1,015	1,09378	0,073213	6,693576
1	0,76	3,05	1,159			
1	0,75	2,94	1,1025			
1	0,78	3	1,17			
1	0,71	2,88	1,0224			

1	2	3	4	5	6	7
5	0,74	17,3	6,401	6,3872	0,049687	0,777919
5	0,73	17,5	6,3875			
5	0,72	17,7	6,372			
5	0,71	17,8	6,319			
5	0,74	17,45	6,4565			
25	0,76	90,8	34,504	37,53185	2,345725	6,249957
25	0,78	101,6	39,624			
25	0,78	98,8	38,532			
25	0,78	91,2	35,568			
25	0,75	105,15	39,43125			
50	0,8	185,5	74,2	78,10785	2,750186	3,521011
50	0,81	197,8	80,109			
50	0,8	200,5	80,2			
50	0,81	188,15	76,20075			
50	0,79	202,1	79,8295			

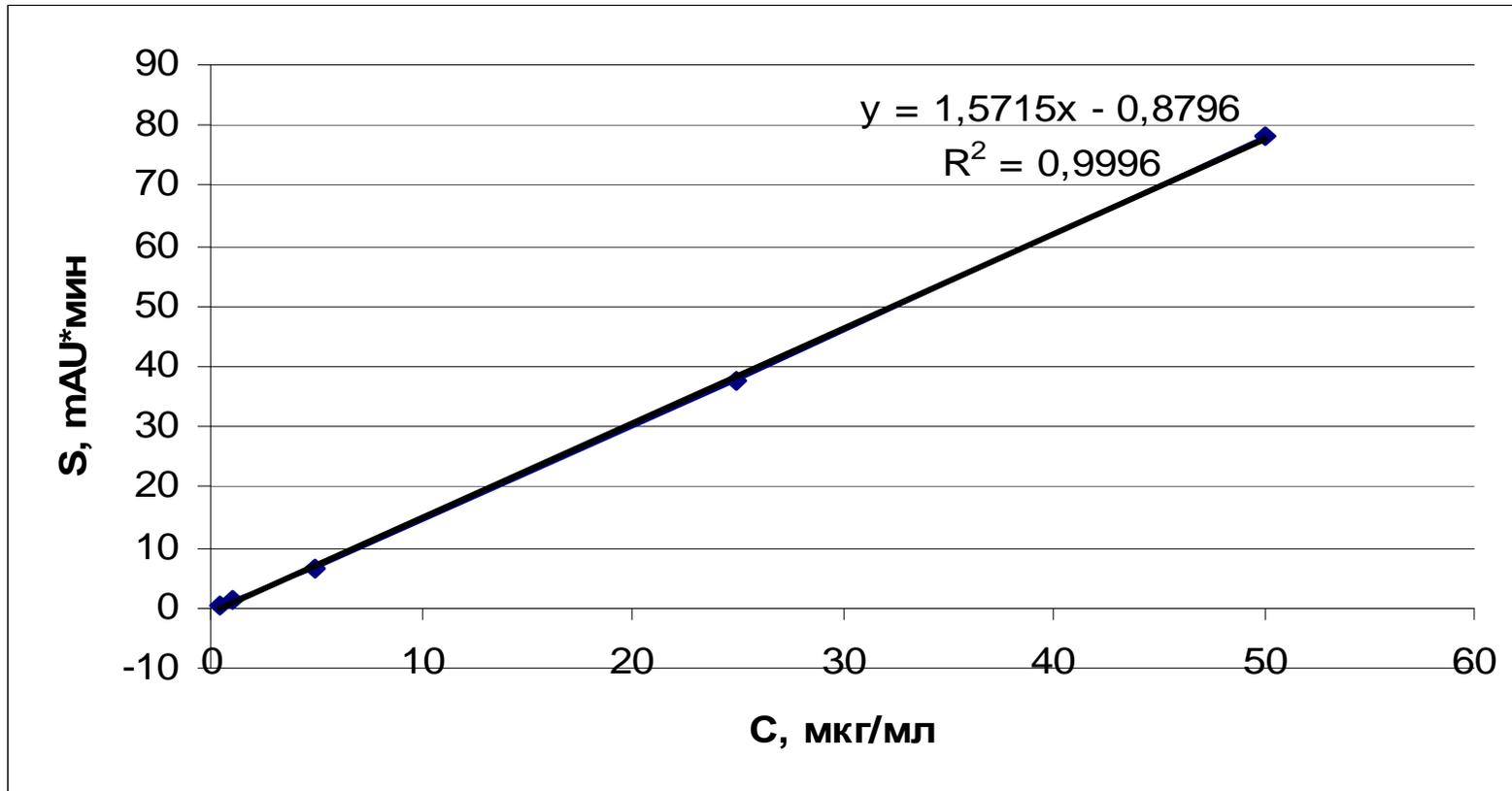


Рисунок 8. Зависимость площади под хроматографическим пиком от концентрации соединения VMA-99-82. Стандартный раствор.

Обозначения: по оси ординат – площадь под хроматографическим пиком, мАУ*мин.; по оси абсцисс – концентрация соединения VMA-99-82, мкг/мл.

Данные измерений 1 дня калибровки по биологическому материалу (плазма крови)

1	2	3	4	5	6	7
концентрация (с), мкг/мл	Ширина основания пика, мин.	Высота пика, мAU	Площадь пика (S), мAU*мин.	Среднее значение (M)	Стандартное отклонение (m)	Средняя ошибка измерения, %
0,5	0,65	1,4	0,6825	0,52242	0,119823	22,93614
0,5	0,63	0,92	0,4347			
0,5	0,63	1,3	0,61425			
0,5	0,61	0,89	0,407175			
0,5	0,59	1,07	0,473475			
1	0,62	1,75	0,81375	0,7656	0,031205	4,075924
1	0,59	1,68	0,7434			
1	0,59	1,67	0,738975			
1	0,63	1,65	0,779625			
1	0,59	1,7	0,75225			

1	2	3	4	5	6	7
5	0,67	8,25	4,145625	4,32825	0,123037	2,842658
5	0,63	9,43	4,455675			
5	0,63	9,27	4,380075			
5	0,65	8,75	4,265625			
5	0,62	9,45	4,39425			
25	0,63	49,8	23,5305	24,6276	0,863094	3,504579
25	0,64	51,9	24,912			
25	0,66	51,4	25,443			
25	0,63	50,6	23,9085			
25	0,66	51,2	25,344			
50	0,7	97,3	51,0825	53,7486	2,553807	4,751392
50	0,7	106,2	55,755			
50	0,68	106,7	54,417			
50	0,68	100,1	51,051			
50	0,7	107,5	56,4375			

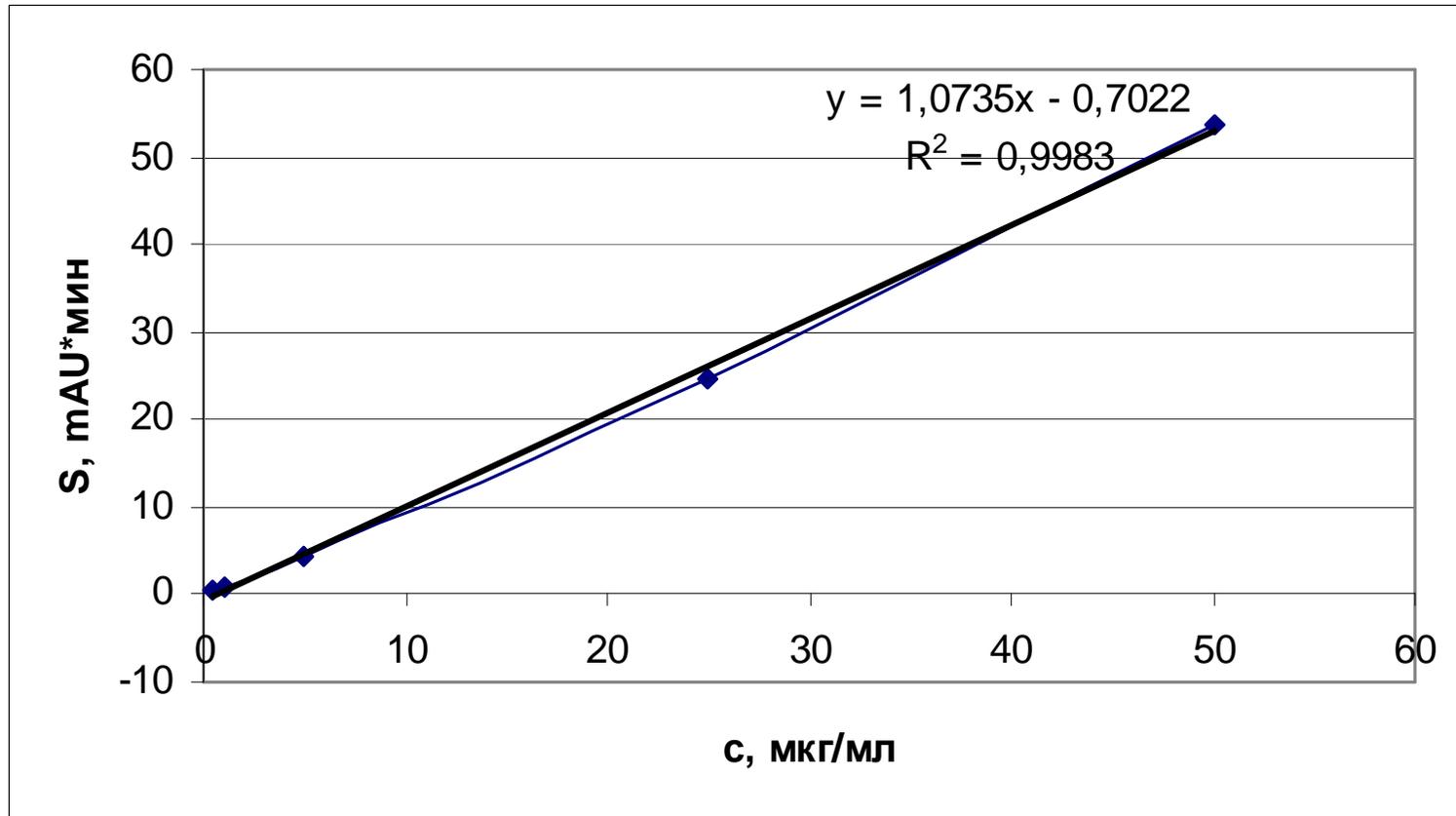


Рисунок 9. Зависимость площади под хроматографическим пиком от концентрации соединения VMA-99-82. Биологический материал (плазма крови).

Обозначения: по оси ординат – площадь под хроматографическим пиком, мАУ*мин.; по оси абсцисс – концентрация соединения VMA-99-82, мкг/мл.

Расчетные данные первого дня калибровки по биологическому материалу (плазма крови).

Концентрация по графику (С), мкг/мл	Среднее значение (М)	Стандартное отклонение (m)	Средняя ошибка измерения, %
1,289893	1,140773	0,111619	9,784502
1,059059			
1,226316			
1,033419			
1,095179			
1,412156	1,367303	0,029069	2,125989
1,346623			
1,342501			
1,380368			
1,354867			
4,515906	4,686027	0,114613	2,445851
4,804728			
4,734304			
4,62769			
4,747508			
22,57354	23,59553	0,804	3,407424
23,86046			
24,3551			
22,92566			
24,26288			
48,23912	50,72268	2,378954	4,690118
52,59171			
51,34532			
48,20978			
53,22748			

Данные измерений 2 дня калибровки по биологическому материалу (плазма крови).

1	2	3	4	5	6	7
концентрация (с), мкг/мл	Ширина основания пика, мин.	Высота пика, мAU	Площадь пика (S), мAU*мин.	Среднее значение (M)	Стандартное отклонение (m)	Средняя ошибка измерения, %
0,5	0,56	1,5	0,63	0,49821	0,109056	21,88958
0,5	0,52	1,09	0,4251			
0,5	0,55	1,46	0,60225			
0,5	0,54	0,98	0,3969			
0,5	0,52	1,12	0,4368			
1	0,53	1,96	0,7791	0,848685	0,062658	7,382958
1	0,53	2,22	0,88245			
1	0,52	2,24	0,8736			
1	0,63	1,95	0,921375			
1	0,61	1,72	0,7869			

1	2	3	4	5	6	7
5	0,52	9,8	3,822	3,97842	0,128534	3,23077
5	0,51	10,78	4,12335			
5	0,54	9,9	4,0095			
5	0,6	8,6	3,87			
5	0,58	9,35	4,06725			
25	0,55	57,3	23,63625	24,04035	0,298222	1,240507
25	0,58	55,6	24,186			
25	0,56	57,9	24,318			
25	0,63	50,4	23,814			
25	0,61	53	24,2475			
50	0,54	119,5	48,3975	50,67039	1,840517	3,632332
50	0,54	127,4	51,597			
50	0,51	136	52,02			
50	0,65	107,4	52,3575			
50	0,61	107,06	48,97995			

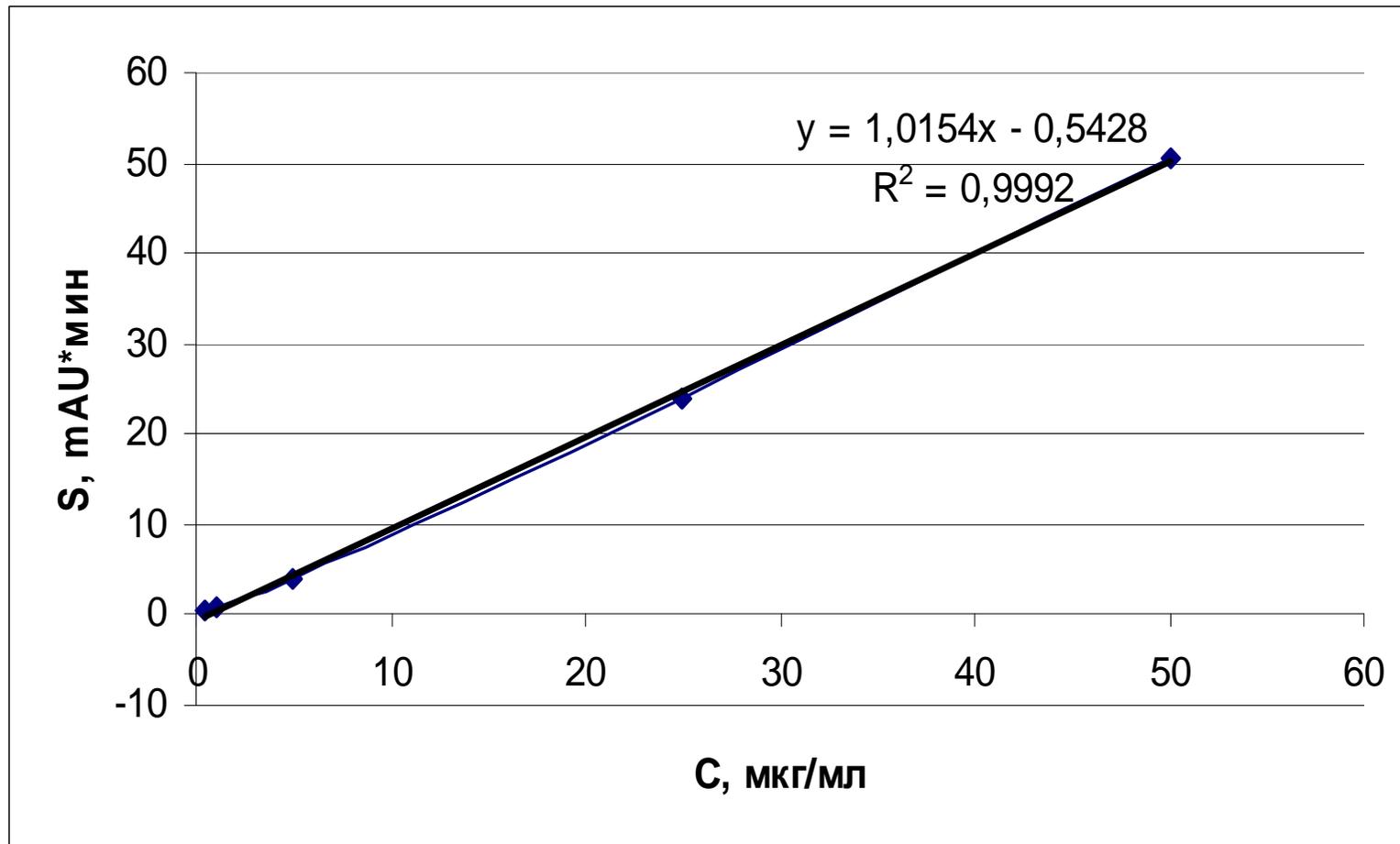


Рисунок 10. Зависимость площади под хроматографическим пиком от концентрации соединения VMA-99-82. Биологический материал (плазма крови).

Обозначения: по оси ординат – площадь под хроматографическим пиком, мАУ*мин.; по оси абсцисс – концентрация соединения VMA-99-82, мкг/мл.

Расчетные данные второго дня калибровки по биологическому материалу
(плазма крови).

Концентрация по графику (С), мкг/мл	Среднее значение (М)	Стандартное отклонение (m)	Средняя ошибка измерения, %
1,155013	1,025222	0,107402	10,47599
0,95322			
1,127684			
0,925448			
0,964743			
1,301851	1,370381	0,061708	4,502963
1,403634			
1,394918			
1,441969			
1,309533			
4,298602	4,452649	0,126584	2,842897
4,595381			
4,483258			
4,345874			
4,540132			
23,81234	24,21031	0,293699	1,213116
24,35375			
24,48375			
23,98739			
24,41432			
48,19805	50,43647	1,812603	3,593834
51,34903			
51,76561			
52,09799			
48,77167			

Данные измерений 3 дня калибровки по биологическому материалу (плазма крови)

1	2	3	4	5	6	7
концентрация (с), мкг/мл	Ширина основания пика, мин.	Высота пика, мAU	Площадь пика (S), мAU*мин.	Среднее значение (M)	Стандартное отклонение (m)	Средняя ошибка измерения, %
0,5	0,57	2,6	1,1115	0,58248	0,313355	53,79676
0,5	0,58	1,34	0,5829			
0,5	0,6	1,15	0,5175			
0,5	0,55	0,8	0,33			
0,5	0,52	0,95	0,3705			
1	0,5	2,02	0,7575	0,86001	0,075791	8,812799
1	0,59	2,12	0,9381			
1	0,61	1,94	0,88755			
1	0,6	1,79	0,8055			
1	0,62	1,96	0,9114			

1	2	3	4	5	6	7
5	0,64	9,7	4,656	4,536435	0,261413	5,762517
5	0,64	10	4,8			
5	0,55	10,1	4,16625			
5	0,65	8,96	4,368			
5	0,63	9,93	4,691925			
25	0,6	52,9	23,805	23,34269	0,366169	1,568666
25	0,56	55,8	23,436			
25	0,59	51,5	22,78875			
25	0,62	50,07	23,28255			
25	0,61	51,15	23,40113			
50	0,51	121,3	46,39725	46,524	0,955301	2,05335
50	0,49	124	45,57			
50	0,51	124,4	47,583			
50	0,62	98,15	45,63975			
50	0,6	105,4	47,43			

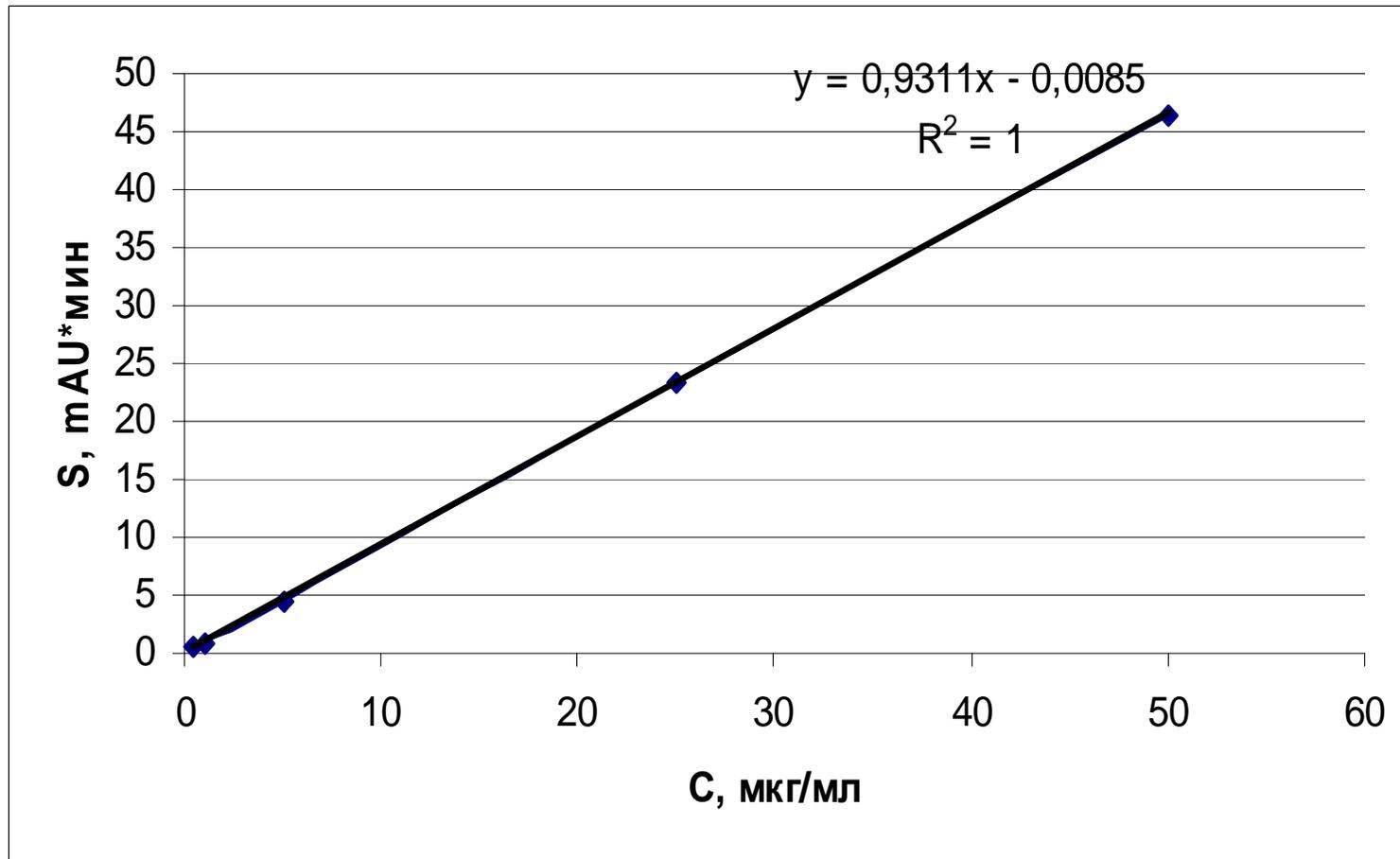


Рисунок 11. Зависимость площади под хроматографическим пиком от концентрации соединения VMA-99-82. Биологический материал (плазма крови).

Обозначения: по оси ординат – площадь под хроматографическим пиком, мАУ*мин.; по оси абсцисс – концентрация соединения VMA-99-82, мкг/мл.

Расчетные данные третьего дня калибровки по биологическому материалу
(плазма крови).

Концентрация по графику (С), мкг/мл	Среднее значение (М)	Стандартное отклонение (m)	Средняя ошибка измерения, %
1,202878	0,634712	0,336543	53,02301
0,635163			
0,564923			
0,363548			
0,407045			
0,822683	0,932778	0,081399	8,726549
1,016647			
0,962356			
0,874235			
0,987971			
5,009666	4,881253	0,280757	5,75174
5,164322			
4,483675			
4,700354			
5,048249			
25,57566	25,07914	0,393265	1,568095
25,17936			
24,48421			
25,01455			
25,1419			
49,83971	49,97584	1,025991	2,052975
48,95124			
51,1132			
49,02615			
50,94888			

Показатели воспроизводимости и повторяемости метода количественного определения соединения VMA-99-82 в диапазоне линейной зависимости площади хроматографического пика от концентрации растворов ($M \pm m$)

Концентрация, мкг/мл	Внутридневные колебания концентрации, мкг/мл			Повторяемость, $\pm\Delta\%$			Воспроизводимость, %
	День 1	День 2	День 3	День 1	День 2	День 3	
0,5	0,52 \pm 0,12	0,5 \pm 0,11	0,58 \pm 0,31	128,15	105,04	26,94	86,71
1	0,77 \pm 0,03	0,84 \pm 0,06	0,86 \pm 0,08	36,73	37,04	-6,72	26,83
5	4,33 \pm 0,12	3,98 \pm 0,13	4,54 \pm 0,26	-6,28	-10,95	-2,38	6,54
25	24,63 \pm 0,86	24,05 \pm 0,3	23,34 \pm 0,37	-5,62	-3,16	0,32	3,03
50	53,75 \pm 2,55	50,67 \pm 1,84	46,52 \pm 0,96	1,45	0,88	-0,05	0,79

Валидационные характеристики метода ВЭЖХ количественного определения соединения VMA-99-82

Номинальная концентрация, мкг/мл	Средние результаты измерения, mAU×мин., (M±m)	Прецизионность, %	Расчетная концентрация, мкг/мл	Точность, %
0,5	0,58±0,31	53,79676	0,634712	126,9423
1	0,86±0,08	8,812799	0,932778	93,27784
5	4,54±0,26	5,762517	4,881253	97,62507
25	23,34±0,37	1,568666	25,07914	100,3166
50	46,52±0,96	2,05335	49,97584	99,95167

Основные аналитические параметры метода ВЭЖХ количественного определения соединения VMA-99-82.

Внутридневные колебания (повторяемость)	14%
Междневные колебания (воспроизводимость)	10%
Точность	97,8%
Чувствительность	1 мкг/мл
Предел обнаружения	200 нг/мл
Прецизионность	4,55%

2.5. Заключение

В результате проведенных исследований разработаны следующие хроматографические условия метода количественного определения соединения VMA-99-82: аналитическая колонка SUPELCOSIL LC-18 (октадецильная привитая фаза) 15 см*4,6 мм, размер частиц 5 мкм. Мобильная фаза, состоящая из 50 mM р-ра однозамещенного фосфата калия (рН 5,65) и ацетонитрила в соотношении 60%:40% v/v. Скорость потока элюента 1 мл/мин. Температура хроматографирования 40 °С. Длина волны детекции 205 нм. Условия подобраны оптимально и обеспечивают достаточные чувствительность и селективность [85].

Детекция изучаемого соединения осуществляется ультрафиолетовым детектором на основе диодной матрицы. Чувствительность метода, обеспечиваемая ультрафиолетовым детектором, вполне отвечает поставленным задачам, что позволяет использовать этот наиболее распространенный и доступный вид детектора. Преимущество диодноматричных детекторов заключается в возможности сканирования широкого диапазона длин волн за один анализ, что обеспечивает значительное сокращение времени подбора оптимальной длины волны детекции. Еще одним плюсом детекторов на основе диодной матрицы является возможность идентификации веществ по их спектральным характеристикам.

Проведен подбор условий экстракции изучаемого соединения из различных видов биологического материала. Опробован ряд экстрагентов и, в итоге, была выбрана смесь спирт этиловый : ацетонитрил (50%:50% v/v), обеспечивающая одновременно высокий уровень извлечения аналита из биоматериала и достаточный уровень очистки пробы. Степень экстракции соединения VMA-99-82 составила не менее 90%. В ходе экспериментов по извлечению соединения VMA-99-82 из различного биологического материала было установлено, что при определении изучаемого вещества в крови необходимо проводить экстракцию из цельной крови. Извлечение аналита из гомогенатов органов и тканей, а также экскретов проводилось аналогичным образом и давало сопоставимые результаты по степени экстракции.

Таким образом, способ количественного извлечения соединения VMA-99-82 из биологического материала подобран оптимально и практически не влияет на среднюю ошибку измерения хроматографического метода.

После подбора хроматографических условий и способа извлечения из биологического материала проведена валидация разработанного метода высокоэффективной жидкостной хроматографии количественного определения соединения VMA-99-82. На основании серии измерений были построены калибровочные кривые зависимости площади под хроматографическим пиком от концентрации изучаемого соединения, в результате установлено, что они носят линейный характер. Далее провели расчет валидационных характеристик метода. Повторяемость (внутридневные колебания) в среднем 14%, воспроизводимость (междневные колебания) – 10%. Показатель точности – 97,8%. Прецизионность – 4,55. На основании измерения серии разведений были определены предел обнаружения (200 нг/мл) и предел количественного определения (1мкг/мл). Аналитические характеристики метода не выходят за границы установленных нормативов, что подтверждает его воспроизводимость и эффективность.

Также была оценена стабильность. При повторном проведении анализа, после 72 часов хранения стандартных растворов соединения при комнатной температуре, а также после заморозки/таяния средние абсолютные процентные колебания находились в тех же пределах, что свидетельствует о стабильности вещества под влиянием данных факторов.

