

*На правах рукописи*



Яичков Илья Игоревич

**Создание новых подходов к разработке методик для  
определения нестабильных соединений в биологических  
объектах при проведении доклинических исследований  
лекарственных средств**

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени  
доктора фармацевтических наук

Москва - 2025

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научный консультант:**

доктор медицинских наук, профессор, академик РАН

Хохлов Александр Леонидович

**Официальные оппоненты:**

**Сливкин Алексей Иванович** – доктор фармацевтических наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет», кафедра фармацевтической технологии, заведующий кафедрой

**Жердев Владимир Павлович** – доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», лаборатория фармакокинетики, заведующий лабораторией

**Шохин Игорь Евгеньевич** - доктор фармацевтических наук, общество с ограниченной ответственностью «Центр Фармацевтической Аналитики», генеральный директор

**Ведущая организация:**

федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «18» марта 2026 г. в 12.00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.002.02 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной учебной библиотеке ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, Зубовский б-р., д. 37/1 и на сайте организации: [www.sechenov.ru](http://www.sechenov.ru)

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2026 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета ДСУ 208.002.02

доктор фармацевтических наук, профессор

Демина Наталья Борисовна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Изучение фармакокинетики (ФК) является обязательным для любого лекарственного препарата. Отличительной особенностью доклинического изучения ФК является то, что все аналитические методики для количественного определения действующего вещества и его метаболитов в биологических объектах создаются впервые. При этом новая активная молекула или продукт ее биотрансформации могут быть химически неустойчивыми в пробах биологических объектов после их отбора. В более чем 20 научных работах, посвященных изучению ФК лекарственных препаратов, опубликованных в период с 2020 по 2025 год, была указана необходимость использования специальных мер по стабилизации аналитов в образцах. При этом данные меры были применены не только к плазме и цельной крови, но и к экскрементам, органам и тканям. В рамках биохимических и фармакодинамических исследований на лабораторных животных также может возникнуть необходимость измерения концентрации химически неустойчивых нейромедиаторов, витаминов, коферментов, аминокислот в биоматериале. Это потребует подбора условий для предотвращения распада таких соединений.

На данный момент сформулированы только подходы для разработки биоаналитических методик для определения веществ, неустойчивых к гидролизу и окислению, в плазме крови человека. Однако, в данной работе не описан порядок проведения экспериментов для других биологических матриц, исследование которых необходимо в рамках доклинических исследований. Поэтому их создание является актуальным.

Важным этапом биоаналитического исследования, гарантирующим достоверность полученных данных, является валидация методики. В рамках полного доклинического изучения лекарственного средства требуется оценка распределения. При этом для каждого органа или ткани, как правило, применяют методики с идентичными аналитическими диапазонами, условиями подготовки проб и хромато-масс-спектрометрического определения. Количество исследуемых биологических объектов при этом варьирует от 6 до 15, а объем проводимых валидационных тестов для каждого из них, согласно требованиям нормативной документации, одинаковый. Поэтому необходимо выполнение нескольких полных валидаций. Это значительно увеличивает стоимость и продолжительность всего исследования. Оценку системной экспозиции лекарственного средства в плазме или цельной крови, как минимум, двух разных видов животных, также часто проводят с помощью одинаковых методик. Таким образом, целесообразно разработать научно обоснованные подходы к оптимизации объема

валидационных испытаний идентичных биоаналитических методик для схожих для ВЭЖХ-МС/МС-анализа биологических матриц.

В настоящее время ведется разработка и изучение новых селективных ингибиторов карбоангидразы II типа местного действия для лечения открытоугольной глаукомы. Наиболее перспективными кандидатами для проведения первой фазы являются 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид (TFISA), обладающий наиболее сильным фармакологическим эффектом, и 4-(5-метил-1,3,4-оксадиазол-2-ил)-бензолсульфонамид (ODASA), действие которого сохраняется более 24 ч после глазной аппликации. Данные соединения способны в процессе биотрансформации образовывать химически нестабильные N-гидроксисульфонамиды. Биоаналитические исследования данной группы метаболитов ранее не проводились.

Одной из перспективных молекул для терапии ревматоидного артрита, обладающей выраженным противовоспалительным эффектом, является 3-(2-бутил-5-хлор-1*H*-имидазол-4-ил)-N-[4-метокси-3-(трифторметил)-фенил]-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоксамид (R004). Данное соединение имеет в структуре амидную группу, которая может быть подвержена ферментативному гидролизу. Примеры стабилизации амидов в биологических матрицах встречаются гораздо реже, чем сложных эфиров.

Также актуальным является создание новых лекарственных средств для лечения болезни Паркинсона. Для данных целей возможно применение ингибиторов MAO-B. С целью оценки селективности действия таких соединений при изучении их фармакодинамики необходимо контролировать уровень допамина, а также серотонина, норадреналина и их метаболитов в стриатуме лабораторных животных. Процесс разработки методики совместного определения данных веществ осложнен тем, что катехоламины содержат в своей структуре пирокатехиновый фрагмент. Это способствует их быстрому окислению в биопробах. Созданные ранее приемы для измерения концентрации фенольных соединений в плазме человека требуют модификации для применения к образцам органов.

### **Степень разработанности темы исследования**

В настоящее время опубликованы научные работы, посвященные количественному определению в биологических объектах различных нестабильных соединений: сложных эфиров, амидов, глюкуронидов, производных пирокатехина, тиолов и других классов органических соединений. Однако, в данных публикациях не сформулированы подходы к разработке биоаналитических методик для таких веществ в биоматериале. Также авторами не предложен перечень и объем предварительных экспериментов, по результатам которых определяют меры для предупреждения химического распада этих молекул.

Разработанные ранее подходы к проведению исследований биотрансформации лекарственных препаратов на лабораторных животных не пригодны для идентификации в биопробах нестабильных веществ. Они не предусматривают каких-либо мер по предотвращению разложения таких аналитов или немедленного анализа проб после отбора. Это может привести к потере неустойчивых метаболитов или ложной идентификации продуктов их деградации, которые в норме не образуются в организме животных.

Валидацию одинаковых методик для количественного определения лекарственных средств и их метаболитов в биологических жидкостях разных видов животных осуществляют, как правило, в полном объеме. При испытаниях некоторых методик для разных органов и тканей крыс или мышей выполняют либо весь перечень необходимых экспериментов для каждого объекта, либо для одного из исследуемых объектов (как правило, печени или почек). В некоторых публикациях для одного органа проводят все положенные тесты, а для других органов – выполняют частичную валидацию. Научно-обоснованного подхода к оптимизации количества испытаний при валидации одинаковых методик ранее не было предложено.

Фармакокинетических исследований, включая исследования по идентификации метаболитов, для R004, ODASA и TFISA ранее не проводилось. Методики для измерения концентраций данных соединений и их метаболитов в биоматериале лабораторных животных не разработаны.

В период с 2020 по 2025 год опубликовано более 10 научных работ, посвященных количественному определению производных катехоламина в плазме, спинномозговой жидкости, структурах головного мозга, моче. В части статей специальные стабилизаторы для предотвращения разрушения данных соединений не использовались. В других публикациях применяются различные антиоксиданты, а также ацилирование фенольных гидроксиллов. Таким образом, данные о необходимости дополнительных мер для предупреждения окисления адреналина, норадrenalина, допамина и 3,4-дигидроксифенилуксусной кислоты в биоматериале не совпадают.

### **Цель и задачи исследования**

Цель исследования - создание новой концепции разработки методик для определения нестабильных веществ в биологических жидкостях, экскрементах, органах и тканях лабораторных животных.

Для достижения поставленной цели определены следующие задачи:

1. Создать методологический подход для идентификации продуктов биотрансформации нестабильных соединений и стабильных соединений, потенциально образующих химически неустойчивые метаболиты, в биоматериале животных.

2. Обосновать перечень, объем и порядок проведения экспериментов по подбору стабилизатора для легкоразлагающихся соединений в различных биологических объектах при разработке методик количественного определения данных соединений.

3. Разработать методики количественного определения R004 и его основных метаболитов, TFISA и его основных метаболитов, ODASA и его основных метаболитов в биологических жидкостях, экскрементах, органах и тканях животных.

4. Разработать методику количественного определения моноаминовых нейромедиаторов и их метаболитов в тканях мозга крысы.

5. Сформулировать методологический подход к валидации одинаковых биоаналитических методик измерения концентрации аналитов в плазме разных видов животных, в крови разных видов животных, а также в разных органах и тканях одного вида животных, позволяющий оптимизировать объем проводимых испытаний.

6. Провести апробацию и внедрение всех разработанных биоаналитических методик в рамках исследований фармакокинетики и фармакодинамики кандидатов в лекарственные препараты для оценки эффективности предпринятых для стабилизации мер.

7. Предложить способ исследования экскреции нестабильных соединений, продукт разложения которых не является метаболитом изучаемого кандидата в лекарственный препарат.

8. Создать алгоритмы разработки методик для определения соединений, неустойчивых к разложению, в различных биологических объектах животных.

### **Научная новизна**

Сформулирован методологический подход к проведению исследований по идентификации метаболитов нестабильных кандидатов в лекарственные препараты и кандидатов в лекарственные препараты, потенциально образующих нестабильные метаболиты, на лабораторных животных.

Создан способ исследования экскреции легкоразлагающихся веществ, в рамках которого предполагается обязательное измерение концентрации продуктов разложения данных соединений в экскрементах. Данный способ апробирован при косвенном определении N-гидроксисульфонамидных производных TFISA и ODASA в моче и кале крыс по соответствующим производным сульфоновых кислот.

Предложен методологический подход, позволяющий оптимизировать объем валидационных тестов для одинаковых биоаналитических методик измерения концентрации аналитов в плазме и крови разных видов животных, а также в разных органах и тканях одного вида животных.

Впервые сформулирована концепция разработки методик определения неустойчивых к разложению соединений в биологических объектах лабораторных животных.

Подобраны меры для предотвращения гидролиза R004 в плазме, моче, фекалиях, органах и тканях. Впервые изучена стабильность ароматических производных N-гидроксисульфонамида в различных биопробах и выбраны оптимальные условия для предупреждения разрушения их молекул.

Разработаны высокочувствительные и высокоселективные методики количественного определения в биологических объектах с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) следующих веществ:

- R004 и его метаболитов в плазме крысы и кролика, моче, кале, органах и тканях крыс;
- TFISA и его метаболитов в плазме и в крови крысы и кролика, моче, кале, органах и тканях крыс;
- ODASA и его метаболитов в плазме и в крови крысы и кролика, моче, кале, органах и тканях крыс;
- норадреналина, адреналина, допамина, серотонина, а также их метаболитов 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты, 3,4-дигидроксифенилуксусной кислоты, гомованилиновой кислоты, ванилилминдальной кислоты в тканях мозга крыс.

Новизна методик определения R004 и TFISA и их метаболитов в плазме подтверждается патентами на изобретения РФ.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Сформулированы критерии для сопоставления структуры метаболитов с их синтезированными субстанциями с применением для идентификации метода ВЭЖХ-МС/МС в режиме детектирования MRM.

Предложен оптимальный порядок испытаний и схемы принятия решений для сокращения объема испытаний при валидации одинаковых методик для плазмы разных видов животных, крови разных видов животных, а также разных органов и тканей одного вида животных.

Выбран перечень и объем испытаний для подбора мер по стабилизации неустойчивых соединений в биоматериале. Этот процесс предложено разделить на два этапа: скрининговый этап, на котором изучаются различные способы предотвращения разложения, и подтверждающий этап, на котором выбранный способ воспроизводится на большем количестве проб. Это позволяет минимизировать риск отрицательных итогов валидационных тестов по изучению стабильности.

Разработаны алгоритмы для разработки методик определения нестабильных соединений в образцах плазмы и цельной крови, образцах мочи, кала, органов и тканей животных.

Изучены особенности системной экспозиции 3-(2-бутил-5-хлор-1*H*-имидазол-4-ил)-*N*-[4-метокси-3-(трифторметил)-фенил]-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоксамиды после перорального введения его субстанции крысам и его капсул кроликам.

Проведены доклинические исследования фармакокинетики глазных суспензий 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида и 4-(5-метил-1,3,4-оксадиазол-2-ил)-бензолсульфонамида на крысах и кроликах.

Изучено влияние новых кандидатов в лекарственный препарат для терапии болезни Паркинсона на уровень моноаминовых нейромедиаторов и их метаболитов в стриатуме крыс. Установлена их способность повышать концентрацию допамина, не влияя на концентрацию норадреналина и серотонина.

Материалы диссертации использованы при создании учебных пособий «Современные методы количественного определения низкомолекулярных соединений в биологических объектах» и «Практические аспекты проведения доклинических исследований фармакокинетики» (2025).

### **Методология и методы исследования**

Методологическую основу работы составили требования, изложенные в приложении 6 решения Совета Евразийской экономической комиссии №85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза», руководстве по валидации «ICH guideline M10 on bioanalytical method validation», а также научные труды ведущих специалистов в области биоаналитических исследований Г.В. Раменской, А.Л. Хохлова, В.П. Жердева, И.Е. Шохина и других.

Исследование выполнено с применением современного высокочувствительного и высокоселективного метода - высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием. Все использованное аналитическое оборудование было внесено в реестр средств измерений и своевременно поверено.

Исследования фармакокинетики и фармакодинамики лекарственных средств проводились в соответствии с Рекомендацией Коллегии Евразийской экономической комиссии от 14 ноября 2023 года №33 «О Руководстве по работе с лабораторными (экспериментальными) животными при проведении доклинических (неклинических) исследований». При работе с лабораторными животными соблюдались все этические принципы.

### **Положения, выносимые на защиту**

- Дизайн исследования по идентификации метаболитов нестабильных кандидатов в лекарственные препараты и кандидатов в лекарственные препараты, потенциально образующих нестабильные метаболиты, на лабораторных животных.
- Обоснование перечня, объема и порядка проведения экспериментов по подбору стабилизатора для легкоразлагающихся соединений в различных биологических объектах.
- Методики количественного определения R004 и его основных метаболитов, TFISA и его основных метаболитов, ODASA и его основных метаболитов в биологических жидкостях, экскрементах, органах и тканях животных, а также моноаминовых нейромедиаторов и их метаболитов в тканях мозга крысы.
- Алгоритм принятия решений для выбора оптимизированного дизайна валидационных испытаний одинаковых методик определения аналитов в плазме или цельной крови разных видов животных, или в разных органах одного вида животного.
- Способ косвенного изучения экскреции на примере N-гидроксисульфонамидов TFISA и ODASA.
- Результаты апробации разработанных методик в рамках доклинических исследований кандидатов в лекарственные препараты и повторного анализа испытуемых образцов животных, отобранных в ходе этих исследований.
- Алгоритмы создания методик количественного определения неустойчивых к разложению соединений в плазме, крови, моче, кале, органах и тканях животных.

### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Диссертационная работа соответствует паспорту научной специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия: Пункт 4. «Разработка методов анализа лекарственных веществ и их метаболитов в биологических объектах для фармакокинетических исследований, экологофармацевтического мониторинга, судебно-химической и наркологической экспертизы».

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Достоверность результатов полученных данных гарантируется использованием сертифицированного и поверенного аналитического оборудования. Все разработанные методики прошли полную валидацию в соответствии с российскими и международными требованиями. Статистическая обработка результатов выполнена с применением широко известного программного обеспечения.

Основные результаты диссертационного исследования доложены на следующих конференциях: XXX Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2024), научной конференции с международным участием «Биохимия человека» (Москва, 2024), II-ом Межрегиональном форуме «Дороговские чтения» (Ярославль, 2025), XXXI Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2025), 79-й Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Актуальные вопросы медицинской науки», посвященной 100-летию со дня рождения заслуженного деятеля науки РФ, профессора Зинаиды Сергеевны Манелис (Ярославль, 2025), XII Всероссийской конференции с международным участием «Актуальные вопросы доклинических и клинических исследований лекарственных средств и клинических испытаний медицинских изделий» (Санкт-Петербург, 2025), II Всероссийской конференции с международным участием «Биоэтика и глобальные социальные трансформации» (Ярославль, 2025), XII Российском форуме биотехнологий «OpenBio» (Кольцово, 2025).

Апробация диссертационной работы прошла на совместном заседании кафедр химии с курсом фармакологической и токсикологической химии, фармакологии и клинической фармакологии, биологической химии, фармакогнозии и фармацевтической технологии, управления и экономики фармации, пропедевтики внутренних болезней, психиатрии, хирургии ИНПО ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, протокол №177 от 16.10.2025.

### **Внедрение результатов в практику**

Созданные подходы к разработке методик для определения нестабильных веществ в биологических объектах животных внедрены в практическую деятельность лаборатории Центра трансфера фармацевтических технологий им. М.В. Дорогова ФГБОУ ВО «Ярославский государственный педагогический университет им. К.Д. Ушинского», лаборатории ООО «Квинта-аналитика Ярославль».

Результаты диссертационного исследования используются в учебном процессе кафедры фармакологии и клинической фармакологии ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедры органической химии ФГБОУ ВО «Российский государственный университет им. А.Н. Косыгина».

### **Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтической науки**

Диссертационная работа выполнена согласно Стратегии развития фармацевтической промышленности Российской Федерации на период до 2030 года (утверждена распоряжением

Правительства Российской Федерации № 1495– р от 7 июня 2023 г.), плану работы научно-исследовательской работы ФГБОУ ВО ЯГМУ Минздрава России и является частью государственных заданий Министерства здравоохранения Российской Федерации «Разработка лекарственного препарата для лечения остроугольной глаукомы» № 1022051100011-8-3.1.5;3.2.17 и «Разработка лекарственного препарата для лечения ревматоидного артрита и других воспалительных заболеваний» №1022051600008-9-3.1.5;3.2.22, гранта Министерства просвещения Российской Федерации «Разработка инновационного лекарственного средства для лечения открытоугольной глаукомы путем селективного ингибирования карбоангидразы II» № 073-00077-21-02 (№ реестровой записи 730000Ф.99.1.БВ10АА00006) и государственного задания Министерства просвещения Российской Федерации «Разработка нового лекарственного средства для лечения нейродегенеративных заболеваний на основе ингибитора моноаминоксидазы» (номер реестровой записи 720000Ф.99.1.БН62АА12000).

### **Личный вклад автора**

Автор самостоятельно осуществил постановку целей и задач работы, выбор объектов и методов исследования, обобщение данных научной литературы, сформулировал основные теоретические положения работы, дизайн экспериментов по изучению фармакокинетики и фармакодинамики новых фармакологически активных соединений. Автор самостоятельно разрабатывал и валидировал все описанные в диссертации биоаналитические методики, выполнял анализ испытуемых образцов лабораторных животных, а также все необходимые статистические расчеты. Автор выполнял основную часть работ по написанию статей, заявок на патенты, обсуждению полученных данных на конференциях и внедрению в практическую деятельность основных результатов диссертации.

### **Публикации по теме диссертации**

По результатам диссертационного исследования опубликовано 28 научных работ, в том числе 13 статей в изданиях, индексируемых в международной базе Scopus, 3 статьи в изданиях из перечня ВАК при Минобрнауки России, 8 статей в сборниках конференций, 2 патента на изобретения и 2 иные публикации по теме работы.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 395 страницах машинописного текста, содержит 91 рисунок и 192 таблиц, и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, 6 экспериментальных глав, выводов, практических рекомендаций, 6 приложений. Список литературы включает 378 источника, в том числе 313 иностранных.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Объекты и методы исследования

В качестве объектов исследования выбраны кандидаты в лекарственные препараты (КЛП) R004, OXSA, TFISA и ODASA (рисунок 1), моноаминовые нейромедиаторы норадреналин (NA), адреналин (Adr), допамин (Dop), серотонин (5HT) и их основные метаболиты 3,4-дигидроксифенилуксусная кислота (DOPAC), гомованилиновая кислота (HVA), ванилилминдальная кислота (VMA), 5-гидроксииндол-3-уксусная кислота (5HIAA).

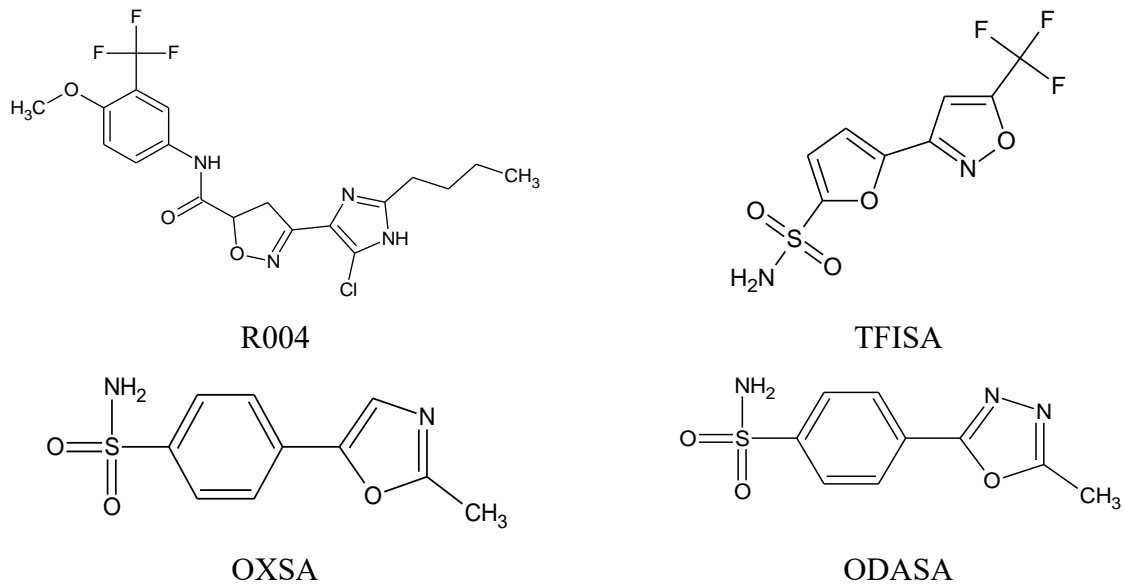


Рисунок 1 - Структурные формулы изучаемых кандидатов в лекарственные препараты

Для каждого изучаемого КЛП проводилась идентификация его метаболитов с помощью скрининговых ВЭЖХ-МС/МС-методик и их синтез. Далее подбирались условия для стабилизации R004, неустойчивого к гидролизу, N-гидроксиметаболитов ИКАП, разлагавшихся с образованием производных сульфоновых кислот в плазме, цельной крови (для ИКАП), моче, кале, органах и тканях животных, а также производных пирокатехина в стриатуме и других тканях мозга крысы. Далее проводилась полная валидация разработанных методик и их апробация при исследовании ФК и фармакодинамики (ФД). После их успешного применения и результатов повторного анализа активных испытанных образцов были сформулированы общие подходы для создания методик количественного определения нестабильных аналитов в биологических жидкостях, экскретах и тканях лабораторных животных.

Диссертационное исследование выполнено с использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием. Все эксперименты проводились на ВЭЖХ-МС/МС-системе, включающей в себя жидкостной хроматограф «Agilent 1260 Infinity» (Германия) и гибридный тандемный масс-спектрометрический детектор «AB Sciex QTRAP5500» (Сингапур). Субстанции R004, OXSA,

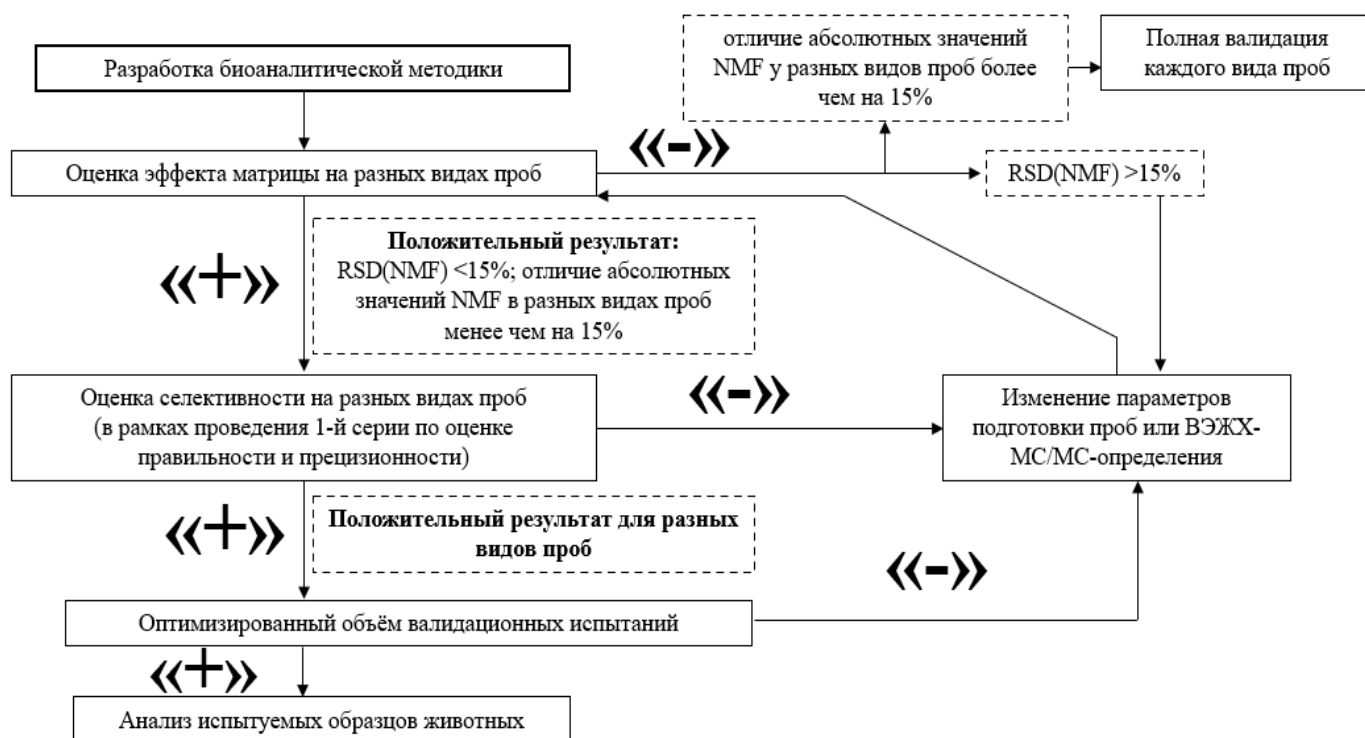
TFISA, ODASA и продуктов их биотрансформации были синтезированы в ЯГПУ им. К.Д. Ушинского. Стандартные образцы моноаминовых нейромедиаторов, их метаболитов, а также органических растворителей и прочих реактивов были получены из коммерческих источников. Холостые образцы биоматериала для приготовления модельных смесей получали от интактных крыс и кроликов.

Валидация биоаналитических методик для анализа мочи, кала и гомогенатов проб глаза, приготовленных в объемном соотношении 1:3, проводилась в полном объеме. Испытания идентичных методик для плазмы крысы и кролика, а также для органов и тканей крыс осуществлялась по оптимизированной схеме (рисунок 2). После завершения подбора параметров ВЭЖХ-МС/МС-анализа, а также предварительных испытаний стабильности, проводилась оценка эффекта матрицы на пробах обоих видов животных (для плазмы и крови) или каждого органа или ткани. Анализировалось по 6 образцов КК на нижнем (LQC) и верхнем (HQC) уровнях концентраций, приготовленных на биологических жидкостях от 6 разных особей. RSD нормализованного фактора матрицы (NMF) не должно превышать 15%, а отличие абсолютных значений NMF между плазмой обоих видов не должно выходить за рамки интервала  $\pm 15\%$ . В случае более существенных различий NMF должна проводиться отдельная валидация для плазмы крысы и плазмы кролика или для каждого органа и ткани.

При получении успешных результатов изучения эффекта матрицы проводили оценку селективности методики в рамках испытаний по подтверждению внутрисерийной правильности и прецизионности. В состав аналитического цикла включалось 6 холостых образцов, полученных от 6 разных особей, и 6 образцов с концентрацией LLOQ, приготовленных из данных интактных матриц. При этом анализировали по 1 серии, выполненной на плазме/крови крысы и на плазме/крови кроликов, или на гомогенатах каждого изучаемого объекта. Если результаты оценки селективности соответствовали установленным требованиям, то дальнейшую валидацию осуществляли в сокращенном объеме.

Изучение эффекта разведения образца, переноса аналитов и ВС из предыдущей пробы, краткосрочной стабильности (STS), стабильности после 3 циклов замораживания и размораживания (FTS), стабильности образцов в автосемплере хроматографа (ASS) проводили на образцах крысы (для плазмы и крови) или на гомогенатах печени (для органов и тканей). Долгосрочную стабильность (LTS) изучаемых соединений в пробах в течение 1 месяца хранения в морозильной камере подтверждали на плазме, крови обоих видов, на каждом органе и ткани для оценки влияния различий ферментных систем на процесс разложения аналитов. Для подтверждения межсерийной прецизионности и правильности проводили испытание еще 1 серии проб, приготовленных на плазме крысы, и 1 серии проб, приготовленных на плазме кролика или по 1 серии на пробах каждого органа и ткани крысы. Затем полученные результаты всех

аналитических циклов объединяли. Дополнительно, согласно требованиям руководства «ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis», оценивали воспроизводимость результатов при повторном введении серии. При испытаниях биоаналитических методик для плазмы и крови данное испытание проводилось на пробах крысы, для гомогенатов органов - на пробах печени.



