

Молекулярно-биологические проблемы создания лекарственных средств и изучение механизма их действия

© Коллектив авторов, 2015

А. Ю. Савченко, Л. А. Меньшикова, Г. В. Раменская, Е. А. Смолярчук

ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ИННОВАЦИОННОГО ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНОГО ПРЕПАРАТА ТИОЗОНИДА В ПЛАЗМЕ КРОВИ

Первый московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова, 119991, Россия, Москва, ул. Трубецкая, д. 8; e-mail: lily-chka@mail.ru

В статье представлены результаты изучения параметров фармакокинетики оригинального противотуберкулезного препарата тиозонид, капсулы 100 мг (ЗАО “Фарм-Синтез”, Москва) при однократном приеме возрастающих доз различными группами здоровых добровольцев в рамках клинического исследования I фазы.

Ключевые слова: тиозонид; фармакокинетика; клинические исследования; I фаза; плазма.

Туберкулез – одна из глобальных проблем современного здравоохранения. Приблизительно одна треть общей популяции всего мира заражена *M. tuberculosis*, при этом каждый год регистрируют от 8 до 10 млн новых случаев заболевания [1, 2]. Туберкулез остается ведущей причиной смерти среди излечимых инфекционных заболеваний.

За последние 20 – 25 лет в России отмечены значительные изменения уровня регистрируемой заболеваемости. Постепенное снижение показателя в 70 – 80 гг. XX века до 34,1 сменилось в 1991 – 2000 гг. значительным ростом – в 2,7 раза (до 90,7 в 2000 г.) с последующей стабилизацией в первые годы нового столетия на уровне 82 – 85 (2008 г. – 85,1). Наконец, в течение последних 2 лет регистрируемая заболеваемость туберкулезом начала снижаться, достигнув в 2010 г. значения 77,4 на 100 тыс. населения (2009 г. – 82,6) [1].

Согласно докладу Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) “О глобальной борьбе с туберкулезом” (за 2012 г.) в 2011 г. было зарегистрировано 8,7 млн случаев заболевания туберкулезом и 1,4 млн случаев смерти от него среди лиц, не имевших ВИЧ-инфекции, и еще 430 тыс. случаев смерти от ВИЧ-ассоциированного туберкулеза [2]. Поликомпонентная противотуберкулезная химиотерапия занимает основное место в лечении больных туберкулезом. Значительную роль в развитии эпидемии туберкулеза (ТБ) играет растущая частота случаев с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) микобактерий туберкулеза (МБТ), а также инфицирования вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ) [3 – 5].

По определению ВОЗ, множественно лекарственно устойчивый туберкулез определяется как случай туберкулеза легких с выделением МБТ, устойчивых одновременно по крайней мере к 2 наиболее активным противотуберкулезным препаратам – изониазиду и рифампицину.

В связи с этим высокую актуальность приобретают вопросы лечения больных ТБ с МЛУ [6, 7]. Для этой цели широко используются противотуберкулезные препараты (ПП) резервного ряда: этионамид, канамицин (амикацин), капреомицин, циклосерин, парааминосалициловая кислота (ПАСК) и фторхинолоны (ципрофлоксацин, офлоксацин), рифабутин, тиацетозон, а также альтернативные препараты [3, 4, 6]. Однако ряд серьезных побочных реакций этих препаратов затрудняет ход лечения и ограничивает возможность проведения эффективной противотуберкулезной терапии.

Таким образом, разработка новых классов противотуберкулезных препаратов, эффективных в лечении туберкулеза, в том числе с МЛУ, является актуальной задачей современной фтизиатрии. Одним из перспективных инновационных лекарственных препаратов является тиозонид – {1R,2S + 1S,2R}-1-(6-бром-2-хлорхинолил-3-ил)-4-(диметиламино)-2-(нафталин-1-ил)-1-фенилбутан-2-ол – I (патент России № 2404971). I является синтетическим противомикробным средством, действующим на МБТ туберкулеза как на чувствительные штаммы *M. tuberculosis* типа H37Rv, так и на резистентные к препаратам первой линии штаммы CN-37, CN-40 и MS-115. В ходе исследований *in vitro* была выявлено его бактериостатическое действие на атипичные микобактерии *M. smegmatis* NCTC 8159 и *M. fortuitum* NCTC 389. Предполагается, что тиозонид нарушает синтез АТФ в клетке *M. tuberculosis* [8].