Таким образом, разработанный метод количественного определения является высокоселективным и высокочувствительным, что позволяет использовать его для проведения фармакокинетических и биофармацевтических исследований соединения VMA-99-82.

Глава 3. Фармакокинетические свойства нового производного аденина – соединения VMA-99-82

Важнейшим этапом в создании новых лекарственных средств являются доклинические испытания, включающие в себя также и изучение экспериментальной фармакокинетики. Данные исследования позволяют изучить процессы всасывания, распределения, метаболизма и выведения лекарственных веществ. Знание фармакокинетических свойств позволяет обосновать выбор путей и методов их введения, выявить ткани, в которые они проникают наиболее интенсивно и/или в которых удерживаются наиболее длительно, установить основные пути элиминации фармакологического средства [173].

Создание новых лекарственных препаратов, доклинические испытания, первая фаза клинических испытаний не возможны без серьёзных фармакокинетических исследований. Разработка новых и совершенствование апробированных лекарственных средств, требует всестороннего изучения фармакокинетики, так как без сведений о многообразном спектре поведения лекарственного вещества в организме невозможно успешное применение препарата в практической медицине [19].

Фармакокинетические данные необходимы для установления зависимости «концентрация – эффект», которая характеризуется меньшими видовыми различиями, чем «доза – эффект» и поэтому может быть использована для прогнозирования действия фармакологического средства у человека. Кроме того, по результатам экспериментального изучения фармакокинетики возможно предсказать концентрацию препарата в крови (плазме) или, по меньшей мере, скорость её снижения у человека и, таким образом, выбрать ориентировочную схему дозирования, которая может быть уточнена в ходе клинических испытаний [8]. Важной задачей изучения фармакокинетики оригинального фармакологического средства является оптимизация выбора его лекарственной формы.

3.1. Материалы и методы

Эксперименты выполнены на 100 белых беспородных крысах – самцах массой 180-220 г, которые содержались в условиях вивария на стандартной диете с соблюдением всех правил и Международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях. Животные были здоровыми, изменений поведения, аппетита, режима сна и бодрствования обнаружено не было. За двенадцать часов до проведения экспериментов животных лишали доступа к пище без ограничения потребления воды.

Внутривенное введение лекарственного вещества в изотоническом растворе, производилось с помощью шприца в хвостовую вену крыс. Пероральное введение осуществлялось с помощью зонда. Контрольной группе животных вводили изотонический раствор в аналогичном объёме.

Распределение соединения в организме крыс изучали в тканях с сильной васкуляризацией – сердце, мозге, легких и селезенке; с умеренной васкуляризацией – мышце (*musculus quadriceps femoris*) и слабой васкуляризацией - сальнике, а также в органах, обеспечивающих элиминацию - печени и почках.

Содержание изучаемого соединения определяли также в моче и кале. Сбор проб мочи и кала осуществляли в метаболических камерах «Термопласт» (Италия).

Кровь стабилизировали 5% раствором натрия цитрата. Зависимость концентрации соединения от времени изучалась в цельной крови. Из органов и кала готовили 20% гомогенаты в дистиллированной воде.

Соединение VMA-99-82 вводили крысам внутривенно в дозе 50 мг/кг. Забор проб крови и органов производился через 0,08; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 12 часов после введения и через 5 минут в контрольной группе животных.

Для изучения абсолютной биодоступности субстанцию VMA-99-82 вводили крысами интрагастрально в дозе 50 мг/кг. Забор проб крови у животных производи через 0,5; 1; 2; 4; 8; 12 часов и через 5 минут в контрольной группе животных.

Для оценки фармакокинетических свойств изучаемого соединения рассчитывали ряд параметров:

- Площадь под фармакокинетической кривой “концентрация – время” (AUC) является основным фармакокинетическим параметром и характеризует биологическую доступность лекарственного средства. Данный параметр рассчитывали модельно – независимым методом статистических моментов в программе Microsoft Excel.

$$AUC = \frac{C_1}{2} \Delta t_1 + \frac{C_1 + C_2}{2} \Delta t_2 + \frac{C_2 + C_3}{2} \Delta t_3 \dots + AUC_{\text{ост}}$$

где $AUC_{\text{ост}} = \frac{C_{\text{посл}}}{K_{el}}$

- Общий (кажущийся) клиренс (cl), отражающий скорость освобождения от препарата единицы объёма биожидкости, как отношение дозы (D) к AUC:

$$cl = \frac{D}{AUC} \text{ (мл/час)}.$$

- Константа элиминации (K_{el}), характеризующая снижение концентрации препарата на конечном (моноэкспоненциальном) участке фармакокинетической кривой:

$$K_{el} = \frac{\ln \frac{C_{\text{max}}}{C_{\text{посл}}}}{T_{\text{посл}} - T_{\text{max}}} \text{ (час}^{-1}\text{)},$$

где C_{max} и T_{max} – максимальная концентрация и время ее достижения, $C_{\text{посл}}$ и $T_{\text{посл}}$ – последнее значение концентрации и время её определения.

- Общий (кажущийся) объём распределения (V_d), под которым понимают такой объём, при распределении в котором, препарат имел бы ту же

концентрацию, что и в плазме крови, как отношение клиренса (cl) к константе элиминации (K_{el}):

$$V_d = \frac{cl}{K_{el}} \text{ (мл)}.$$

- Период полувыведения ($T_{1/2}$), отражающий время, в течении которого концентрация ЛВ в крови снижается вдвое:

$$T_{1/2} = \frac{0,693}{K_{el}} \text{ (час)}.$$

- Среднее время удерживания, характеризующее среднее время пребывания в организме молекулы препарата (MRT):

$$MRT = \frac{AUMC}{AUC} \text{ (час)}, \text{ где}$$

AUMC – площадь под кривой “произведение времени на концентрацию лекарственного вещества-время”.

Для оценки интенсивности проникновения вещества в ткани использовалось вычисление тканевой доступности (f_t), определяемой отношением значения AUC в ткани к соответствующей величине AUC в крови.

Абсолютная биодоступность рассчитывалась как отношение AUC при пероральном введении к AUC при внутривенном введении лекарственного вещества крысам. Экспериментальные данные обсчитывались с помощью t -критерия Стьюдента. Статистическая обработка данных проводилась при помощи компьютерной программы Microsoft Excel.

Расчет предполагаемых схем метаболизма соединения VMA-99-82 и физико-химических свойств возможных метаболитов проводился при помощи компьютерной программы PALLAS.

3.2. Фармакокинетика VMA-99-82 при внутривенном введении

В результате проведенного исследования были получены усредненные фармакокинетические профили зависимости концентрации вещества в плазме крови крыс от времени (Рисунок 12). Как видно из представленных данных, максимальная концентрация соединения VMA-99-82 (5,71 мкг/мл) наблюдается на пятой минуте после введения. После этого концентрация снижается, причем снижение носит биэкспоненциальный характер, предполагая быструю первую фазу распределения, сменяющуюся более медленной фазой элиминации. Первая фаза элиминации заканчивается к 2 часам и начинается вторая «медленная» фаза до 12 часов исследования.

Основные фармакокинетические параметры, рассчитанные по зависимости концентрации соединения в плазме крыс от времени (Таблица 11) показывают высокие значения периода полувыведения ($T_{1/2} = 11,03$ часа) и среднего времени удерживания в организме одной молекулы препарата (MRT = 9,55 часа). Площадь под фармакокинетической кривой составляет $AUC = 74,96$ мкг*час/мл. Показатель системного клиренса не слишком высок ($Cl = 0,67$ л/час*кг). Величина общего объема распределения ($Vd = 10,61$ л/кг) в 15,8 раза превышает общий объем жидкости в организме крысы - 0,67 л/кг, что свидетельствует о выраженной способности препарата интенсивно проникать в органы и ткани животных.

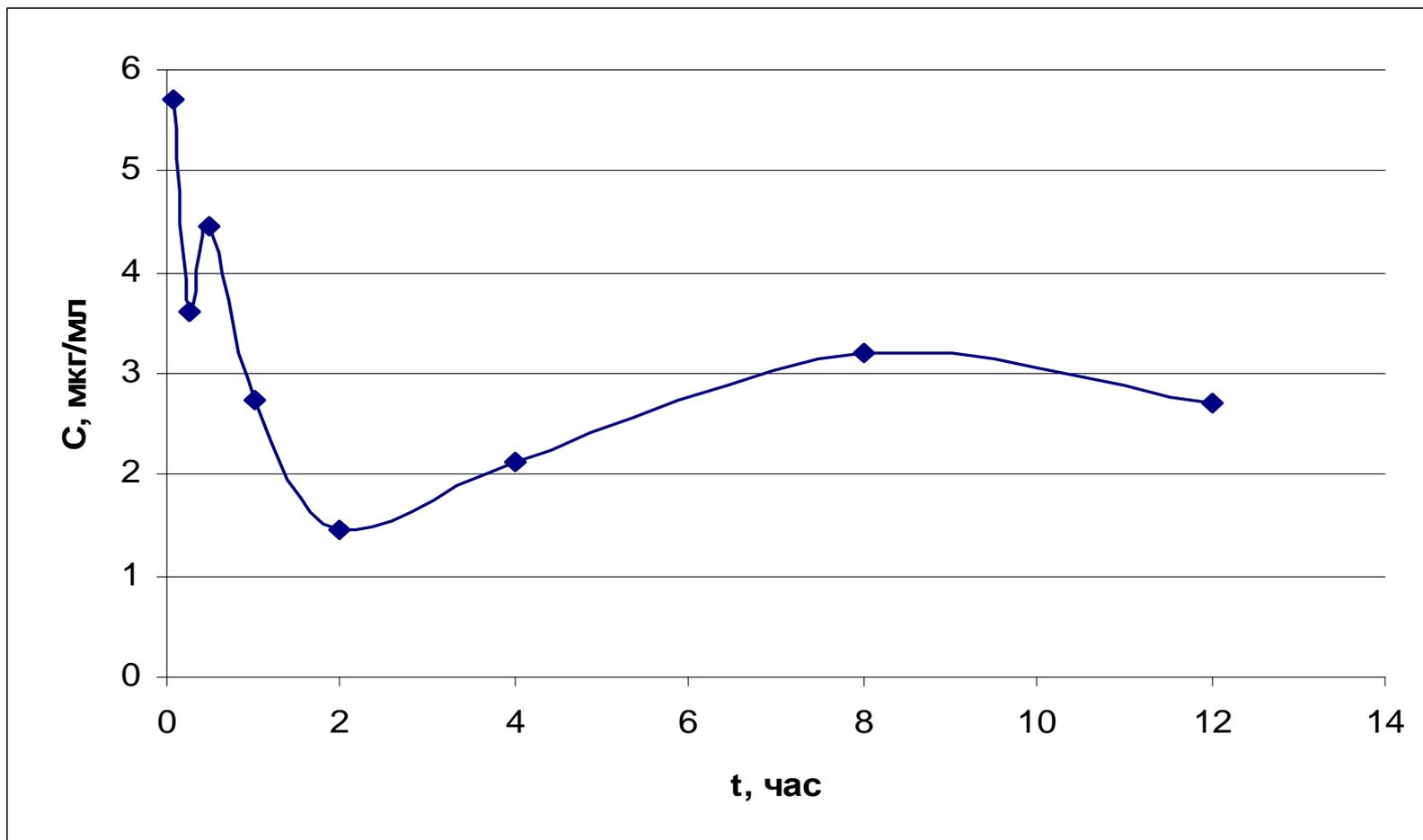


Рисунок 12. Содержание соединения VMA-99-82 в крови крыс при внутривенном введении в дозе 50 мг/кг. Обозначения: по оси абсцисс – время (часы), по оси ординат – концентрация (мкг/мл).

Фармакокинетические параметры соединения VMA-99-82 в крови крыс при внутривенном введении в дозе 50 мг/кг

<i>Параметры</i>	Значение
AUC (мкг*час/мл)	74,96
Kel (час ⁻¹)	0,063
T _{1/2} (час)	11,03
MRT (час)	9,55
Cl (л/(час/кг))	0,67
Vd (л/кг)	10,61

В распределении изучаемого соединения по органам и тканям прослеживается значительная неоднородность. Соединение VMA-99-82 в небольших количествах проникает через гематоэнцефалический барьер в головной мозг, достигая максимальной концентрации (6,52 мкг/г) на 15 минуте после введения и оставаясь выше порога обнаружения в течение 12 часов (Рисунок 13). Тканевая доступность составила 0,43 (Таблица 12).

В сердце максимум концентрации (25,07 мкг/г) достигается несколько позже (Рисунок 14), затем постепенно снижается и остается выше порога обнаружения в течение 12 часов. Тканевая доступность равна 1,16 (Таблица 12).

В мышечной и жировой ткани содержание VMA-99-82 также не велико. Достигая максимума на 30 минуте, концентрация соединения остается выше порога обнаружения в течение 12 часов (Рисунок 17, 20). Тканевая доступность составила 0,51 и 0,5 соответственно (Таблица 12).

В почках наблюдается сходная картина распределения, содержание вещества не слишком высоко, максимум концентрации составляет 10,87 мкг/г на 30 минут после введения (Рисунок 18). Тканевая доступность составила 0,45 (Таблица 12).

Большую тропность VMA-99-82 проявляет к печени и селезенке. Максимальная концентрация в печени (56,83 мкг/г) и селезенке (71,51 мкг/г) достигается к 30 минуте (Рисунок 15, 19). Фармакокинетический профиль соединения аналогичен таковым в других органах и тканях, а также плазме. Тканевая доступность составила 1,54 и 3,63 (Таблица 12).

Наиболее велико содержание VMA-99-82 в легких, достигая на максимуме через 1 час после введения 24693,5 мкг/г. Тканевая доступность составляет 1111,18. (Таблица 12).

Таблица 12.

Фармакокинетические параметры распределения препарата VMA-99-82 в органах и тканях при внутривенном введении крысам в дозе 50 мг/кг

Орган	AUC, мкг×час/мл	Ft
Мозг	32,46	0,43
Сердце	87,17	1,16
Селезенка	272,05	3,63
Легкие	83299,4	1111,18
Мышцы	38,2	0,51
Почки	33,91	0,45
Печень	115,38	1,54
Сальник	37,23	0,5

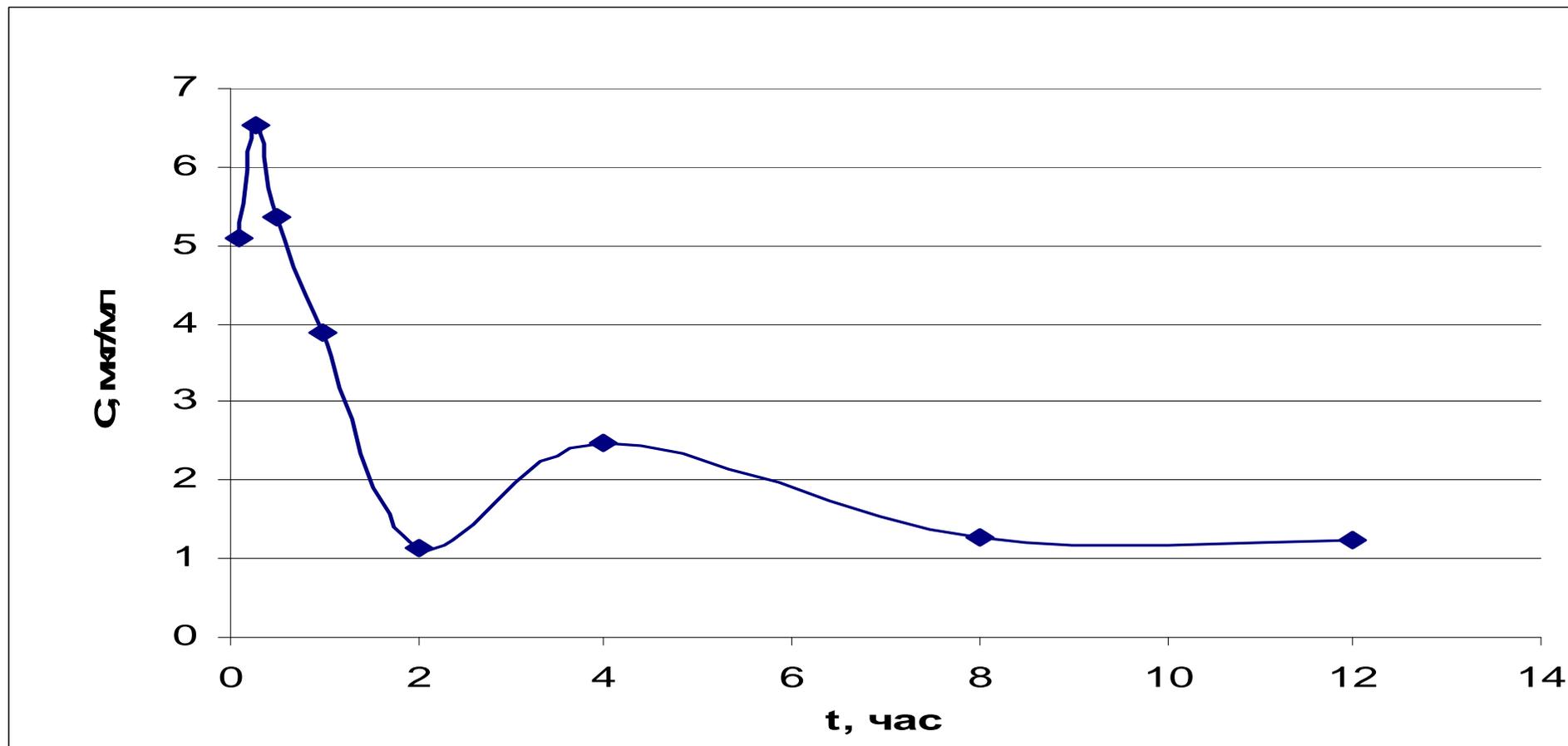


Рисунок 13. Содержание соединения VMA-99-82 в мозге крыс при внутривенном введении в дозе 50 мг/кг.

Обозначения: по оси абсцисс – время (часы), по оси ординат – концентрация (мкг/мл).

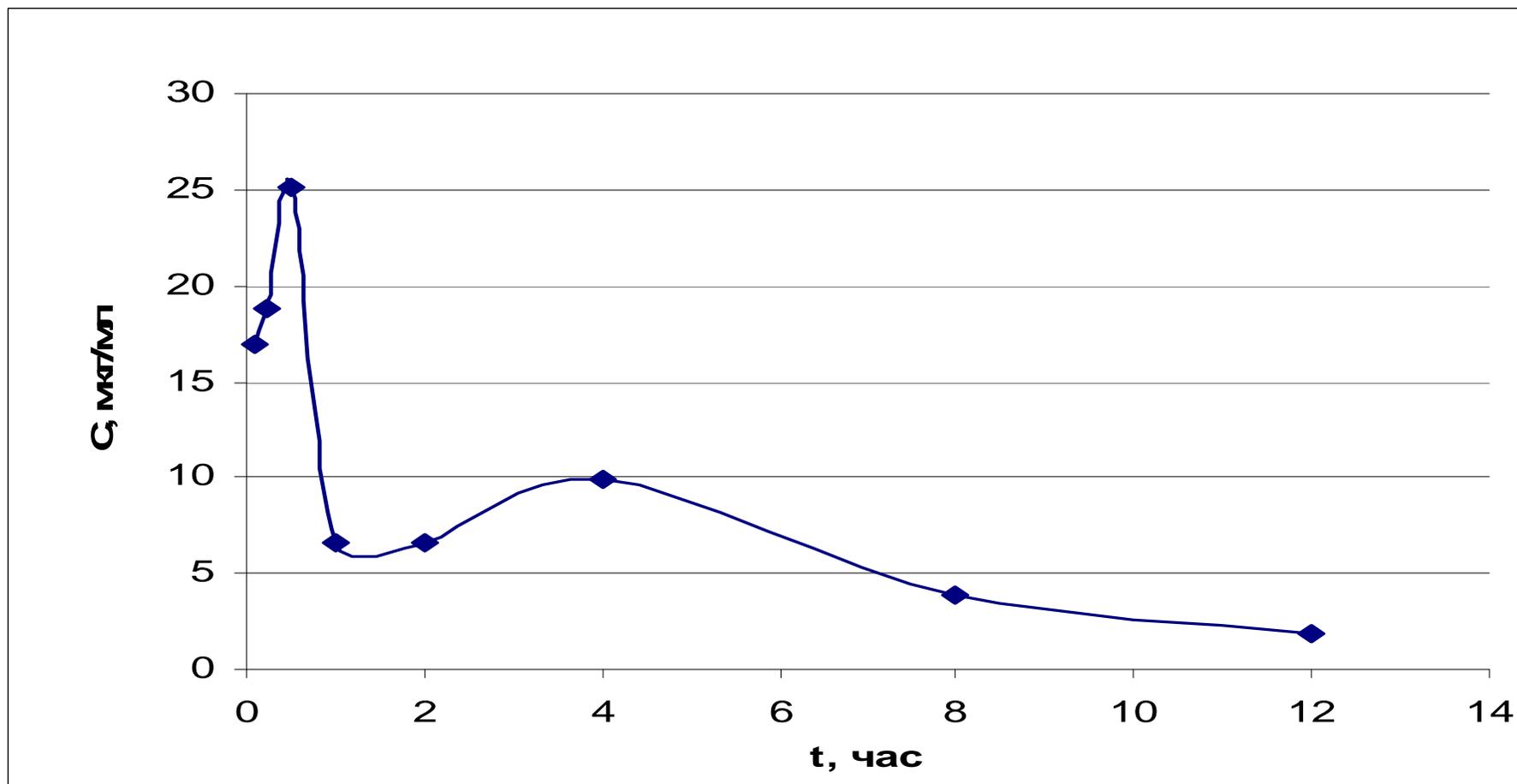


Рисунок 14. Содержание соединения VMA-99-82 в сердце крыс при внутривенном введении в дозе 50 мг/кг.

Обозначения: по оси абсцисс – время (часы), по оси ординат – концентрация (мкг/мл).

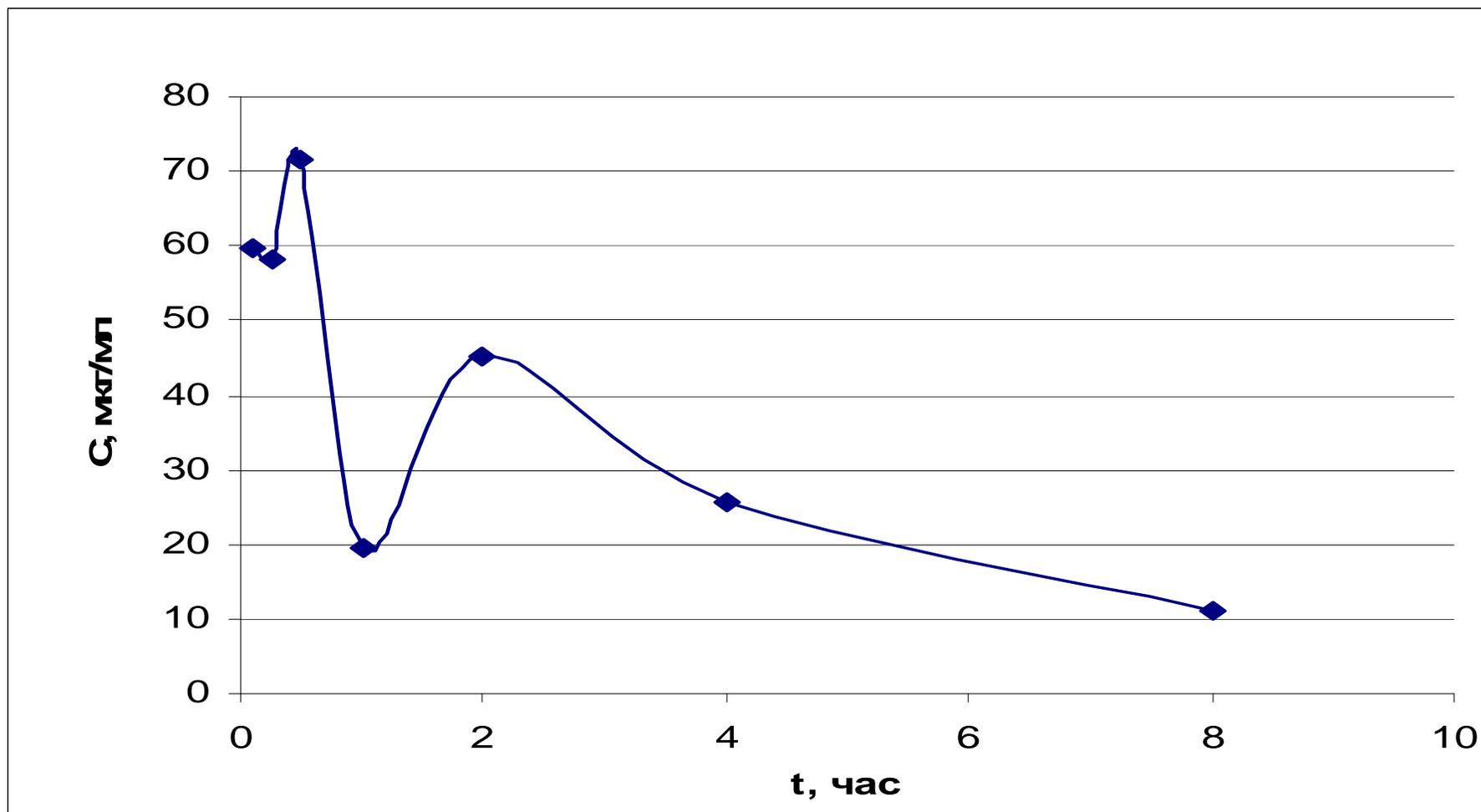


Рисунок 15. Содержание соединения VMA-99-82 в селезенке крыс при внутривенном введении в дозе 50 мг/кг. Обозначения: по оси абсцисс – время (часы), по оси ординат – концентрация (мкг/мл).

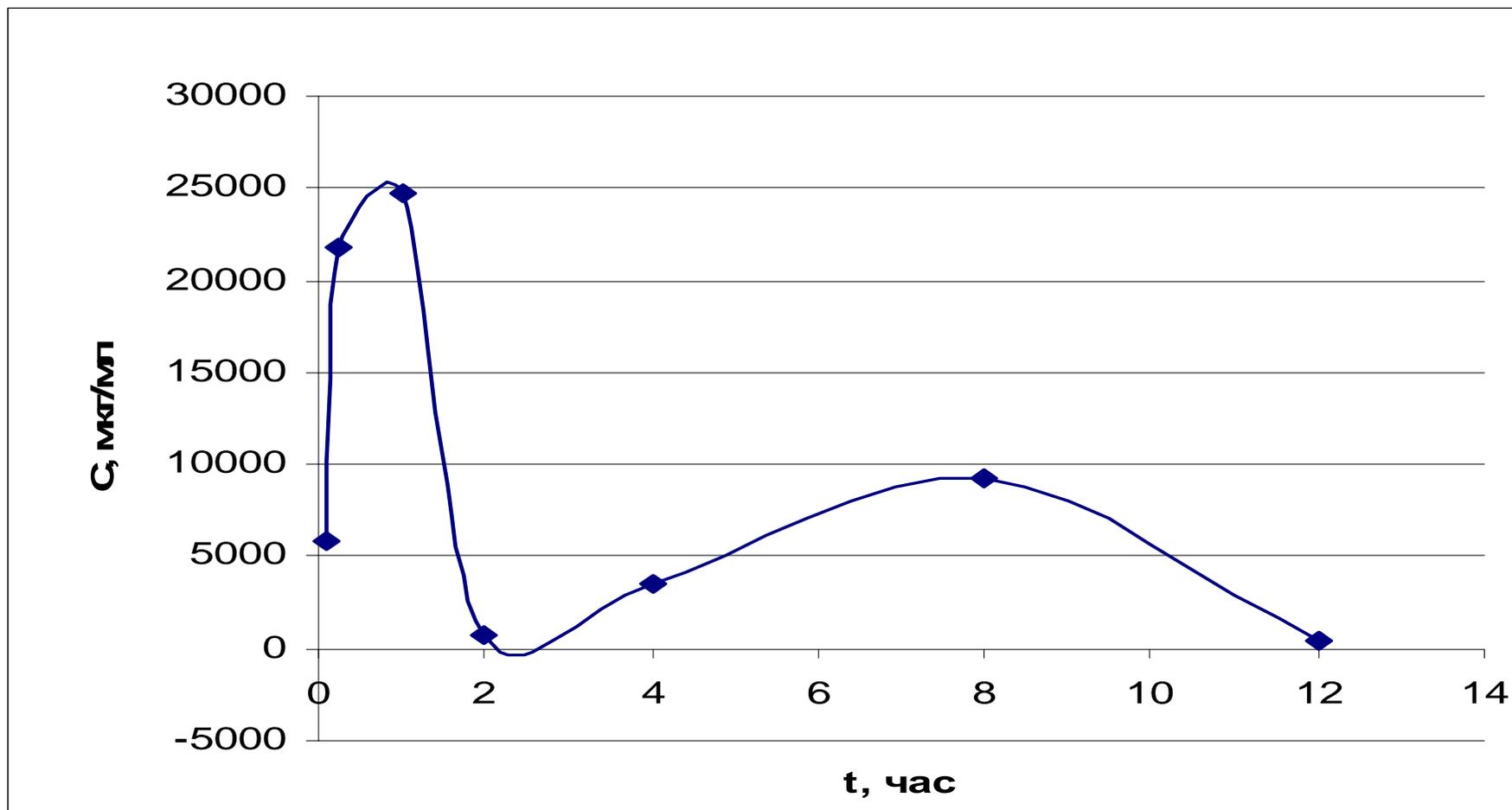


Рисунок 16. Содержание соединения VMA-99-82 в легких крыс при внутривенном введении в дозе 50 мг/кг. Обозначения: по оси абсцисс – время (часы), по оси ординат – концентрация (мкг/мл).