Примечание: «+» - результат испытания соответствует установленным требованиям; «-» - результат испытания не соответствует установленным требованиям

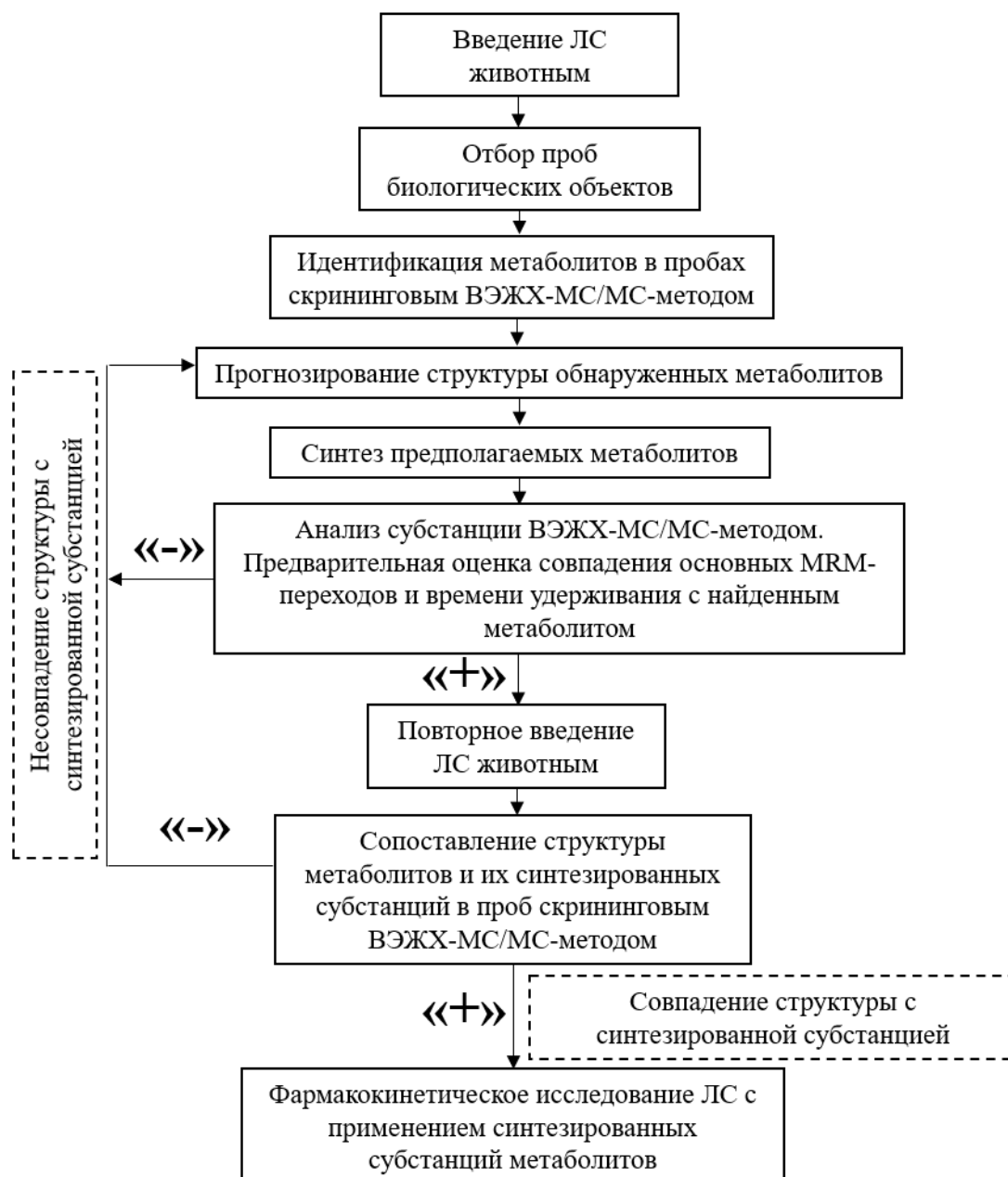
Рисунок 2 - Оптимизированная схема проведения валидации биоаналитических методик для плазмы и цельной крови животных крысы и кролика, а также для органов и тканей крысы

Дизайн исследований по изучению связи КЛП и их метаболитов с белками, по идентификации метаболитов КЛП, исследований ЖК и ФД, а также порядок статистических расчетов разработан на основании Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств (Часть 1, 2012). опыты проводились на крысах линии Wistar и кроликах породы «Советская шиншилла».

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты по идентификации метаболитов OXSA, TFISA, ODASA и R004 в биологических пробах выполнялись на двух видах животных - крысах и кроликах из-за различий в их ферментных системах, участвующих в модификации молекулы действующего вещества, и, как следствие, возможных различий в профиле метаболитов. Исследование проводилось в два этапа (рисунок 3). На первом этапе проводили предварительную идентификацию и

прогнозирование структуры метаболитов. Лекарственные средства в виде суспензии вводились 3 животным обоих видов внутривенно в дозах, превышающих терапевтическую. После анализа испытуемых образцов биологических объектов предполагаемые метаболиты синтезировались. Затем проводился их анализ для предварительной оценки совпадения MRM-переходов и времени удерживания с обнаруженным продуктом биотрансформации (БТ). Далее КЛП повторно вводили 3 животным и снова отбирали пробы крови и экскретов. При изучении БТ OXSA эксперимент выполняли на тех же крысах и кроликах, что и на первом этапе. В рамках последующих исследований R004, TFISA и ODASA препараты вводили 3 новым животным для подтверждения воспроизводимости первоначальных результатов.



Примечание: «+» - совпадение результатов; «-» - несовпадение результатов

Рисунок 3- Общая схема исследования биотрансформации изучаемых кандидатов в лекарственные препараты

Второй этап был необходим, так как заранее неизвестна реакционная способность продуктов БТ. Дополнительные меры по предотвращению разложения неустойчивых аналитов в биопробах не гарантируют их устойчивость на протяжении длительного периода хранения. Так, R004 и N-гидроксиметаболиты ингибиторов карбоангидразы легко разлагались. Сопоставление структуры метаболитов и синтезированных субстанций путем анализа проб животных и модельных образцов с добавкой стандарта проводилось с помощью скрининговых ВЭЖХ-МС/МС-методик. При создании этих методик использовались спрогнозированные MRM-переходы продуктов БТ, при которых величина  $m/z$  модификации вычиталась или прибавлялась к величине  $m/z$  молекулярного и дочернего иона действующего вещества.

Сравнение выполняли по следующим критериям: наличие пиков на одних и тех же MRM-переходах на хроматограммах стандартного и испытуемого образца (данные пики в холостом образце должны были отсутствовать), расхождение их времен удерживания ( $t_R$ ) (в интервале  $\pm 1\%$ ), расхождение соотношения площадей пиков метаболита на хроматограммах двух основных MRM-переходов в испытуемом и стандартном образце (в интервале  $\pm 20\%$ ), совпадение масс-спектров метаболитов, полученных в режиме MS2, в испытуемых образцах с наивысшей интенсивностью аналитического сигнала и стандартных образцах (не менее чем на 85%).

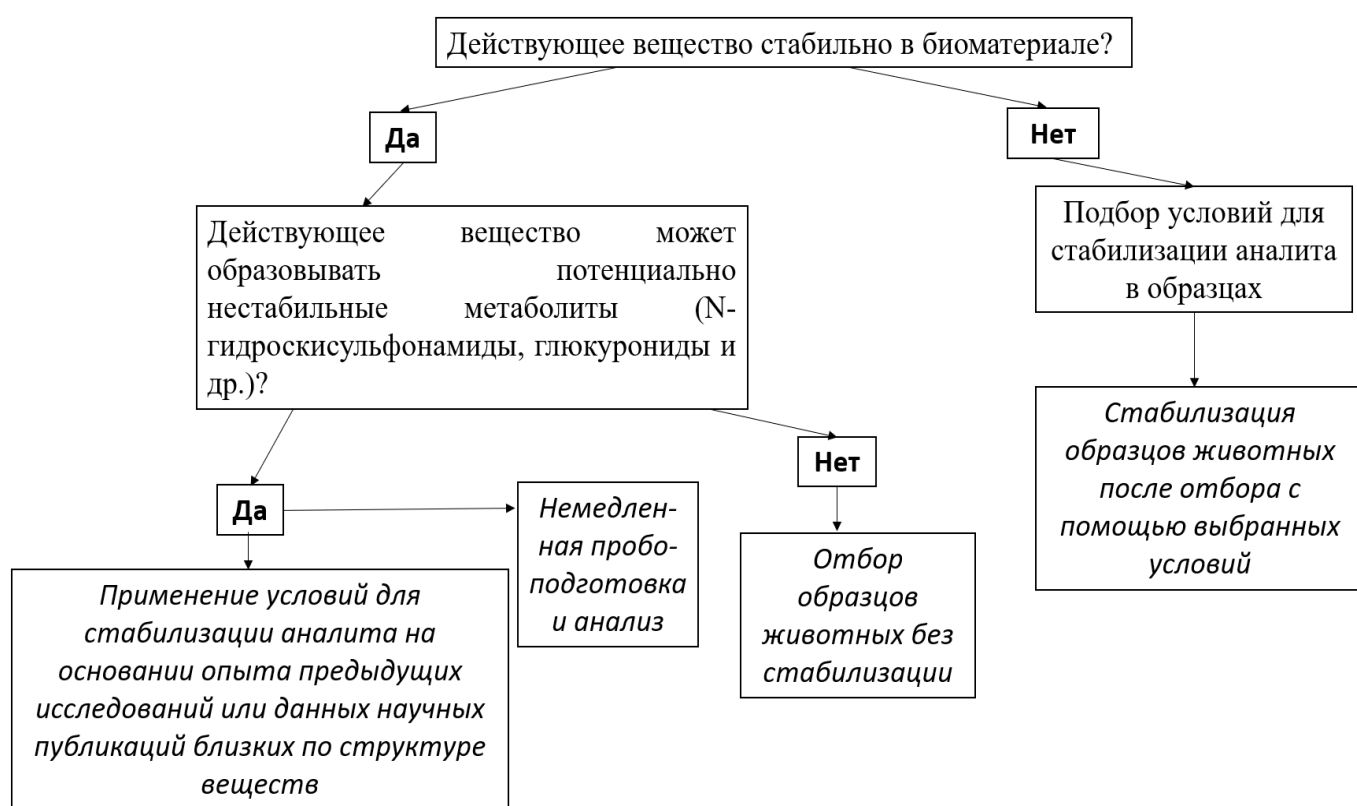
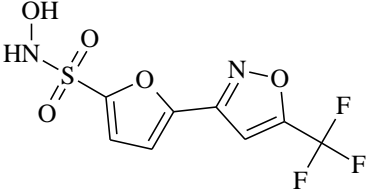
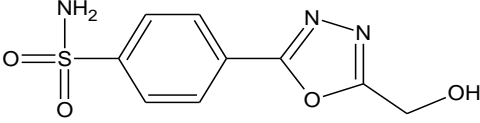
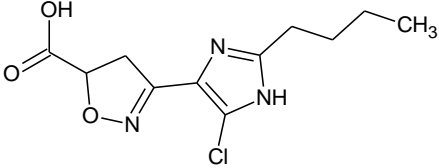
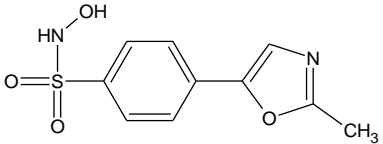
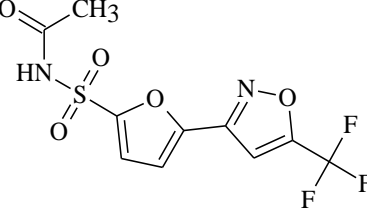
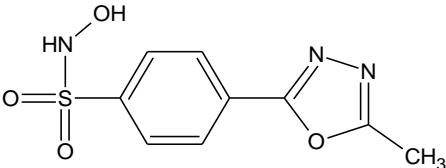
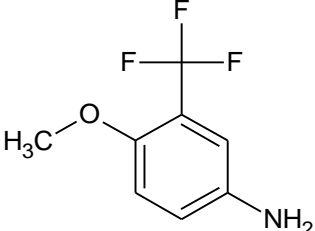
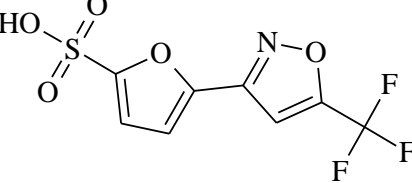
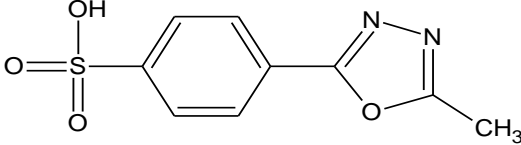


Рисунок 4 - Выявление необходимости стабилизации проб биологических объектов при проведении исследований по идентификации метаболитов

Таблица 1 - Результаты идентификации метаболитов изучаемых кандидатов в лекарственные препараты

КЛП	OXSA	TFISA	ODASA	R004
Обнаруженные метаболиты		 <p data-bbox="719 456 1115 611">N-гидрокси-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид (TFISA-M1)</p>	 <p data-bbox="1155 424 1673 539">4-[5-(гидроксиметил)-1,3,4-оксадиазол-2-ил]-бензолсульфонамид (ODASA-M1)</p>	 <p data-bbox="1720 493 2128 647">3-(2-бутил-5-хлор-1H-имидазол-4-ил)-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоновая кислота (R004-M1)</p>
	 <p data-bbox="297 836 678 991">N-гидрокси-4-(2-метил-1,3-оксазол-5-ил)-бензолсульфонамид (OXSA-M1)</p>	 <p data-bbox="719 852 1115 1007">N-ацетил-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид (TFISA-M2)</p>	 <p data-bbox="1155 836 1673 951">N-гидрокси-4-(5-метил-1,3,4-оксадиазол-2-ил)-бензолсульфонамид (ODASA-M2)</p>	 <p data-bbox="1720 1171 2128 1246">4-метокси-3-(трифторметил)-анилин (R004-M2)</p>
		 <p data-bbox="712 1230 1122 1430">5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфоновая кислота (TFISA-M3) – продукт разложения TFISA-M1</p>	 <p data-bbox="1155 1230 1673 1382">4-(5-метил-1,3,4-оксадиазол-2-ил)-бензолсульфоновая кислота (ODASA-M3) – продукт разложения ODASA-M2</p>	

Результаты идентификации метаболитов изучаемых соединений представлены в таблице 1. Таким образом, до начала «in-vivo» экспериментов по идентификации метаболитов необходимо проанализировать структуру действующего вещества на предмет наличия в его молекуле функциональных групп, при наличии которых оно потенциально способно вступать в химическую реакцию с компонентами биологической матрицы в процессе хранения образца (рисунок 4). К ним относятся сложноэфирная, амидная, сульфгидрильная, N-гидроксисульфонамидная группы, фенольные гидроксилы и другие. Для таких соединений возможно провести предварительные испытания STS, ASS и FTS на модельных смесях крови, плазмы, мочи или кала и подобрать меры для предотвращения их разложения. После проведения указанных экспериментов выполнялось обнаружение метаболитов R004 в биологических жидкостях крыс и кроликов. Стабилизация аналита в K<sub>3</sub>ЭДТА-плазме и моче была достигнута путём применения 250 мМ раствора CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> с рН=4,0 в объёмном соотношении 1:5 (стабилизатор: биологическая жидкость). Следует отметить, что в плазме крысы R004 был более устойчив, чем в плазме кролика. В фекалиях разложение R004 было предотвращено путём приготовления гомогенатов с применением ацетонитрила в соотношении 1:1 (масса фекалий: объём ацетонитрила). В процессе экспериментов оценивалась не только химическая стабильность R004, но и влияние его распада на селективность определения продуктов гидролиза.