Экспериментальная часть

В ходе биоаналитического исследования была разработана и валидирована методика определения I в плазме крови [9]. Пробоподготовку проводили осаждением белков ацетонитрилом. Анализ проводили на жидкостном хроматографе Agilent 1200 с масс-спектрометрическим детектором MS 6120 (Agilent Technologies, США). Данные обрабатывали при помо-

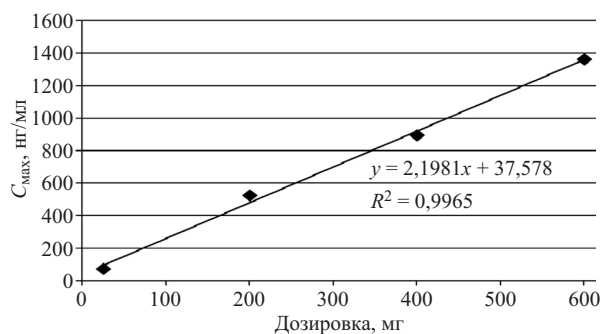


Рис. 1. Линейность фармакокинетики тиозонида по параметру C_{\max} .

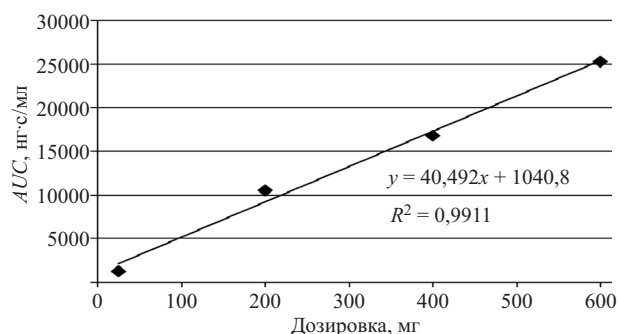


Рис. 2. Линейность фармакокинетики тиозонида по параметру AUC .

щи программного обеспечения ChemStation (ver. A.01.04.122) (Agilent Technologies, США).

Разработанная методика была валидирована по следующим валидационным характеристикам: селективность, линейность, правильность, прецизионность, предел количественного определения, перенос пробы, стабильность растворов. Аналитический диапазон методики составил 1 – 1000 нг/мл I в плазме крови. Полученный аналитический диапазон позволяет применять разработанную методику для исследований фармакокинетики препарата тиозонид. Подробная информация по данному исследованию изложена в статье [9].

Разработанная методика была применена для изучения фармакокинетики препарата тиозонид, капсулы 100 мг (ЗАО “Фарм-Синтез”) при однократном пероральном приеме возрастающих доз различными группами здоровых добровольцев в рамках клинического исследования I фазы.

Данное исследование проводилось с соблюдением требований законодательных документов и этических принципов, изложенных в ФЗ “Об обращении лекар-

ственных средств” (№ 61-ФЗ от 12 апреля 2010 г.) [10], Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (1964 г., с последующими дополнениями) и регламентировалось действующим законодательством.