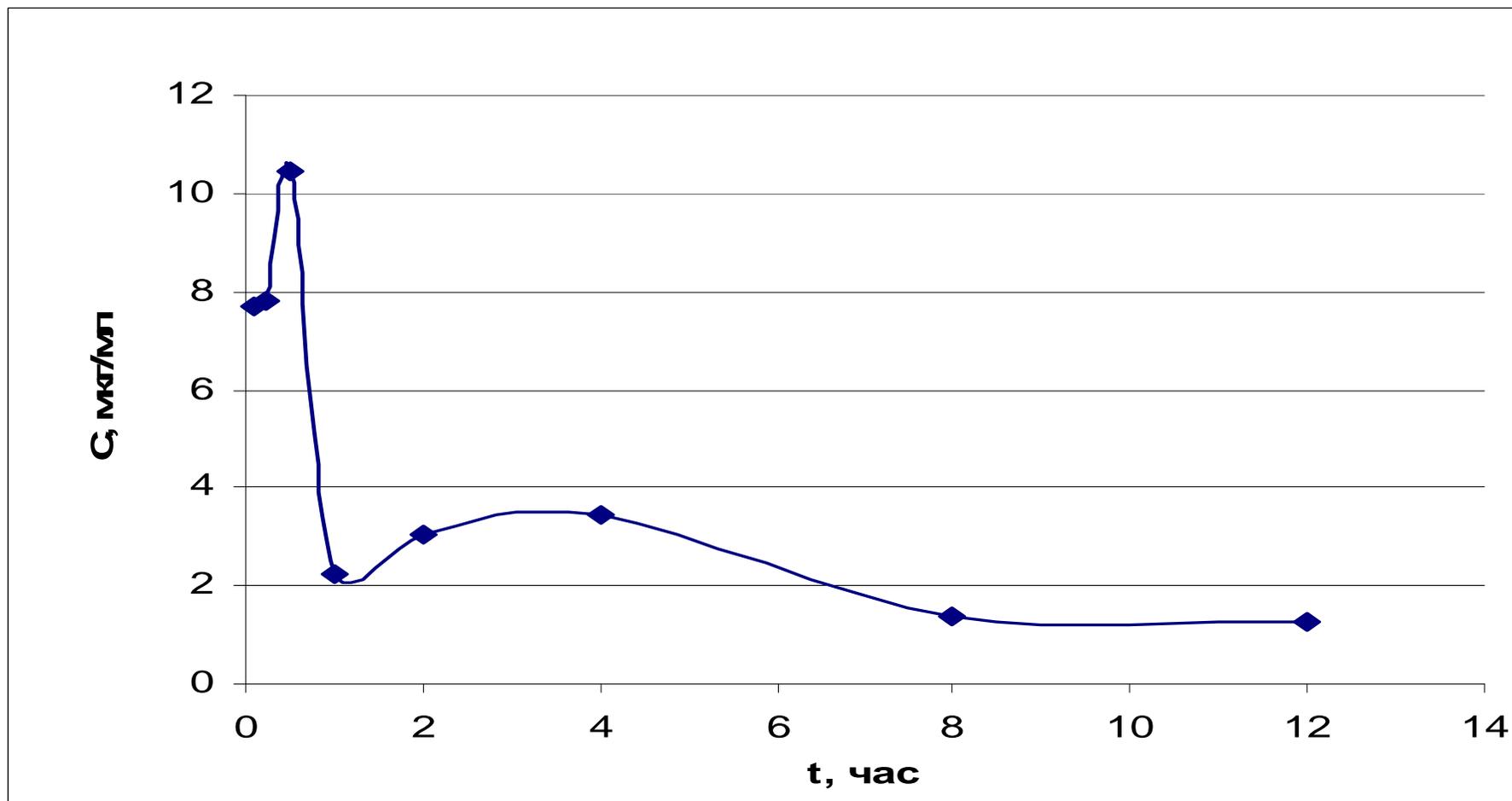


Рисунок 17. Содержание соединения VMA-99-82 в мышце крыс при внутривенном введении в дозе 50 мг/кг.

Обозначения: по оси абсцисс – время (часы), по оси ординат – концентрация (мкг/мл).

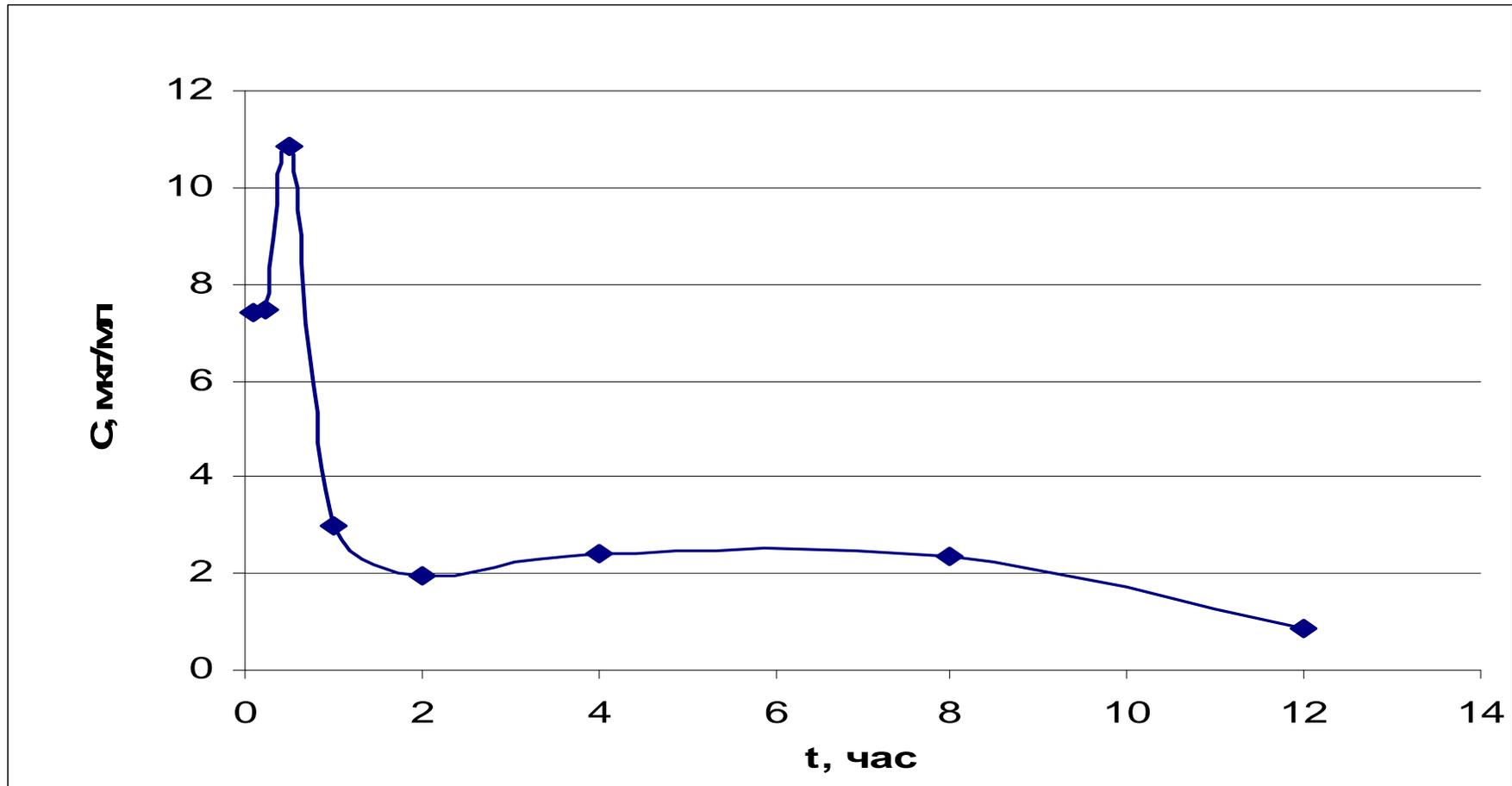


Рисунок 18. Содержание соединения VMA-99-82 в почках крыс при внутривенном введении в дозе 50 мг/кг.

Обозначения: по оси абсцисс – время (часы), по оси ординат – концентрация (мкг/мл).

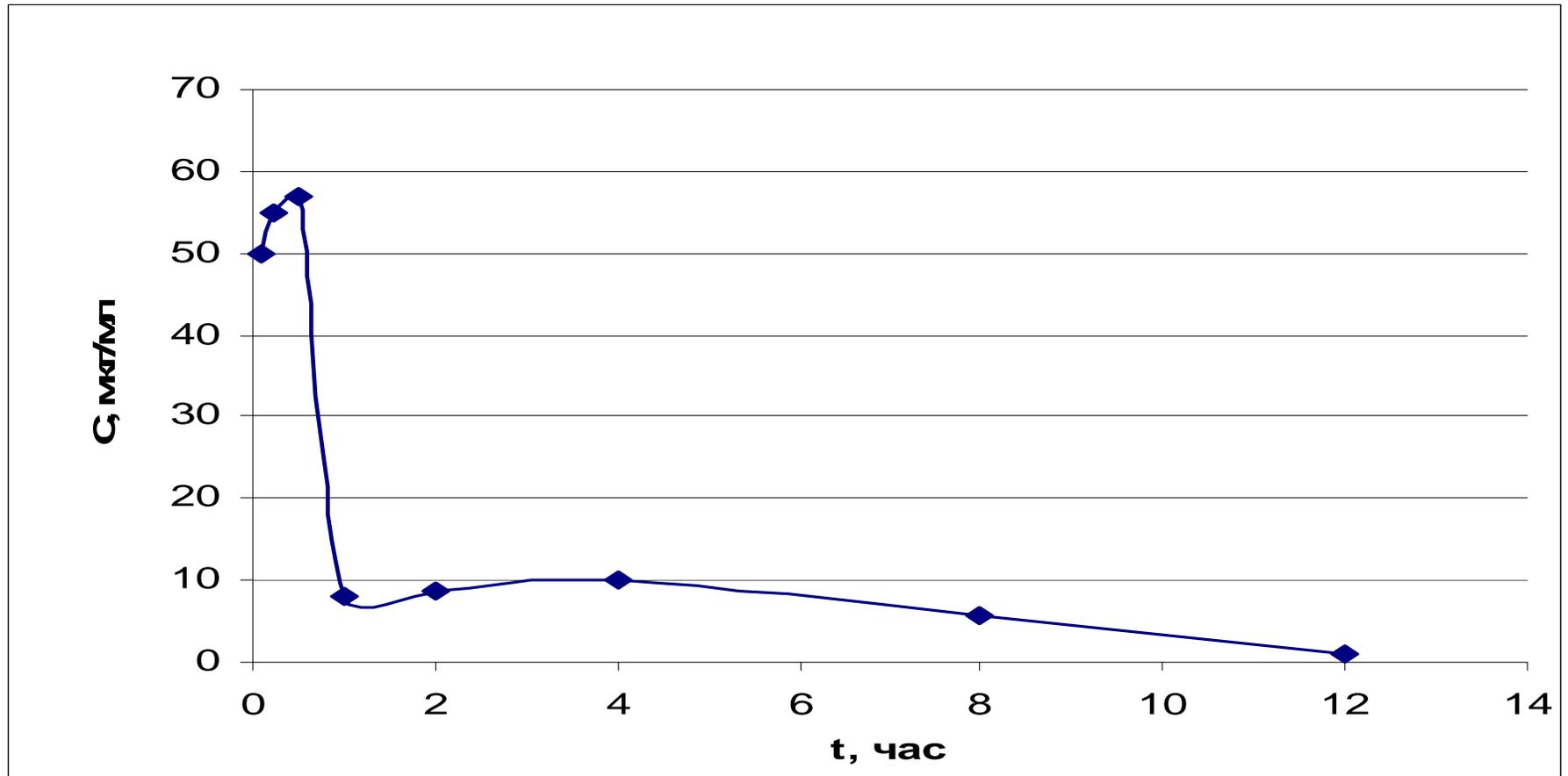


Рисунок 19. Содержание соединения VMA-99-82 в печени крыс при внутривенном введении в дозе 50 мг/кг.

Обозначения: по оси абсцисс – время (часы), по оси ординат – концентрация (мкг/мл).

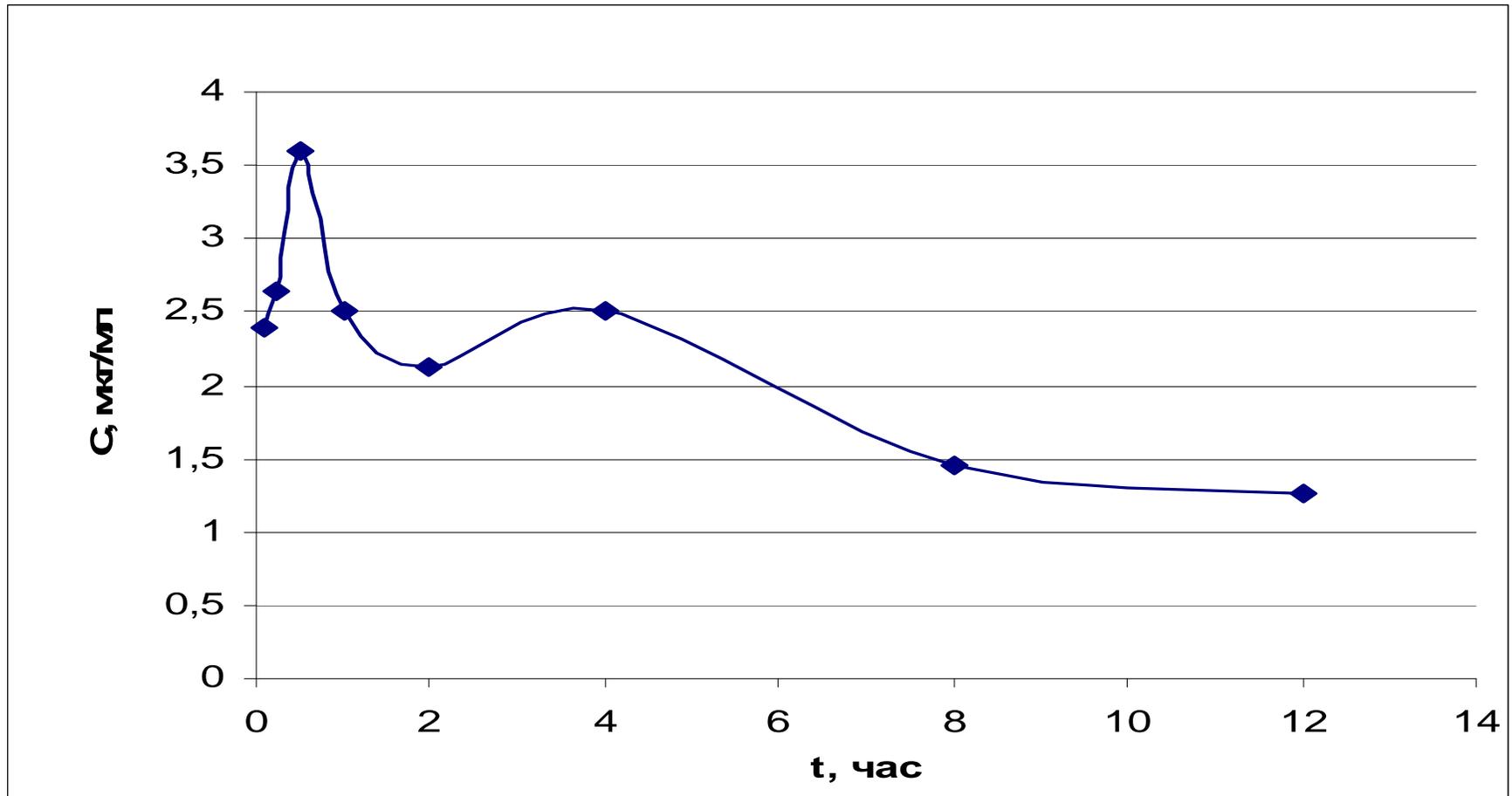


Рисунок 20. Содержание соединения VMA-99-82 в сальнике крыс при внутривенном введении в дозе 50 мг/кг.

Обозначения: по оси абсцисс – время (часы), по оси ординат – концентрация (мкг/мл).

При изучении экскреции препарата было выявлено, что VMA-99-82 определяется в моче в течение не менее 72 часов исследования. При этом максимум выведения приходится на 2 сутки после введения (Рисунок 21). С мочой выделилось менее 1% неизменной субстанции от общего количества введенного препарата. Почечный клиренс составляет 0,936 мл/час, внепочечный – 666,04 мл/час, то есть значительно превышает ренальный, что коррелирует с полученными ранее данными о характере распределения в органах.

При исследовании экскреции VMA-99-82 с содержимым кишечника было обнаружено, что максимальное выделение препарата приходится на 2 сутки (Рисунок 22). Соединение определяется не менее 72 часов. Суммарная экскреция неизменной субстанции в 5 раз ниже таковой в моче, что свидетельствует о низкой степени участия данного пути выведения в процессах элиминации препарата в организме крыс.

Малые количества неизменной субстанции, выводимые с мочой и калом, могут свидетельствовать о выраженной способности вещества подвергаться процессам биотрансформации в организме крыс.

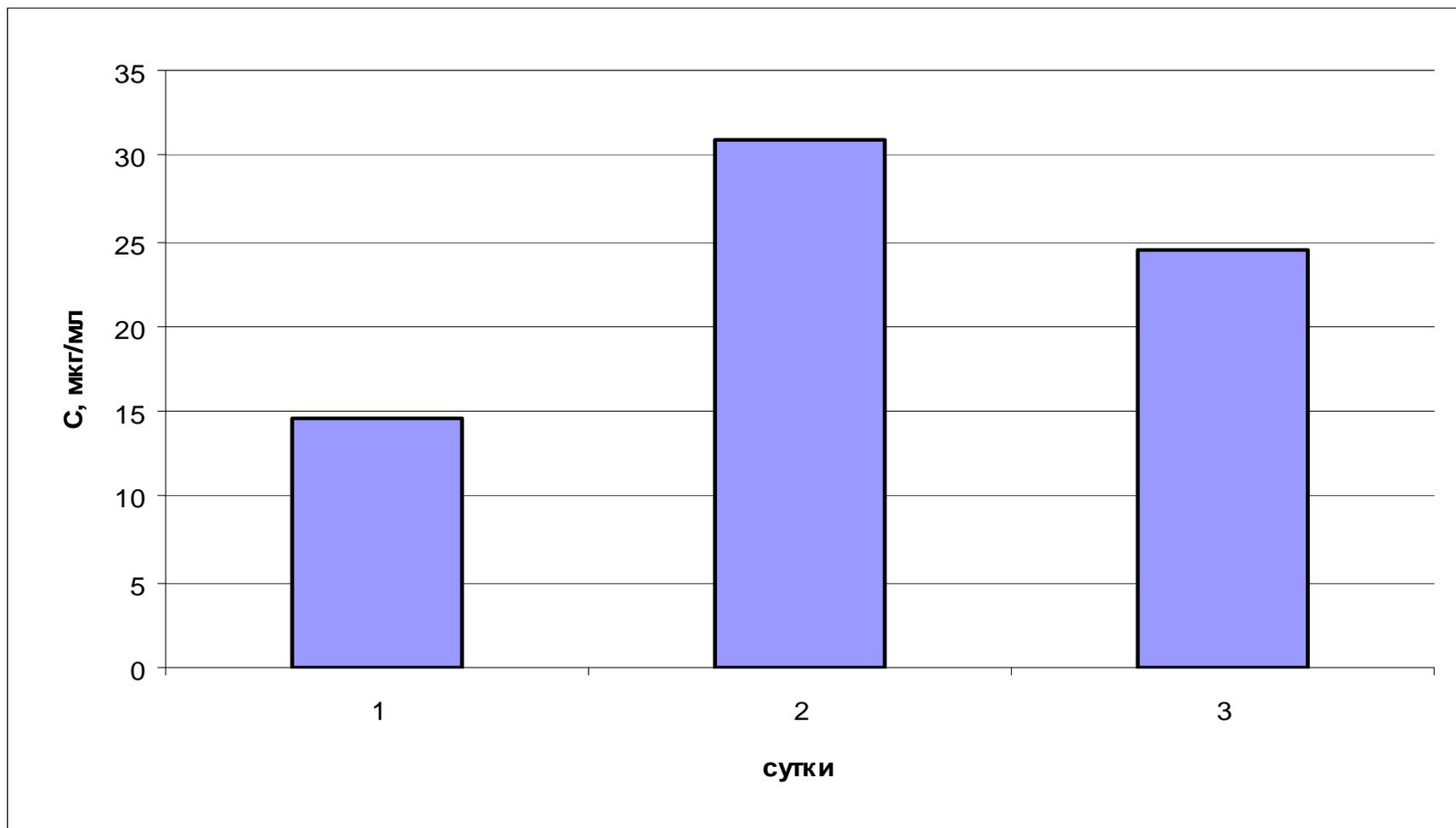


Рисунок 21. Содержание препарата VMA-99-82 в моче крыс при внутривенном введении в дозе 50 мг/кг.

Обозначения: по оси абсцисс – время (сутки), по оси ординат – количество вещества (мкг).

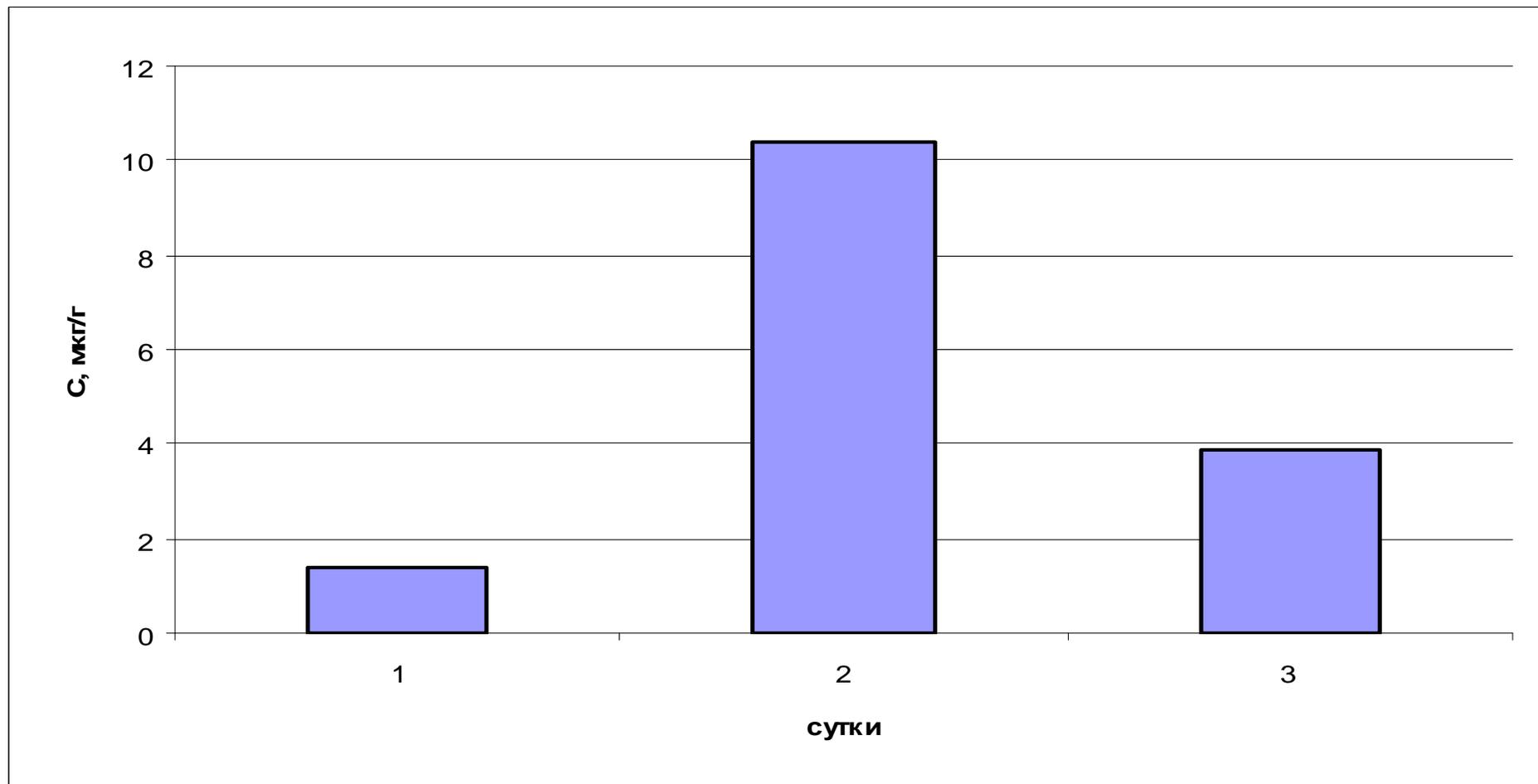


Рисунок 22. Содержание препарата VMA-99-82 в кале крыс при внутривенном введении в дозе 50 мг/кг.

Обозначения: по оси абсцисс – время (сутки), по оси ординат – концентрация (мкг/г).

3.3. Фармакокинетические свойства соединения VMA-99-82 при внутрижелудочном введении

Фармакокинетический профиль соединения VMA-99-82 в плазме крови при пероральном введении у крыс (Рисунок 23) имеет фазу повышения концентрации или фазу всасывания, в течение которой происходит достижение максимальной концентрации в плазме крови. Вторая часть фармакокинетической кривой, характеризующая элиминацию препарата из плазмы крови (фаза снижения концентрации препарата), носит биэкспоненциальный характер. Первая «быстрая» фаза элиминации заканчивается к 1 часу и начинается вторая «медленная», продолжающаяся до 12 часов исследования. Соединение VMA-99-82 очень быстро всасывается из ЖКТ - максимальная концентрация соединения (9,3 мкг/мл) достигается к 30 минутам после введения.

Основные фармакокинетические параметры (Таблица 13) показывают высокие значения периода полувыведения ($T_{1/2} = 6,11$ часа) и среднего времени удерживания в организме одной молекулы препарата (MRT = 8,52 часа), что согласуется с данными, рассчитанными при внутривенном введении. Площадь под фармакокинетической кривой составляет $AUC = 49,43$ мкг*час/мл. Величина общего объема распределения ($V_d = 8,91$ л/кг) в 13,3 раза превышает общий объем жидкости в организме крысы $-(0,67$ л/кг), что свидетельствует о выраженной способности препарата интенсивно проникать в органы и ткани животных. Показатель системного клиренса не слишком высок ($Cl = 1,01$ л/час*кг), но превосходит таковой при внутривенном введении. Величина абсолютной биодоступности составила 65,94 %.

