

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

DOI: 10.30906/0023-1134-2020-54-2-3-7
© Коллектив авторов, 2020

Ю. А. Портной, С. А. Довженко, М. Б. Кобрин, Э. Р. Переверзева,
М. И. Трещалин, В. А. Голибродо, А. Е. Щекотихин, А. А. Фирсов

ДОКЛИНИЧЕСКАЯ ФАРМАКОКИНЕТИКА И ОСТРАЯ ТОКСИЧНОСТЬ АНТРАФУРАНА — НОВОГО ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ВЕЩЕСТВА

¹ ФГБНУ “Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г. Ф. Гаузе” (ФГБНУ “НИИНА”), Россия, 119021, Москва.
* e-mail: kindyn@gmail.com

Изучены фармакокинетика и острая токсичность нового производного антра[2,3-*b*]фуран-3-карбоксамид (антрафуран, АФ) после его введения крысам внутривенно (в/в), внутрибрюшинно (в/б) и перорально (п/о). Концентрацию АФ в плазме крови животных определяли методом ВЭЖХ. Значения общего клиренса, стационарного объема распределения и среднего времени удержания АФ составляли 17,4 мл · мин⁻¹ · кг⁻¹, 6,6 л/кг и 6,3 ч, соответственно. Абсолютная биодоступность АФ после в/б введения составляла 96 %, а после п/о введения — 31 %. Продолжительность периода полувыведения препарата находилась в пределах 5 – 6 ч. Значения ЛД₅₀ у крыс при в/в, в/б и п/о введении составляли 17,1; 64,6 и 353,6 мг/кг, соответственно. Выявлены корреляции между ЛД₅₀ или максимально переносимой дозой (МПД) при изученных путях введения АФ и логарифмами площади под кривой “концентрация АФ — время” или максимальной концентрации АФ, а также натуральными значениями времени достижения максимума.

Ключевые слова: антрафуран; фармакокинетика; острая токсичность; экспериментальное изучение; крысы.

В результате направленного поиска противоопухолевых веществ в ряду гетероциклических производных антрахинона в ФГБНУ “НИИНА” открыт новый класс противоопухолевых 4,11-дигидрокси-9,10-диоксоантра[2,3-*b*]фуран-3-карбоксамидов, обладающих полифармакологическим (мультиадресным) действием [1 – 3]. За счет одновременного ингибирования нескольких мишеней, важных для опухолевого роста (топоизомеразы I и II, а также ряд серин-треониновых протеинкиназ AurB, AurC, Pim1, Pim3), антрафуран-3-карбоксамиды способны в субмикромольных и микромольных концентрациях ингибировать рост опухолевых клеток различного гистогенеза, включая линии с множественной лекарственной устойчивостью. Среди синтезированных антрафуран-3-карбоксамидов был отобран антрафуран (АФ, рис. 1), обладающий наибольшей цитотоксичностью и способностью к преодолению резистентности опухолевых клеток.

На основе комплекса включения с производным β-циклодекстрина была разработана парентеральная лекарственная форма АФ, позволившая увеличить его растворимость в водных средах, а также снизить острую токсичность [4, 5]. В ходе углубленных доклинических исследований на различных моделях опухолей мышей (гемобластоз P388, его вариант с множественной лекарственной устойчивостью P388/DOX, а также меланома В16) АФ показал высокую противоопухоле-

вую эффективность при внутрибрюшинном введении [4]. Показано также, что АФ эффективен и при пероральном введении [6].

Целью настоящей работы явилось получение первичных данных о фармакокинетике АФ, а также оценка его острой токсичности у крыс при парентеральном и пероральном пути введения.

Экспериментальная часть

В работе использовали субстанцию АФ, представляющую собой дигидрат метансульфоната (*S*)-3-[(3-амино-1-пирролидинил)карбонил]-4,11-дигидрокси-2-метилантра[2,3-*b*]фуран-5,10-диона, полученную в ФГБНУ “НИИНА” по методу [5].