Дизайн исследования: одноцентровое проспективное исследование с последовательным включением добровольцев с эскалацией дозы для оценки безопасности и переносимости препарата, впервые применяющегося у человека. В исследовании приняли участие 4 группы добровольцев (по 10 добровольцев в каждой группе), которые принимали перорально препарат (25 мг, капсулы были изготовлены для исследования) в дозах 200, 400 и 600 мг (2, 4 и 6 капсул по 100 мг соответственно). Основные требования к добровольцам были следующие: мужской пол, возраст – 18 – 45 лет включительно, вес от 60 до 100 кг включительно, индекс массы тела от 18 до 32 кг/м², верифицированный диагноз “здоров”. График отбора проб крови для изучения фармакокинетики был следующим: 0 (до приема препарата), 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 24, 36, 48, 72, 96, 120, 144, 168 ч после приема

Индивидуальные фармакокинетические параметры после приема препарата тиозонид, капсулы в дозировке 25 мг

№ добровольца	C_{\max} , нг/мл	T_{\max} , ч	$AUC_{(0-168)}$, нг·ч/мл	k_{el} , ч ⁻¹	$AUC_{(0-\infty)}$, нг·ч/мл	$t_{1/2}$, ч	C_{\max}/AUC , ч ⁻¹	$AUC_{(0-168)}/AUC_{(0-\infty)}$
1	54	4,00	599	0,038	599	18,36	0,090	1,00
2	53	5,00	557	0,037	557	18,90	0,095	1,00
3	79	4,00	929	0,031	929	22,38	0,085	1,00
4	96	5,00	1221	0,032	1221	21,91	0,079	1,00
5	77	6,00	2167	0,020	2167	34,24	0,036	1,00
6	72	6,00	1310	0,025	1310	27,28	0,055	1,00
7	70	3,00	1789	0,020	1789	34,57	0,039	1,00
8	82	4,00	1221	0,048	1221	14,38	0,067	1,00
9	60	5,00	1687	0,030	1687	22,78	0,036	1,00
10	53	3,00	1189	0,025	1189	27,58	0,044	1,00
Mean	70	4,50	1267	0,031	1267	24,24	0,063	1,00
GMean	68	4,38	1168	0,030	1168	23,42	0,058	1,00
SD	15	1,08	509	0,009	509	6,65	0,023	0,00
CV	21	24,00	40	28,245	40	27,45	37,567	0,00
Median	71	4,50	1221	0,031	1221	22,58	0,061	1,00
Доверит	8	0,56	265	0,005	265	3,46	0,012	0,00
L-90 %	62	3,94	1002	0,026	1002	20,78	0,050	1,00
U-90 %	77	5,06	1532	0,035	1532	27,70	0,075	1,00

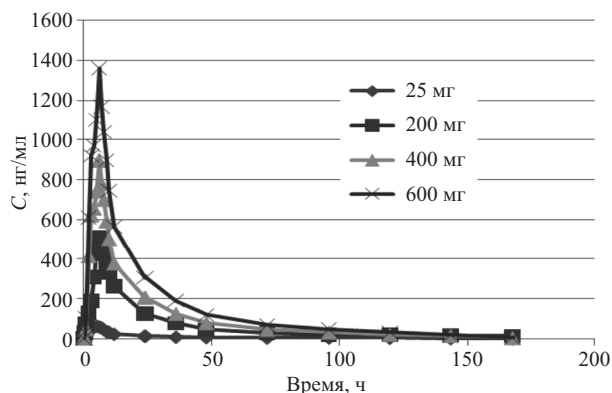


Рис. 3. Усредненные фармакокинетические профили препарата тиозонид (после однократного перорального приема 25, 200, 400, 600 мг).

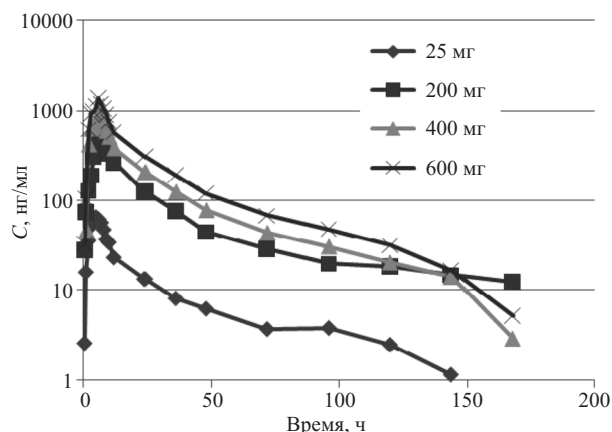


Рис. 4. Усредненные фармакокинетические профили препарата тиозонид (после однократного перорального приема 25, 200, 400, 600 мг), полулогарифмическая шкала.