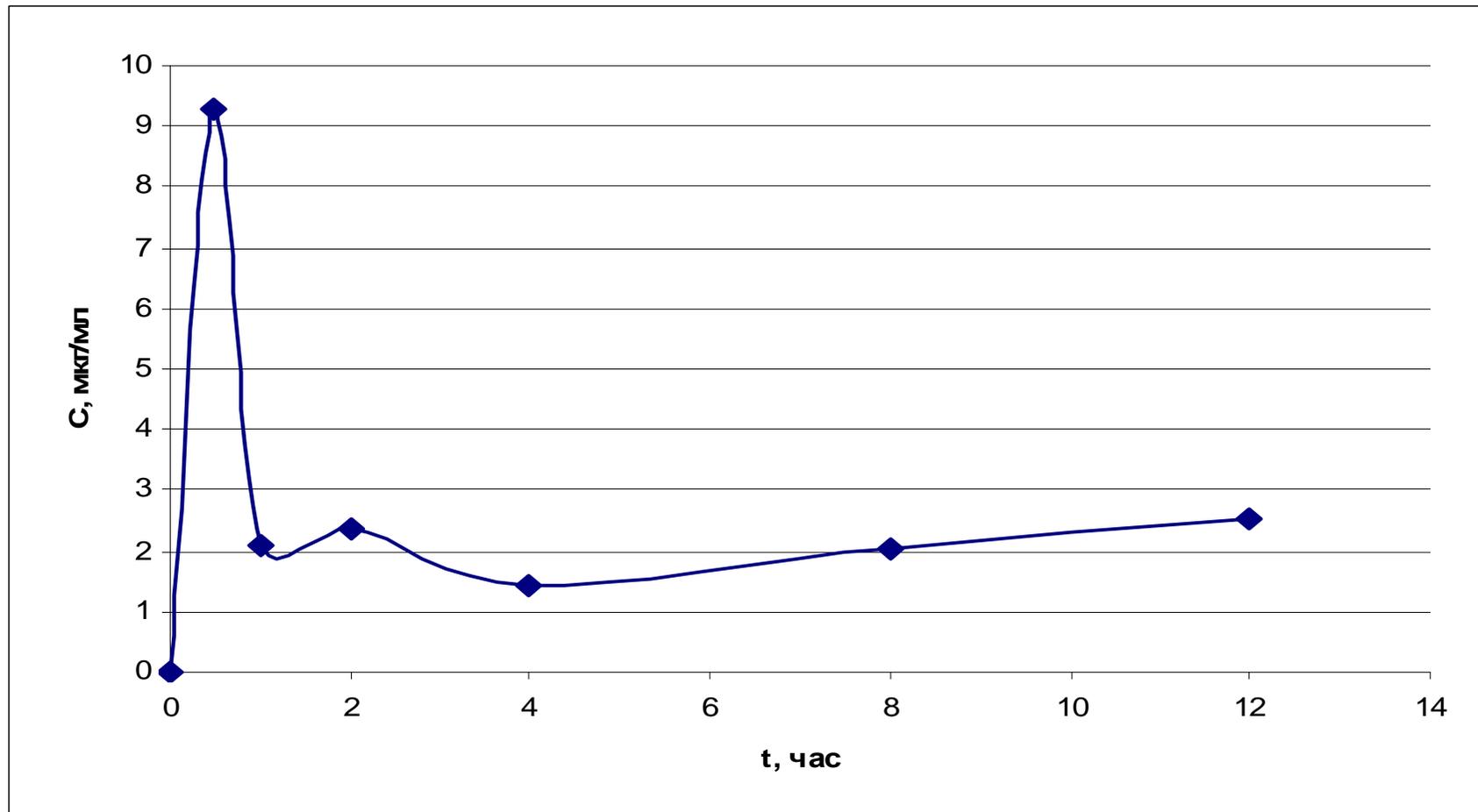


Рисунок 23. Содержание соединения VMA-99-82 в крови крыс при пероральном введении в дозе 50 мг/кг.

Обозначения: По оси абсцисс – время (часы), по оси ординат – концентрация (мкг/мл).

Таблица 13.

Фармакокинетические параметры соединения VMA-99-82 в крови крыс при пероральном введении в дозе 50 мг/кг

Параметры	Значение
AUC (мкг/мл/час)	49,43
Kel (час)	0,11
T1/2 (час)	6,11
MRT (час)	8,52
Cmax (мкг/мл)	9,3
Tmax (час)	0,5
Vd (л/кг)	8,91
Cl (л/час/кг)	1,01
Фабс. %	65,94

Соединение VMA-99-82 интенсивно распределяется в органы и ткани, концентрация в которых соответствует или превышает его содержание в плазме крови. Следует отметить, что характер распределения соответствует таковому при внутривенном введении.

Соединение VMA-99-82 проявляет наименьшую тропность к тканям головного мозга, в небольших количествах проникая через гематоэнцефалический барьер, достигая максимума (1,13 мкг/г) через 4 часа после введения и оставаясь выше порога обнаружения в течение 8 часов (Рисунок 24). Тканевая доступность составила 0,28 (Таблица 14).

В сердце соединение VMA-99-82 также определяется в небольших количествах. Максимум концентрации (2,17 мкг/г) достигается к 4 часу (Рисунок 25), затем снижается, оставаясь выше порога обнаружения в течение 8 часов. Тканевая доступность 0,34 (Таблица 14).

В мышечной ткани содержание VMA-99-82 достигает максимума через 1 час после введения, концентрация соединения остается выше порога обнаружения в течение 12 часов (Рисунок 28). Тканевая доступность составила 0,65 (Таблица 14).

В почках наблюдается сходная картина распределения и также содержание вещества не слишком высоко, максимум концентрации составляет 1,33 мкг/г через 2 часа после введения (Рисунок 29). Тканевая доступность составила 0,41 (Таблица 14). Низкие значения концентрации соединения VMA-99-82 в ткани почек коррелируют с данными по элиминации.

В селезенке пик концентрации изучаемого соединения наблюдается через 2 часа после введения и составляет 4,67 мкг/г. Падение ниже порога определения наступает через 8 часов после введения (Рисунок 26). Тканевая доступность 0,63 (Таблица 14).

Большую тропность VMA-99-82 проявляет к печени. Максимальная концентрация в печени (3,21 мкг/г) достигается к 8 часу после введения (Рисунок 30). Тканевая доступность составила 1,34 (Таблица 14).

При пероральном введении содержание изучаемого соединения в жировой ткани также невелико, как и при внутривенном пути введения. Максимум (3 мкг/г) достигается через 30 минут после введения и после достаточно резкого падения концентрация остается выше порога обнаружения в течение 8 часов (Рисунок 31). Тканевая доступность – 0,52 (Таблица 14).

Наиболее велико содержание VMA-99-82 в легких, достигая максимума 744,64 мкг/г уже через 30 минут после введения (Рисунок 27). Тканевая доступность составила 8,14. (Таблица 14). Высокое содержание ананта в легочной ткани аналогично таковому при внутривенном пути введения. Данный факт также подтверждается полученными при изучении экскреции соединения VMA-99-82 данными о превосходстве внеренального пути выведения.

При изучении экскреции препарата было выявлено, что VMA-99-82 определяется в моче в течение не менее 72 часов исследования. При этом максимум выведения приходится на 1 сутки после введения (Рисунок 32). Почечный клиренс составляет 1,8 мл/час, внепочечный – 1009,72 мл/час.

При исследовании экскреции VMA-99-82 с содержимым кишечника было обнаружено, что максимальное выделение препарата также приходится на 1 сутки исследования (Рисунок 33). Соединение определяется в течение 48 часов.

Картина экскреции несколько отличается от таковой при внутривенном пути введения и основная часть выведения происходит в первые сутки исследования, но количество неизменной субстанции, выделяемой с мочой и калом также крайне незначительно (менее 1%), что подтверждает предположение о выраженной способности вещества подвергаться процессам биотрансформации в организме крыс.

Таблица 14.

Фармакокинетические параметры распределения соединения VMA-99-82 в органах и тканях при пероральном введении крысам в дозе 50 мг/кг

Орган	AUC, мкг×час/мл	Ft
Мозг	13,58	0,28
Сердце	16,94	0,34
Селезенка	30,97	0,63
Легкие	402,42	8,14
Мышцы	32	0,65
Почки	20,4	0,41
Печень	66,03	1,34
Сальник	25,51	0,52

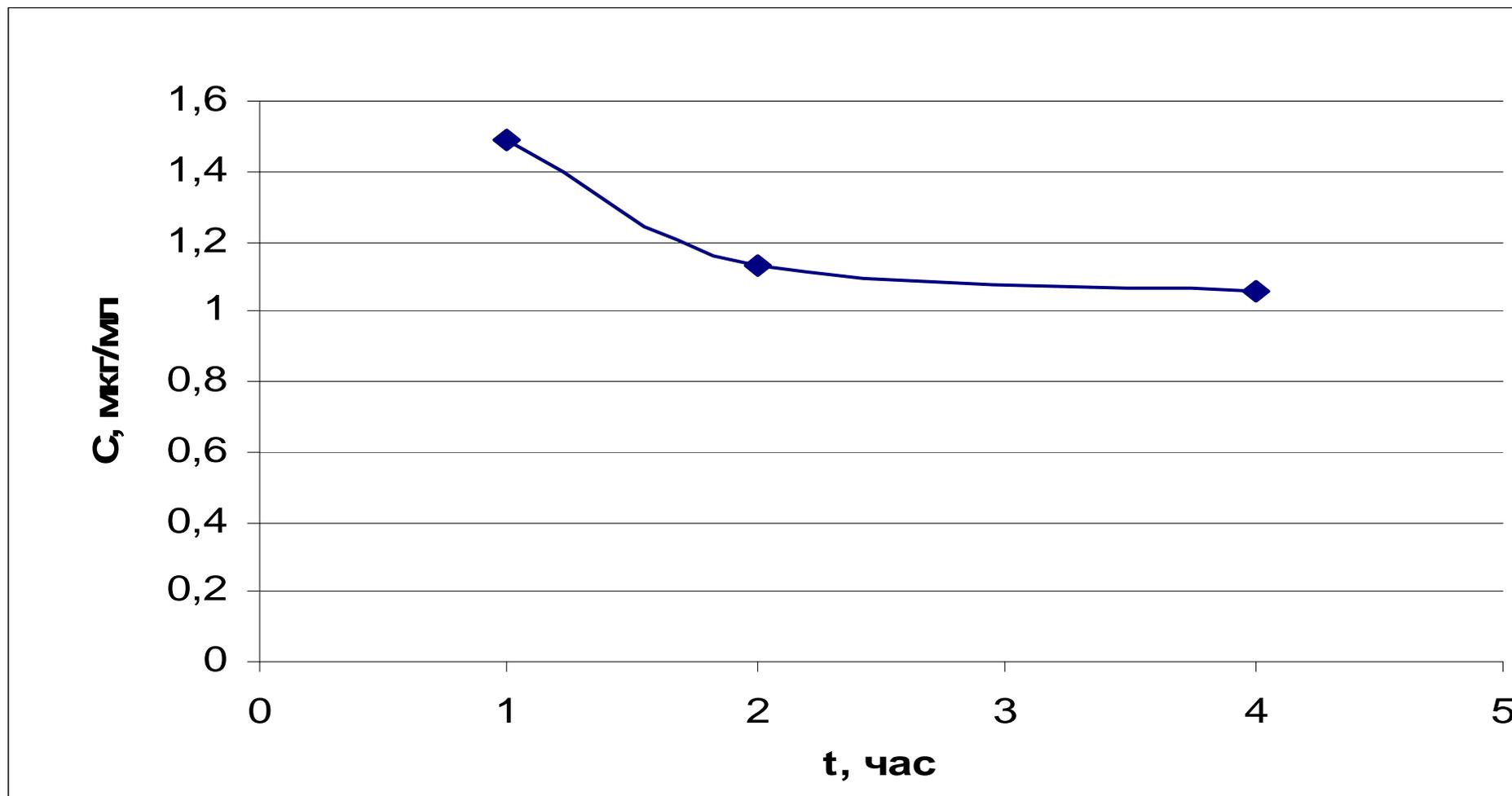


Рисунок 24. Содержание соединения VMA-99-82 в мозге крыс при пероральном введении в дозе 50 мг/кг.

Обозначения: По оси абсцисс – время (часы), по оси ординат – концентрация (мкг/мл).

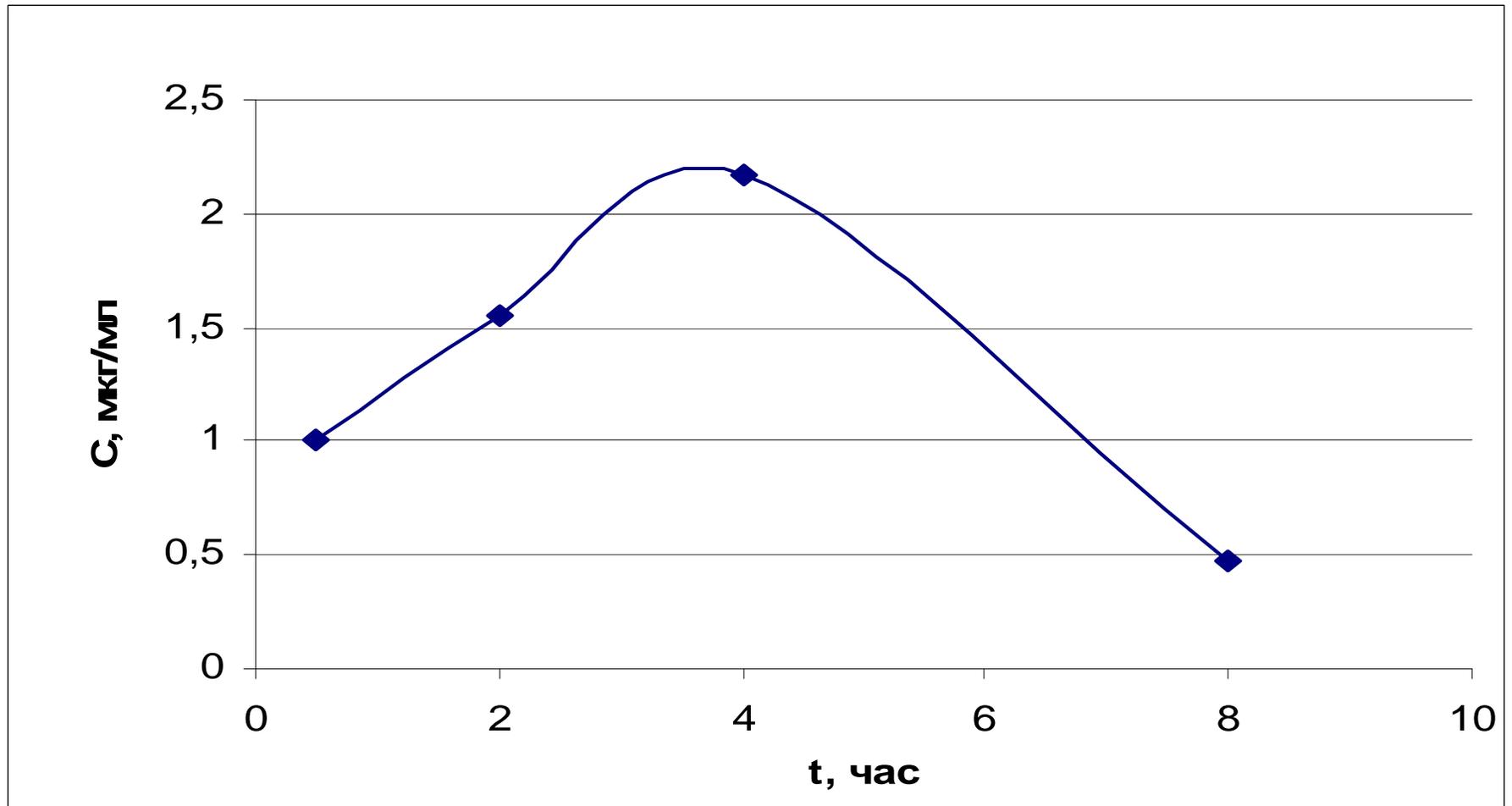


Рисунок 25. Содержание соединения VMA-99-82 в сердце крыс при пероральном введении в дозе 50 мг/кг.

Обозначения: По оси абсцисс – время (часы), по оси ординат – концентрация (мкг/мл).

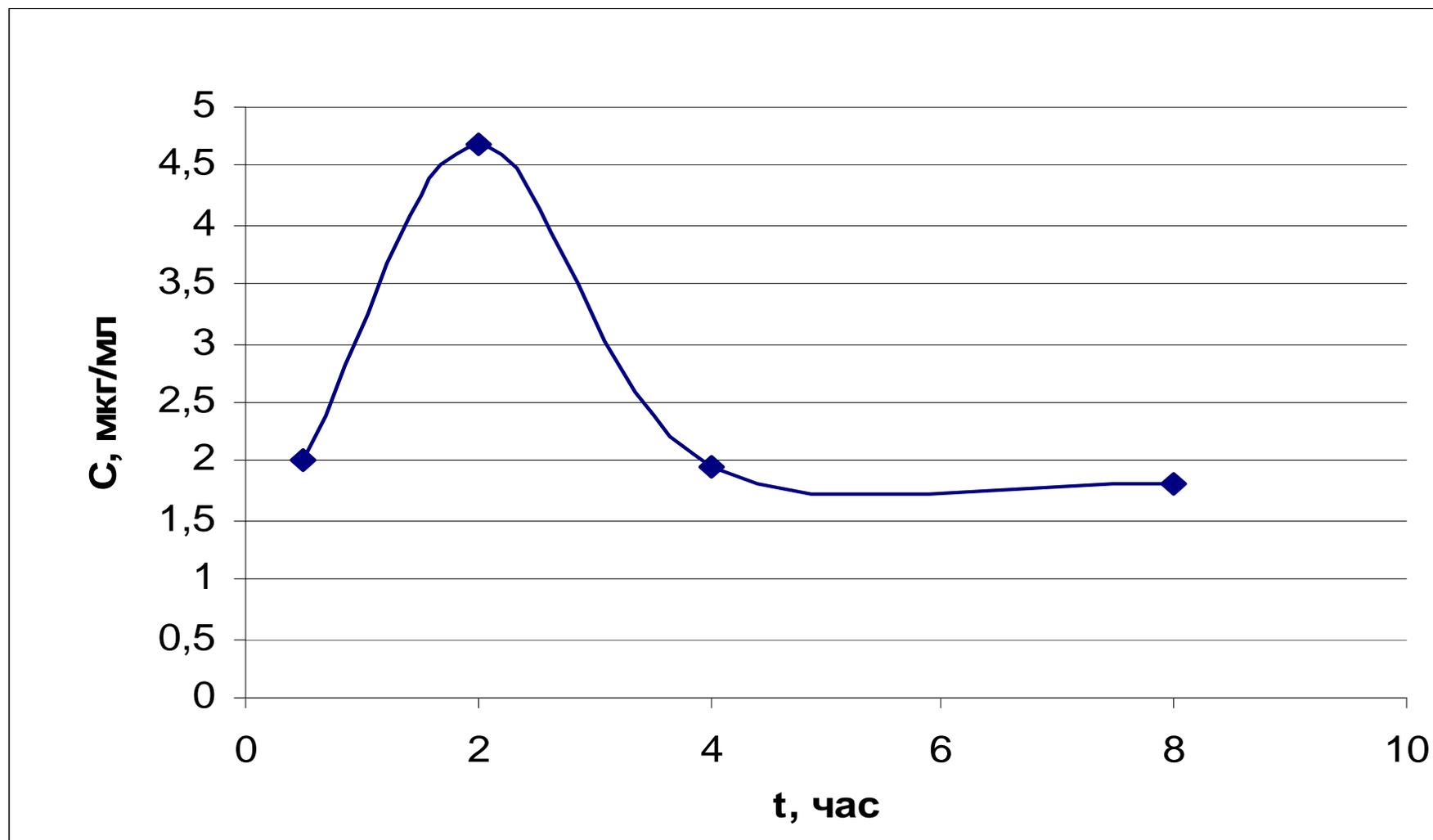


Рисунок 26. Содержание соединения VMA-99-82 в селезенке крыс при пероральном введении в дозе 50 мг/кг.

Обозначения: По оси абсцисс – время (часы), по оси ординат – концентрация (мкг/мл).

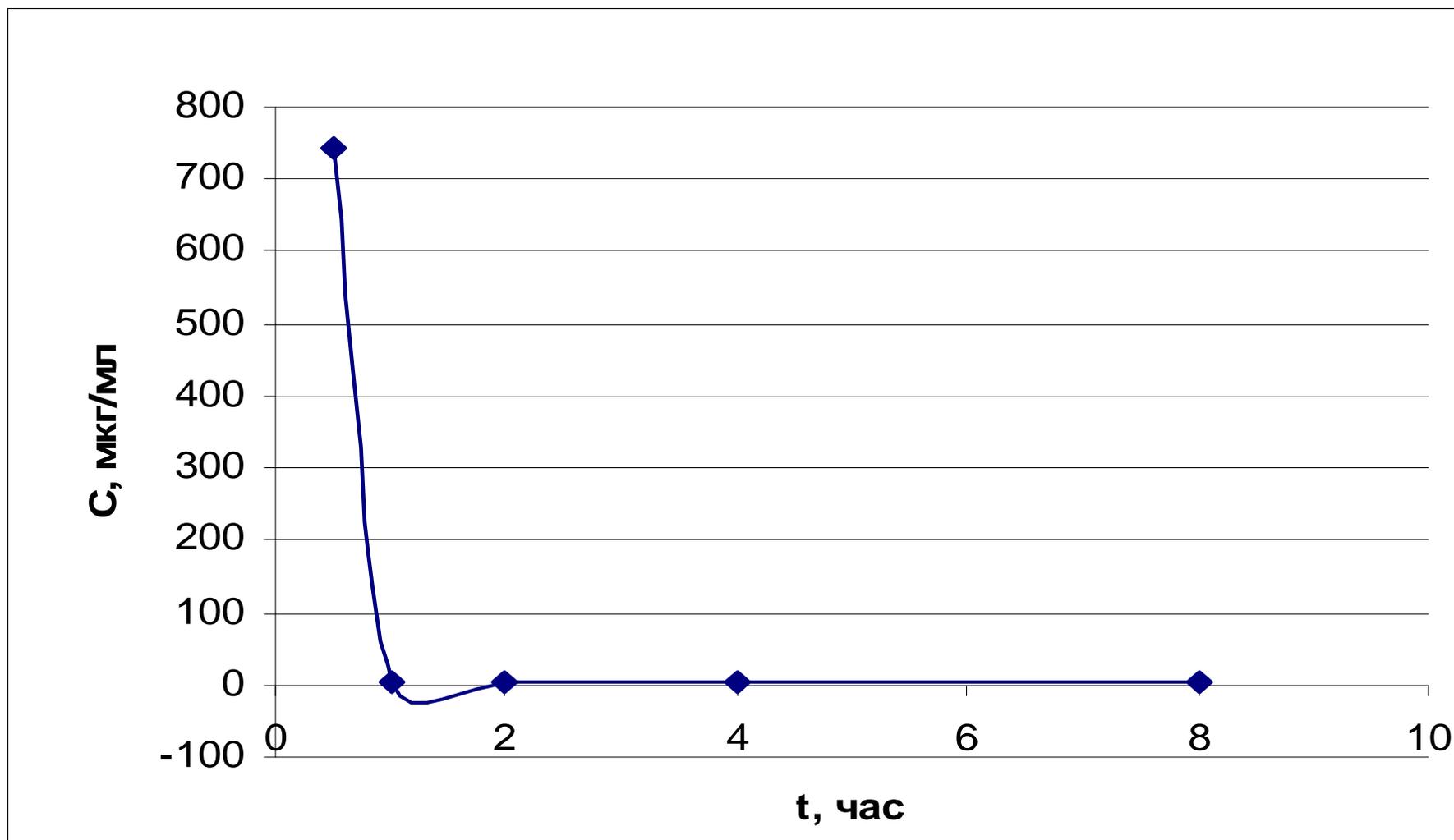


Рисунок 27. Содержание соединения VMA-99-82 в легких крыс при пероральном введении в дозе 50 мг/кг.

Обозначения: По оси абсцисс – время (часы), по оси ординат – концентрация (мкг/мл).

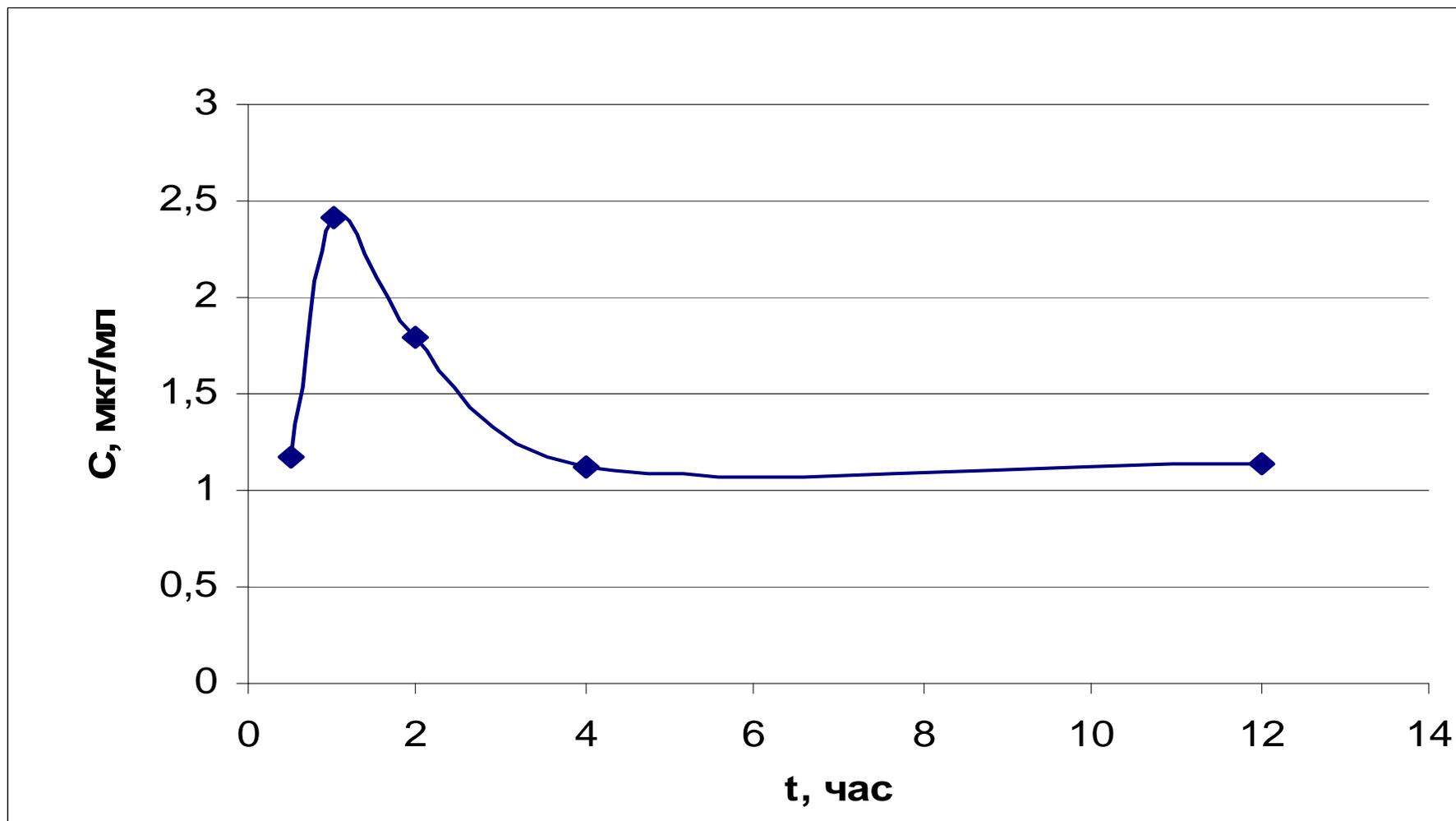


Рисунок 28. Содержание соединения VMA-99-82 в мышце крыс при пероральном введении в дозе 50 мг/кг.

Обозначения: По оси абсцисс – время (часы), по оси ординат – концентрация (мкг/мл).