Количественное определение АФ в плазме крови проводили методом ВЭЖХ с использованием хроматографической системы Gilson (Gilson, Франция). Раз-

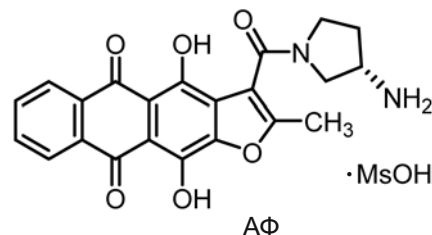


Рис. 1. Структура антрафурана.

деление проводили на колонке Luna C18(2) (4,6 × 250 мм, 5 мкм, Phenomenex, США). Обработку сигнала и полученных результатов осуществляли при помощи программы “Мультихром” версия 1,7 (ЗАО “Амперсэнд”, Россия). В качестве растворителей использовали ацетонитрил для ВЭЖХ (Biosolve, Нидерланды) и воду (квалификации Milli-Q).

Статистический анализ результатов определения концентрации АФ предусматривал расчет среднегеометрических $[M_G = \exp(M_{A,ln})]$ значений и их интервальной оценки, вычисляемой как $[\exp(M_{A,ln} \pm SD_{ln})]$, где $M_{A,ln}$ и SD_{ln} — соответственно среднеарифметическое и стандартное отклонение выборки после логарифмического преобразования ее вариант. Расчеты проводили при помощи программы Excel 2010.

Анализ фармакокинетических данных включал оценку площади под кривой изменения средних геометрических значений концентрации (С) АФ во времени (t) (AUC). Величину AUC в пределах от нуля до момента τ отбора последней пробы крови (AUC_τ) рассчитывали методом трапеций. Величину AUC в пределах от нуля до бесконечности (AUC_∞) определяли по формуле [7]:

$$AUC_{\infty} = AUC_{\tau} + C_{\tau}/\lambda, \quad (1)$$

где C_{τ} — значение концентрации антибиотика в последней пробе, а λ — значение константы скорости снижения концентрации препарата на конечном, моноэкспоненциальном участке фармакокинетической кривой рассчитано методом нелинейного регрессионного анализа при помощи программы TOPFIT V. 1.1 (Gödecke, Schering, Thomae, 1991). Та же программа была использована для расчета среднего времени удержания препарата в системном кровотоке (MRT) и периода его полувыведения ($T_{1/2}$), а в случае внутривенного (в/в) введения еще и значений общего клиренса (Cl_T) и стационарного объема распределения (V_{ss}).

Фармакокинетические профили АФ после его внутривенного (в/в) и перорального (п/о) введения дополнительно характеризовали максимальной концентрацией препарата (C_{max} , наибольшее из измеренных значений) и временем ее достижения (t_{max}), а также значениями Cl_T/f и V_{ss}/f , где f — абсолютная биодоступность препарата.

При в/в введении антибиотика кинетику изменения его концентрации описывали биэкспоненциальным уравнением двучастевой модели [8]:

$$C(t) = A_1 \exp(-\alpha t) + A_2 \exp(-\beta t), \quad (2)$$

где A_1 и A_2 — предэкспоненциальные множители, α и β — показатели экспоненты, а при в/в и п/о введении — биэкспоненциальным уравнением одночастевой модели со всасыванием [8]:

$$C(t) = B_1 \exp(-k_{el}t) + B_2 \exp(-k_a t), \quad (3)$$

где B_1 и B_2 — предэкспоненциальные множители, k_{el} — константа скорости элиминации, k_a — константа скорости всасывания. Параметры уравнений (2) и (3) рассчитывали методом нелинейного регрессионного

анализа при помощи программы TOPFIT. Кроме того, рассчитывали значения AUC_{∞} , а также MRT и $T_{1/2}$. Фармакокинетический профиль антрафурандиона после его в/в введения дополнительно характеризовали также значениями Cl_T и V_{ss} , а после в/б и п/о введения — расчетными значениями C_{max} и t_{max} , а также значениями Cl_T/f и V_{ss}/f .