препарата. Кровь для определения фармакокинетических параметров отбирали в обработанные натриевой солью гепарина пробирки “Вакутейнер” в объеме не более 4 мл для каждой временной точки. Затем кровь центрифугировали в течение 10 мин при скорости 3000 об/мин. Плазму замораживали при температуре -35°C и передавали в лабораторию для проведения фармакокинетического анализа.

Исследование фармакокинетики I включало определение концентраций активного вещества I в плазме крови каждого добровольца, получившего исследуемый препарат. Данные перечислены и суммированы в таблицах в зависимости от полученной дозы препарата. Эти таблицы включают число наблюдений, среднее значение, стандартное отклонение, медиану, минимальное и максимальное значение.

Для каждого добровольца рассчитаны следующие фармакокинетические параметры:

1. Значения площади под кривыми “концентрация – время” (AUC_{0-t});
2. Максимальная концентрация в плазме (C_{\max});
3. Время достижения максимальной концентрации (t_{\max});
4. Общая площадь под кривой $AUC_{0-\infty}$;
5. Период полувыведения ($T_{1/2}$);
6. Соотношение AUC_{0-t} и $AUC_{0-\infty}$;
8. Показатель скорости всасывания (C_{\max}/AUC_{0-t});
9. Константа элиминации (k_{el}).

Статистический анализ результатов определения концентраций тиозонида в плазме крови и параметров фармакокинетики заключался в расчете среднеарифметических (Mean) и среднегеометрических (GMean) значений, стандартного отклонения (SD), коэффициента вариации (CV, %), медианы (Median) и их интервальной оценки (доверительный интервал, L-90%, U-90%).

Описательную статистику и расчет фармакокинетических параметров проводили при помощи пакета MS Excel с расширением для проведения фармакокинетического анализа Boomer (разработано Joel I. Usansky, Ph.D., Atul Desai, M.S. and Diane Tang-Liu, Ph.D.; Department of Pharmacokinetics and Drug Metabolism

Allergan, Irvine, CA 92606, США)[МИГ1]. Интервальные значения фармакокинетических параметров рассчитывали по формулам: $L-90 = \text{Mean} - \Delta X$; $U-90 = \text{Mean} + \Delta X$; где ΔX – доверительный интервал. Коэффициенты вариации рассчитывали по формуле: $CV = (SD \cdot 100)/\text{Mean}$.

Для расчета основных фармакокинетических параметров в используемом программном обеспечении были применены следующие расчетные формулы:

$$AUC_{0-t} = \sum_{i=0}^{n-1} (t_{i+1} - t_i) \cdot (C_i + C_{i+1})/2,$$

где AUC_{0-t} – площадь под кривой “концентрация – время” в пределах от нуля до момента отбора последней пробы крови (168 ч); C_i – значение концентрации I в момент времени t ; t – время отбора пробы; n – общее количество временных точек отбора проб; i – порядковый номер временной точки отбора проб.

$$AUC_{0-\infty} = AUC_{0-t} + C_t/k_{el},$$

где C_t – концентрация в последней временной точке отбора проб $T_{1/2} = \ln 2/k_{el}$.

Для расчета константы элиминации принимали во внимание весь нисходящий участок фармакокинетической кривой с ненулевыми значениями концентраций.

Значения индивидуальных фармакокинетических параметров тиозонида, 25 мг капсулы, (в качестве примера) после приема препарата приведены в таблице.

Результаты и их обсуждение

В ходе исследования были рассчитаны индивидуальные значения концентраций (C) I в плазме крови во времени, а также индивидуальные и усредненные фармакокинетические параметры I.