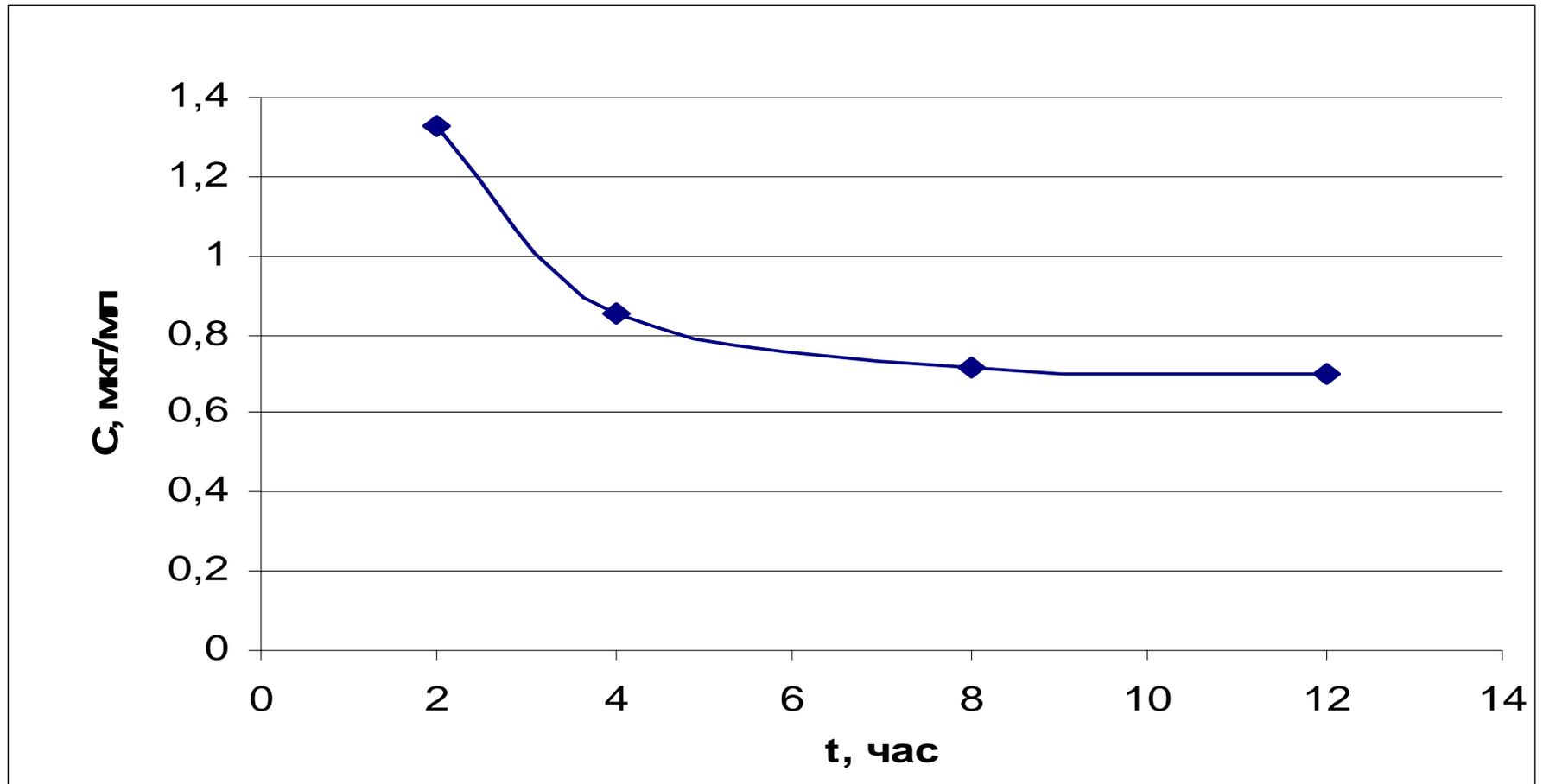


Рисунок 29. Содержание соединения VMA-99-82 в почках крыс при пероральном введении в дозе 50 мг/кг.

Обозначения: По оси абсцисс – время (часы), по оси ординат – концентрация (мкг/мл).

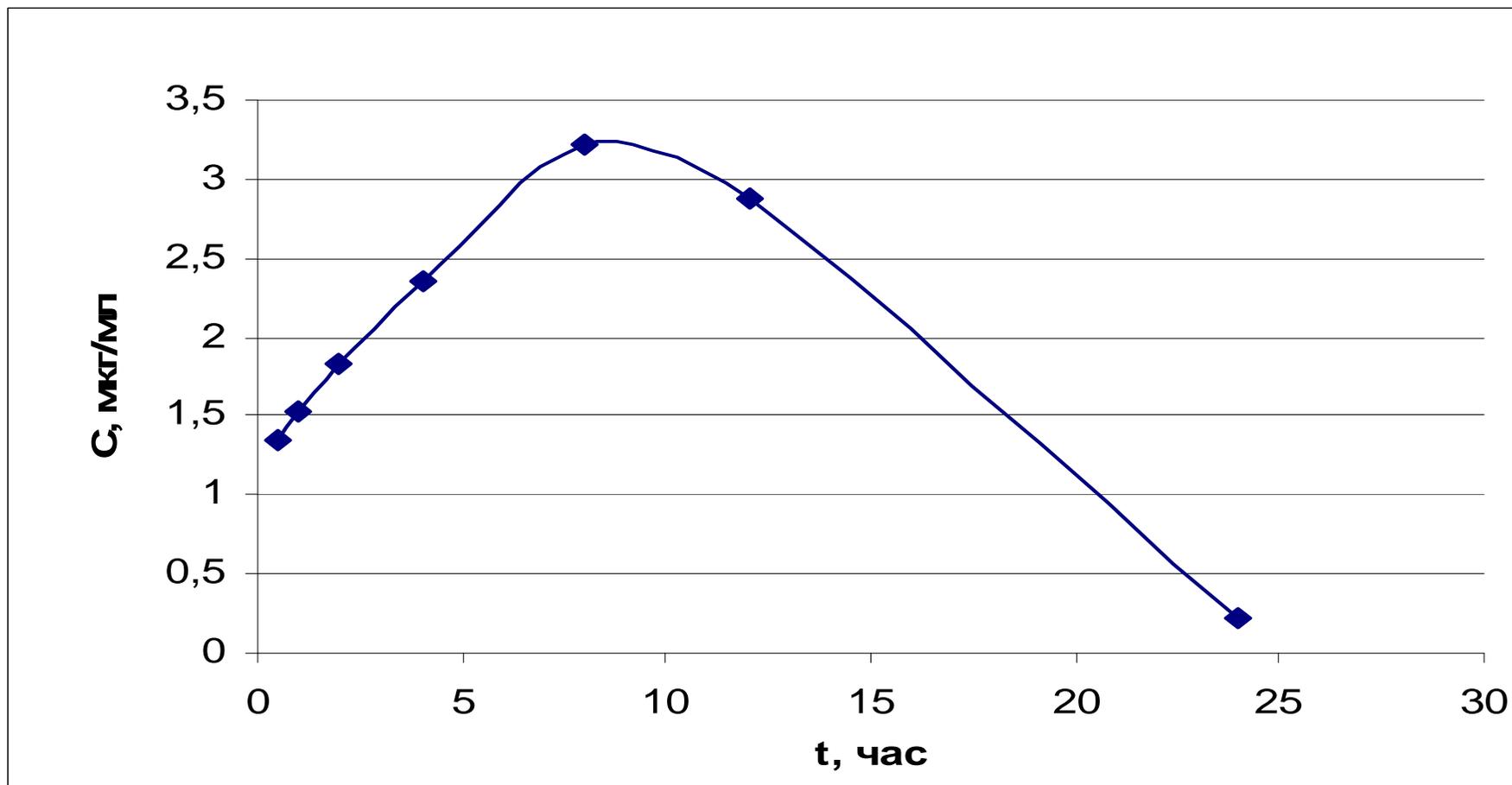


Рисунок 30. Содержание соединения VMA-99-82 в печени крыс при пероральном введении в дозе 50 мг/кг.

Обозначения: По оси абсцисс – время (часы), по оси ординат – концентрация (мкг/мл).

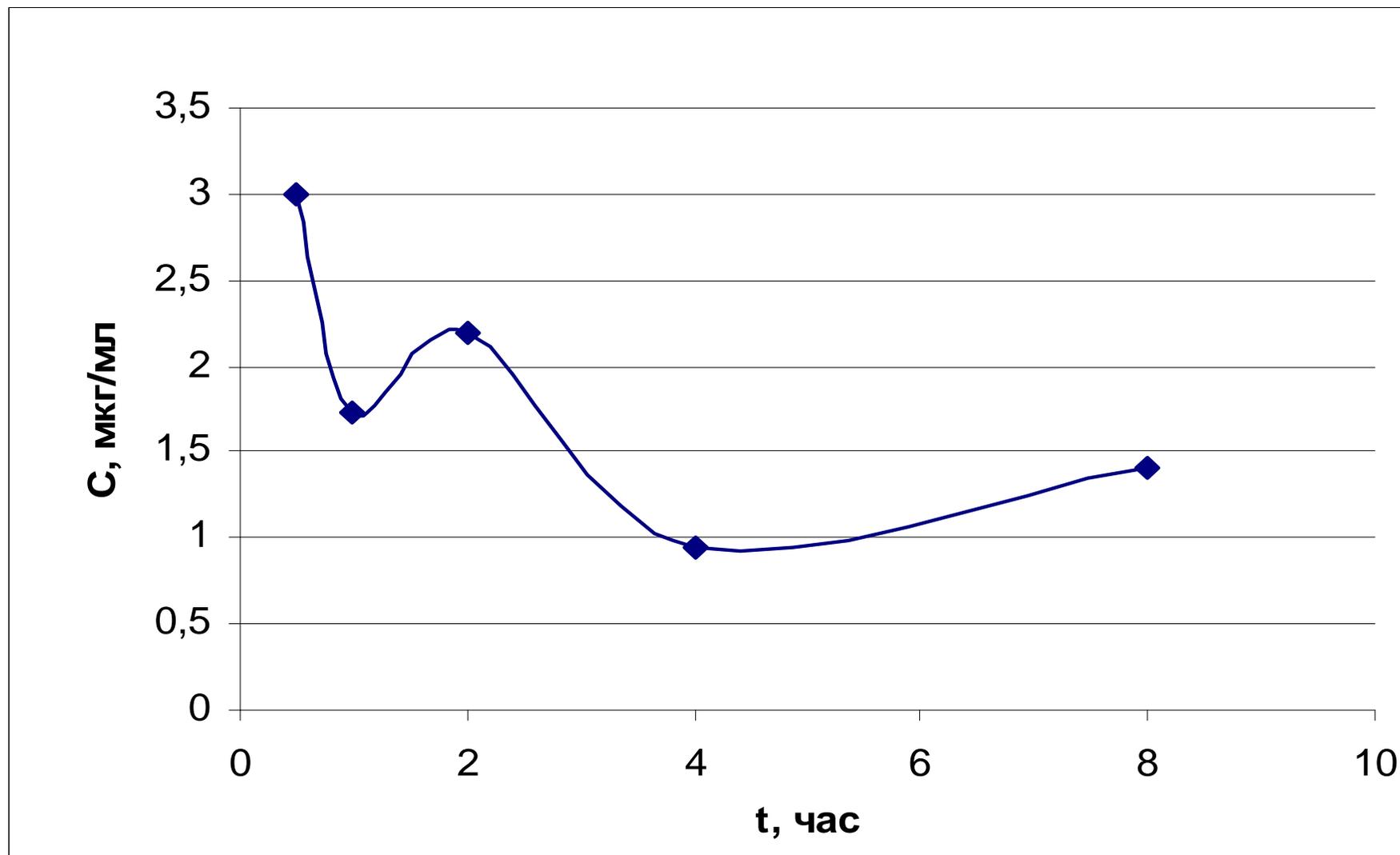


Рисунок 31. Содержание соединения VMA-99-82 в сальнике крыс при пероральном введении в дозе 50 мг/кг.

Обозначения: По оси абсцисс – время (часы), по оси ординат – концентрация (мкг/мл)

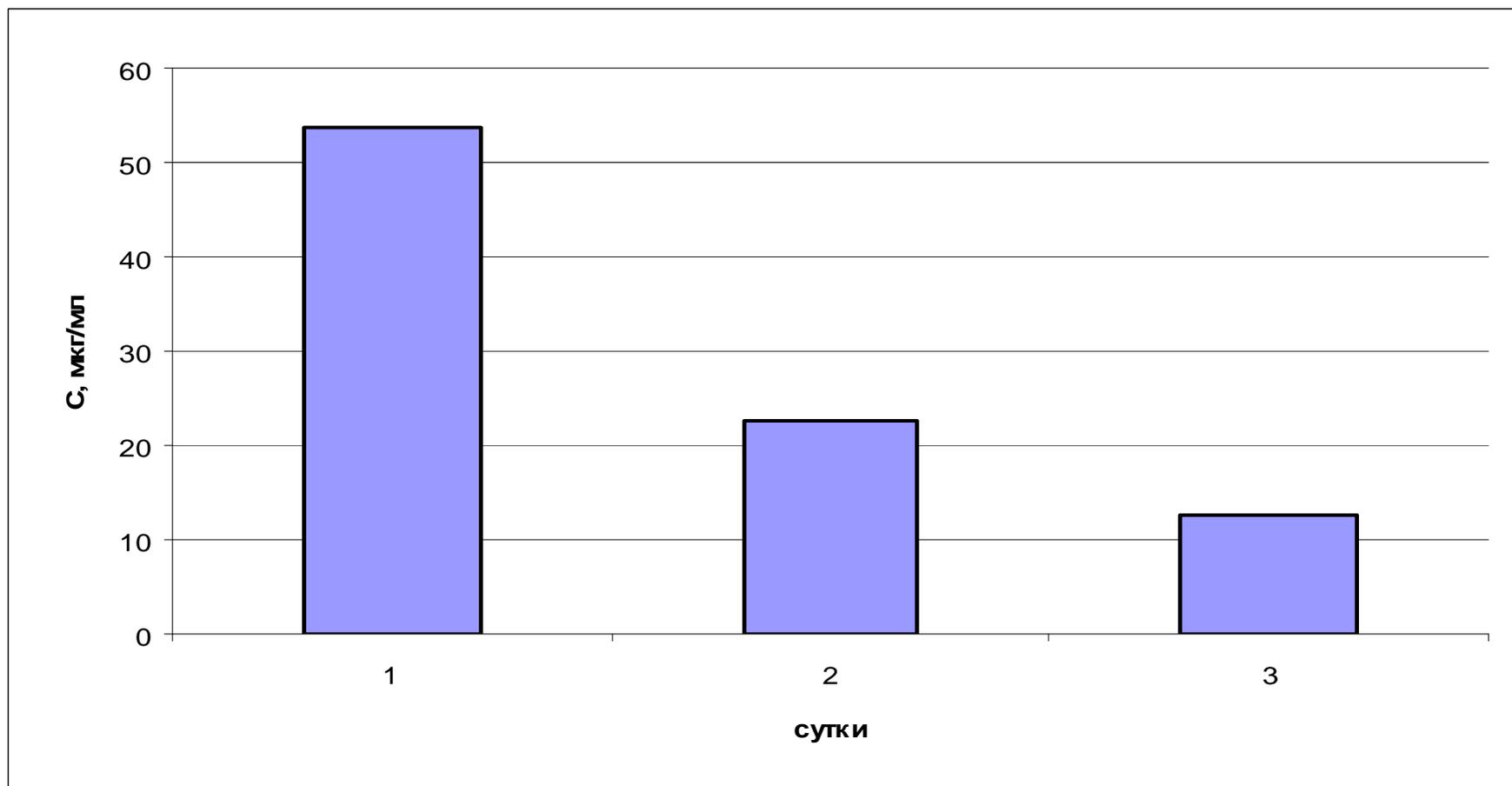


Рисунок 32. Содержание препарата VMA-99-82 в моче крыс при пероральном введении в дозе 50 мг/кг.

Обозначения: по оси абсцисс – время (сутки), по оси ординат – количество вещества (мкг).

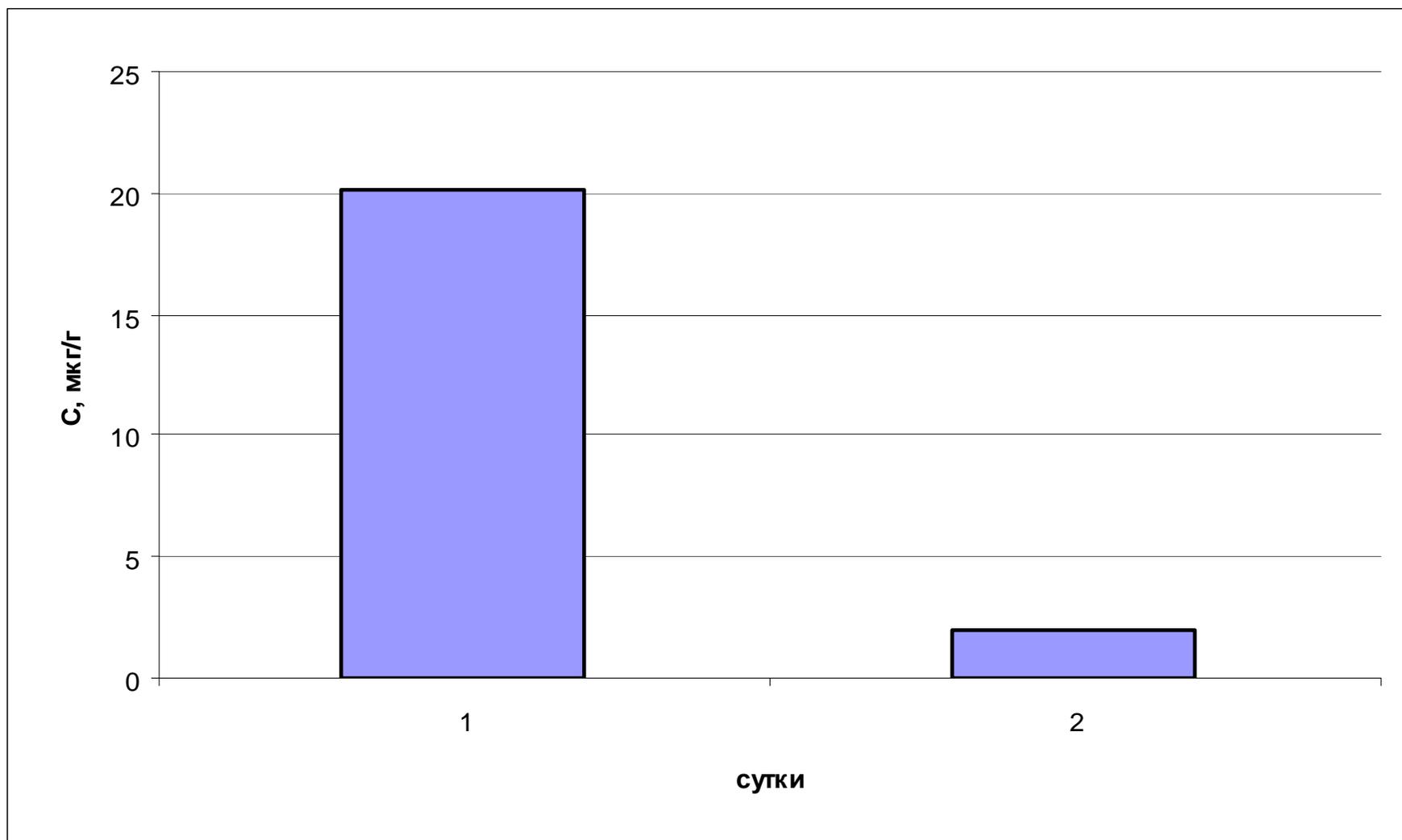


Рисунок 33. Содержание препарата VMA-99-82 в кале крыс при пероральном введении в дозе 50 мг/кг.

Обозначения: по оси абсцисс – время (сутки), по оси ординат – концентрация (мкг/г).

3.4. Оценка возможных путей метаболизма соединения VMA-99-82 и изменений физико-химических свойств предполагаемых метаболитов с использованием специализированной компьютерной программы PALLAS

Изучение возможных путей метаболизма, а также идентификация образующихся метаболитов требует проведения отдельного, достаточно сложного и объемного исследования. Применяются либо методы ядерного магнитного резонанса и хромато-масс-спектрометрии, либо синтез всех возможных метаболитов и последовательная идентификация каждого из них, например, хроматографическим методом. Так же следует учесть, что между начальной структурой и метаболитами часто наблюдается значительные различия в физико-химических свойствах. Поэтому не всегда представляется возможным применение прямых методов изучения метаболизма. В таких случаях целесообразно использование методов *in silico*, позволяющих спрогнозировать основные направления метаболизма и изменения физико-химических свойств метаболитов [158, 162, 171, 200].

Из расчетной схемы (Рисунок 34) видно, что основные направления метаболизма протекают в виде окислительных реакций и реакций деградации. Окислительные реакции представлены N-гидроксилированием атомов азота структуры аденина и гидроксилированием третичного атома углерода боковой цепи. Реакция деградации протекает в виде разрушения эфирной связи.

Анализ констант липофильности и диссоциации (Таблица 15) позволяет предположить неоднородное изменение физико-химических свойств метаболитов, а соответственно и хроматографических свойств. Наблюдаемое в большинстве случаев увеличение липофильности, а также значительно изменение кислотно-основных свойств, вероятно, потребует внесения изменений в хроматографический метод при дальнейшей идентификации и изучении свойств метаболитов.

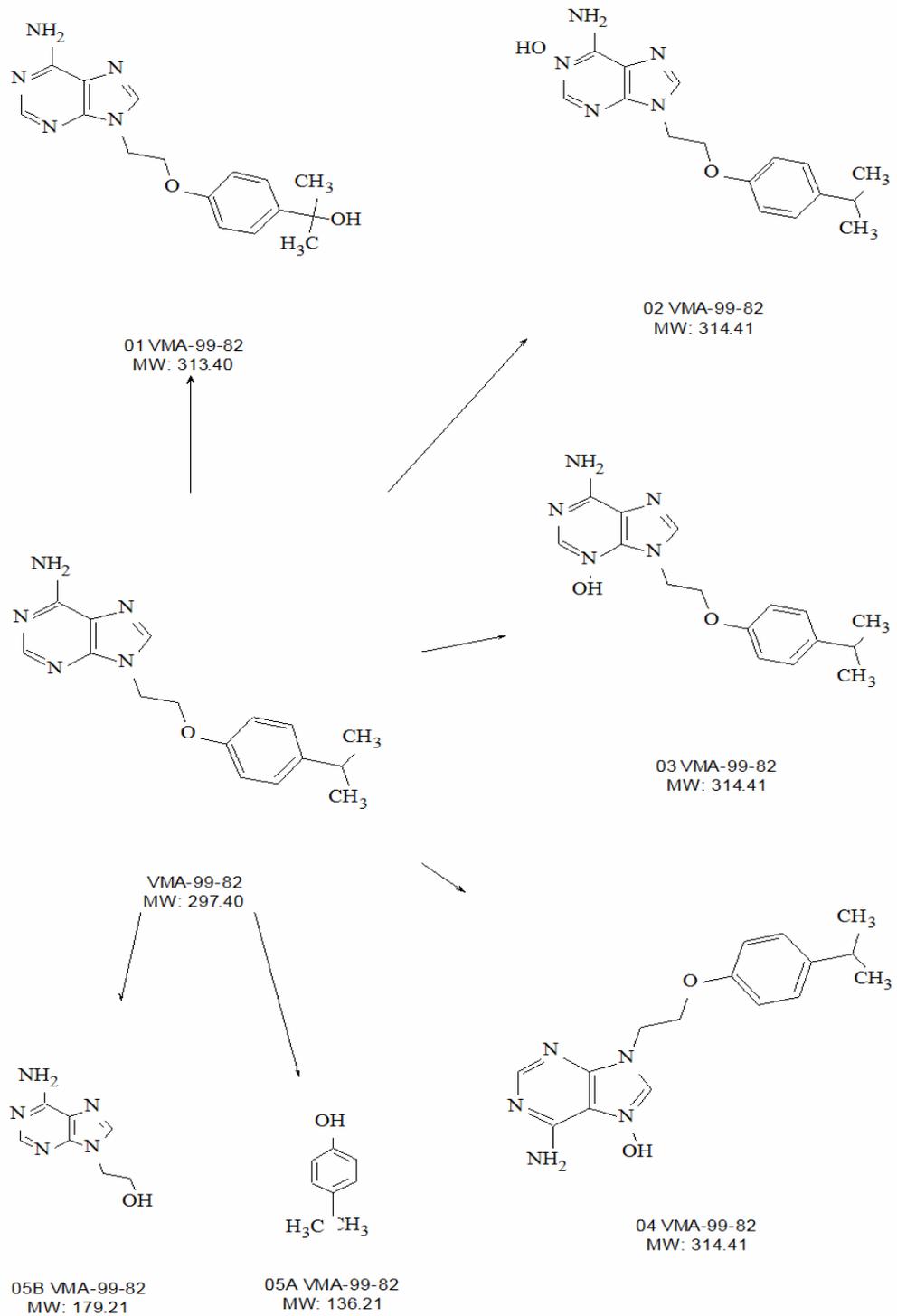
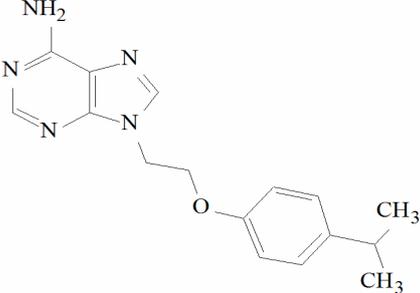
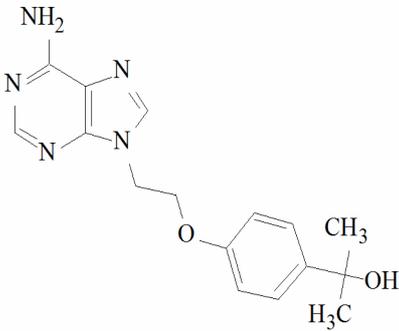
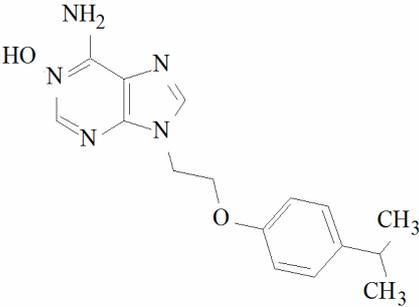
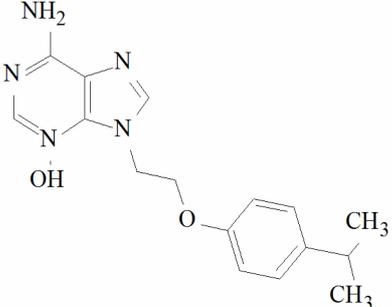
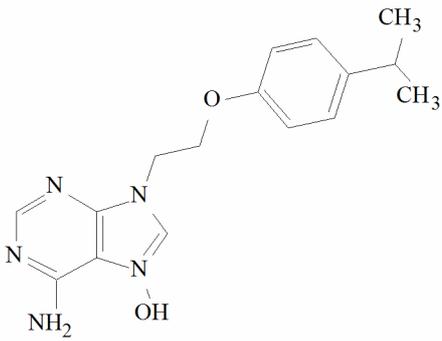
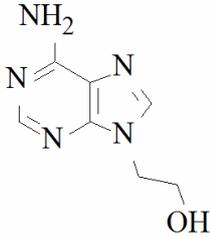


Рисунок 34. Прогноз метаболизма соединения VMA-99-82 в программе PALLAS.

Физико-химические свойства соединения VMA-99-82 и его возможных метаболитов.

Структура	LgP	LgKa	
	2,81	Кислотных групп нет	
		Основные гр.	3,6
	1,4	Кислотных групп нет	
		Основные гр.	3,6
	3,51	Кислотные гр.	4,75
		Основные гр.	3,6
	3,51	Кислотные гр.	3,23
		Основные гр.	3,6

	3,3	Кислотные гр.	2,31
	1,05	Кислотные гр.	15,58
		Основные гр.	3,61
			-2,53

3.5. Заключение

Выполнено фармакокинетическое исследование нового производного аденина – соединения VMA-99-82. На основании экспериментальных данных получены усредненные фармакокинетические профили аналита и рассчитаны числовые показатели основных фармакокинетических параметров, а также проанализирован характер распределения по органам и тканям. Было проведено исследование процессов экскреции исследуемого соединения с мочой и калом [84].

Фармакокинетические кривые при обоих путях введения достаточно сходны. Максимальная концентрация соединения VMA-99-82 (5,71 мкг/мл) при внутривенном пути наблюдается через пять минут после введения. При интрагастральном пути – максимальная концентрация аналита (9,3 мкг/мл) достигается через 30 минут, что свидетельствует о том, что соединение VMA-99-82 очень быстро всасывается из ЖКТ. После этого начинается снижение концентрации, носящее биэкспоненциальный характер, предполагая быструю первую фазу распределения, сменяющуюся более медленной фазой элиминации. Первая фаза элиминации заканчивается к 2 часам и начинается вторая «медленная», продолжающаяся до 12 часов исследования.

По зависимости концентрации соединения в плазме крыс от времени рассчитаны основные фармакокинетические параметры (Таблица 16). Из особенностей следует отметить значительные различия в показателях периода полувыведения ($T_{1/2}$ (час) = 11,03 для внутривенного и $T_{1/2}$ (час) = 6,11 для перорального пути, соответственно) и системного клиренса (Cl (л/(час*кг)) = 0,67 и 1,01, соответственно). Аналогично разнятся и показатели площади под фармакокинетической кривой (AUC (мкг*час/мл) = 74,96 и 49,43, соответственно).

Фармакокинетические параметры соединения VMA-99-82 в плазме крови крыс при внутривенном и пероральном введении в дозе 50 мг/кг

Параметры	Внутривенное введение	Пероральное введение
AUC (мкг*час/мл)	74,96	49,43
Kel (час ⁻¹)	0,063	0,11
T _{1/2} (час)	11,03	6,11
MRT (час)	9,55	8,52
Cl (л/(час*кг))	0,67	1,01
Vd (л/кг)	10,61	8,91

Распределение соединения VMA-99-82 по органам и тканям носит неоднородный характер и осуществляется следующим образом (Таблица 17).

Таблица 17.