Значения f после в/б и п/о введения рассчитывали по уравнениям [7]:

$$f = AUC_{\tau}(\text{в/б}) \cdot 100 \% / AUC_{\tau}(\text{в/в}), \quad (4)$$

и

$$f = AUC_{\tau}(\text{п/о}) \cdot 100 \% / AUC_{\tau}(\text{в/в}), \quad (5)$$

где $AUC_{\tau}(\text{в/б})$, $AUC_{\tau}(\text{п/о})$ и $AUC_{\tau}(\text{в/в})$ — значения AUC_{τ} после в/б, п/о и в/в введения препарата, соответственно.

Значение биодоступности АФ после п/о введения по сравнению с в/б введением (относительная биодоступность — f) рассчитывали по уравнению:

$$f = AUC_{\tau}(\text{п/о}) \cdot 100 \% / AUC_{\tau}(\text{в/б}). \quad (6)$$

Фармакокинетические исследования проводили на половозрелых беспородных крысах-самцах массой около 300 г. Изучение острой токсичности АФ проведено на крысах-самцах линии Wistar массой 120 – 160 г. Животных, полученных из филиала “Андреевка” ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, содержали в поликарбонатных клетках на стандартном рационе брикетированных экструзированных кормов со свободным доступом к пище и питьевой воде. После 2-недельного карантина клинически здоровые крысы были разделены на группы по 6 особей. Каждому животному был присвоен индивидуальный номер, помечаемый проколом ушной раковины и фиксируемый на карточке клетки. Испытания проводили в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей [9]. Процедура исследования фармакокинетики соответствовала требованиям отечественных нормативных документов [10].

Для получения раствора для в/в введения суспензию субстанции АФ в солюбилизаторе растворяли в 5 % растворе глюкозы для в/в инъекций, для в/б введения раствор субстанции в 5 % растворе глюкозы получали при нагревании до 50 – 60 °С на водяной бане, для п/о введения субстанцию растирали в ступке с добавлением питьевой воды. Полученные непосредственно перед введением растворы в 0,2 % концентрации вводили животным однократно в/в в хвостовую вену, в/б (после охлаждения раствора) или п/о (при помощи шприца со специальным металлическим зондом). Контрольным крысам вводили раствор глюкозы или воду в тех же объемах.

АФ вводили однократно натошак (животные не получали пищи в течение 8 ч до введения препарата) в/в, в/б или п/о. Доза АФ при в/в и в/б введении составляла 10 мг/кг. Дозы АФ при п/о введении составляли 10 и

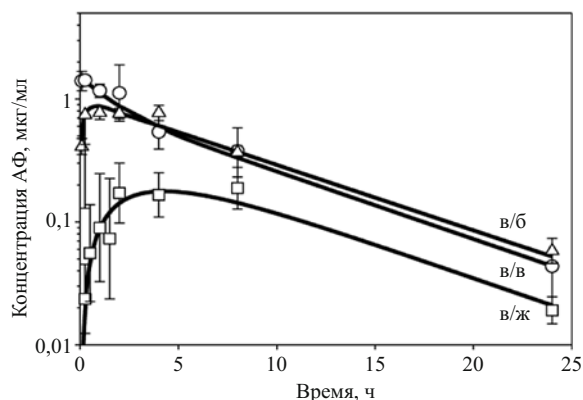


Рис. 2. Среднегеометрические значения концентрации АФ в плазме крови крыс после введения АФ в дозе 10 мг/кг и фармакокинетические профили, рассчитанные по параметрам уравнений (2) и (3).

60 мг/кг. Пробы крови отбирали в течение 24 ч после введения (по 3 животных на каждую временную точку при в/в и в/б введении и по 6 животных — при п/о введении). После декапитации крысы, предварительно введенной в наркоз при помощи эфира, отбор крови производили в гепаринизированные пластиковые пробирки. Пробы крови центрифугировали в течение 20 мин при 1500 об/мин. Надосадочную жидкость разливали по пробиркам и хранили при температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ до проведения хроматографического анализа.

Острая токсичность. Исследование выполнено в соответствии с требованиями Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств [11] согласно действующим в Российской Федерации Правилам лабораторной практики [12], Национальному стандарту Российской Федерации (ГОСТ Р 53434 – 2009).