Перед началом экспериментов на животных также следует прогнозировать структуру продуктов биотрансформации изучаемых соединений. Даже у химически стабильной молекулы среди возможных метаболитов могут быть легкоразлагающиеся соединения (рисунок 4). При этом их субстанций для проведения предварительных тестов STS, ASS и FTS, как правило, нет в наличии. Поэтому меры для повышения устойчивости таких аналитов в биопробах необходимо выбирать эмпирическим путем, опираясь на данные литературы и ранее выполненных исследований. Так, при изучении биотрансформации ODASA для отбора крови в качестве антикоагулянта использовалась смесь NaF и K<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub> вместо K<sub>3</sub>ЭДТА, пробы мочи и плазмы стабилизировались добавлением 5% раствора АК, приготовленные пробы крови – добавлением 1% раствора HCOOH. Подобные условия использовались в методиках для количественного определения TFISA и его метаболитов в биологических жидкостях крыс и кроликов. Это позволило обнаружить в образцах следовые количества минорного N-гидроксисульфонида ODASA, аналитический сигнал которого на спрогнозированных MRM-переходах оказался очень слабым. При исследовании TFISA меры по стабилизации применялись только на втором этапе после обнаружения N-гидроксисульфонида TFISA-M1. Так, к пробам плазмы и мочи добавляли 10% раствор аскорбиновой кислоты (АК) в соотношении 1:5, к обработанным метанолом пробам крови добавляли 5% раствор HCOOH. Аналогичные меры использовались для

стабилизации N-гидроксиметаболита OXSA в биоматериале в ходе изучения его фармакокинетики (Khokhlov A.L et al., 2023). Альтернативным способом надежной идентификации нестабильных метаболитов является немедленная пробоподготовка и анализ образцов. Это позволит снизить вероятность потери нестабильных соединений. Такой подход применялся при изучении профиля продуктов БТ OXSA.

Предложенный алгоритм проведения экспериментов по идентификации метаболитов успешно использован для исследований TFISA, ODASA и R004. Правильность полученных результатов подтверждена в ходе изучения экскреции данных соединений и продуктов их биотрансформации на крысах после В/Б. Так, при расчете материального баланса установлено, что с мочой и калом вывелось 85-95% от введенной дозы этих КЛП. Таким образом, все основные метаболиты данных соединений в биоматериале животных были успешно обнаружены.

Описание методик количественного определения R004 и его метаболитов, TFISA и его метаболитов, ODASA и его метаболитов в биоматериале животных представлены таблице 2, процедуры подготовки и меры по стабилизации проб - в таблице 3. Одинаковые методики количественного определения R004, TFISA, ODASA и их метаболитов в плазме крысы и кролика, в крови крысы и кролика (кроме R004), а также схожие методики для печени, почек, селезенки, сердца, легких, мозга, кожи и мышц крысы были валидированы по оптимизированной схеме (рисунок 2) благодаря близким итогам оценки эффекта матрицы и селективности (таблицы 4,5,8). Для них приведены объединенные данные по селективности (максимальный измеренный % от площади пика образца LLOQ в холостом образце), эффекту матрицы, правильности и прецизионности, долгосрочной стабильности ввиду оптимизированного объема валидации; данные по прецизионности и правильности скомпилированы по результатам внутрисерийных испытаний. Эксперименты на пробах мочи, кала (таблицы 6,7), глаз крысы (для TFISA и ODASA) проводились в полном объеме. Результаты изучения прецизионности (RSD рассчитанных концентраций на каждом уровне концентраций) и правильности ( $\delta$ -среднее значение относительной погрешности на каждом уровне концентраций) методик во всех таблицах 4-9 скомпилированы по результатам внутрисерийных испытаний.

Разработанные методики количественного определения R004, TFISA, ODASA и их метаболитов в биоматериале животных были использованы для изучения фармакокинетики данных препаратов. R004 способен попадать в системный кровоток животных при пероральном введении. Относительная биодоступность (ОБ) действующего вещества по сравнению с внутривенной инъекцией у крыс составила 21,26%, у кроликов - 20,46%. R004 и его метаболиты при многократном введении способны к материальной кумуляции. Большая часть R004 у крыс элиминировалась в неизменном виде с калом. Этим же путем выводился R004-

M2. Экскреция R004-M1 преимущественно происходит с мочой. Степень связывания R004 и его метаболитов с белками плазмы достаточно низкая- около 10%. Действующее вещество хорошо распределялось по всем изучаемым органам и тканям. Высокие концентрации R004 выявлены в органах экскреции и коже, а низкие концентрации – в головном мозге. Наибольшее содержание метаболитов наблюдалось в печени и почках.

При изучении фармакокинетики обнаружено, что TFISA способен проникать в организм животных после закапывания его суспензии в глаза. Величина ОБ действующего вещества после И/Г по сравнению с В/Б у кроликов составляла более 44,7%, у крыс – 85,8%. TFISA-M1 является основным метаболитом, а TFISA-M2 – минорным. TFISA и его N-гидроксипроизводное способны депонироваться в эритроцитах. Так, величина биодоступности в крови после И/Г у TFISA и у TFISA -M1 составила около 50, а у TFISA-M2 – около 2. Поэтому для данных веществ характерна материальная кумуляция после многократного закапывания в глаза крысам.

TFISA экскретировался из организма крыс преимущественно ренальным путем в неизменном виде, а также в виде TFISA-M1. Минорный N-ацетилметаболит выводился только с мочой. Наибольшие концентрации действующего вещества наблюдались в месте введения и действия – глазах. TFISA хорошо проникал в органы с хорошей васкуляризацией. Высокая тканевая биодоступность TFISA-M1 наблюдалась в селезенке, сердце, легких, высокая тканевая биодоступность TFISA-M2 – в печени и почках крыс.

ODASA также способен всасываться в системный кровоток после закапывания его суспензии в глаза животным. Величина ОБ данного КЛП по сравнению с В/Б у кроликов составляла более 30%, у крыс - более 81%. ODASA-M1 является основным метаболитом ODASA. Действующее вещество и продукты его гидроксирования накапливаются в эритроцитах. При исследовании экскреции на крысах установлено, что более 80% данного кандидата в лекарственный препарата выводится в виде ODASA-M1 и около 16% - в неизменном виде. Доля ODASA-M2 в кумулятивной экскреции составляла менее 4%. Основным путем экскреции ODASA и его метаболитов является ренальный. ODASA и его ODASA-M1 после инстилляций глазной суспензии хорошо распределялись по тканям селезенки, печени, почек, сердца, легких, а также проникали в головной мозг, кожу и мышцы. ODASA-M2 был обнаружен в печени в сравнительно больших концентрациях, чем в других изучаемых органах.

Аналитические диапазоны новой методики для измерения концентрации моноаминовых нейромедиаторов норадреналина (NA), допамина (Dop), серотонина (5HT), адреналина (Adr) и их метаболитов 3,4-дигидроксибензилуксусной кислоты (DOPAC), гомованилиновой кислоты (HVA), ванилилминдальной кислоты (VMA), 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты (5HIAA) в тканях мозга крыс рассчитаны для измерения концентрации данных соединений в стриатуме. Валидационные испытания выполнены в полном объеме (таблица 9).

Таблица 2 - Описание параметров ВЭЖХ-МС/МС-анализа разработанных биоаналитических методик

Аналиты	Внутренние стандарты	Колонка	Состав подвижной фазы (ПФ)	MRM-переходы, выбранные для количественного определения	Время анализа, мин.
R004, R004-M1, R004-M2	3-(2-бутил-5-хлоро-1Н-имидазол-4-ил)-N-[3,4-диметилфенил]-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоксамид (R002)-BC для R004; 4-хлоранилин (4CA) - BC для R004-M1 и R004-M2	Zorbax Eclipse Plus C18 (150*3,0 мм, 3,5 мкм)	ПФ А: 0,2% водный раствор HCOOH; ПФ Б-ацетонитрил	R004 (+)- 445→425 m/z, R004-M1 (+)- 272→200 m/z, R004-M2 (+)- 192→108 m/z, R002 -375→226 m/z (+), 4CA (+) - 128→93 m/z (BC для R004-M1) и 128→75 m/z (BC для R004-M2)	12,5 мин.
TFISA, TFISA-M1, TFISA-M2. TFISA-M3-только в моче и кале	5-[2-(морфолин-4-карбонил)-1,3-оксазол-5-ил]-тиофен-2-сульфонамид (THSA)	Zorbax Eclipse Plus C18 (150*3,0 мм, 3,5 мкм)	ПФ А: 0,1% водный раствор HCOOH-для плазмы, крови, органов и тканей; 10 мМ водный раствор HCOONH <sub>4</sub> – для мочи и кала; ПФ Б-метанол	TFISA (-) - 281→136 m/z, TFISA-M1 (-)- 297→136 m/z, TFISA-M2 (-)- 323→136 m/z, THSA (-) – 342→78 m/z (BC для TFISA) и 342→110 m/z (BC для TFISA-M1, TFISA-M2), TFISA-M3 (-) - 282→136 m/z	10,0 мин.
ODASA, ODASA-M1, ODASA-M2. ODASA-M3-только в моче и кале	4-(3-метил-6-оксо-5,6-дигидропиридазин-1(4H)-ил)-бензолсульфонамид (OHSA)- BC для ODASA, ODASA-M1, ODASA-M2); TFISA-M3 – BC для ODASA-M3 моче и кале	Kinetex Phenyl-Hexyl (50*4,6 мм, 2,6 мкм)	ПФ А: 0,1% водный раствор HCOOH-для плазмы, крови, органов и тканей; 10 мМ водный раствор HCOONH <sub>4</sub> – для мочи и кала; ПФ Б-метанол	ODASA (+)- 240→184 m/z, ODASA-M1 (+)- 256→184 m/z, ODASA-M2 (+)- 256→160 m/z, OHSA (BC) (+)- 268→187 m/z, ODASA-M3(-) - 239→182 m/z, TFISA-M3 (BC) (-) - 282→136 m/z (только в моче и кале)	9,0 мин-плазма, кровь, органы и ткани; 11,0 мин. -моча, кал
NA, Dop, 5HT, Adr, DOPAC, HVA, VMA, 5HIAA	3,4-дигидроксибензальдегид (DHBA)- BC для NA, Dop, Adr соталол -BC для 5HT, 5HIAA, HVA, VMA	№1: Synergi Max RP (20* 2,0 мм, 2,5 мкм) и №2: Synergi Fusion – RP 80Å (250*4,6 мм, 4 мкм)	ПФ А: 0,1% водный раствор HCOOH; ПФ Б-метанол	NA (+)-170→77 m/z, Adr (+)-184→77 m/z, Dop (+)- 154→119 m/z, 5HT (+)- 177→160 m/z, 5HIAA(+)- 192→146 m/z, DHBA(+)- 140→77 m/z, Sot (+)- 273→133 m/z (BC для 5HT, 5HIAA), DOPAC (-)- 167→123 m/z, HVA(-)- 181→122 m/z, VMA (-)- 197→137 m/z, Sot (-)-271→174 m/z (BC для HVA, VMA)	21 мин.
Примечание: (+)-положительная полярность электрораспылительной ионизации; (-)-отрицательная полярность электрораспылительной ионизации					

Таблица 3 - Описание процедуры подготовки проб и мер по стабилизации аналитов

Исследование	Нестабильный аналит	Объект	Меры по стабилизации	Подготовка проб
R004, R004-M1, R004-M2	R004	Плазма	Антикоагулянт-К <sub>3</sub> ЭДТА; добавление 250мМ раствора CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> с pH=4,0 в объемном соотношении 1:5 (стабилизатор: плазма)	ПП (Асн)
		Моча	Добавление 250мМ раствор CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> с pH=4,0 в объемном соотношении 1:5 (стабилизатор: моча)	
		Кал	Гомогенизация с ацетонитрилом (Асн) в соотношении 1:3 (масса кала: объем Асн)	
		Органы и ткани	Гомогенизация с Асн в соотношении 1:1 (масса объекта: объем Асн)	
TFISA	TFISA - M1	Кровь	Антикоагулянт – NaF и K <sub>2</sub> C <sub>2</sub> O <sub>4</sub> ; добавление 1% раствора HCOOH к метанольным пробам	ПП (метанол)
		Плазма	Добавление 5% раствора АК в объемном соотношении 1:2 (стабилизатор: плазма)	
		Моча	Добавление 5% раствора АК в объемном соотношении 1:5 (стабилизатор: моча)	
		Кал	Гомогенизация с метанолом в соотношении 1:3 (масса кала: объем метанола)	
		Органы и ткани	Гомогенизация с метанолом в соотношении 1:1 (масса объекта: объем метанола); добавление 10% раствора АК в объемном соотношении 1:1	
		Глаза	Гомогенизация с метанолом в соотношении 1:3 (масса объекта: объем метанола); добавление 5% раствора АК в объемном соотношении 1:5	
ODASA	ODASA-M2	Кровь	Антикоагулянт-К <sub>3</sub> ЭДТА; добавление 1% раствора HCOOH к метанольным пробам	ПП (метанол)
		Плазма	Добавление 10% раствора АК в объемном соотношении 1:2 (стабилизатор: плазма)	
		Моча	Добавление 10% раствора АК в объемном соотношении 1:5 (стабилизатор: моча)	
		Кал	Гомогенизация с метанолом в соотношении 1:3 (масса кала: объем метанола)	
		Органы и ткани	Гомогенизация с метанолом в соотношении 1:1 (масса объекта: объем метанола); добавление 10% раствора АК в объемном соотношении 1:1	
		Глаза	Гомогенизация с метанолом в соотношении 1:3 (масса объекта: объем метанола); добавление 5% раствора АК в объемном соотношении 1:5	
Моноаминовые нейромедиаторы	NA, Dop, Adr, DOPAC	Ткани мозга	Гомогенизация с метанолом в соотношении 1:7 (масса ткани: объем метанола); добавление 5% раствора АК в объемном соотношении 1:5	ПП (метанол)
Примечание: ПП-осаждение белков, форменных элементов и других эндогенных веществ пробы или гомогената растворами внутренних стандартов в ацетонитриле (Асн) или метаноле				

Таблица 4 - Результаты валидации методик определения R004 и его метаболитов в биологических объектах животных