Фармакокинетические параметры распределения препарата VMA-99-82 в органах и тканях при внутривенном и пероральном введении крысам в дозе 50 мг/кг

Орган	Внутривенное введение		Пероральное введение	
	AUC, мкг×час/мл	Ft	AUC, мкг×час/мл	Ft
Мозг	32,46	0,43	13,58	0,28
Сердце	87,17	1,16	16,94	0,34
Селезенка	272,05	3,63	30,97	0,63
Легкие	83299,4	1111,18	402,42	8,14
Мышцы	38,2	0,51	32	0,65
Почки	33,91	0,45	20,4	0,41
Печень	115,38	1,54	66,03	1,34
Сальник	37,23	0,5	25,51	0,52

Наибольшую тропность VMA-99-82 проявляет к легким, в них концентрация достигает на максимуме через 1 час после введения 24693,5 мкг/г. Тканевая доступность составила 1111,18. Пероральный путь введения при более

низких абсолютных значениях (744,64 мкг/кг) демонстрирует аналогично высокую, на фоне прочих органов, тропность к легким. Тканевая доступность составила 8,14.

Распределение VMA-99-82 в органы с высокой васкуляризацией соответствует или превосходит уровень его в крови. Для сердца характерной особенностью является значительное отличие между внутривенным и пероральным путями введения.

В мышечной ткани VMA-99-82 определяется на уровне органов с высокой степенью васкуляризации при обоих путях введения. Максимальная концентрация (10,45 мкг/г) наблюдается через 30 минут после введения, тканевая доступность составляет 0,51 при внутривенном введении и при пероральном – 0,65.

Наименьшее содержание отмечается в мозге, что, скорее всего, связано с транспортом через гематоэнцефалический барьер и с липофильностью VMA-99-82 и не детерминируется высокой степенью васкуляризации мозга.

В результате проведенного сравнительного анализа фармакокинетики VMA-99-82 при внутри- и внесосудистом способах введения был рассчитан показатель абсолютной биодоступности величина, которого составила 0,66.

Проведено изучение выведения препарата. Установленное в результате значительное превосходство внеренального клиренса над ренальным (почечный клиренс составляет 0,936 мл/час, внепочечный – 666,04 мл/час при внутривенном пути введения; 1,8 мл/час и 1009,72 мл/час соответственно при пероральном пути введения) коррелирует с полученными ранее данными о характере распределения соединения VMA-99-82 в органы и ткани. Препарат определялся в почках в низких концентрациях и при внутривенном и при пероральном путях введения. Тканевая доступность составила 0,452 и 0,413 соответственно.

Длительное время определения изучаемого соединения в экскретах соотносится с установленными ранее данными о длительной циркуляции в крови и довольно высоких значениях периода полувыведения (11 и 6,5 часов для внутривенного и перорального путей введения соответственно).

Низкие показатели элиминации неизменной субстанции с мочой и калом могут свидетельствовать о выраженной способности вещества подвергаться процессам биотрансформации в организме и о высоком значении эффекта «первого прохождения через печень».

Был проведен анализ предполагаемых схем метаболизма соединения VMA-99-82 и оценка физико-химических свойств возможных метаболитов при помощи методов *in silico*. На основании полученной посредством компьютерной программы предполагаемой схемы метаболизма установлено, что основные направления биотрансформации протекают в виде окислительных реакций и реакций деградации.

Анализ констант липофильности и диссоциации возможных метаболитов соединения VMA-99-82 позволяет предположить довольно значительное изменение физико-химических свойств, а соответственно, и хроматографических свойств образующихся веществ. Наиболее вероятно, что потребуются внесение определенных изменений в метод количественного определения при дальнейшей идентификации и изучении свойств метаболитов.

Глава 4. Биофармацевтическое исследование адепрофена – таблетированной лекарственной формы соединения VMA-99-82 и анализ межвидовых различий фармакокинетических параметров изучаемого соединения

Фармакотерапевтическая эффективность препаратов во многом определяется процессами их всасывания, распределения и элиминации из организма. Все эти ключевые процессы, а, особенно, всасывание и элиминация, напрямую связаны с лекарственной формой данного средства. Лекарственная форма является определяющим фактором для пути введения, дозировки, степени и скорости поступления действующего вещества в кровь [16, 57].

Разработка и внедрение новых лекарственных форм позволяет повысить терапевтический эффект, снизить риск передозировок лекарственным средством и развития побочных эффектов, разработать новые схемы фармакотерапии и увеличить комплаентность пациентов. Соответственно, корректная оценка биологической доступности новых лекарственных форм и разработка соответствующих рекомендаций позволяет добиться максимальной эффективности лечения и, в то же время, свести к минимуму нежелательные побочные эффекты лекарственных средств [80].

Проведение биофармацевтических исследований весьма актуально как при изучении новых, только внедряемых, биологически активных веществ, так и при разработке более эффективных лекарственных форм уже существующих препаратов. Результаты биофармацевтических исследований позволяют не только оценить изучаемую лекарственную форму, но и составить рекомендации специалистам-технологам по возможным направлениям ее оптимизации на основании выявленных недостатков [83].

4.1. Материалы и методы

Исследование проведено на таблетированной лекарственной форме соединения VMA-99-82 – адепрофене, созданной на кафедре технологии лекарств Пятигорского медико-фармацевтического института*.

Эксперименты выполнены на 20 кроликах породы Шиншилла массой 1,5 – 2 кг, которые содержались в условиях вивария на стандартной диете с соблюдением всех правил и Международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях. На момент проведения исследований животные были здоровыми, изменений поведения, аппетита, режима сна и бодрствования обнаружено не было. За двенадцать часов до проведения экспериментов животных лишали доступа к пище без ограничения потребления воды.

Субстанцию VMA-99-82 в изотоническом растворе и таблетки адепрофена вводили животным перорально, посредством желудочного зонда, в максимальной терапевтической дозе 50 мг/кг. Контрольная группа животных получала изотонический раствор в аналогичных объемах. Забор проб крови производили из ушной вены через 15, 30 минут и через 1, 2, 4, 8 и 12 часов после введения.

Кровь стабилизировали 5% раствором натрия цитрата. Определение содержания соединения VMA-99-82 проводили в цельной крови.

Формулы расчета основных фармакокинетических параметров см. главу 3. Относительная биодоступность рассчитывалась как отношение AUC субстанции к AUC лекарственной формы при соответствующем введении лекарственного вещества кроликам:

$$F\% = \frac{AUC_{\text{суб}}}{AUC_{\text{таб}}} * 100\%, \text{ где}$$

AUC суб – значение AUC субстанции VMA-99-82 при пероральном введении,

* Выражаем благодарность профессору Степановой Э.Ф. и сотрудникам кафедры технологии лекарств Пятигорского медико-фармацевтического института

AUC таб – значение AUC таблеток VMA-99-82 при пероральном введении.

Экспериментальные данные обсчитывались с помощью t-критерия Стьюдента. Статистическая обработка данных проводилась при помощи компьютерной программы Microsoft Excel.

4.2. Результаты исследования

4.2.1. Фармакокинетические и биофармацевтические свойства таблеток адепрофен

В результате проведенного исследования были получены усредненные фармакокинетические профили зависимости концентрации вещества в крови кроликов от времени.

Как видно из представленных данных (Рисунок 35), соединение VMA-99-82 быстро всасывается из ЖКТ - максимальная концентрация соединения (8,71 мкг/мл) достигается через 30 минут после введения. После этого начинается снижение, носящее биэкспоненциальный характер, предполагая быструю первую фазу распределения, сменяющуюся более медленной фазой элиминации. Первая заканчивается через 2 часа после введения и начинается вторая «медленная», продолжающаяся до 12 часов исследования.

Характер фармакокинетических кривых для субстанции и таблеток весьма сходен.

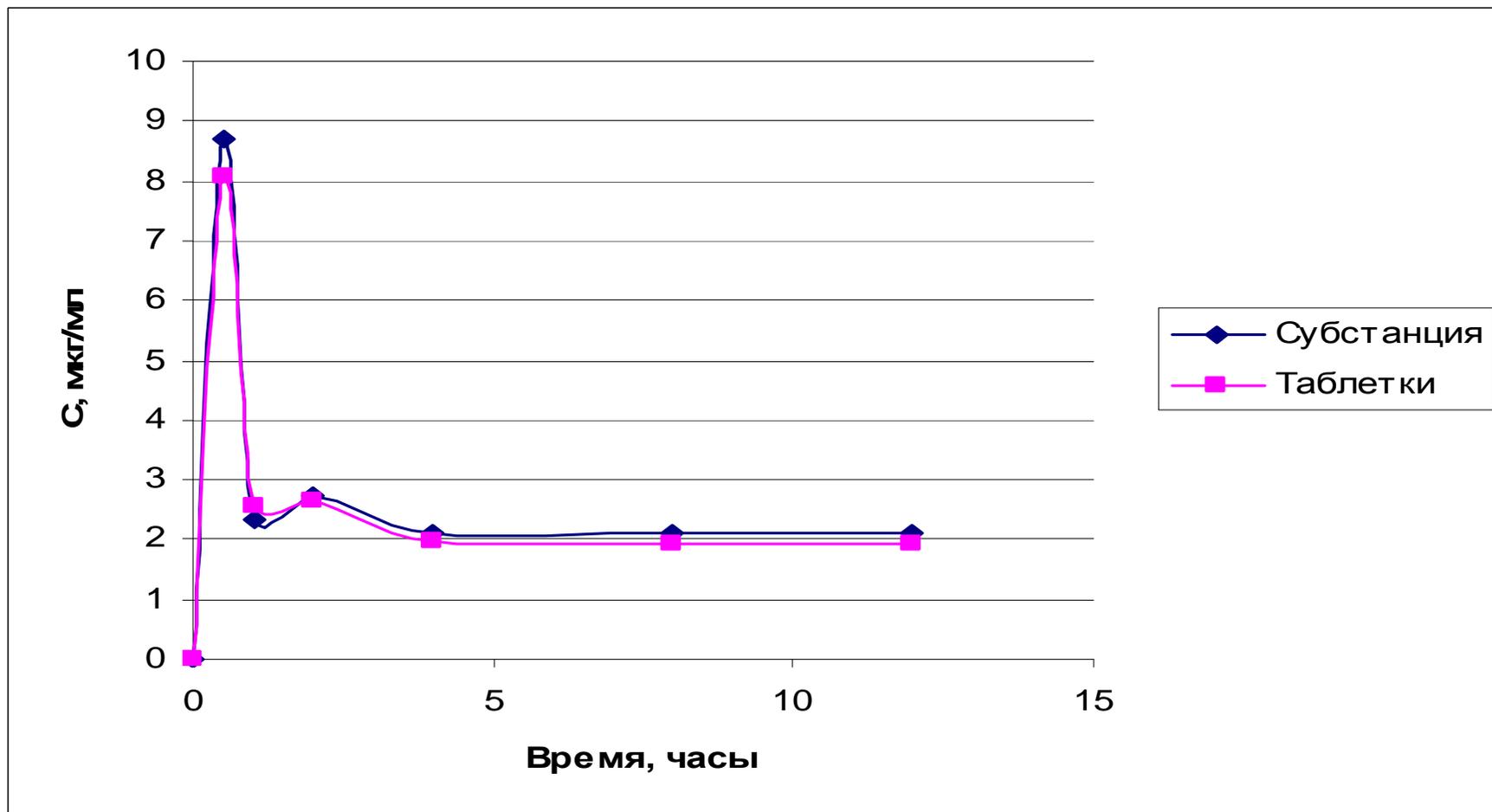


Рисунок 35. Содержание соединения VMA-99-82 в крови кроликов при пероральном введении субстанции и таблеток в дозе 50 мг/кг.

Обозначения: По оси абсцисс – время (часы), по оси ординат – концентрация (мкг/мл).

Основные фармакокинетические параметры рассчитанные для субстанции и таблеток (Таблица 18) показывают невысокие значения периода полувыведения ($T_{1/2} = 5,62$ и $5,6$ часа соответственно) и среднего времени удерживания в организме одной молекулы препарата ($MRT = 7,8$ и $7,72$ часа). Это обуславливает низкое значение площади под фармакокинетической кривой ($AUC = 46,29$ и $43,05$ мкг*час/мл). Величина общего объема распределения ($Vd = 8,77$ и $9,4$ л/кг) примерно в 14 раз превышает общий объем жидкости в организме крысы - $0,67$ л/кг, что свидетельствует о выраженной способности препарата интенсивно проникать в органы и ткани животных.

Характер распределения и основные фармакокинетические параметры для субстанции и таблеток близки по значениям.

На основании полученных в ходе исследования данных была рассчитана относительная биодоступность, которая составила $93,44\%$.

4.2.2. Межвидовые различия фармакокинетических свойств соединения VMA-99-82

В результате ранее проведенных экспериментов были получены усредненные фармакокинетические профили зависимости концентрации вещества в крови кроликов и крыс от времени при пероральном введении (Рисунок 36). Как видно из представленных данных фармакокинетические кривые имеют сходный характер.

Также был проведен сравнительный анализ рассчитанных ранее фармакокинетических параметров субстанции соединения VMA-99-82 при пероральном введении у кроликов и крыс (Таблица 19). Числовые характеристики фармакокинетических свойств соединения VMA-99-82 также весьма близки по значениям.

Таким образом, при анализе экспериментальных данных полученных в ходе введения соединения VMA-99-82 различным видам животных (крысы, кролики) не было выявлено значимых межвидовых различий.

Фармакокинетические параметры соединения VMA-99-82 в плазме крови кроликов при пероральном введении субстанции и таблеток в дозе 50 мг/кг.

Параметры	Субстанция	Таблетки
AUC (мкг*час/мл)	46,288	43,054
Kel (час ⁻¹)	0,1236	0,1238
T _{1/2} (час)	5,618	5,598
MRT (час)	7,796	7,718
Cl (л/(час*кг))	1,084	1,164
Vd (л/кг)	8,77	9,388
F отн., %	-	93,44

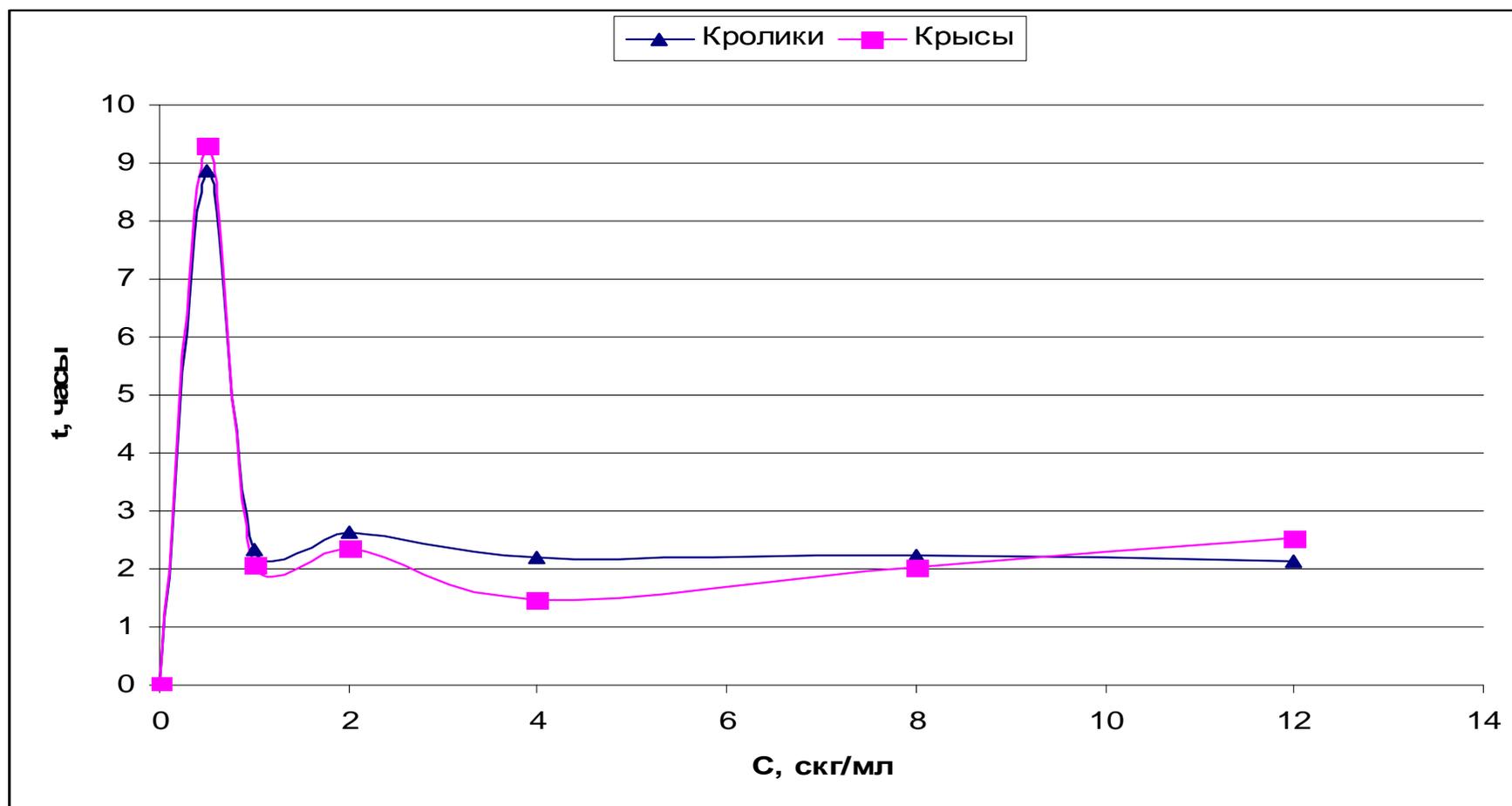


Рисунок 36. Содержание соединения VMA-99-82 в плазме крови кроликов и крыс при пероральном введении субстанции в дозе 50 мг/кг.

Обозначения: По оси абсцисс – время (часы), по оси ординат – концентрация (мкг/мл).

Фармакокинетические параметры соединения VMA-99-82 в плазме крови крыс и кроликов при пероральном введении в дозе 50 мг/кг.

Параметры	Крысы	Кролики
AUC (мкг*час/мл)	49,43	46,288
Kel (час ⁻¹)	0,11	0,1236
T _{1/2} (час)	6,11	5,618
MRT (час)	8,52	7,796
Cl (л/(час*кг))	1,01	1,084
Vd (л/кг)	8,91	8,77

4.3. Заключение

Таким образом, в результате проведенных экспериментов получены усредненные фармакокинетические кривые зависимости концентрации соединения в крови от времени для субстанции и таблеток. Анализ полученных данных показывает, что соединение VMA-99-82 быстро всасывается в ЖКТ, так как максимум концентрации отмечается уже через 30 минут после введения. Установлено, что фармакокинетические кривые носят биэкспоненциальный характер и весьма сходны между собой.

Рассчитаны основные фармакокинетические параметры для субстанции и таблеток соединения VMA-99-82. Невысокие значения периода полувыведения ($T_{1/2} = 5,62$ и $5,6$ часа соответственно) и среднего времени удерживания в организме одной молекулы препарата ($MRT = 7,8$ и $7,72$ часа) свидетельствуют о быстром снижении концентрации препарата в крови. Это обуславливает низкое значение площади под фармакокинетической кривой ($AUC = 46,29$ и $43,05$ мкг*час/мл). Показатели системного клиренса довольно невелики ($Cl = 1,084$ и $1,164$ л/час*кг соответственно). Высокие показатели общего объема распределения ($Vd = 8,77$ и $9,4$ л/кг соответственно), свидетельствуют о выраженной способности препарата интенсивно проникать в органы и ткани.

На основании полученных в ходе проведенных экспериментов данных рассчитан показатель относительной биодоступности, величина которого составила 93,44%. Столь высокие значения относительной биодоступности позволяют сделать заключение, что лекарственная форма подобрана оптимально и ее можно рекомендовать к дальнейшему производству и применению.

Также была проведена оценка межвидовых различий в фармакокинетических свойствах соединения VMA-99-82 при пероральном введении субстанции изучаемого соединения крысам и кроликам. Сравнение фармакокинетических кривых выявило их высокое сходство по характеру и абсолютным значениям концентраций в отдельные временные интервалы. В результате изучения фармакокинетических параметров у кроликов и крыс при

внутрижелудочном введении было установлено, что числовые показатели не демонстрируют значительных различий.

Таким образом, в результате сравнительного анализа усредненных фармакокинетических профилей и основных фармакокинетических параметров, полученных в результате перорального введения соединения VMA-99-82 различным видам животных (крысы, кролики) не было выявлено значимых межвидовых различий.

Глава 5. Обсуждение результатов

Создание и внедрение в практику новых биологически активных веществ и расширение тем самым спектра эффективных и безопасных средств фармакотерапии является одной из важнейших задач современного здравоохранения.

Разработка новых лекарственных препаратов это длительный ресурсо- и трудоемкий процесс. Тем более важное значение имеет верный выбор соединений, направляемых после первичного отбора на дальнейшие исследования. Перспективные соединения, полученные синтетическим путем или выделенные из природного сырья, отобранные в результате скрининговых исследований или при помощи методов *in silico*, после ряда предварительных исследований и тестов направляется на стадию доклинических испытаний [102].

Разработка новых лекарственных средств, обладающих противовирусной активностью является одним из приоритетных направлений, что обусловлено как стремительным ростом числа заболеваний вирусного генеза, так и недостаточностью имеющегося набора противовирусных средств, большинство из которых обладает либо очень узким спектром действия, либо значительными нежелательными побочными эффектами [24, 47, 115, 152].

Соединение VMA-99-82 (адепрофен) является веществом лидером по противовирусной активности, отобранным в результате скрининговых исследований из целого ряда 9-производных аденина, синтезированных в лаборатории синтеза противовирусных средств НИИ фармакологии ВолгГМУ. Данное соединение продемонстрировало высокую ингибиторную активность в отношении различных ДНК- и РНК-содержащих вирусов, в особенности цитомегаловируса человека и ВИЧ-1 [58, 59].

При изучении новых биологически активных веществ необходимо проведение фармакокинетических и биофармацевтических исследований. Для этого требуются адекватные методы количественного определения исследуемых соединений в биологическом материале. Они должны быть высокочувствительными, селективными, надежными, воспроизводимыми и

универсальными. Вышеуказанным требованиям в полной мере отвечает метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), являющийся одним из основных при проведении фармакокинетических и биофармацевтических исследований [38, 76,133, 156, 194].

Вновь создаваемые аналитические методы требуют обязательного проведения процедуры валидации. Корректная оценка установленных аналитических характеристик является подтверждением работоспособности и воспроизводимости метода и, соответственно, правильности полученных его посредством данных[3, 15, 69, 175].

В результате проведенных исследований разработаны следующие хроматографические условия метода высокоэффективной жидкостной хроматографии количественного определения соединения VMA-99-82: аналитическая колонка SUPELCOSIL LC-18 (октадецильная привитая фаза) 15 см*4,6 мм, размер частиц 5 мкм. Мобильная фаза, состоящая из 50 mM р-ра однозамещенного фосфата калия (рН 5,65) и ацетонитрила в соотношении 60%:40% v/v. Температура хроматографирования 40 °С. Скорость потока элюента 1 мл/мин. Длина волны детекции 205 нм [85].

Проведен ряд экспериментов по подбору условий экстракции изучаемого соединения из различных видов биологического материала. Опробован ряд экстрагентов и, в итоге, была выбрана смесь спирт этиловый : ацетонитрил (50%:50% v/v), обеспечивающая высокий уровень извлечения аналита из биоматериала и очистки пробы. Степень экстракции соединения VMA-99-82 составила не менее 90%. При работе с различными видами биологического материала установлено, что при определении изучаемого вещества в крови необходимо проводить экстракцию из цельной крови.

Таким образом, способ количественного извлечения соединения VMA-99-82 из биологического материала подобран оптимально и не оказывает значимого влияния на среднюю ошибку измерения хроматографического метода.

Выполнена валидация разработанного метода высокоэффективной жидкостной хроматографии количественного определения соединения VMA-99-

82. На основании серии измерений были построены калибровочные кривые зависимости площади под хроматографическим пиком от концентрации изучаемого соединения. Кривые носят линейный характер.

Рассчитаны валидационные показатели точности (97,8%), прецизионности (4,55%) повторяемости (14%), воспроизводимости (10%). На основании измерения серии разведений были определены предел обнаружения (200нг/мл) и предел количественного определения (1мкг/мл). Аналитические характеристики метода не выходят за пределы установленных нормативов, что подтверждает его воспроизводимость и эффективность (Таблица 20).

Также была оценена стабильность хранения растворов изучаемого соединения в различных условиях. При повторном проведении анализа, после 72 часов хранения стандартных растворов соединения при комнатной температуре, а также после заморозки/таяния средние абсолютные процентные колебания находились в тех же пределах, что свидетельствует о стабильности вещества под влиянием данных факторов.

Таблица 20

Основные аналитические параметры метода ВЭЖХ количественного определения соединения VMA-99-82.

<i>Параметр</i>	<i>Значение</i>
Точность	97,8%
Прецизионность	4,55%
Повторяемость	14%
Воспроизводимость	10%
Предел обнаружения	200 нг/мл
Чувствительность	1 мкг/мл

Таким образом, разработанный метод количественного определения является высокоселективным и высокочувствительным, что позволяет

использовать его для проведения фармакокинетических и биофармацевтических исследований соединения VMA-99-82.

Фармакокинетические данные необходимы для установления зависимости «концентрация – эффект», которая характеризуется меньшими видовыми различиями, чем «доза – эффект» и поэтому может быть использована для прогнозирования действия фармакологического средства у человека. Экспериментальная фармакокинетика позволяет предсказать концентрацию препарата в крови или скорость её снижения, что позволяет выбрать ориентировочную схему дозирования, которая уточняется в ходе клинических испытаний [19, 50, 101, 173].

Проведенное исследование позволило изучить фармакокинетические свойства соединения VMA-99-82 при двух путях введения – внутривенном и пероральном [84]. Установлено, что изучаемое соединение обнаруживается во всех исследуемых органах и тканях в течение не менее 8 часов после введения, причем в распределении препарата прослеживается значительная неоднородность. Следует отметить сходство фармакокинетических профилей VMA-99-82 в различных органах и тканях с таковым в плазме.

На основании экспериментальных данных получены усредненные фармакокинетические профили аналита и рассчитаны числовые показатели основных фармакокинетических параметров, а также проанализирован характер распределения по органам и тканям. Изучены процессы экскреции [86].

Фармакокинетические кривые при обоих путях введения достаточно сходны. Максимум концентрации соединения VMA-99-82 (5,71 мкг/мл) при внутривенном пути наблюдается через 5 минут после введения. При интрагастральном введении – максимум (9,3 мкг/мл) достигается через 30 минут, что свидетельствует о том, что соединение VMA-99-82 очень быстро всасывается из ЖКТ. Затем наступает фаза снижения концентрации, носящая биэкспоненциальный характер, предполагая быструю первую фазу распределения, сменяющуюся более медленной фазой элиминации. Первая фаза элиминации заканчивается к 2 часам и начинается вторая «медленная», продолжающаяся до 12 часов исследования.

Произведен расчет числовых значений фармакокинетических параметров. Обращают на себя внимание значительные различия в показателях периода полувыведения ($T_{1/2}$ (час) = 11,03 для внутривенного и $T_{1/2}$ (час) = 6,11 для перорального пути, соответственно) и системного клиренса (Cl (л/(час*кг)) = 0,67 и 1,01, соответственно). Аналогично разнятся и показатели площади под фармакокинетической кривой (AUC (мкг*час/мл) = 74,96 и 49,43, соответственно).

Установлена значительная гетерогенность распределения соединения VMA-99-82 по органам и тканям.

Распределение VMA-99-82 в органы с высокой васкуляризацией соответствует или превосходит уровень его в крови. Для сердца характерной особенностью является значительное отличие между внутривенным и пероральным путями введения.

В мышечной ткани VMA-99-82 определяется на уровне органов с высокой степенью васкуляризации при обоих путях введения. Максимальная концентрация (10,45 мкг/г) наблюдается через 30 минут после введения, тканевая доступность составляет 0,51 при внутривенном введении и 0,65 при пероральном.

Наиболее велико содержание VMA-99-82 в легких, в них при внутривенном пути концентрация достигает на максимуме через 1 час после введения 24693,5 мкг/г. Тканевая доступность составила 1111,18. Пероральный путь при более низких абсолютных значениях (744,64 мкг/кг) демонстрирует аналогично высокую, на фоне прочих органов, тропность к легким. Тканевая доступность составила 8,14.

Низкие концентрации изучаемого соединения в мозге, скорее всего, связаны с транспортом через гематоэнцефалический барьер и с липофильностью VMA-99-82, а не с высокой степенью васкуляризации мозга.

В результате проведенного сравнительного анализа фармакокинетики VMA-99-82 при внутри- и внесосудистом способах введения был рассчитан показатель абсолютной биодоступности, величина которого составила 0,66.

Проведено изучение выведения препарата. Следует отметить значительное превосходство внеренального клиренса над ренальным (почечный клиренс

составляет 0,936 мл/час, внепочечный – 666,04 мл/час при внутривенном пути введения; 1,8 мл/час и 1009,72 мл/час соответственно при пероральном пути введения), что явно коррелирует с полученными ранее данными о характере распределения соединения VMA-99-82 в органы и ткани. Препарат определялся в почках в низких концентрациях при обоих путях введения. Тканевая доступность составила 0,452 и 0,413 соответственно.