Животные получали АФ однократно в/в, в/б или п/о в диапазоне доз. Ежедневно регистрировали количество погибших животных, срок гибели, оценивали клиническую картину гибели. Продолжительность наблюдения составляла 30 дней после последнего случая гибели животного. Дозы, характеризующие токсичность, рассчитывали по методу Литчфилда и Уилкоксона с применением компьютерной программы “StatPlus 2006 professional”.

Результаты и их обсуждение

Методика количественного определения АФ в пробах крови. С учетом физико-химических свойств применяемых растворителей и анализируемого вещества были выбраны следующие условия проведения анализа: температура колонки — $26\text{ }^{\circ}\text{C}$; подвижная фаза — смесь 10 мМ раствора фосфата калия монозамещенного (рН 3,0) и ацетонитрила (60:40, об./об.); скорость потока подвижной фазы — 1 мл/мин. Детектирование проводили при помощи флуориметрического детектора (Waters 2475, США) при длине волны поглощения, равной 475 нм, и длине волны испускания, равной 580 нм, выбранных по результатам анализа спектра флуоресценции АФ.

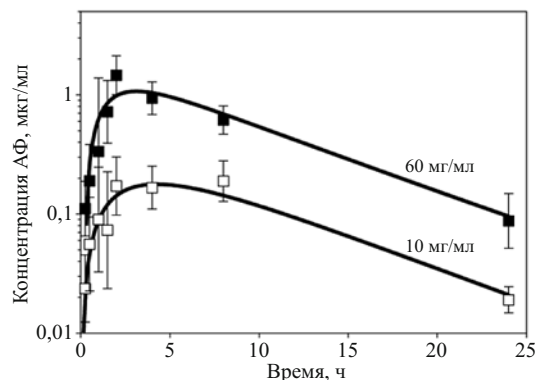


Рис. 3. Среднегеометрические значения концентрации АФ в плазме крови крыс после п/о введения и фармакокинетические профили, рассчитанные по параметрам уравнения (3).

Перед проведением анализа белки плазмы крови осаждали ацетонитрилом (1:1, об./об.). Полученную смесь встряхивали в течение 2 мин, затем центрифугировали в течение 5 мин при 10000 об/мин. К супернатанту (100 мкл) прибавляли 900 мкл подвижной фазы, встряхивали в течение 30 с, а затем центрифугировали при 10000 об/мин в течение 5 мин. Супернатант (10 мкл) вводили в хроматограф. Испытуемые растворы готовили непосредственно перед анализом. Коэффициент извлечения АФ из плазмы крови крыс составлял около 99 %. При выбранных условиях анализа пики веществ, содержащихся в плазме, не мешали определению АФ, время выхода которого составляло около 3 мин.

Фармакокинетические исследования. Средние геометрические значения концентраций АФ в плазме крови крыс после введения АФ и их интервальная оценка показаны на рис. 2 и 3. Как видно из рис. 2, после в/в введения снижение уровней АФ в плазме крови носило двухфазный характер. В течение первого часа концентрация АФ снижалась несколько быстрее, чем в последующие 23 ч. После в/б введения уровни концентрации АФ, близкие к максимальному, достигались уже через 15 мин, а затем практически не отличались от таковых при в/в введении. После п/о введения в той же дозе уровни концентрации АФ оказались существенно ниже, чем в случае в/в и в/б введения. Так, максимальная концентрация препарата после п/о введения была в 4,5 раза ниже, чем после в/б введения, и достигалась значительно позже (рис. 2). В дальнейшем наблюдалось плавное снижение концентрации АФ, которое происходило практически с той же скоростью, что и после в/в и в/б введения АФ.