Аналит		R004				R004-M1				R004-M2			
Объект		Плазма	Моча	Кал	Органы и ткани	Плазма	Моча	Кал	Органы и ткани	Плазма	Моча	Кал	Органы и ткани
Аналитический диапазон (линейный)		2-2000 нг/мл	5-2000 нг/мл	0,5-500,0 мкг/г	2-2000 нг/г	1-1000 нг/мл	100-40000 нг/мл	4-4000 нг/г	1-1000 нг/г	1-1000 нг/мл	5-2000 нг/мл	40-40000 нг/г	1-1000 нг/г
Селективность, % от LLOQ (макс.)		5,93	11,52	10,24	10,23	0	0	0	0	0	0	0	0
Эффект переноса, % от LLOQ (макс.)		13,83	12,51	0	14,00	0	0	0	0	0	0	0	0
Эффект матрицы (мин.-макс.)	RSD(NMF), %	2,81-3,93	6,18-6,58	5,67-8,26	1,82-8,15	2,24-10,98	5,01-6,61	3,75-5,51	1,75-7,06	2,95-8,30	2,83-3,17	6,19-6,54	1,94-6,06
	NMF	0,994-1,034	0,912-0,964	0,949-0,982	0,946-0,990	0,830-0,887	0,937-0,956	0,935-0,956	0,936-0,990	0,972-0,987	0,952-0,958	0,932-0,961	0,939-0,990
Правильность (δ,%) (мин.-макс.)	LLOQ	0,63-13,16	0,90-1,10	-3,00-1,00	-5,20-5,61	-3,80-8,40	-0,34-7,73	3,58-5,04	-7,24-8,25	-1,80-15,60	-4,00-2,57	5,58-6,52	-5,85-7,95
	LQC, MQC, HQC	0,44-11,16	-3,85-4,66	-3,22-2,41	-3,02-5,96	-2,23-10,41	-4,99-4,41	0,09-6,33	-2,31-6,57	0,76-8,33	-2,70-5,19	1,80-4,87	-2,69-6,13
Прецизионность (RSD,%) (макс.)	LLOQ	12,61	7,19	9,81	9,39	15,90	5,10	6,39	10,37	9,55	8,38	3,60	9,14
	LQC, MQC, HQC	5,95	6,93	7,96	4,75	6,84	8,89	5,10	6,88	10,03	6,08	7,34	8,21
Воспроизводимость при повторном введении (δ,%) (мин.-макс.)		-5,63-5,58	-1,20-3,38	-1,67-0,56	0,17-2,86	-2,78-8,90	-0,25-2,60	0,63-5,51	1,77-2,27	1,78-5,67	1,83-3,47	0,01-4,40	1,95-3,52
Эффект разведения (δ,%)		3,82	0,24	5,31	-2,27	4,08	-0,30	5,27	-1,71	8,65	1,86	4,40	-1,35
STS (24 ч) (δ,%) (мин.-макс.)		4,12-8,29	0,34-0,46	-0,44-1,44	3,82-4,87	3,43-5,06	-0,64-0,74	2,25-2,63	4,00-4,87	0,51-3,56	-1,47-1,36	2,68-2,89	2,89-5,48
FTS (3 цикла) (δ,%) (мин.-макс.)		3,45-4,14	0,69-0,93	2,72-6,11	5,25-5,75	2,83-6,81	-4,94-1,70	3,74-4,61	0,75-1,75	-0,68-0,67	-0,62-0,10	3,20-4,76	0,76-3,13
ASS (48ч) (δ,%) (мин.-макс.)		3,24-7,12	0,82-1,12	0,67-0,94	2,80-5,61	4,44-4,80	-2,84-1,46	1,82-2,50	2,20-3,64	-0,21-3,23	-1,68-0,99	1,21-2,54	3,35-5,48
LTS (1 месяц-не выше -70°C) (δ,%) (мин.-макс.)		-1,26-12,03	0,37-0,90	-1,44-1,11	0,48-5,60	-1,53-5,56	-1,99-0,80	2,24-3,42	-2,14-6,46	0,21-10,17	-0,61-0,19	0,81-1,78	-3,22-6,02

Таблица 5 - Результаты валидации методик определения TFISA и его метаболитов в биологических объектах животных

Аналит		TFISA				TFISA-M1				TFISA-M2			
Объект		Кровь	Плазма	Органы и ткани	Глаза	Кровь	Плазма	Органы и ткани	Глаза	Кровь	Плазма	Органы и ткани	Глаза
Аналитический диапазон (линейный)		20-20000 нг/мл	10-4000 нг/мл	20-20000 нг/г	80-80000 нг/г	2-2000 нг/мл	1-400 нг/мл	2-2000 нг/г	8-8000 нг/г	0,1-100,0 нг/мл	0,1-40,0 нг/мл	0,1-100,0 нг/г	0,4-400,0 нг/г
Селективность, % от LLOQ (макс.)		7,95	15,12	12,50	13,12	1,02	0	0	0	0	0	0	0
Эффект переноса, % от LLOQ (макс.)		10,11	13,25	8,55	9,88	0	0	0	0	0	0	0	0
Эффект матрицы (мин.-макс.)	RSD(NMF),%	1,91-5,14	3,55-7,30	2,27-9,25	4,40-7,21	1,83-4,73	1,87-5,99	1,92-9,45	6,44-9,52	2,64-8,75	2,50-5,88	2,29-13,41	3,04-5,57
	NMF	0,872-0,908	0,725-0,811	0,911-0,989	0,981-0,983	0,836-0,884	0,708-0,767	0,909-0,996	0,951-1,007	0,887-0,922	0,774-0,839	0,922-0,990	0,940-0,946
Правильность (δ, %) (мин.-макс.)	LLOQ	-7,07-13,65	-15,48-1,83	-1,15-5,55	-0,77-0,66	-12,47-3,67	-7,50-12,67	-1,50-4,04	-1,37-1,69	-3,61-8,92	-3,33-8,33	-3,50-5,08	-0,83-2,50
	LQC, MQC, HQC	-7,41-8,59	-9,00-10,70	-1,30-4,11	-3,60-5,32	-10,76-12,81	-7,71-8,28	-0,87-5,66	-0,47-2,51	-2,33-6,15	-13,17-12,87	-1,61-4,60	0,08-4,73
Прецизионность (RSD,%) (макс.)	LLOQ	7,14	5,72	5,53	6,72	9,25	12,41	7,44	8,97	14,23	15,58	7,62	11,79
	LQC, MQC, HQC	8,27	8,75	9,39	6,34	12,63	8,35	9,27	9,15	8,76	10,63	11,08	5,70
Воспроизводимость при повторном введении (δ,%) (мин.-макс.)		1,08-9,09	-11,82-2,79	1,44-3,64	-0,64-3,68	2,61-8,14	-6,53-4,33	0,42-3,67	0,10-5,65	-0,49-7,77	-3,01-8,33	2,09-4,89	-1,16-2,88
Эффект разведения (δ,%)		7,95	-10,37	-3,11	0,52	6,48	-8,07	-2,44	3,79	6,87	-0,32	-1,45	0,38
STS (24 ч) (δ,%) (мин.-макс.)		-8,78-5,72	-8,17-6,32	2,10-2,97	1,77-3,63	-9,57-3,92	-8,10-2,11	2,80-2,94	0,77-3,75	-4,69-0,22	-7,43-0,56	3,22-4,56	-0,10-5,28
FTS (3 цикла) (δ,%) (мин.-макс.)		-0,94-6,76	-9,37-3,85	2,58-4,02	0,17-2,25	-4,57-0,89	-6,17-3,29	3,35-3,69	-5,40-0,75	-1,84-1,33	-11,80-2,22	3,33-6,00	-0,10-1,67
ASS (48ч) (δ,%) (мин.-макс.)		1,23-7,92	-2,56-13,01	3,78-4,18	-0,19-2,00	-12,84-3,33	-9,99-1,78	2,42-4,57	-0,72-1,60	1,24-2,82	-3,68-2,78	3,61-4,18	-1,13-3,75
LTS (1 месяц-не выше -70°C) (δ,%) (мин.-макс.)		-4,57-2,33	5,35-9,82	-2,69-6,73	-0,41-0,96	-7,76-0,69	3,83-12,09	-2,93-4,34	-1,80-1,51	-4,57-3,25	0,49-10,74	-4,28-3,61	-0,91-1,53

Таблица 6 - Результаты валидации методик определения TFISA и его метаболитов в моче и кале крыс

Аналит	TFISA				TFISA-M1				TFISA-M2				TFISA-M3			
	Моча		Кал		Моча		Кал		Моча		Кал		Моча		Кал	
Аналитический диапазон (линейный)	10-10000 нг/мл		10-4000 нг/г		1-1000 нг/мл		1-1000 нг/г		10-10000 нг/мл		5-2000 нг/г		10-10000 нг/мл		5-2000 нг/г	
Селективность (% от LLOQ)	10,55		12,24		0		0		0		0		0		0	
Эффект переноса (% от LLOQ)	8,98		8,98		0		0		0		0		0		0	
Правильность ( $\delta$ ,%)(мин.-макс.)	-7,69-11,98		-3,26-10,28		-11,00-12,57		-5,84-8,94		-4,36-8,45		-6,23-8,40		-0,84-14,30		-1,99-7,17	
Прецизионность (RSD,%)(макс.)	12,41		13,43		11,08		11,48		11,36		9,69		8,22		13,39	
Эффект разведения ( $\delta$ ,%)	-3,95		-1,38		0,00		-0,48		-0,81		-3,76		1,94		0,40	
Воспроизводимость при повторном введении ( $\delta$ ,%)(мин.-макс.)	0,08-11,04		-2,28-4,37		-1,06-11,14		-1,28-0,67		-0,26-6,51		-0,09-1,87		-1,50-10,25		1,28-2,49	
Уровень концентрации	LQC	HQC	LQC	HQC	LQC	HQC	LQC	HQC	LQC	HQC	LQC	HQC	LQC	HQC	LQC	HQC
Эффект матрицы (RSD (NMF),%)	7,59	5,80	2,98	4,54	10,62	4,59	4,12	4,23	2,76	3,44	6,23	3,37	4,31	5,63	2,93	5,44
STS (24 ч) ( $\delta$ ,%)	2,76	2,30	6,09	-2,41	-0,61	1,50	5,28	1,80	1,07	0,04	5,71	1,45	2,25	-1,05	3,08	3,64
FTS (3 цикла) ( $\delta$ ,%)	4,02	2,05	4,62	5,16	0,72	0,60	0,89	-1,60	2,84	1,74	0,13	0,98	3,23	1,53	-1,21	-1,50
ASS (48ч) ( $\delta$ ,%)	0,46	-0,28	1,96	3,15	2,72	-0,63	1,94	1,03	0,74	1,34	1,32	-1,60	0,36	2,63	2,20	1,42
LTS (1 месяц-не выше -70°C) ( $\delta$ ,%)	1,30	-2,65	2,99	0,95	1,94	1,19	-1,50	-2,11	2,95	5,77	1,16	1,15	0,64	0,02	0,22	4,70

Таблица 7 - Результаты валидации методик определения ODASA и его метаболитов в моче и кале крыс

Аналит	ODASA				ODASA -M1				ODASA -M2				ODASA -M3			
	Моча		Кал		Моча		Кал		Моча		Кал		Моча		Кал	
Аналитический диапазон (линейный)	10-10000 нг/мл		10-10000 нг/г		10-10000 нг/мл		10-10000 нг/г		1-1000 нг/мл		1-1000 нг/г		5-5000 нг/г		5-5000 нг/мл	
Селективность (% от LLOQ)	0		0		0		0		0		0		0		0	
Эффект переноса (% от LLOQ)	0		0		0		0		0		0		0		0	
Правильность ( $\delta$ ,%)(мин.-макс.)	-2,95-6,93		-5,95-4,44		-2,48-6,82		0,03-7,77		-1,83-5,43		-3,50-3,97		-7,67-5,99		0,57-5,27	
Прецизионность (RSD,%)(макс.)	10,11		10,43		12,24		12,00		13,18		12,07		10,91		12,88	
Воспроизводимость( $\delta$ ,%)(мин.-макс.)	-2,42-1,54		0,70-3,63		-2,50-5,85		2,33-4,98		1,00-3,85		1,22-3,83		-0,15-2,70		2,19-5,20	
Эффект разведения ( $\delta$ ,%)	7,83		1,46		6,66		1,23		5,40		3,16		3,53		0,92	
Уровень концентрации	LQC	HQC	LQC	HQC	LQC	HQC	LQC	HQC	LQC	HQC	LQC	HQC	LQC	HQC	LQC	HQC
Эффект матрицы (RSD(NMF),%)	8,69	4,36	4,93	3,47	4,72	8,42	5,90	6,69	7,57	6,07	6,05	7,18	5,88	6,48	8,08	6,78
STS (24 ч) ( $\delta$ ,%)	2,53	2,18	1,65	3,03	3,26	1,58	0,85	2,62	3,39	2,82	3,44	1,40	4,44	2,32	3,60	-0,50
FTS (3 цикла) ( $\delta$ ,%)	0,17	1,23	3,97	2,42	3,90	0,20	0,36	0,04	-1,89	2,45	3,28	-0,37	0,91	1,68	2,68	0,11
ASS (48ч) ( $\delta$ ,%)	2,33	1,46	0,82	1,58	3,29	2,09	1,61	1,29	2,56	2,32	0,83	-0,18	2,22	4,12	1,50	-0,87
LTS (1 месяц-не выше -70°C)	3,26	0,20	2,02	2,51	0,84	-0,90	-1,18	-0,66	2,72	1,75	-1,83	-0,84	2,74	2,49	5,78	-0,71

Таблица 8 - Результаты валидации методик определения ODASA и его метаболитов в биологических объектах животных