Длительное время определения изучаемого соединения в экскретах соотносится с установленными ранее данными о длительной циркуляции в крови и довольно высоких значениях периода полувыведения (11 и 6,5 часов для внутривенного и перорального пути введения соответственно).

В моче и кале обнаружены низкие концентрации неизменной субстанции. Эти данные могут свидетельствовать о выраженной способности вещества подвергаться процессам биотрансформации в организме. Также можно предположить выраженный эффект «первого прохождения» через печень.

При помощи компьютерной программы PALLAS был проведен анализ предполагаемого метаболизма соединения VMA-99-82 методом *in silico* с целью построения вероятной схемы метаболизма и оценки физико-химических свойств метаболитов. На основании полученных в ходе исследования данных установлено, что основные направления метаболизма протекают в виде окислительных реакций и реакций деградации.

Анализ констант липофильности и диссоциации возможных метаболитов соединения VMA-99-82 позволяет предположить довольно значительное изменение физико-химических свойств, а соответственно, и хроматографических свойств образующихся веществ. Наиболее вероятно, что потребуются внесение определенных изменений в метод количественного определения при дальнейшей идентификации и изучении свойств метаболитов.

Корректная оценка биологической доступности новых лекарственных форм и разработка соответствующих рекомендаций позволяет добиться максимальной эффективности лечения и минимизация нежелательных побочных эффектов лекарственных средств.

Проведение биофармацевтических исследований весьма актуально как при изучении новых, только внедряемых, биологически активных веществ, так и при разработке более эффективных лекарственных форм уже существующих препаратов. Результаты биофармацевтических исследований позволяют не только оценить действенность изучаемой лекарственной формы, но и составить рекомендации специалистам-технологам по возможным направлениям ее оптимизации на основании выявленных недостатков [16, 57, 80, 93, 96].

В результате проведенного биофармацевтического исследования [83] получены усредненные фармакокинетические кривые зависимости концентрации соединения в крови кроликов от времени для субстанции и таблеток. Анализ полученных данных показывает, что соединение VMA-99-82 быстро всасывается в ЖКТ, так как максимум концентрации отмечается уже через 30 минут после введения. Установлено, что фармакокинетические кривые носят биэкспоненциальный характер и весьма сходны между собой.

Рассчитаны основные фармакокинетические параметры для субстанции и таблеток соединения VMA-99-82. Низкое значение площади под фармакокинетической кривой ($AUC = 46,29$ и $43,05$ мкг*час/мл) обусловлено быстрым снижением концентрации препарата в крови. Это подтверждается относительно невысокими значениями периода полувыведения ($T_{1/2} = 5,62$ и $5,6$ часа соответственно) и среднего времени удерживания в организме одной молекулы препарата ($MRT = 7,8$ и $7,72$ часа). Довольно высокие показатели общего объема распределения ($V_d = 8,77$ и $9,4$ л/кг соответственно), свидетельствуют о выраженной способности препарата интенсивно проникать в органы и ткани.

Рассчитан показатель относительной биодоступности, величина которого составила 93,44%. Такое значение относительной биодоступности позволяет сделать заключение, что лекарственная форма подобрана оптимально и ее можно рекомендовать к дальнейшему внедрению.

Также была проведена оценка межвидовых различий в фармакокинетических свойствах соединения VMA-99-82 при пероральном введении субстанции изучаемого соединения крысам и кроликам. Сравнение

фармакокинетических кривых выявило их высокое сходство по характеру и абсолютным значениям концентраций в отдельные временные интервалы. В результате изучения фармакокинетических параметров у кроликов и крыс при внутрижелудочном введении было установлено, что числовые показатели не демонстрируют значительных различий.

Таким образом, в результате сравнительного анализа усредненных фармакокинетических профилей и основных фармакокинетических параметров, полученных в результате перорального введения соединения VMA-99-82 различным видам животных (крысы, кролики), не было выявлено значимых межвидовых различий.

Заключение

Разработанный метод количественного определения соединения VMA-99-82 в биологических пробах является валидизированным, селективным и чувствительным, что позволяет использовать его для проведения фармакокинетических исследований.

Исследуемое вещество циркулирует в организме животных на протяжении не менее 12 часов при внутривенном и пероральном путях введения. Соединение VMA-99-82 интенсивно распределяется по органам и тканям, при этом распределение носит неоднородный характер. Наибольшая тропность наблюдается по отношению к легочной ткани. Исследуемое вещество экскретируется на протяжении не менее 72 часов после введения при обоих путях введения. В экскретах обнаружены низкие концентрации неизменной субстанции. Эти данные могут свидетельствовать о выраженной способности вещества подвергаться процессам биотрансформации в организме. Также можно предположить выраженный эффект «первого прохождения» через печень.

При помощи компьютерной программы PALLAS был проведен анализ предполагаемого метаболизма соединения VMA-99-82 методом *in silico* с целью построения вероятной схемы метаболизма и оценки физико-химических свойств метаболитов. На основании полученных данных можно предположить, что потребуется внесение определенных изменений в метод количественного определения при дальнейшей идентификации и изучении свойств метаболитов.

В результате проведенного биофармацевтического исследования установлено, что соединение VMA-99-82 быстро всасывается в ЖКТ, так как максимум концентрации отмечается уже через 30 минут после введения. Рассчитан показатель относительной биодоступности, величина которого составила 93,44%. Также в результате сравнительного анализа усредненных фармакокинетических профилей и основных фармакокинетических параметров, полученных в результате перорального введения соединения VMA-99-82 различным видам животных (крысы, кролики) не было выявлено значимых межвидовых различий.

На основании вышеизложенного можно сделать ряд выводов по результатам проведенного исследования.

Выводы

1. Разработанный метод высокоэффективной жидкостной хроматографии количественного определения обладает аналитическими характеристиками (точность 97,8%; прецизионность 4,55%; воспроизводимость 10%; повторяемость 14%; чувствительность 1 мкг/мл; предел обнаружения 200 нг/мл), позволяющими проведение определения соединения VMA-99-82 в биологическом материале.
2. Изучаемое биологически активное производное аденина обладает высокой абсолютной биодоступностью (66%), что позволяет рекомендовать к разработке пероральную лекарственную форму.
3. Установлено, что распределение по органам и тканям носит неоднородный характер, наибольшее содержание наблюдается в легких (F_t 1111,18 и 8,14 при внутривенном и пероральном введении, соответственно).
4. В ходе изучения экскреции соединения VMA-99-82 установлено значительное превосходство внеренального клиренса над ренальным (666,04 мл/час и 0,936 мл/час соответственно при внутривенном введении; 1009,72 мл/час и 1,8 мл/час соответственно при пероральном пути введения). Низкое содержание неизмененного вещества в экскретах позволяет сделать предположение об активном метаболизме.
5. В результате проведенного биофармацевтического исследования установлено, что таблетки адепрофен имеют высокую относительную биодоступность (93,44%), что позволяет рекомендовать их к дальнейшей разработке.

Научно-практические рекомендации

1. Разработанный метод высокоэффективной жидкостной хроматографии может быть использован для разработки методов количественного определения в биологических пробах других лекарственных средств, производных аденина, а так же взят за основу при работе с малорастворимыми соединениями.
2. Полученные в ходе исследования фармакокинетические характеристики могут использоваться при дальнейших доклинических, клинических и биофармацевтических исследованиях нового производного аденина.
3. Таблетированная лекарственная форма соединения VMA-99-82 является оптимальной и может быть рекомендована для промышленного производства и дальнейшего внедрения в практическое здравоохранение.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Полученные в ходе исследования результаты могут быть использованы при последующем клиническом изучении нового производного аденина с противовирусной активностью – соединения VMA-99-82.

Список литературы

1. Абдурахманов Д.Т. Нуклеозидные аналоги в лечении хронического гепатита В: достоинства и недостатки / Д.Т. Абдурахманов // Лечебное дело. – 2007. – № 1. – с. 31-38.
2. Алексенко С.С. Жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием для определения отравляющих веществ и продуктов их деструкции / С.С. Алексенко // Журнал аналитической химии. – 2012. – Т. 67. № 2. – с. 116.
3. Арзамасцев А.П. Валидация аналитических методов / А.П. Арзамасцев, Н.П. Садчикова, Ю.Я. Харитонов // Фармация. – 2006. – № 4. – с. 8-12.
4. Беккер, Ю. Хроматография. Инструментальная аналитика: методы хроматографии и капиллярного электрофореза: пер. с нем. / Ю. Беккер. – М.: Техносфера, 2009. – 472 с.
5. Белоусов Ю.Б., Гуревич К.Г. Клиническая фармакокинетика. Практика дозирования лекарств / Ю.Б. Белоусов, К.Г. Гуревич. – М.: Литера, 2005. – 288 с.
6. Березкин В.Г. Трехмерная тонкослойная хроматография / В.Г. Березкин, Н.Ю. Кулакова // Журнал физической химии. – 2009. – Т. 83. № 11. – с. 2153-2157.
7. Бондарева И.Б. Методические рекомендации по проведению качественных клинических исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов / И.Б. Бондарева, В.М. Булаева, В.Б. Герасимов. – М., 2001. – 237 с.
8. Бондарева И.Б. Оптимизация дозирования лекарственных препаратов на основе принципов фармакокинетики / И.Б. Бондарева // Детская больница. – 2000. – № 1. – С. 82-84.
9. Бохан Н.А. Дженерик и бренд: сходства и различия оригинальных и воспроизведенных психоактивных лекарственных средств (обзор литературы) / Н.А. Бохан, В.Л. Дресвянников, Д.А. Старичков, А.А.

Овчинников // Сибирский вестник психиатрии и наркологии. – 2007. – № 4. – с. 85-88.

10. Васильев А.Н. Качественные доклинические исследования — необходимый этап разработки и внедрения в клиническую практику новых лекарственных препаратов / А.Н. Васильев // Антибиотики и химиотерапия. – 2012. – № 57. – С. 41-49.
11. Василькин Д.А. Фармакотерапевтическая эффективность лекарственных веществ во взаимосвязи с их полиморфизмом как фармацевтическим фактором. сообщение I / Д.А. Василькин, Л.А., Литвинов, И.А. Поцелуева, А.М. Губайдуллин // Вестник Санкт-Петербургского университета. Серия 11: Медицина. – 2010. – № 1. – с. 166-174.
12. Василькин Д.А. Фармакотерапевтическая эффективность лекарственных веществ во взаимосвязи с их полиморфизмом как фармацевтическим фактором. сообщение II / Д.А. Василькин, Л.А., Поцелуева, Н.И. Наумкина, А.Т. Губайдуллин // Вестник Санкт-Петербургского университета. Серия 11: Медицина. – 2011. – № 1. – с. 92-99.
13. Василькин Д.А. Фармакотерапевтическая эффективность лекарственных веществ во взаимосвязи с их полиморфизмом как фармацевтическим фактором. сообщение III / Д.А. Василькин, Л.А., Поцелуева, Л.Т. Мусина, Е.В. Файзуллина, Г.М. Зинатулина, Н.И. Наумкина, А.Т. Губайдуллин // Вестник Санкт-Петербургского университета. Серия 11: Медицина. – 2011. – № 2. – с. 127-132.
14. Видершайн Г.Я. Руководство Юинга по аналитическим инструментальным методам / Г.Я. Видершайн // Биоорганическая химия. – 2007. – Т. 33. № 4. – с. 480.
15. Галкин А.В. Валидация качественных методов анализа / А.В. Галкин, А.А. Елагина // Контроль качества продукции. – 2013. – № 7. – с. 9-12.
16. Ганичева Л.М. Биофармацевтические аспекты разработки, производства и применения лекарственных препаратов / Л.М. Ганичева, Г.П. Вдовина//

- Вестник Волгоградского государственного медицинского университета.
– 2012. – № 3. – с. 3-9.
17. Головки Ю.С. Современные методы поиска новых лекарственных средств / Ю.С. Головки, О.А. Ивашкевич, А.С. Головки // Вестник БГУ, Серия 2, Химия. Биология. География. – 2012. – № 1. – с. 7-15.
18. Горшков А.В. Критическая хроматография – метод анализа полимеров / А.В. Горшков, В.В. Евреинов // Журнал аналитической химии. – 2009. – Т. 64. № 10. – с. 1022-1027.
19. Горьков В.А. Введение в фармакокинетику / В.А. Горьков, Е.И. Карамышева // Клиническая фармакокинетика. – 2004. – № 1. – с. 2-4.
20. Давыдов К.С. Установление взаимозаменяемости воспроизведенных лекарственных средств / К.С. Давыдов, И.Е. Шохин, Г.В. Раменская, В.Г. Кукес // Ремедиум. Журнал о российском рынке лекарств и медицинской технике. – 2010. – № 7. – с. 36-38.
21. Долгоносков, А.М. Неспецифическая селективность в проблеме моделирования высокоэффективной хроматографии / А.М. Долгоносков. – М.: Эдиториал УРСС, 2012. – 256 с.
22. Жилиякова Е.Т. Методология создания лекарственных форм с использованием современных информационных технологий / Е.Т. Жилиякова, Н.А. Шевченко // Вестник новых медицинских технологий. – 2007. – Т. XIV. № 3. – с. 157-159.
23. Жилиякова Е.Т. Совершенствование процесса выбора новых составов лекарственных форм с помощью компьютерных технологий / Е.Т. Жилиякова, М.А. Халикова, О.О. Новиков, М.Ю. Новикова, Э.Ф. Степанова, Д.А. Фадеева // Ученые записки Орловского государственного университета. Серия: Естественные, технические и медицинские науки. – 2010. – № 4. – с. 185-195.
24. Зарубаев В.В. Разработка новых препаратов против вируса гриппа на основе синтетических и природных соединений / В.В. Зарубаев, П.М. Анфимов, А.А. Штро, А.В. Гаршинина, И.А. Мелешкина, Л.А.

- Карпинская, К.Н. Козелецкая, О.И. Киселев // Вопросы вирусологии. – 2012. – Т. 57. № 6. – С. 30-36.
25. Захарычев В.В. Валидационные исследования в лабораторной практике / В.В. Захарычев, А.Ю. Ещенко // Контроль качества продукции. – 2013. – № 7. – с. 6-8.
26. Иванникова Е.В. Исследование фармакокинетики и биодоступности в создании новых оригинальных лекарственных средств пептидной структуры и их оптимальных лекарственных форм / Е.В. Иванникова, В.П. Жердев, С.С. Бойко, Е.В. Блынская, К.Г. Турчинская, К.В. Алексеев // Фармакокинетика и фармакодинамика. – 2013. – № 2. – с. 1-17.
27. Иммунологические методы // Медицинская иммунология. – 2009. – Т. 11. № 4-5. – с. 470-477.
28. Иммунологические методы // Медицинская иммунология. – 2011. – Т. 13. № 4-5. – с. 502-513.
29. Каркищенко Н. Н. Фармакокинетика / Н. Н. Каркищенко, В. В. Хоронько, С. А. Сергеева, В. Н. Каркищенко. – Ростов: Феникс, 2001. – 384 с.
30. Ковалёва Е.Л. Международный и отечественный опыт в сфере регулирования допуска фармацевтических субстанций и вспомогательных веществ в производство лекарственных препаратов / Е.Л. Ковалёва, И.А. Баландина, Л.И. Митькина // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. – 2011. – № 1. – с. 19-24.
31. Ковалева Е.Л. Стандартизация фармацевтических субстанций и препаратов в лекарственной форме «таблетки» / Е.Л. Ковалева. — М.: Гриф и К, 2012. — 288 с.
32. Козлов С.Н. Проблемы применения генериков антимикробных препаратов / С.Н. Козлов, Л.П. Жаркова, С.В. Буданов // Лекарственные средства: Прикладная фармакология и персонализированная фармакотерапия. – 2010. – Т. 1. № 1. – с. 44-50.

33. Конюхов В.Ю. Хроматография / В.Ю. Конюхов. – СПб.: Лань, 2012. – 224 с.
34. Конюшкова А.Н. Обзор требований к исследованиям биоэквивалентности генерических лекарственных средств. требования ема / А.Н. Конюшкова, А.Ю. Савченко, К.С. Давыдова, Г.В. Раменская, В.Г. Кукес // Ремедиум. Журнал о российском рынке лекарств и медицинской технике. – 2011. – № 6. – с. 45-50.
35. Коровина А.Н. Поиск ингибиторов репликации вируса герпеса: 30 лет после ацикловира / А.Н. Коровина, М.К. Куханова, С.Н. Кочетков // BIOTECHNOLOGIA ACTA. – 2013. – V. 6, № 4. – P. 79-85.
36. Кудрявцева А.В. Этапы репликации вируса ВИЧ как потенциальные мишени антиретровирусной терапии / А.В. Кудрявцева // Успехи современного естествознания. – 2011. – № 8. – с. 114-115.
37. Кузнецов А.А. Лекарственная форма и ее потребительные свойства как дополнительный фактор лекарственной комплаентности / А.А. Кузнецов, Т.И. Кабакова, А.В. Кузнецов // Современные проблемы науки и образования. – 2012. – № 5. – с. 356
38. Кузнецов К.А. Количественное определение ивабрадина у больных ишемической болезнью сердца / К.А. Кузнецов, А.Ф. Рябуха, О.В. Магницкая, Л.А. Смирнова, Е.А. Сучков, А.А. Ефимова, Б.Е. Толкачев // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2011. – № 2. – с. 48-50.
39. Кукес В. Изучение биотрансформации лекарственных средств - путь к повышению эффективности и безопасности фармакотерапии / В. Кукес, Д. Сычев, Е. Ших // Врач. – 2007. – № 1. – с. 6-8.
40. Кукес В.Г. Клиническая фармакокинетика / В.Г. Кукес. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 434 с.
41. Кукес В.Г. Метаболизм лекарственных средств. Научные основы персонализированной медицины / В.Г. Кукес, С.В. Грачев, Д.А. Сычев, Г.В. Раменская. – М. ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 304 с.

42. Кулябина Е.В. Применение государственных стандартных образцов и тестовых смесей для поверки и калибровки средств измерений, используемых в биологических исследованиях / Е.В. Кулябина, Т.В. Кулябина // Измерительная техника. – 2013. – № 12 (12). – С. 50-51.
43. Куханова М.К. Анти-ВИЧ нуклеозидные препараты: история создания и взгляд в будущее / М.К. Куханова // Молекулярная биология. – 2012. – № 46 (6). – с. 860.
44. Лапач С.Н. Основные принципы применения статистических методов в клинических испытаниях / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич. – Киев: Морион, 2003. – 246 с.
45. Леонидов Н.Б. Научный фундамент фармацевтики. Полиморфизм субстанций. Открытие / Н.Б. Леонидов // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2013. – № 3 (3). – с. 8-11.
46. Летов О. В. Биозтика и современная медицина / О. В. Летов. – М.: РАН. ИНИОН. Центр гуманитарных научно-информационных исследований, 2009. – 254 с.
47. Львов Д.К. Медицинская вирусология / Д. К. Львов. – Медицинское информационное агентство, 2008. – 656 с.
48. Матасов А.В. Систематизация вспомогательных веществ, применяемых в производстве готовых лекарственных средств / А.В. Матасов, А.И. Козлов, В.А. Мозгунов, Н.В. Меньшутина // Химическая промышленность сегодня. – 2010. – № 7. – с. 51-56.
49. Миназова Г.И. Высокоэффективная жидкостная хроматография в анализе природного сырья / Г.И. Миназова // Башкирский химический журнал. – 2010. – Т. 17. № 4. – с. 134-136.
50. Михайлов И.Б. Клиническая фармакология / И.Б. Михайлов. – СПб.: Фолиант, 2000. – 528 с.
51. Мищенко Е.Л. Математическое моделирование действия потенциальных противовирусных препаратов на репликацию субгеномного репликона вируса гепатита С в клетке / Е.Л. Мищенко, К.Д. Безматерных, В.А.

- Иванисенко, В.А. Лихошвай, Н.А. Колчанов // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2009. – Т. 13. № 1. – С. 208-217.
52. Моргун А.В. Основные функции гематоэнцефалического барьера / А.В. Моргун // Сибирский медицинский журнал (г. Иркутск). – 2012. – Т. 109. № 2. – с. 5-8.
53. Мочалова В.С. Высокоэффективная жидкостная хроматография водорастворимых витаминов на модифицированных сорбентах / В.С. Мочалова, Г.Д. Брыкина, О.А. Шпигун // Вестник Московского университета. Серия 2: Химия. – 2006. – Т. 47. № 3. – с. 206-209.
54. Нестеренко, П. Высокоэффективная комплексообразовательная хроматография ионов металлов: пер. с англ. / П. Нестеренко, Ф. Джонс, Б. Полл. – М.: Техносфера, 2013. – 312 с.
55. Островская А.В. Особенности фармакокинетики лекарственных препаратов при беременности / А.В. Островская, С.А. Шер // Педиатрическая фармакология. – 2010. – Т. 7. № 5. – с. 44-47.
56. Песков К.В. Математическое моделирование при разработке лекарств / К.В. Песков // Вестник Росздравнадзора. – 2013. – №1. – С 57-60.
57. Пестрикова Н.В. Современные аспекты создания лекарственных форм как предпосылка разработки новых фармакотерапевтических технологий (обзор литературы) / Н.В. Пестрикова, Е.М. Карпова, Н.К. Мазина // Вятский медицинский вестник. – 2009. – № 2-4. – с. 26-30.
58. Петров В.И. 9-(2-бензилоксиэтил) производные аденина - противовирусные агенты с широким спектром действия / В.И. Петров, А.А. Озеров, М.С. Новиков, Я. Бальзарини, Э. Де Клерк. // Фундаментальные исследования. – 2004. – № 1. – с. 78-79.
59. Петров В.И. Изучение лекарственной безопасности новых противовирусных лекарственных веществ ряда аденина / В.И. Петров, Л.И. Бугаева, Н.В. Онищенко, М.С. Новиков, А.А. Озеров, Г.Ю. Аветисян // Фундаментальные исследования. – 2004. – № 1. – с. 78.

60. Петров В.И. Количественное определение аторвастатина для проведения терапевтического лекарственного мониторинга, установления фенотипирования по активности сур450 и межлекарственного взаимодействия у больных ИБС / В.И. Петров, Л.А. Смирнова, О.В. Магницкая, А.Ф. Рябуха, К.А. Кузнецов, Е.А. Сучков // Биомедицина. – 2010. – Т. 1. № 3. – с. 111-112.
61. Петров В.И. Медицина основанная на доказательствах / В.И. Петров, С.В. Недогода. – М. ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 144 с.
62. Петров В.И. Противовирусная активность 9-(2-феноксиптил) производных аденина в отношении цитомегаловируса человека / В.И. Петров, А.А. Озеров, М.С. Новиков, Я. Бальзарини, Э. Де Клерк // Фундаментальные исследования. – 2004. – № 1. – с. 77-78.
63. Полторак В.В. Бренды и генерики: критерии оценки эффективности / В.В. Полторак, В.В. Липсон // Международный эндокринологический журнал. – 2013. – № 6 (54). – С. 61-70.
64. Порошин С.А. Валидация и верификация / С.А. Порошин // Контроль качества продукции. – 2013. – № 7. – с. 5.
65. Проведение качественных исследований биоэквивалентности лекарственных средств. Методические указания Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 10.08.2004 г. Клиническая Фармакокинетика. – 2005. – №1.
66. Прудковский А.Г. Теоретическое описание градиентной высокоэффективной хроматографии на основе метода статистических моментов / А.Г. Прудковский // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2011. – Т. 11. № 3. – с. 323-334.
67. Пятигорская Н.В. Унификация основных валидационных документов / Н.В. Пятигорская, В.В. Беляев, В.В. Береговых // Фармация. – 2009. – № 4. – с. 21-24.
68. Раменская Г.В. Выбор препарата сравнения при оценке взаимозаменяемости генерических лекарственных средств / Г.В.

- Раменская, А.Ю. Савченко, К.С. Давыдова, И.Е. Шохин, В.Г. Кукес // Медицинский альманах. – 2011. – № 3. – с. 40-42.
69. Раменская Г.В. Обзор требований к валидации биоаналитических методик / Г.В. Раменская, И.Е. Шохин, А.Ю. Савченко, К.С. Давыдова, В.Г. Кукес // Ремедиум. Журнал о российском рынке лекарств и медицинской технике. – 2011. – № 12. – с. 60-67.
70. Рейхарт Д.В. Исследование биоэквивалентности лекарственных препаратов в России / Д.В. Рейхарт // Фармация. – 2010. – № 3. – с. 5-8.
71. Руденко Б.А. 100 лет хроматографии / Б.А. Руденко. – М.: Наука, 2003. – 744 с.
72. Руденко Б.А. Циркуляционная хроматография / Б.А. Руденко // Журнал аналитической химии. – 2009. – Т. 64. № 6. – с. 565-570.
73. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / Под ред. А.Н. Миронова. — М.: Гриф и К, 2012. — 944 с.
74. Руководство по проведению клинических исследований лекарственных средств. Часть первая / Под ред. А.Н. Миронова. — М.: Гриф и К, 2012. — 244 с.
75. Рябуха А.Ф. Особенности количественного определения аторвастатина в плазме крови пациентов с ишемической болезнью сердца / А.Ф. Рябуха, К.А. Кузнецов, О.В. Магницкая, Л.А. Смирнова, Е.А. Сучков, А.А. Ефимова, Б.Е. Толкачев // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2011. – № 1. – с. 53-55.
76. Рябуха А.Ф. Разработка метода количественного определения биогенных аминов и их метаболитов в структурах головного мозга крыс / А.Ф. Рябуха, Е.А. Сучков, А.В. Мекеня, Е.В. Дьякова, Д.Г. Ковалев, Л.А. Смирнова // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2010. – № 02. – с.29-31.
77. Самойличенко О.В. Валидация аналитических методик как неотъемлемая часть обеспечения качества результатов испытаний / О.В.

- Самойличенко, В.М. Мокийчук // Электротехнические и компьютерные системы. – 2012. – № 6. – с. 228-234.
78. Селезнев Е. Фармакокинетика как основа доказательной фармакотерапии / Е. Селезнев // Врач. – 2006. – № 4. – с. 56-61.
79. Сергиенко В.И. Математическая статистика в клинических исследованиях / В.И. Сергиенко, И.Б. Бондарева. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. – 304 с.
80. Скатков С.А. Эффективность и безопасность лекарств или чему служит биофармация / С.А. Скатков // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2013. – № 2 (2). – с. 14-19.
81. Скачилова С.Я.. Биофармацевтические аспекты фармакопейных субстанций / С.Я. Скачилова, И.П. Рудакова, И.Г. Ильина, Е.В. Шилова, И.А. Самылина, А.И. Тенцова // Фармация. – 2012. – № 8. – с. 29-32.
82. Смирнова Л.А. Изучение абсолютной биодоступности нового производного гамк -- цитрокарда / Л.А. Смирнова, В.Н. Перфилова, И.Н. Тюренков, А.Ф. Рябуха, Е.А. Сучков, С.А. Лебедева // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2013. – Т. 155. № 4. – с. 450-452.
83. Смирнова Л.А. Относительная биодоступность соединения VMA-99-82 – нового производного аденина, обладающего противовирусной активностью / Л.А. Смирнова, Е.А. Сучков, А.Ф. Рябуха, К.А. Кузнецов, А.А. Озеров // Вестник ВолгГМУ. – 2013. – №3 (47). – с. 78-81.
84. Смирнова Л.А. Фармакокинетические свойства нового производного аденина с противовирусной активностью / Л.А. Смирнова, Е.А. Сучков, А.Ф. Рябуха, К.А. Кузнецов, А.А. Озеров // Вестник ВолгГМУ. – 2014. – №1 (49). – с. 92-93.
85. Смирнова Л.А. Хроматографические условия анализа нового производного аденина, обладающего противовирусной активностью / Л.А. Смирнова, Е.А. Сучков, А.Ф. Рябуха, К.А. Кузнецов, А.А. Озеров // Вестник ВолгГМУ. – 2014. – №1 (49). – с. 94-96.