Параметры фармакокинетики АФ у крыс, рассчитанные внемоделльным способом, приведены в табл. 1. Как следует из представленных данных, значения общего клиренса (Cl_T) и стационарного объема распределения (V_{ss}) при в/в введении АФ были равны $17,4\text{ мл} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{кг}^{-1}$ и $6,6\text{ л/кг}$, соответственно. Значения Cl_T/f при в/б и п/о введении препарата в той же дозе были близки значению Cl_T : $18,9$ и $17,9\text{ мл} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{кг}^{-1}$, соответственно. Среднее время

Фармакокинетические параметры АФ, рассчитанные внемодельным способом

Путь введения	Доза, мг/кг	C_{\max} , мкг/мл	t_{\max} , ч	AUC_t	AUC_{∞}	Cl_T	Cl_T/f	V_{ss}	V_{ss}/f	MRT, ч	$T_{1/2}$, ч
				мкг · ч/мл		мл · мин ⁻¹ · кг ⁻¹		л/кг			
в/в	10	-	-	9,251	9,60	17,4	-	6,58	-	6,30	5,40
в/б	10	0,766	1	8,70	9,20	-	18,9	-	8,92	7,55	6,00
п/о	10	0,172	4	2,86	3,00	-	17,9	-	9,18	8,40	4,83
	60	1,46	4	12,6	13,2	-	24,4	-	11,7	7,96	5,80

Таблица 2

Фармакокинетические параметры АФ, рассчитанные по параметрам уравнений (2) и (3)

Путь введения	Доза, мг/кг	C_{\max} , мкг/мл	t_{\max} , ч	AUC_{∞} , мкг · ч/мл	Cl_T	Cl_T/f	V_{ss}	V_{ss}/f	MRT	$T_{1/2}$
					мл · мин ⁻¹ · кг ⁻¹		л/кг			
в/в	10	-	-	8,01	20,8	-	9,08	-	7,28	5,50
в/б	10	0,899	0,63	7,93	-	21,0	-	10,3	8,16	5,70
п/о	10	0,185	4,00	2,35	-	22,9	-	13,9	10,1	5,39
	60	1,09	3,98	13,8	-	23,4	-	14,2	10,1	5,39

удержания (MRT) АФ после его в/в введения составляло 6,3 ч, в случае в/б введения — 7,5 ч, а при п/о введении — около 8 ч. Значение периода полувыведения АФ ($T_{1/2}$) находилось в диапазоне от 5 до 6 ч. Как следует из табл. 1, при 6-кратном повышении дозы АФ при п/о введении (от 10 до 60 мг/кг), величина AUC_t увеличивалась в 4,4 раза (с 2,86 до 12,6 мкг · ч/мл). При этом значения параметра V_{ss}/f практически не зависели от дозы: 9,18 против 11,7 л/кг, что свидетельствует о незначительном искажении линейности фармакокинетики препарата.

Тот же вывод позволяет сделать сопоставление фармакокинетических параметров, рассчитанных модельным способом (табл. 2). Как видно из рис. 4 и 5, фармакокинетические профили удовлетворительно описывались уравнением (2) при в/в введении АФ и уравнением (3) при его в/б и п/о введении. Моделирование фармакокинетики АФ после п/о введения осуществляли в предположении о том, что значения констант скорости всасывания и элиминации не зависят от дозы.

По значениям AUC_t , приведенным в табл. 1, были рассчитаны значения абсолютной биодоступности АФ после в/б и п/о введения, которые составили 96 и 31 %, соответственно, а также биодоступности АФ после п/о введения по отношению к в/б введению — 33 %.

Таблица 3
Основные параметры токсичности субстанции АФ для крыс при различных путях введения

Путь введения	Параметр	Доза, мг/кг
в/в	ЛД ₅₀	17,1 (16,1 – 18,0)
	МПД	15,2 (14,5 – 15,9)
в/б	ЛД ₅₀	64,6 (56,1 – 72,5)
	МПД	47,6 (45,3 – 49,9)
п/о	ЛД ₅₀	353,6 (253,2 – 457,7)
	МПД	171,7 (155,5 – 188,1)