Аналит		ODASA				ODASA -M1				ODASA -M2			
Объект		Кровь	Плазма	Органы и ткани	Глаза	Кровь	Плазма	Органы и ткани	Глаза	Кровь	Плазма	Органы и ткани	Глаза
Аналитический диапазон (линейный)		20-20000 нг/мл	2-2000 нг/мл	20-20000 нг/г	80-80000 нг/г	10-10000 нг/мл	2-2000 нг/мл	10-10000 нг/г	40-40000 нг/г	1-1000 нг/мл	0,5-500,0 нг/мл	1-1000 нг/г	4-4000 нг/г
Селективность, % от LLOQ (макс.)		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Эффект переноса, % от LLOQ (макс.)		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Эффект матрицы (мин.-макс.)	RSD(NMF),%	2,86-5,96	5,80-11,15	1,12-6,54	3,13-3,60	3,05-8,27	5,27-10,28	0,921-0,973	5,21-6,40	3,09-3,93	7,41-9,71	0,912-0,978	5,58-7,51
	NMF	0,935-0,980	0,956-0,976	0,912-0,980	0,976-0,989	0,929-0,980	0,825-0,908	1,09-7,31	0,959-0,998	0,912-0,972	0,970-1,031	1,18-9,79	0,903-0,937
Правильность ( $\delta$ , %) (мин.-макс.)		-9,18-6,44	-4,66-8,31	-3,48-5,68	0,99-7,27	-5,52-10,39	-10,96-10,70	-2,31-7,97	-1,81-9,75	-12,03-11,45	-11,10-10,41	-5,40-5,23	-1,33-6,51
Прецизионность (RSD,%) (макс.)	LLOQ	8,18	12,39	7,07	4,13	10,74	16,47	8,97	7,78	10,34	18,20	10,25	9,88
	LQC, MQC, HQC	5,38	10,78	5,50	6,86	9,94	14,65	8,70	10,09	9,49	14,28	8,63	5,82
Воспроизводимость при повторном введении ( $\delta$ ,%) (мин.-макс.)	LLOQ	-6,08	11,38	4,13	-0,07	-2,90	4,50	-3,77	1,55	7,48	16,97	5,67	2,88
	LQC, MQC, HQC	-1,38-4,34	-1,61-4,76	0,23-6,42	1,44-6,35	-0,55-3,48	-2,14-2,38	-1,27-4,91	2,07-4,03	-7,34-5,07	-5,13-6,28	2,03-5,33	1,23-3,75
Эффект разведения ( $\delta$ ,%)		4,89	4,69	0,48	2,13	1,39	7,33	0,62	1,19	1,77	7,94	1,85	0,27
STS (24 ч) ( $\delta$ ,%) (мин.-макс.)		1,87-4,05	9,15-12,36	0,83-2,33	2,79-6,38	1,21-3,23	-1,66-10,12	-0,31-2,89	4,58-7,14	-12,90-12,43	5,10-10,01	-1,39-1,50	2,74-5,36
FTS (3 цикла) ( $\delta$ ,%) (мин.-макс.)		4,71-5,94	-0,85-0,44	1,61-4,73	-1,90-3,23	0,67-2,70	-5,21-4,98	4,15-6,54	2,34-3,12	-6,52-7,50	1,17-6,64	3,61-4,41	1,11-3,13
ASS (48ч) ( $\delta$ ,%) (мин.-макс.)		1,87-4,36	-3,21-0,39	-0,30-0,91	5,30-5,68	-1,81-6,51	2,39-0,78	0,97-2,19	3,35-7,03	-13,39-11,06	0,52-3,85	2,27-7,00	-0,16-1,18
LTS (1 месяц-не выше -70°C) ( $\delta$ ,%) (мин.-макс.)		2,27-5,08	-5,87-11,09	1,20-6,40	-2,09-0,48	-4,23-6,51	-4,68-4,71	-0,53-8,20	-4,67-4,27	-4,51-6,73	-7,07-4,43	-2,67-9,06	-0,26-3,64

Таблица 9 - Результаты валидации методики определения моноаминовых нейромедиаторов и их метаболитов в тканях мозга крыс

Параметр		Адреналин	NA	Допамин	5HT	5HIAA	DOPAC	HVA	VMA
Аналитический диапазон (линейная зависимость)		50-1200 нг/г	50-1200 нг/г	1,25-30,00 мкг/г	75-1800 нг/г	150-3600 нг/г	200-4800 нг/г	80-1920 нг/г	67,5-1620,0 нг/г
Селективность, % (макс)*		0	0	0	0	0	0	0	0
Эффект переноса, % (макс)**		0	0	0	0	0	0	0	0
Правильность (δ,%) (мин.-макс.)	LLOQ	-14,56-12,73	-5,79-9,61	-9,58-6,51	-17,36-10,94	3,52-16,19	12,96-15,69	-13,32-1,01	0,42-17,88
	LQC, MQC, HQC	-12,33-4,51	-9,96-1,75	-9,00-0,89	-13,02-3,97	-13,93-14,60	-2,39-8,07	-1,02-12,17	-3,18-10,87
Прецизионность (RSD,%) (макс.)	LLOQ	13,05	12,11	13,48	7,00	9,49	7,62	11,90	7,97
	LQC, MQC, HQC	9,26	9,06	10,04	5,01	10,62	9,49	9,11	3,96
Воспроизводимость при повторном введении (δ,%) (мин.-макс.)		-5,59-13,80	-8,61-9,60	-4,04-4,27	-16,18-10,41	-3,01-9,77	-1,77-14,63	-11,73-8,94	0,67-7,75
Эффект разведения	δ, %	-6,23	-9,27	-5,01	-5,29	-10,24	-6,42	-8,83	-6,64
	RSD, %	4,63	4,05	3,60	5,88	2,77	3,97	4,68	4,24
STS (24 ч) (δ,%)	LQC	0,88	-3,42	-0,15	-8,20	-3,07	-2,20	-0,99	1,79
	HQC	0,47	-5,97	-2,49	-9,36	5,85	2,21	3,88	7,47
FTS (3 цикла) (δ,%)	LQC	0,60	1,04	1,40	-4,44	-2,74	0,69	2,62	5,00
	HQC	3,22	-3,22	3,04	-2,37	1,48	1,13	2,01	7,44
ASS (48ч) (δ,%)	LQC	2,81	-1,58	-1,24	-3,79	-0,39	0,65	1,47	0,41
	HQC	2,48	-4,04	-3,78	-6,18	0,83	-2,05	0,79	4,58
LTS (1 месяц-не выше -20°C) (δ,%)	LQC	3,11	0,12	4,84	-4,50	-1,59	2,41	2,43	-3,01
	HQC	2,25	-0,92	0,74	-1,30	-1,25	-2,16	-1,35	-1,15
Примечание: * % от площади пика образца LLOQ в холостом образце мозга, хранившемся более 2 лет в морозильной камере; ** % от площади пика образца LLOQ в растворителе (метаноле)									

Методика определения моноаминовых нейромедиаторов и их метаболитов в тканях мозга крысы была использована при изучении ФД новых ингибиторов MAO-B S9 и S13. Установлено, что данные соединения способны повышать уровень допамина в стриатуме крыс, пораженных нейротоксином 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридином. При этом снижались концентрации метаболитов DOPAC и HVA. По силе фармакологического эффекта в рамках данного эксперимента эти соединения были сопоставимы с разагилином. Применение S9 и S13 не влияло на концентрации субстратов MAO-A, что позволяет судить о селективности их действия. Поэтому их дальнейшее доклиническое изучение является актуальным.

Надежность полученных результатов подтверждена в ходе проведения ISR-тестов образцов исследований фармакокинетики R004, ODASA, TFISA и их метаболитов и фармакодинамики S9 и S13. Испытания проводились отдельно для плазмы крысы и кролика, крови крысы и кролика, а также каждого органа и ткани крысы. Их результаты для всех аналитов соответствовали установленным требованиям. Таким образом, предложенный подход к разработке биоаналитических методик позволяет подобрать оптимальные меры для обеспечения стабильности и достоверного количественного определения химически неустойчивых соединений в образцах биологических объектах лабораторных животных.

Основные подходы к проведению биоаналитических исследований нестабильных соединений сформулированы после выполненных экспериментальных исследований. В процессе разработки методик для исследований фармакокинетики R004, TFISA и ODASA выполнялись предварительные испытания стабильности аналитов в образцах в течение 24 ч при комнатной температуре, 3 циклов заморозки/разморозки, как и в предложенных ранее для плазмы крови человека подходах. Дополнительно изучалось разложение аналитов после 24 ч хранения обработанных проб в автосемплере, опираясь на данные, полученные в исследовании OXSA и его N-гидроксиметаболита в цельной крови. Предварительные эксперименты, в отличие от предыдущего алгоритма, включали в себя 2 этапа. На стадии скрининга проводилась оптимизация мер для стабилизации аналитов в биоматериале на небольшом количестве проб – 2. Далее переходили к подтверждающим тестам с применением выбранных условий. При этом число проанализированных в ходе каждого испытания образцов доходило до 6.

Эксперименты STS, FTS, ASS выполняли на плазме, цельной и гемолизированной крови крысы и кролика, моче, а также надосадочной жидкости, полученной после центрифугирования гомогенатов кала, органов и тканей крысы. В случае разложения изучаемых веществ в интактном биоматериале тесты повторяли с добавлением к пробам растворов стабилизаторов. Общее количество скрининговых испытаний стабильности, выполненных при разработке методик для биоаналитических исследований R004, TFISA и ODASA, составило **316**, подтверждающих испытаний стабильности- **41**, скрининговых испытаний по оценке влияния распада метаболита

или КЛП на селективность определения других аналитов – **39**, подтверждающих испытаний по оценке влияния распада метаболита или КЛП на селективность определения других аналитов – **28**.

В процессе подбора мер для предотвращения разложения N-гидроксисульфонамидов в пробах экскретов рассчитывалась только их концентрация после проведения скрининговых тестов. Оценку селективности определения продуктов их деградации, производных сульфоновых кислот, проводили только на стадии подтверждения. Это привело к отрицательным результатам при разработке методики для ODASA и его метаболитов в пробах мочи и потребовало повторных испытаний с применением 10% раствора АК в той же пропорции. Полученные результаты соответствовали критериям приемлемости.

Таким образом, предварительное изучение химической стабильности веществ и влияния их распада на селективность определения других аналитов следует проводить параллельно. Одновременная оценка рекомендуется, если в пробах содержатся другие близкие по структуре заведомо стабильные вещества. Данный подход был применен при повторных подтверждающих тестах стабильности ODASA-M2 в моче крыс, когда вместе с N-гидроксипроизводным в пробах содержались ODASA и ODASA-M1.

Изучение стабильности аналитов после 3 циклов заморозки и разморозки проб достаточно длительное. Его продолжительность может составлять от 3 до 4 суток в отличие от тестов STS и ASS. Это задерживает процесс разработки методики. Практически во всех испытаниях на этапе скрининга и подтверждения результат (соответствует/не соответствует) более короткого испытания STS совпадал с результатом испытания FTS (314 совпадений из 316). Гипотеза о совпадении результатов испытаний STS и FTS была проверена с использованием критерия  $\chi^2$ . Расчеты проводились отдельно для изучения стабильности веществ и оценки влияния их разложения на селективность определения других аналитов в ходе скрининговых экспериментов. Различия между ожидаемыми и полученными результатами не являлись статистически значимыми: для стабильности -  $\chi^2=0,0127$ ;  $p= 0,91$ ; для селективности  $\chi^2=0,0$ ;  $p= 1,0$ . Таким образом, гипотеза о совпадении итогов испытаний STS и FTS была подтверждена для обоих видов исследований. Это позволяет исключить изучение стабильности аналитов после 3 циклов заморозки и разморозки из перечня скрининговых тестов при разработке методики (рисунок 5).

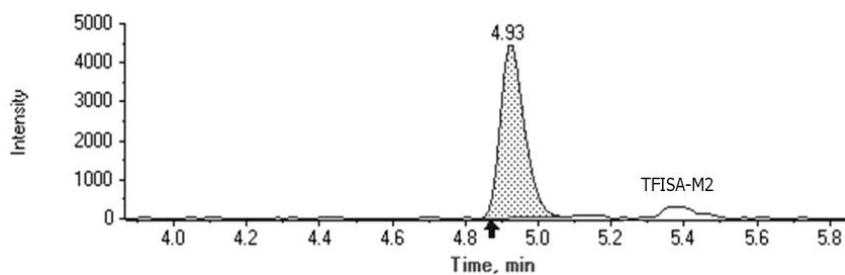
У сложных эфиров, амидов, лактонов, глюкуронидов, N-оксидов и других соединений возможно разложение не только в процессе хранения образцов, но и в процессе ионизации. Если есть необходимость совместного количественного определения этих веществ и продуктов их распада, то требуется изучить влияние фрагментации в источнике ионов неустойчивых веществ на селективность методики. N-ацетилметаболит TFISA-M2 был способен превращаться в TFISA

при анализе плазмы, крови, органов и тканей. Требуемая специфичность достигалась путем хроматографического разделения (рисунок 6).



Примечание: «+» положительный результат теста (85-115% от начальной концентрации аналита); «-» отрицательный результат теста

Рисунок 5 - Порядок проведения предварительных испытаний стабильности при разработке биоаналитической методики для анализа химически неустойчивых соединений



TFISA - 281 → 136 m/z

Рисунок 6 - Пример хроматограммы образца крови с концентрацией TFISA 20 нг/мл (LLOQ) и концентрацией TFISA-M2 100 нг/мл

Данную проверку возможно проводить путем анализа рабочих растворов аналитов без использования биоматериала. После выбора оптимальных условий подготовки проб и ВЭЖХ-МС/МС-определения, обеспечивающих достаточную чувствительность, избирательность и отсутствие переноса после предыдущего анализа, следует провести скрининговые тесты по изучению стабильности аналитов. Для плазмы, цельной крови и мочи выполняют испытания STS и ASS, для органов и тканей – в начале выполняют испытания SPS. В ходе начальных экспериментов целесообразно использовать по 2 модельные смеси на каждый способ предотвращения разложения, как для оценки химической устойчивости легкоразлагающихся веществ, так и для оценки влияния их распада на селективность методики. Из испытуемого образца отбирают две аликвоты: одну аликвоту обрабатывают и хранят 24 ч в автосемплере хроматографа для изучения ASS, вторую аликвоту инкубируют 24 ч при комнатной температуре или на ледяной бане для изучения STS. На подтверждающем этапе третью часть пробы подвергают 3 циклам заморозки продолжительностью от 12 до 16 ч и разморозки от 4 до 8 ч. При этом количество исследуемых модельных смесей увеличивается до 6 (рисунок 5). Расчеты содержания аналитов в рамках испытаний стабильности следует проводить методом внешнего стандарта с использованием свежеприготовленной пробы с той же концентрацией, а расчеты селективности после их обратной конверсии или распада - с использованием свежеприготовленной LLOQ-пробы. Количество образцов сравнения для каждого вида исследования – не менее 2.

При разработке методики для плазмы или крови разных видов животных в экспериментах следует использовать биоматериал всех изучаемых видов. Это необходимо из-за возможных различий активности ферментных систем и состава эндогенных соединений, которые могут повлиять на интенсивность разложения аналитов. При разработке методик для определения ксенобиотиков в органах и тканях испытания также следует проводить на пробах каждого биологического объекта. Так, в ходе оценки стабильности R004 в плазме степень гидролиза в образцах крысы была ниже, чем в образцах кролика. Добавление буферных растворов к биоматериалу нивелировало это различие. При подборе стабилизаторов для N-

гидроксипроизводных TFISA и ODASA в гомогенатах органов и тканей крыс разложение данных аналитов в пробах селезенки, сердца, легких удалось предотвратить при использовании 5% раствора АК в объемном соотношении 1:1 (раствор АК: супернатант гомогената), а в пробах печени, почек, мозга, кожи и мышц – при использовании 10% раствора АК.

При разработке методик также необходимо подтвердить отсутствие химического распада определяемых веществ в цельной крови, а также образцах цельных органов и тканей в течение короткого промежутка времени. При этом биоматериал целесообразно инкубировать на ледяной бане. Данное испытание необходимо проводить для всех соединений согласно требованиям международного руководства ICH M10. Оно позволит установить продолжительность интервала времени от отбора образца до его обработки или получения плазмы и применения мер по стабилизации.