86. Смирнова Л.А. Экскреция соединения vma-99-82 — нового производного аденина, обладающего противовирусной активностью / Л.А. Смирнова, Е.А. Сучков, А.Ф. Рябуха, К.А. Кузнецов, А.А. Озеров, А.В. Караваев // Фармакокинетика и фармакодинамика. – 2013. – № 1. – с. 40-42.
87. Соколов А.В. Правила исследования биоэквивалентности лекарств / А.В. Соколов // Фармакокинетика и фармакодинамика. – 2004. – №1. – С. 14-16
88. Спицын В.А. Полиморфизм в генах человека, ассоциирующихся с биотрансформацией ксенобиотиков / В.А. Спицын, С.В. Макаров, Г.В. Пай, Л.С. Бычковская // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2006. – Т. 10. № 1. – С. 97-105.
89. Сычев Д.А. Половые различия в биотрансформации лекарственных средств: значение для проведения клинических исследований лекарственных средств / Д.А. Сычев, Г.В. Раменская, В.Г. Кукес // Клиническая фармакокинетика. – 2005. – № 1. – С. 15-17.
90. Сычев К.С. Практическое руководство по жидкостной хроматографии / К.С. Сычев ; Ред. А.А. Курганов. – М.: Техносфера, 2010. – 272 с.
91. Сычев, С.Н. Высокоэффективная жидкостная хроматография: аналитика, физическая химия, распознавание многокомпонентных систем: учебное пособие / С.Н. Сычев, В.А. Гаврилина. – СПб.: Лань, 2013. – 256 с.
92. Ташенова А.И. Транспортная система гликопротеина-р и фармакокинетика лекарственных средств / А.И. Ташенова // Биомедицина. – 2010. – Т. 1. № 4. – с. 24-32.
93. Тенцова А.И. Биофармация – 50 лет в пути: развитие, перспективы, проблемы / А.И. Тенцова // Фармация. – 2012. – № 3. – с. 3-4.
94. Тенцова А.И. Современные биофармацевтические аспекты вспомогательных веществ / А.И. Тенцова, О.И. Терёшкина, И.П. Рудакова, И.А. Самылина, Т.А. Гуськова // Фармация. – 2012. – № 7. – с. 3-6.

95. Терешкина О.И. Информация о безопасности вспомогательных веществ, входящих в лекарственные препараты / О.И. Терешкина, Т.А. Гуськова // Фармация. – 2007. – № 6. – с. 6-9.
96. Тихонов А.И. Биофармация / А.И. Тихонов, Т.Г. Ярных, И.А. Зупанец. – Харьков: НФаУ Золотые страницы, 2003. – 240 с.
97. Толпыгина С.Н. Проблема дженерической замены: плюсы и минусы / С.Н. Толпыгина, С.Ю. Марцевич // Рациональная фармакотерапия в кардиологии. – 2009. – Т. 5. № 1. – с. 63-68.
98. Тюренков И.Н. Гепатодуоденальная циркуляция и экскреция нового производного гамк — цитрокарда / И.Н. Тюренков, В.Н. Перфилова, Л.А. Смирнова, А.Ф. Рябуха, Е.А. Сучков, С.А. Лебедева // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2013. – Т. 76. № 3. – с. 38-40.
99. Тюренков И.Н. Разработка хроматографического метода количественного определения фенибута в биологических пробах / И.Н. Тюренков, В.Н. Перфилова, Л.А. Смирнова, А.Ф. Рябуха, Е.А. Сучков, С.А. Лебедева // Химико-фармацевтический журнал. – 2010. – Т. 44. № 12. – с. 53-56.
100. Тюренков И.Н. Фармакокинетические свойства нового производного гамк цитрокарда: распределение и тканевая биодоступность / И.Н. Тюренков, В.Н. Перфилова, Л.А. Смирнова, А.Ф. Рябуха, Е.А. Сучков, С.А. Лебедева // Фармакокинетика и фармакодинамика. 2012. № 2. С. 26-29.
101. Тюренков И.Н. Фармакокинетические свойства фенибута при внутривенном и пероральном введении / И.Н. Тюренков, В.Н. Перфилова, Л.А. Смирнова, А.Ф. Рябуха, Е.А. Сучков, С.А. Лебедева // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2010. – № 9. – с. 22-26.
102. Филимонов Д.А. Прогноз спектра биологической активности органических соединений / Д.А. Филимонов, В.В. Поройков // Рос. хим.

- ж. (Ж. Рос. хим. общества им. Д.И. Менделеева). – 2006. – Т. 1, № 2. – С. 66–75
103. Хаджиева З.Д. Технологические аспекты использования вспомогательных веществ в производстве лекарственных препаратов / З.Д. Хаджиева, А.В. Кузнецов, Д.В. Бирюкова // *Фундаментальные исследования*. – 2012. – № 5-2. – с. 436-440.
104. Хенке, Х. Жидкостная хроматография: пер. с нем. / Х. Хенке. – М.: Техносфера, 2009. – 264 с.
105. Хишова О.М. Вспомогательные вещества в производстве мазей / О.М. Хишова, Т.В. Бычковская, А.А. Яремчук // *Вестник фармации*. – 2009. – № 4-46. – с. 97-105.
106. Чистяков В.В. Некоторые особенности биоаналитической части изучения биоэквивалентности лекарственных препаратов / В.В. Чистяков // *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. – 2013. – № 3. – с. 24-28.
107. Чубарова С.В. Физиологические и клинические аспекты р-гликопротеина / С.В. Чубарова, А.Ю. Крапошина, Е.А. Собко, И.В. Демко, А.Б. Салмина // *Бюллетень физиологии и патологии дыхания*. – 2012. – № 45. – с. 91-97.
108. Шикова Ю.В. Современные вспомогательные вещества в изготовлении лекарств / Ю.В. Шикова, В.А. Лиходед, З.Р. Кадырова, А.В. Епифанова, Е.В. Елова, А.В. Лиходед, Т.А. Хасанов, С.Б. Бахтиярова // *Фармация*. – 2011. – № 6. – с. 39-42.
109. Эльяшевич Е.Г. История зарождения технологии лекарственных форм / Е.Г. Эльяшевич // *Вестник фармации*. – 2006. – № 2-32. – с. 87-89.
110. Якушева Е.Н. Характеристика гликопротеина-р как белка транспортера лекарственных веществ / Е.Н. Якушева, И.В. Черных, А.С. Бирюкова // *Российский медико-биологический вестник им. академика И.П. Павлова*. – 2011. – № 3. – с. 142-148.

111. Яшин Я.И. Аналитическая хроматография. Методы, аппаратура, применение / Я.И. Яшин, А.Я. Яшин // Успехи химии. – 2006. – Т. 75. № 4. – с. 366-379.
112. Amacher D.E. The primary role of hepatic metabolism in idiosyncratic drug-induced liver injury / D.E. Amacher // Expert Opin Drug Metab Toxicol. – 2012. – V. 8 (3). – P. 335-347.
113. Amidon K.S. Bioequivalence of oral products and the biopharmaceutics classification system: science, regulation, and public policy / K.S. Amidon, P. Langguth, H. Lennernäs, L. Yu, G.L. Amidon // Clin Pharmacol Ther. – 2011. – V. 90 (3). –P. 467-70.
114. Anderson S. Consideration of individual bioequivalence / S. Anderson, W.W. Yauck // J. Pharmacokinet. Biopharm. – 1990. – V. 18, N 3. – P. 259-273.
115. Antonelli G. Antiviral therapy: old and current issues / G. Antonelli, O. Turriziani // Int J Antimicrob Agents. – 2012. – V. 40 (2). – P. 95-102.
116. Baillie T.A. Role of biotransformation in drug-induced toxicity: influence of intra- and inter-species differences in drug metabolism / T.A. Baillie, A.E. Rettie // Drug Metab Pharmacokinet. – 2011. – V. 26 (1). – P. 15-29.
117. Bashaw E.D. Bioanalytical method validation: concepts, expectations and challenges in small molecule and macromolecule--a report of PITTCON 2013 symposium / E.D. Bashaw, B. DeSilva, M.J. Rose, Y.M. Wang, C. Shukla // AAPS J. – 2014. – V. 16(3). – P. 586-591.
118. Benjamin B. Integration of physicochemical and pharmacokinetic parameters in lead optimization: a physiological pharmacokinetic model based approach / B. Benjamin, T.K. Barman, T. Chaira, J.K. Paliwal // Curr Drug Discov Technol. – 2010. – V. 7 (3). – P. 143-153.
119. Bjarnsholt T. Applying insights from biofilm biology to drug development - can a new approach be developed? / T. Bjarnsholt, O. Ciofu, S. Molin, M Givskov, N. Høiby // Nat Rev Drug Discov. – 2013. – V. 12 (10). – P. 791-808.

120. Boswell C.A. Effects of charge on antibody tissue distribution and pharmacokinetics / C.A. Boswell, D.B. Tesar, K. Mukhyala, F.P. Theil, P.J. Fielder, L.A. Khawli // *Bioconjug Chem.* – 2010. – V. 21 (12) – P. 2153-2163.
121. Bower J.F. Recommendations and best practices for reference standards and reagents used in bioanalytical method validation / J.F. Bower, J.B. McClung, C. Watson, T. Osumi, K. Pastre // *AAPS J.* – 2014. – V. 16(2). – P. 352-356.
122. Brunner M. Microdialysis versus other techniques for the clinical assessment of in vivo tissue drug distribution / M. Brunner, O. Langer // *AAPS J.* – 2006. – V. 8 (2). – P. 263-271.
123. Casey G. Metabolism and excretion: eliminating drugs from the body / G. Casey // *Nurs N.Z.* – 2012. – V. 18 (7). – P. 20-24.
124. Chen B. Pharmacokinetics/pharmacodynamics model-supported early drug development / B. Chen, J.Q. Dong, W.J. Pan, A. Ruiz // *Curr Pharm Biotechnol.* – 2012. – V. 13 (7). – P. 1360-1375.
125. Chen M.L. Using partial area for evaluation of bioavailability and bioequivalence / M.L. Chen, B. Davit, R. Lionberger, Z. Wahba, H.Y. Ahn, L.X. Yu // *Pharm Res.* – 2011. – V. 28 (8). – P. 1939-1947.
126. Davit B. International guidelines for bioequivalence of systemically available orally administered generic drug products: a survey of similarities and differences / B. Davit, A.C. Braddy, D.P. Conner, L.X. Yu // *AAPS J.* – 2013. – V. 15 (4). P. 974-990.
127. DeGorter M.K. Drug transporters in drug efficacy and toxicity / M.K. DeGorter, C.Q. Xia, J.J. Yang, R.B. Kim // *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* – 2012. – V. 52. – P. 249-273.
128. Dostalek M. Pharmacokinetics, pharmacodynamics and physiologically-based pharmacokinetic modelling of monoclonal antibodies / M. Dostalek, I. Gardner, B.M. Gurbaxani, R.H. Rose, M. Chetty // *Clin Pharmacokinet.* – 2013. – V. 52 (2). – P. 83-124.

129. Dubey R. Bioequivalence challenges in development of fixed-dose combination products: looking beyond reformulation / R. Dubey // *Expert Opin Drug Deliv.* – 2012. – V. 9 (3). – P. 325-332.
130. Fan A. Chemiluminescence platforms in immunoassay and DNA analyses / A. Fan, Z. Cao, H. Li, M. Kai, J. Lu // *Anal Sci.* – 2009. – V. 25(5). – P. 587-597.
131. Fan J. Pharmacokinetics / J. Fan, I.A. de Lannoy // *Biochem Pharmacol.* – 2014. – V. 87 (1). – P. 93-120.
132. Gibaldi M. Biopharmaceutics and clinical pharmacokinetics / M. Gibaldi. – 4 ed. – London. – 1991.
133. Gordon J. A simplified approach for the simultaneous qualification of bioanalytical methods for multiple species at late discovery stage / J. Gordon, M. Johnson, J.T. Wu, S. Yu // *Bioanalysis.* – 2012. – V. 4 (9). – P. 1065-1075.
134. Guideline on bioanalytical method validation (EMA 2012). www.ema.europa.eu
135. Hadziyannis S.J. Long_term adefovir dipivoxil treatment induces regression of liver fibrosis in patients with HBeAg_negative chronic hepatitis B: results after 5 years of therapy / S.J. Hadziyannis, N.C. Tassopoulos, T.T. Chang // *Hepatology.* – 2005. – V. 42. – P. 754.
136. Hage D.S. Pharmaceutical and biomedical applications of affinity chromatography: recent trends and developments / D.S. Hage, J.A. Anguizola, C. Bi, R. Li, R. Matsuda, E. Papastavros, E. Pfaunmiller, J. Vargas, X. Zheng // *J Pharm Biomed Anal.* – 2012. – V. 69. – P.93-105.
137. Huang Y. Regulated drug bioanalysis for human pharmacokinetic studies and therapeutic drug management / Y. Huang, R. Shi, W. Gee, R. Bonderud // *Bioanalysis.* – 2012. – V. 4 (15). – P. 1919-1931.
138. Jennen D.G. Biotransformation pathway maps in WikiPathways enable direct visualization of drug metabolism related expression changes / D.G. Jennen, S. Gaj, P.J. Giesbertz, J.H. van Delft, C.T. Evelo, J.C. Kleinjans // *Drug Discov Today.* – 2010. – V. 15 (19-20). – P. 851-858.

139. Jones H.M. Dose selection based on physiologically based pharmacokinetic (PBPK) approaches / H.M. Jones, K. Mayawala, P. Poulin // *AAPS J.* – 2013. – V. 15 (2). – P. 377-87.
140. Jones H.M. Dose selection based on physiologically based pharmacokinetic (PBPK) approaches / H.M. Jones, K. Mayawala, P. Poulin // *AAPS J.* – 2013. – V. 15 (2). – P. 377-87.
141. Kaji N. [Development of bioanalytical techniques using micro- and nanostructures for medical applications] / N. Kaji // *Yakugaku Zasshi.* – 2012. – V. 132(2). – P. 205-209.
142. Karalis V. Current regulatory approaches of bioequivalence testing / V. Karalis, P. Macheras // *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* – 2012. – V. 8 (8). – P. 929-942.
143. Keck B.D. Analytical validation of accelerator mass spectrometry for pharmaceutical development/ B.D. Keck, T. Ognibene, J.S. Vogel // *Bioanalysis* – 2010. – Vol. 2, No. 3. – P. 469-485.
144. Knights K.M. Renal drug metabolism in humans: the potential for drug-endobiotic interactions involving cytochrome P450 (CYP) and UDP-glucuronosyltransferase (UGT) / K.M. Knights, A. Rowland, J.O. Miners // *Br J Clin Pharmacol.* – 2013. – V. 76 (4). – P. 587-602.
145. Koren G. Gender differences in drug bioequivalence: time to rethink practices / G. Koren, H. Nordeng, S. MacLeod // *Clin Pharmacol Ther.* – 2013. – V. 93 (3). – P. 260-262.
146. Lain R.K. Principles and applications of physiologically based pharmacokinetic modeling / R.K. Lain, L.E. Gerlowski // *J. Pharm. Sci.* – 2006. – Vol. 72, № 10. – P. 1103–1127.
147. Leung L. Metabolic activation in drug-induced liver injury / L. Leung, A.S. Kalgutkar, R.S. Obach // *Drug Metab Rev.* – 2012. – V. 44 (1). – P. 18-33.
148. Levine K.E. Aspects of bioanalytical method validation for the quantitative determination of trace elements / K.E. Levine, C. Tudan, P.M. Grohse, F.X.

- Weber, M.A. Levine, Y.S. Kim // *Bioanalysis*. – 2011 – V. 3 (15). – P. 1699-1712.
149. Li C. A modern in vivo pharmacokinetic paradigm: combining snapshot, rapid and full PK approaches to optimize and expedite early drug discovery / C. Li, B. Liu, J. Chang, T. Groessl, M. Zimmerman, Y.Q. He, J. Isbell, T. Tuntland // *Drug Discov Today*. – 2013. – V. 18 (1-2). – P. 71-78.
150. Li L. Systematic evaluation of dose accumulation studies in clinical pharmacokinetics / L. Li, X. Li, L. Xu, Y. Sheng, J. Huang, Q. Zheng // *Curr Drug Metab*. – 2013. – V. 14 (5). – P. 605-15.
151. Lin Z.J. Capsule review on bioanalytical method transfer: opportunities and challenges for chromatographic methods / Z.J. Lin, W. Li, N. Weng // *Bioanalysis*. – 2011. – V. 3(1). – P. 57-66.
152. Lou Z. Current progress in antiviral strategies / Z. Lou, Y. Sun, Z. Rao // *Trends Pharmacol Sci*. – 2014. – V. 35 (2). – P. 86-102.
153. Lu G. Physiologically-based pharmacokinetic (PBPK) models for assessing the kinetics of xenobiotics during pregnancy: achievements and shortcomings / G. Lu, K. Abduljalil, M. Jamei, T.N. Johnson, H. Soltani, A. Rostami-Hodjegan // *Curr Drug Metab*. – 2012. – V. 13 (6). – P. 695-720.
154. Luffer-Atlas D. The early estimation of circulating drug metabolites in humans / D. Luffer-Atlas // *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. – 2012. – V. 8 (8). – P. 985-997.
155. Marcellin P. Adenine arabinoside 5-monophosphate in patients with chronic hepatitis B: comparison of the efficacy in patients with high and low viral replication / P. Marcellin, M. Pouteau, M.A. Lorient // *Gut*. – 1995. – V. 36. – P. 422–426.
156. Marchi I. Characterization and classification of matrix effects in biological samples analyses / I. Marchi, V. Viette, F. Badoud, M. Fathi, M. Saugy, S. Rudaz, J.L. Veuthey // *J Chromatogr A*. – 2010. – V. 1217(25). – P. 4071-4078.

157. Martinez M.N. Dosing regimen matters: the importance of early intervention and rapid attainment of the pharmacokinetic/pharmacodynamic target / M.N. Martinez, M.G. Papich, G.L. Drusano // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2012. – V. 56 (6). – P. 2795-2805.
158. Mendieta-Wejebe J.E. Molecular modeling used to evaluate CYP2C9-dependent metabolism: homology modeling, molecular dynamics and docking simulations / J.E. Mendieta-Wejebe, J. Correa-Basurto, E.M. García-Segovia, G. Ceballos-Cancino, M.C. Rosales-Hernández // *Curr Drug Metab.* – 2011. – V. 12 (6). – P. 533-48.
159. Meyer M.R. Absorption, distribution, metabolism and excretion pharmacogenomics of drugs of abuse / M.R. Meyer, H.H. Maurer // *Pharmacogenomics.* – 2011. – V. 12 (2). – P. 215-33.
160. Milne C.P. Prospects for rapid advances in the development of new medicines for special medical needs / Milne C.P. // *Clin Pharmacol Ther.* – 2014. – V. 95 (1). – P. 98-109.
161. Mitra A. Challenges and opportunities in achieving bioequivalence for fixed-dose combination products / A. Mitra, Y. Wu // *AAPS J.* – 2012. – V. 14 (3)ю – P. 646-655.
162. Moroy G. Toward in silico structure-based ADMET prediction in drug discovery / G. Moroy, V.Y. Martiny, P. Vayer, B.O. Villoutreix, M.A. Miteva // *Drug Discov Today.* – 2012. – V. 17 (1-2). – P. 44-55.
163. Obach R.S. Pharmacologically active drug metabolites: impact on drug discovery and pharmacotherapy / R.S. Obach // *Pharmacol Rev.* – 2013. – V. 65 (2). – P. 578-640.
164. Palleria C. Pharmacokinetic drug-drug interaction and their implication in clinical management / C. Palleria, A. Di Paolo, C. Giofrè, C. Caglioti, G. Leuzzi, A. Siniscalchi, G. De Sarro, L. Gallelli // *J Res Med Sci.* – 2013. – V. 18 (7). – P. 601-610.

165. Pang K.S. Physiologically-based pharmacokinetic modeling for absorption, transport, metabolism and excretion / K.S. Pang, M.R. Durk // *J Pharmacokinet Pharmacodyn.* – 2010. – V. 37 (6). – P. 591-615.
166. Patel D. Matrix effect in a view of LC-MS/MS: an overview / D. Patel // *J. Pharma and Bio Scie.* – 2011. – V. 2. N 1.
167. Petrov V.I. 9-(2-aryloxyethyl) derivatives of adenine – a new class of nonnucleosidic antiviral agents / V.I. Petrov, A.A. Ozerov, M.S. Novikov // *Chemistry of Heterocyclic Compounds.* – 2003. – 39 (9). – P. 1218-1226.
168. Ravindranath V. Cytochrome P450-mediated metabolism in brain: functional roles and their implications / V. Ravindranath, H.W. Strobel // *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* – 2013. – V. 9 (5). – P. 551-558.
169. Roberts D.J. Drug absorption, distribution, metabolism and excretion considerations in critically ill adults / D.J. Roberts, R.I. Hall // *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* – 2013. – V. 9 (9). – P. 1067-1084.
170. Robertson E.E. Human renal organic anion transporters: characteristics and contributions to drug and drug metabolite excretion / E.E. Robertson, G.O. Rankin // *Pharmacol Ther.* – 2006. – V. 109 (3). – P. 399-412.
171. Roncaglioni A. In silico methods to predict drug toxicity / A. Roncaglioni, A.A. Toropov, A.P. Toropova, E. Benfenati // *Curr Opin Pharmacol.* – 2013. – V. 13 (5). – P. 802-806.
172. Roses A.D. New applications of disease genetics and pharmacogenetics to drug development / A.D. Roses, A.M. Saunders, M.W. Lutz, N. Zhang, A.R. Hariri, K.E. Asin, D.G. Crenshaw, K. Budur, D.K. Burns, S.K. Brannan // *Curr Opin Pharmacol.* – 2014. – V. 14. – P. 81-89.
173. Rowland M. Physiologically-based pharmacokinetics in drug development and regulatory science / M. Rowland, C. Peck, G. Tucker // *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* – 2011. – V. 51. – P. 45-73.
174. Rozet E. Advances in validation, risk and uncertainty assessment of bioanalytical methods / E. Rozet, R.D. Marini, E. Ziemons, B. Boulanger, P. Hubert // *J Pharm Biomed Anal.* – 2011. – V. 55(4). – P. 848-858.

175. Rustichelli D Validation of analytical methods in compliance with good manufacturing practice: a practical approach / D. Rustichelli, S. Castiglia, M. Gunetti, K. Mareschi, E. Signorino, M. Muraro, L. Castello, F. Leone M. Sanavio, I. Ferrero, F. Fagioli // *J Transl Med.* – 2013. – v.11
176. Savoie N. 2009 White Paper on recent issues in regulated bioanalysis from the 3rd Calibration and Validation Group Workshop/ N. Savoie, F. Garofolo, P. van Amsterdam, B.P. Booth, D.M. Fast, M. Lindsay, S. Lowes, R. Masse, L. Mawer, E. Ormsby, R. Phull, M.L. Rocci Jr, P.T. Vallano, X. Yin // *Bioanalysis.* – 2010 – 2 (1). –P. 53-68.
177. Sherwin C.M. Fundamentals of population pharmacokinetic modelling: validation methods / C.M. Sherwin, T.K. Kiang, M.G. Spigarelli, M.H. Ensom // *Clin Pharmacokinet.* – 2012. – V. 51 (9). – P. 573-590.
178. Shitara Y. Transporters as a determinant of drug clearance and tissue distribution / Y. Shitara, T. Horie, Y. Sugiyama // *Eur J Pharm Sci.* – 2006. – V. 27 (5). – P. 425-46.
179. Shugarts S. The role of transporters in the pharmacokinetics of orally administered drugs / S. Shugarts, L.Z. Benet // *Pharm Res.* – 2009. – V. 26 (9). – P. 2039-54.
180. Sieber J.R. Matrix-independent XRF methods for certification of standard reference materials / J.R. Sieber // *JCPDS.* – 2002. – V. 45. – P. 493-504.
181. Slaughter R.L. Pharmacokinetic behavior presents drug therapy challenges / R.L. Slaughter // *Expert Rev Clin Pharmacol.* – 2013. – V. 6 (6) – P. 627-39.
182. Soh N. Sequential injection immunoassay for environmental measurements / N. Soh, M. Tanaka, K. Hirakawa, R. Zhang, H. Nakajima, K. Nakano, T. Imato // *Anal Sci.* – 2011. – V. 27(11). – P. 1069-1076.
183. Suenderhauf C. A physiologically based pharmacokinetic model of the minipig: data compilation and model implementation / C. Suenderhauf, N. Parrott // *Pharm Res.* – 2013. – V. 30 (1). – P. 1-15.

184. Theodorsson E. Validation and verification of measurement methods in clinical chemistry/ E. Theodorsson // *Bioanalysis*. – 2012. – V. 4(3). – P. 305-320.
185. Thews O. Activation of P-glycoprotein (Pgp)-mediated drug efflux by extracellular acidosis: in vivo imaging with ⁶⁸Ga-labelled PET tracer / O. Thews, W. Dillenburg, M. Fellner, H.G. Buchholz, N. Bausbacher, M. Schreckenberger, F. Rösch // *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. – 2010. – V. 37 (10). – P. 1935-1942.
186. Ueno K. Sex-related differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics of anti-hypertensive drugs / K. Ueno, H. Sato // *Hypertens Res*. – 2012. – V. 35 (3). – P. 245-50.
187. Van de Merbel N.C. Aging of biological matrices and its effect on bioanalytical method performance / N.C. van de Merbel, R. de Vries // *Bioanalysis*. – 2013. – V. 5(19). – P. 2393-2407.
188. Voicu V.A. New insights on the consequences of biotransformation processes on the distribution and pharmacodynamic profiles of some neuropsychotropic drugs / V.A. Voicu, J. de Leon, A.V. Medvedovici, F.Ş. Rădulescu, D.S. Miron // *Eur Neuropsychopharmacol*. – 2012. – V. 22 (5). – P. 319-329.
189. Walsh J.S. Bioactivation of drugs: risk and drug design / J.S. Walsh, G.T. Miwa // *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. – 2011. – V. 51. – P. 145-167.
190. Whiteaker J.R. Peptide immunoaffinity enrichment coupled with mass spectrometry for peptide and protein quantification / J.R. Whiteaker, A.G. Paulovich // *Clin Lab Med*. – 2011. – V. 31(3). – P. 385-396.
191. Williamson L.N. Common bioanalytical deficiencies with bioequivalence submissions in Abbreviated New Drug Applications / L.N. Williamson, D.P. Conner, E.M. Stier, B.M. Davit // *Bioanalysis*. – 2014. – V. 6(4). – P. 441-445.
192. Wilson J.T. Drug excretion in human breast milk: principles, pharmacokinetics and projected consequences / J.T. Wilson, R.D. Brown, D.R.

- Cherek, J.W. Dailey, B. Hilman, P.C. Jobe, B.R. Manno, J.E. Manno, H.M. Redetzki, J.J. Stewart // *Clin Pharmacokinet.* – 1980. – V. 5 (1). – P. 1-66.
193. Woolley C.F. Recent developments in emerging microimmunoassays. / C.F. Woolley, M.A. Hayes // *Bioanalysis.* – 2013. – V. 5(2). – P.245-264.
194. Xue Y.J. An integrated bioanalytical method development and validation approach: case studies / Y.J. Xue, B. Melo, M. Vallejo, Y. Zhao, L. Tang, Y.S. Chen, K.M. Keller // *Biomed Chromatogr.* – 2012. – V. 26(10). – P.1215-1227.
195. Yamaoka K. Statistical moments in pharmacokinetics / K. Yamaoka, T. Nakagawa, T. Uno // *J. Pharmacokinet. Biopharm.* – 1978. – Vol. 6, N 6. – P 547-558.
196. Yamashita F. Pharmacokinetic considerations for targeted drug delivery / F. Yamashita, M. Hashida // *Adv Drug Deliv Rev.* – 2013. – V. 65 (1). – P. 139-147.
197. Yamazaki M. Recent advances in carrier-mediated hepatic uptake and biliary excretion of xenobiotics / M. Yamazaki, H. Suzuki, Y. Sugiyama // *Pharm Res.* – 1996. – V. 13 (4). – P. 497-513.
198. Yeo K.R. Predicting drug-drug interactions: application of physiologically based pharmacokinetic models under a systems biology approach / K.R. Yeo, M. Jamei, A. Rostami-Hodjegan // *Expert Rev Clin Pharmacol.* – 2013. – V. 6 (2). – P. 143-157.
199. Zamek-Glisczynski M.J. Integration of hepatic drug transporters and phase II metabolizing enzymes: mechanisms of hepatic excretion of sulfate, glucuronide, and glutathione metabolites / M.J. Zamek-Glisczynski, K.A. Hoffmaster, K. Nezasa, M.N. Tallman, K.L. Brouwer // *Eur J Pharm Sci.* – 2006. – V. 27 (5). – P. 447-486.
200. Zhao L. Application of pharmacokinetics-pharmacodynamics/clinical response modeling and simulation for biologics drug development / L. Zhao, E.Y. Shang, C.G. Sahajwalla // *J Pharm Sci.* – 2012. – V. 101 (12). – P. 4367-4382.

201. Zhong H.A. Understanding the molecular properties and metabolism of top prescribed drugs / H.A. Zhong, V. Mashinson, T.A. Woolman, M. Zha // *Curr Top Med Chem.* – 2013. – V. 13 (11). – P. 1290-1307.
202. Zou P. Prediction of volume of distribution at steady state in humans: comparison of different approaches / P. Zou, N. Zheng, Y. Yang, L.X. Yu, D. Sun // *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* – 2012. – V. 8 (7). – P. 855-872.