Острая токсичность. Расчетные дозы, характеризующие токсичность АФ при различных путях введения, приведены в табл. 3. Как видно из представленных данных, токсичность препарата зависит от пути введения: величина ЛД₅₀ и МПД при в/б введении возрастает в 10 раз по сравнению со значениями этих показателей при в/в введении. Так, для достижения ЛД₅₀ и МПД при п/о введении дозу АФ необходимо увеличить на порядок по сравнению с в/б введением и на 2 порядка — по отношению к дозам, вызывающим такой же эффект при в/в введении. Подобные различия в токсических эффектах проявлялись и по времени гибели животных. Введение (в/в) субстанции АФ в смертельных дозах приводит к гибели крыс в течение первых 3 мин, в/б — в период от 1 ч до 1 сут. Характер гибели и результаты вскрытия погибших животных позволяют считать, что причиной смерти в обоих случаях является сердечно-сосудистая недостаточность, вызванная нейротоксическим действием препарата. При п/о применении АФ гибель животных наступает, в основном, на 3 – 5 сут при явлениях кишечной токсичности (диспепсия, снижение массы тела) и 7 – 10 сут на фоне гематологической токсичности (резкое уменьшение массовых коэффициентов селезенки и тимуса), что характерно для многих цитостатиков.

Прогнозирование острой токсичности АФ по фармакокинетическим параметрам. Различия в значениях ЛД₅₀ и МПД, установленные при в/в, в/б и п/о введении АФ, коррелировали с соответствующими значениями AUC_t , C_{\max} и t_{\max} (рис. 4). Как видно из рис. 4, по мере повышения значений логарифма AUC_t или C_{\max} величина ЛД₅₀ или МПД систематически уменьшалась, а с увеличением t_{\max} возрастала. Прогностическое значение всех 3 параметров оказалось одинаковым — значения квадрата коэффициента корреляции между токсикологическими и фармакокине-

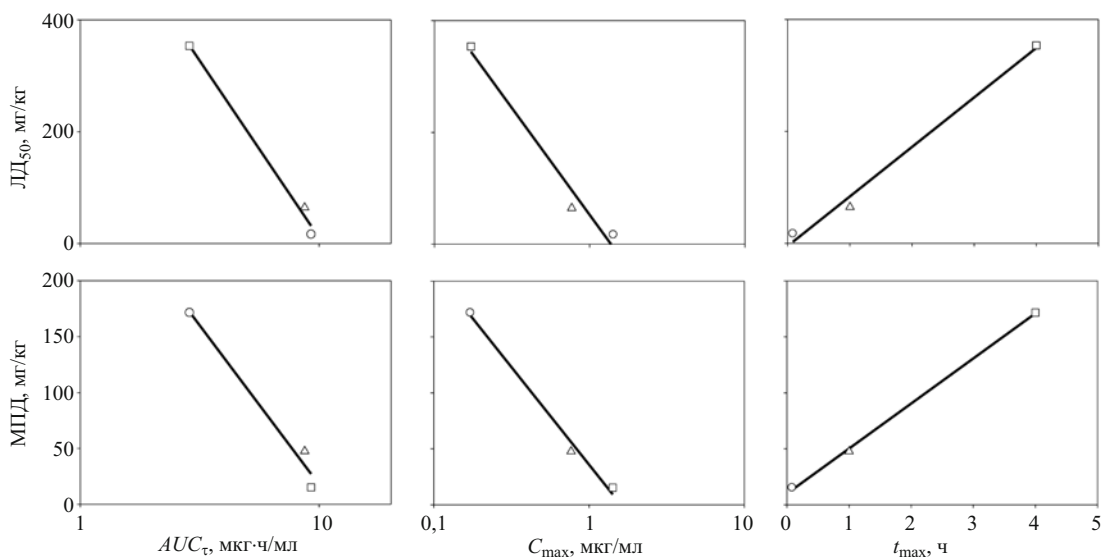


Рис. 4. Взаимосвязь между параметрами фармакокинетики и острой токсичности АФ. Путь введения: ○ — в/в, △ — в/б, □ — п/о.

тическими характеристиками составляли 0,975 – 0,999.

Проведенные исследования позволили охарактеризовать фармакокинетику АФ внемоделными и модельными параметрами, а также оценить биодоступность АФ при внесосудистых путях введения. Показано, что различия в острой токсичности АФ при его в/в, в/б и п/о введении имеют фармакокинетическую природу.