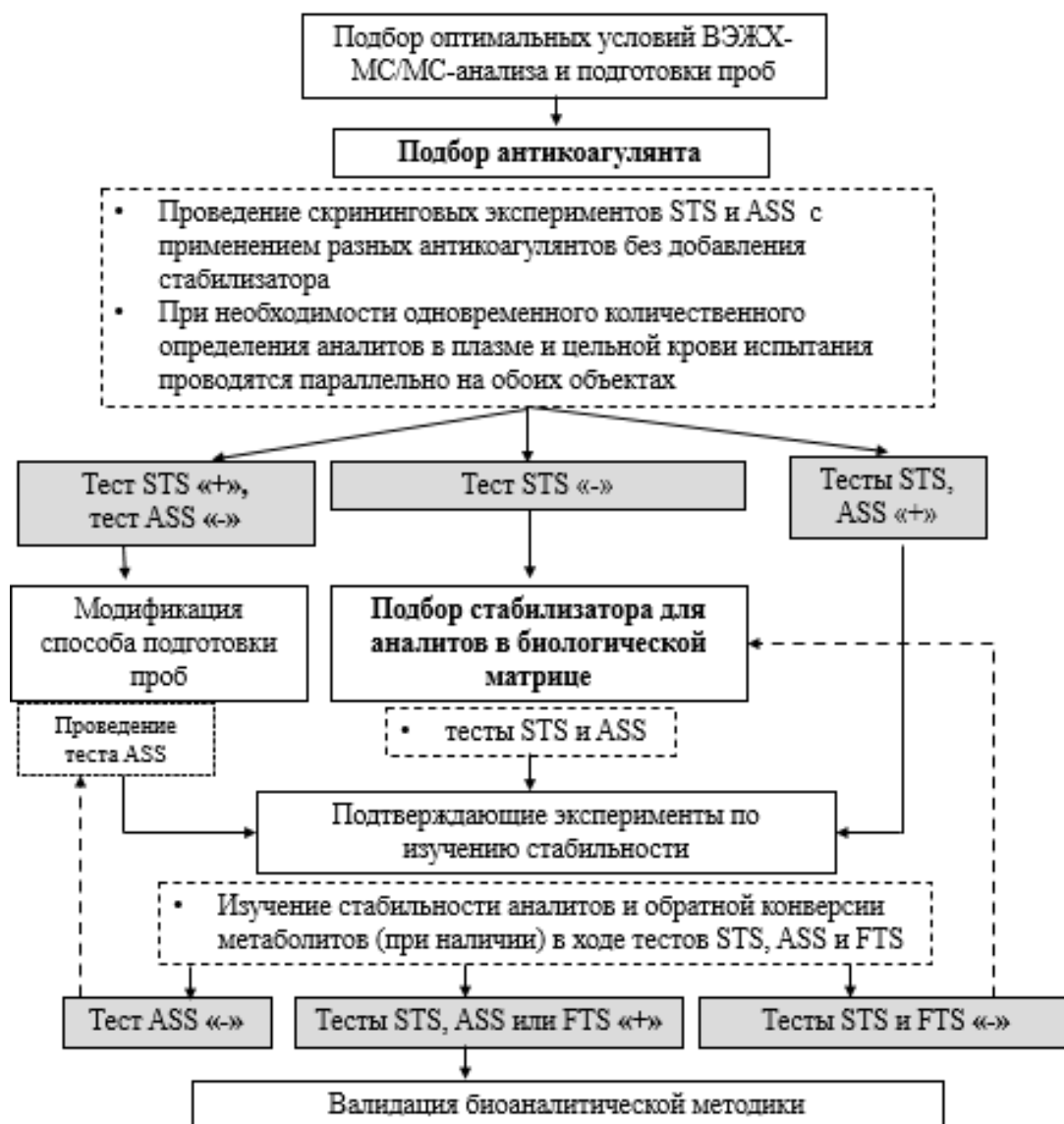
После завершения валидации необходимо составить подробные инструкции для сотрудников вивария по отбору образцов биоматериала животных. Точное выполнение выбранных мер по стабилизации проб гарантирует получение достоверных результатов фармакокинетических исследований.

Методика для количественного определения моноаминовых нейромедиаторов и их метаболитов в тканях мозга крыс была создана при сокращенном объеме скрининговых испытаний стабильности согласно рисунку 5: на начальном этапе изучалась SPS, STS и ASS на 2 пробах с каждой комбинацией, на подтверждающем этапе – SPS, STS, ASS, FTS на 6 пробах. При этом в рамках испытания SPS производные пирокатехина NA, Dop, Adr, DOPAC были стабильны. В итоге к супернатанту метанольного гомогената добавлялся 5% раствор АК в объемном соотношении 1:5 (АК: супернатант гомогената). Результаты всех валидационных испытаний и ISR- теста соответствовали установленным требованиям.

Изучение системной экспозиции действующего вещества и его метаболитов в плазме, как правило, является начальным этапом исследования фармакокинетики на лабораторных животных. Для этого требуется создание новых биоаналитических методик. При наличии среди изучаемых веществ продуктов конъюгации с глюкуроновой, серной или уксусной кислотой, N-оксидов, лактонов, лактамов и других неустойчивых соединений в процессе подбора параметров ВЭЖХ-МС/МС-определения необходимо убедиться в отсутствии влияния их обратной конверсии в процессе ионизации на селективность определения других аналитов.

Действующее вещество и его метаболиты могут разлагаться под действием УФ-излучения. Об этом будет известно уже при изучении стабильности активной фармацевтической субстанции до начала фармакокинетического исследования. Специальных мер химической стабилизации фотолabile соединений в биоматериале не существует. При отборе, подготовке и хранении проб, а также приготовлении основных и рабочих растворов аналитов

необходимо использовать светонепроницаемые расходные материалы и посуду. Также в лаборатории необходимо применять источники освещения, не выделяющие излучение в УФ-диапазоне, а также предотвращать прямое попадание солнечного света на образец.



Примечание: «+» положительный результат теста (85-115% от начальной концентрации аналита); «-» отрицательный результат теста

Рисунок 7- Алгоритм разработки методики для определения нестабильных соединений в плазме и крови

Для других групп неустойчивых веществ следует подобрать оптимальный антикоагулянт для отбора образцов путем проведения скрининговых испытаний стабильности STS и ASS. В случае изучения экспозиции аналитов также и в цельной крови, как в исследованиях TFISA и ODASA, данные тесты выполняются параллельно для обоих объектов (рисунок 7). При необходимости изучения фармакокинетики КЛП на двух и более видах животных эксперименты выполняют на биоматериале каждого вида.

По результатам тестов следует выбирать именно тот антикоагулянт, который обеспечил максимальную сохраняемость аналитов в цельной крови. В данном объекте выбор стабилизатора затруднителен из-за свертывания после добавления многих реактивов, таких как растворы АК, ацетата аммония, натрия пиросульфита и натрия сульфита с концентрациями выше 5%. Так, для исследования TFISA вместо К<sub>3</sub>ЭДТА была использована смесь NaF и K<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, которая предотвращала разложение N-гидроксиметаболита TFISA-M1 в образцах при проведении испытаний STS и FTS. Эксперименты по изучению стабильности целесообразно проводить как на пробах свежееотобранной крови, так и на размороженной крови. Например, концентрации N-гидроксисульфонида OXSA-M1 в образцах цельной крови после тестов STS и FTS были выше, чем в модельных образцах гемолизированной крови, хранившейся перед тестами около месяца в морозильной камере.

В случае значимого разрушения анализируемого вещества в образцах биологических жидкостей при использовании разных антикоагулянтов требуется применение растворов стабилизаторов. С этой целью также следует провести скрининговые тесты STS и ASS. Нужный реагент подбирается исходя из особенностей структуры аналита и механизма реакции его разложения. Для определения неустойчивых к окислению соединений к биопробам добавляют антиоксиданты, для определения неустойчивых к гидролизу соединений – буферные растворы с различным pH, для определения соединений с сульфгидрильными группами проводят их дериватизацию сразу после отбора и т.д. Необходимо выбрать концентрацию раствора стабилизатора, а также его соотношение с биологической жидкостью, как и в предложенных ранее подходах к разработке биоаналитических методик для плазмы крови человека. В начале следует идти по пути увеличения содержания реагента в растворе, а затем уже повышать соотношение с биоматериалом. Это минимизирует разведение пробы и, как следствие, снижение чувствительности методики. Если эти меры не дадут результатов, рекомендуется выполнить дериватизацию функциональной группы, подверженной химическому преобразованию. Так, фенольные гидроксилы можно модифицировать ацилированием пропионовым ангидридом, меркаптогруппу – алкилированием N-фенилмалеимидом и N-этилмалеимидом и другими реагентами, амидную группу – реакцией с гидросульфитом натрия.

Наряду с химической стабильностью аналита необходимо изучить возможность его обратного превращения в действующее вещество или другой аналит. Подобные испытания проводились для N-ацетилметаболизма TFISA-M2 и для метаболитов R004-M1 и R004-M2. Площадь пиков R004 и TFISA в соответствующих испытуемых образцах не превышала 20% от площади пика аналита в образце LLOQ.

Стабильность аналитов в пробе биологической жидкости не гарантирует их стабильность в приготовленной пробе в автосемплере (рисунок 7). Так, для предотвращения разложения

TFISA-M1 и ODASA-M2 метанольный супернатант крови дополнительно подкисляли муравьиной кислотой. Даже образцы данной биологической жидкости с добавкой  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  пришлось дополнительно стабилизировать 5% раствором  $\text{HCOOH}$  для надежного определения OXSA-M1.

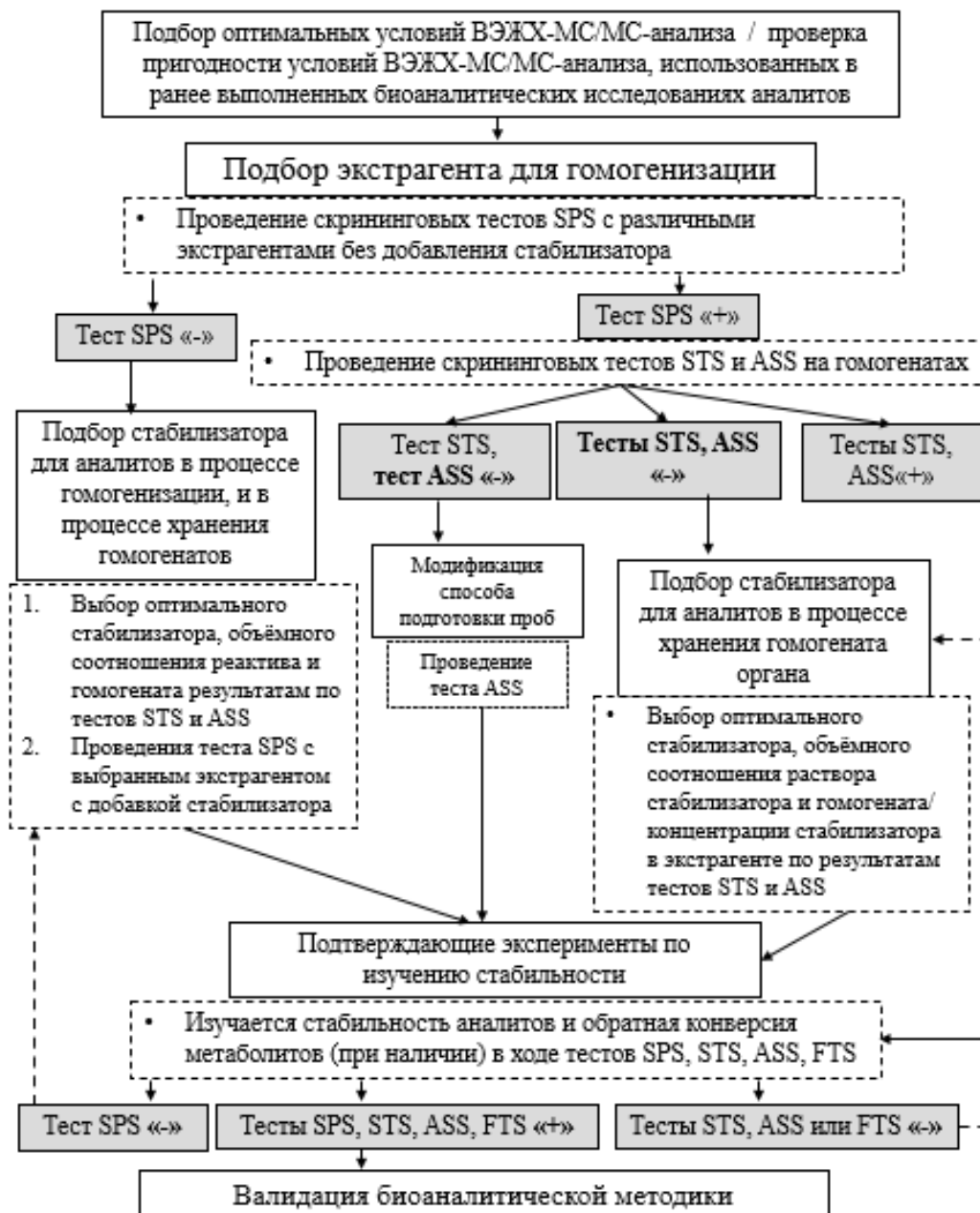
Если биоаналитическая методика разрабатывается только для плазмы, то следует подтвердить сохранность аналитов в цельной крови в течение короткого промежутка времени. Данное испытание обязательно для всех аналитов согласно руководству ICH M10. Оно позволит установить максимальный промежуток времени от отбора образца до его центрифугирования и добавления стабилизаторов.

После выбора антикоагулянта и других мер для предотвращения разложения аналитов в процессе подготовки и хранения образцов следует провести подтверждающие испытания STS, ASS, а также FTS. В случае отрицательных результатов следует выполнить корректировку выбранных условий и провести повторные тесты. Далее можно переходить к этапу валидации. Если методика разрабатывается для плазмы или крови двух и более видов животных и условия стабилизации, подготовки проб и ВЭЖХ-МС/МС-анализа совпадают, то возможно сократить объем испытаний согласно схеме на рисунке 2.

Для достоверного количественного определения химически неустойчивых аналитов в органах и тканях необходимо как можно быстрее гомогенизировать и стабилизировать образец. Хранение цельной пробы в морозильной камере приведет к разложению изучаемых веществ. Разработка методики, как и для других биологических объектов, начинается с подбора оптимальных условий ВЭЖХ-МС/МС-анализа. В случае полного изучения фармакокинетики КЛП могут быть использованы параметры, которые ранее применялись для плазмы или цельной крови, как в исследованиях R004, ODASA и TFISA. Далее необходимо выбрать экстрагент для извлечения определяемых веществ из биопроб, а также способ их подготовки к анализу (рисунок 8).