Период полувыведения I составил около 25 ч. I практически не обнаруживался в плазме крови спустя 168 ч после однократного применения для дозировки 25 мг, либо обнаруживался на низких уровнях для дозировок 200, 400, 600 мг.

C_{\max} I составила (70 ± 8); (522 ± 94); (892 ± 131); (1359 ± 193) нг/мл для дозировок 25, 200, 400 и 600 мг соответственно.

AUC_{0-168} I составила (1267 ± 265); (10508 ± 2108); (16760 ± 1713); (25231 ± 1862) нг · ч/мл для дозировок 25, 200, 400 и 600 мг соответственно.

Сопоставление значений AUC_{0-168} с общим $AUC_{0-\infty}$ (их отношение составляло значительно больше 80 %) свидетельствовало о том, что выбранный регламент фармакокинетического исследования обеспечивает необходимую надежность оценки фармакокинетических параметров I.

Фармакокинетика в диапазоне доз 25 – 600 мг является линейной по C_{\max} и AUC_{0-168} ($r^2 > 0,99$), графики линейности приведены на рис. 1 и 2. Усредненные фармакокинетические профили тиозонида приведены на рис. 3 и 4.

Таким образом, в результате фармакокинетического исследования оригинального противотуберкулезного препарата тиозонид, капсулы 100 мг, была показана линейность фармакокинетики препарата в интервале доз 25 – 600 мг. Установлено, что тиозонид постепенно всасывался в системный кровоток при пероральном приеме (T_{\max} около 4,5 ч). Период полувыведения со-

ставлял 25 ч, что показывает медленное выведение препарата из плазмы крови. Полученные данные демонстрируют возможный режим дозирования препарата 1 – 2 раза в сутки для изучения препарата в последующих клинических исследованиях.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Туберкулез в Российской Федерации. Ежегодник основных статистических показателей по туберкулезу, используемых в Российской Федерации*, Москва (2011), с. 402.
2. *Доклад ВОЗ о глобальной борьбе с туберкулезом* (2013); URL: http://www.who.int/tb/publications/global_report/ru/
3. М. И. Перельман, *Consilium Med.*, № 12, 564 – 568 (2001).
4. В. Ю. Мишин, *Проблемы туберкулеза*, № 7, 24 – 29 (2003).
5. М. А. Карачунский, *Рус. мед. ж.*, **9**(21), 951 – 953 (2001).
6. В. И. Чуканов, *Рус. мед. ж.*, **9**(21), 954 – 959 (2001).
7. Ю. М. Репин, *Хирургическое лечение*, Гиппократ, Санкт-Петербург (2007), с. 168.
8. И. В. Бачарова, М. С. Буренков, Л. Н. Лепеха и др., *Туберкулез и болезни легких*, № 6, 46 – 50 (2014).
9. Г. В. Раменская, И. Е. Шохин, Л. А. Меньшикова и др., *Хим.-фарм. журн.*, **49**(3), 46 – 49 (2015).
10. *Федеральный закон № 61-ФЗ “Об обращении лекарственных средств”*. Принят постановлением Правительства Российской Федерации от 12.04.2010, Москва (2010).

Поступила 27.01.15

STUDYING PHARMACOKINETICS OF NEW ANTI-TUBERCULOSIS DRUG THIOZONIDE IN BLOOD PLASMA

A. Yu. Savchenko, L. A. Menshikova*, G. V. Rameskaya, and E. A. Smolyarchuk

I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, 119991 Russia

* e-mail: lily-chka@mail.ru

The results of phase I clinical trials for the pharmacokinetic parameters of new original antituberculosis drug thiozonide in 100 mg capsules developed at the Farm-Sintez Co. (Moscow) are presented. The drug pharmacokinetics has been studied after single administration in increasing doses on various groups of healthy volunteers.

Keywords: thiozonide; pharmacokinetics; clinical trials; phase I; blood plasma.