ЛИТЕРАТУРА

1. A. S. Tikhomirov, A. A. Shtil, A. E. Shchekotikhin, *Recent Pat. Anticancer Drug Discov.*, **13**(2), 159 – 183 (2018); doi: 10.2174 / 1574892813666171206123114.
2. Y. L. Volodina, L. G. Dezhenkova, A. S. Tikhomirov, et al., *Eur. J. Med. Chem.*, **165**(1), 31 – 45 (2019); doi: 10.1016 / j.ejmech.2018.12.068.
3. A. E. Shchekotikhin, L. G. Dezhenkova, V. B. Tsvetkov, et al., *Eur. J. Med. Chem.*, **112**(Apr.), 114 – 129 (2016); doi: 10.1016 / j.ejmech.2016.01.050.
4. H. M. Treshalina, V. I. Romanenko, D. N. Kaluzhny, et al., *Eur. J. Pharm. Sci.*, **109**(Nov.), 631 – 637 (2017); doi: 10.1016 / j.ejps.2017.09.025.
5. A. E. Щекотихин, М. Н. Преображенская, А. А. Штиль и др., *Противоопухолевый антрафурандион и фармацевти-*

ческие композиции на его основе, Патент РФ № 2554939 (2015).

6. А. Е. Щекотихин, Е. М. Трещалина, И. Д. Трещалин, *Пероральные противоопухолевые средства и способ лечения онкологических заболеваний*, Патент РФ № 2639479 (2017).
7. А. А. Фирсов, В. К. Пиотровский, *Фармакокинетические методы в биофармации: оценка биодоступности и пресистемная элиминация лекарственных средств*, Итоги науки и техники ВИНТИ, Т. 14, ВИНТИ, Москва (1984), сс. 113 – 223.
8. В. Н. Соловьев, А. А. Фирсов, В. А. Филов, *Фармакокинетика (руководство)*, Медицина, Москва (1980).
9. European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes, Council of Europe, ETS No. 123 (1986).
10. А. Н. Миронов (ред.), *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*, часть 1, Гриф и К^о, Москва (2012), сс. 13 – 24.
11. А. Н. Миронов (ред.), *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*, часть 1, Гриф и К^о, Москва (2012), сс. 845 – 855.
12. Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 года № 708н “Об утверждении Правил лабораторной практики”.

Поступила 11.06.19

PHARMACOKINETICS AND ACUTE TOXICITY OF ANTHRAFULRAN: A NEW ANTITUMOR AGENT (PRE-CLINICAL STUDY)

Yu. A. Portnoi*, S. A. Dovzhenko, M. B. Kobrin, E. R. Pereverzeva, M. I. Treshchalin, V. A. Golibrodo, A. E. Shchekotikhin, and A. A. Firsov

G. F. Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, 119021 Russia

* e-mail: kindyn@gmail.com

The pharmacokinetics and acute toxicity of a new antitumor agent (S)-3-(3-aminopyrrolidine-1-carbonyl)-4,11-dihydroxy-2-methylanthra[2,3-b]furan-5,10-dione (antrafulran, AF) were studied in rats after single intravenous (i.v.), intraperitoneal (i.p.) and oral (p.o.) administration. Plasma concentrations of AF were determined using HPLC assay with fluorimetric detection. The total clearance, steady-state volume of distribution, and mean residence time of AF were $17.4 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$, 6.6 L/kg, and 6.3 h, respectively. The absolute bioavailability of AF upon i.p. and p.o. administration was 96 and 31%, respectively. The half-life of AF ranged from 5 to 6 h. The LD₅₀ values of AF after i.v., i.p. and p.o. administration were 17.1, 64.6 and 353.6 mg/kg, respectively. These differences in acute toxicity were shown to be mutually related to the pharmacokinetic variables. Correlations were established between LD₅₀ or maximum tolerated dose (for various administration pathways) and the logarithmic area under the concentration – time curve (at maximum drug concentration) and the time to attaining this maximum.

Keywords: antrafulran; pharmacokinetics; acute toxicity; preclinical study; rats.