Скрининговые эксперименты по исследованию стабильности необходимо проводить на образцах каждого изучаемого биологического объекта. Это связано с различиями их ферментных систем и состава эндогенных веществ, которые могут повлиять на скорость распада аналитов. При работе со светочувствительными веществами необходимо предотвратить попадание на пробу УФ-лучей как в процессе отбора, так и в процессе экстракции, хранения и анализа. Первым целесообразно выполнить тест SPS, при котором проверяется отсутствие разложения изучаемых соединений в процессе гомогенизации биоматериала. В случае положительного результата можно переходить к испытаниям STS и ASS на гомогенатах биологических матриц или надосадочной жидкости, полученной после их центрифугирования (рисунок 8). Для экстракции аналитов из органов и тканей целесообразно использовать органические растворители. Так,

обработка образцов крыс ацетонитрилом позволила предотвратить гидролиз R004, а обработка образцов крыс метанолом, в отличие от физиологического раствора, замедляла разложение N-гидроксиметаболитов TFISA и ODASA. Если в ходе начальных тестов SPS получен отрицательный результат, то при гомогенизации требуется применение стабилизатора.



Примечание: «+» положительный результат теста (85-115% от начальной концентрации аналита); «-» отрицательный результат теста

Рисунок 8 - Алгоритм разработки методики для определения нестабильных соединений в органах и тканях крысы

В случае разложения аналита при SPS целесообразно начинать подбор стабилизатора по средством скрининговых тестов STS и ASS. Так, при разработке методик для TFISA, ODASA, моноаминовых нейромедиаторов и их метаболитов, в рамках короткого испытания SPS все неустойчивые соединения не успевали разлагаться. Во время длительных 24-часовых испытаний

STS и ASS наблюдалась их деградация. Эксперименты следует проводить на интактных пробах гомогенатов, полученных уже с применением экстрагента с добавкой стабилизатора. Это необходимо, так как в процессе обработки образца состав экстрагированных эндогенных веществ может измениться. Данное явление способно повлиять на скорость распада аналитов. Если в первую очередь будут подбираться условия для предотвращения разложения веществ в процессе гомогенизации, то после тестов STS и ASS может возникнуть необходимость применения дополнительных реагентов для обеспечения устойчивости данных соединений. Это замедлит производительность пробоподготовки.

В выполненных исследованиях реактив, с помощью которого достигнута краткосрочная стабильность аналитов в образцах при комнатной температуре, обеспечивал и стабильность данных соединений в обработанных образцах в автосемплере. В случае получения положительных результатов теста STS и отрицательных результатов теста ASS необходимо модифицировать методику пробоподготовки (рисунок 8).

На стабильность аналитов может влиять кратность разведения при приготовлении гомогената. Так, в образцах глаз, приготовленных в пропорции 1:3 (масса ткани: объем метанола), предотвратить разложение N-гидроксисульфонамидов TFISA-M1 и ODASA-M2 удалось при добавлении 5% раствора АК в объемном соотношении 1:5 (раствор АК: супернатант гомогената). К пробам других органов и тканей крысы, приготовленных в пропорции 1:1 (масса ткани: объем метанола), пришлось добавлять 10% раствор АК в большем количестве для достижения объемного соотношения 1:1 (раствор АК: супернатант гомогената). Более сильное разведение для получения гомогенатов глаз применялось из-за их маленьких размеров и объема получившегося гомогената.

Поскольку устранить разложение аналитов, пока экскременты еще не вывелись из организма животных невозможно, в рамках изучения экскреции необходимо проводить как прямое, так и косвенное определение данных веществ. В случаях, когда продукт распада соединения сам является метаболитом, как было в исследовании R004, целесообразно использовать более короткие интервалы для забора проб мочи и кала, особенно в первые сутки после начала эксперимента. Это позволит уменьшить вклад деградации «in-vitro» в результаты расчетов. Так, первый временной промежуток для отбора образцов кала составлял не 24 ч, а 12 ч после введения R004. Для мочи изменения временных точек не проводилось, так как в ходе экспериментов по идентификации метаболитов R004 было установлено, что данный аналит практически не выводится ренальным путем. По результатам исследования экскреции R004 обнаружено, что с фекалиями в виде R004-M1 выводилось около 0,2% действующего вещества, в том числе и при пероральном применении. Таким образом, гидролиз данного КЛП в процессе нахождения в ЖКТ являлся незначительным. Поэтому в использовании более коротких

интервалов пробоотбора или стабилизации сразу после испражнения животного не было необходимости. Если бы в ходе экспериментов по идентификации метаболитов аналитический сигнал R004-M1 в пробах кала был намного выше, чем у R004-M2, то для выбора оптимальной продолжительности временных промежутков потребовалось бы изучение стабильности R004 в цельных фекалиях до гомогенизации.

В случае N-гидроксипроизводных TFISA и ODASA в экспериментах по идентификации метаболитов продукты их разложения не были обнаружены в плазме и крови животных. Данные соединения не образуются в организме и нециркулируют в системном кровотоке. Следовательно, процесс разложения TFISA-M1 и ODASA-M2 происходит в кишечнике или мочевыводящих путях. Он не характеризует какие-либо особенности метаболизма изучаемых препаратов. Концентрация производных сульфоновых кислот TFISA-M3 и ODASA-M3 в пробах ситуационно зависит от продолжительности нахождения экскрементов в организме крысы. Даже в случае немедленной стабилизации образца после мочеиспускания или дефекации соотношение содержания TFISA-M1/ TFISA-M3 и ODASA-M2/ ODASA-M3 в биоматериале будет всегда разным. Данные результаты не воспроизведутся при повторном введении тем же самым животным. Поэтому в расчетах доли действующего вещества и метаболитов в кумулятивной экскреции производные сульфоновых кислот не учитывались, и их концентрации полностью пересчитывались на концентрации соответствующих N-гидроксиметаболитов.

При изучении экскреции R004, TFISA и ODASA с момента испражнения животного до момента обработки пробы могло пройти до 24 ч. Поэтому в точном определении максимального промежутка времени от получения образцов до применения мер по стабилизации не было необходимости. В рамках выполненных исследований он был фиксированным и не превышал 15 мин. после окончания интервала отбора.

Разработку методики для количественного определения потенциально нестабильных соединений в пробах мочи целесообразно начинать с экспериментов STS и ASS в биоматериале без добавки каких-либо реактивов (рисунок 12). В случае отрицательного результата теста STS возникает необходимость дополнительно проводить измерение концентрации продуктов их разложения. При этом, возможно, потребуются изменение параметров ВЭЖХ-МС/МС-анализа, а также подготовки проб. Так, при создании методик для исследований экскреции TFISA и ODASA на MRM-хроматограммах производных сульфоновых кислот TFISA-M3 и ODASA-M3 появлялись пики действующих веществ. При этом разрешение между пиками аналитов было меньше 1,5. Для надежного детектирования был изменен состав водного компонента подвижной фазы, а также программа градиентного элюирования. Это позволило разделить данные соединения (рисунки 9, 11). После применения новых параметров хроматографического

разделения фрагментация TFISA-M2 в процессе ионизации практически отсутствовала (рисунок 10).

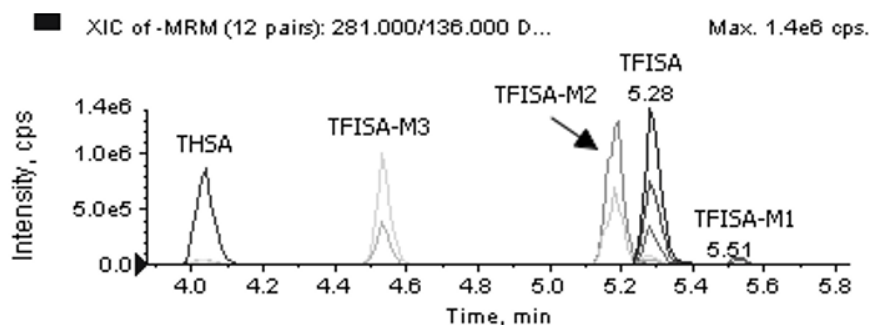


Рисунок 9 - Пример хроматограммы калибровочного образца мочи в новых условиях элюирования

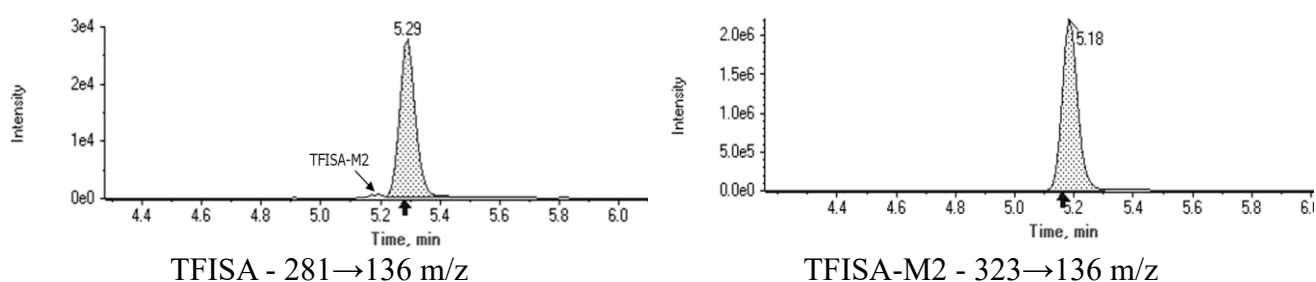


Рисунок 10 - Пример хроматограммы образца мочи с концентрацией TFISA 10 нг/мл (LLOQ) и концентрацией TFISA-M2 10000 нг/мл

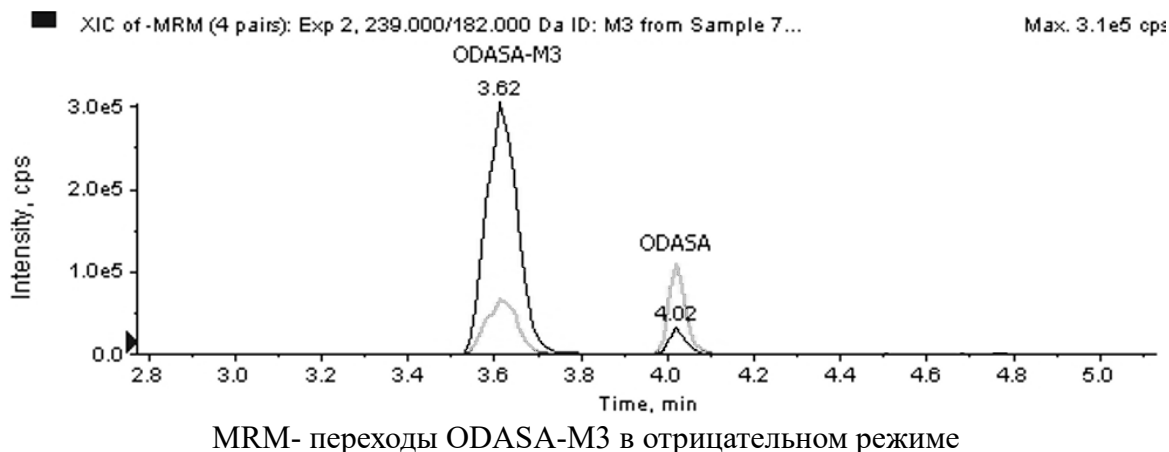
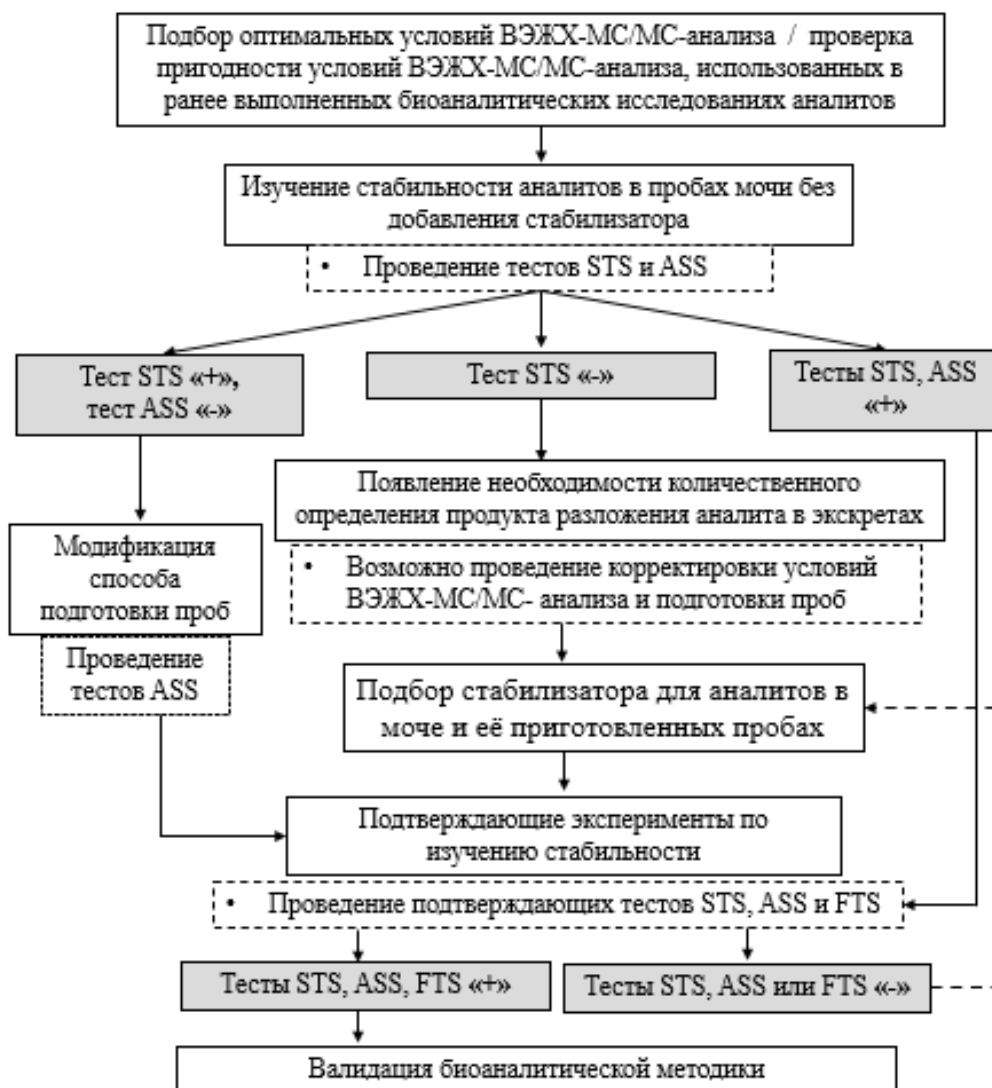


Рисунок 11 - Примеры хроматограмм калибровочных образцов мочи крысы, содержащих ODASA и его метаболиты

На следующем этапе необходимо выполнить подбор раствора стабилизатора, его концентрации или величины pH, а также объемного соотношения, в котором он добавляется к биологической жидкости. Так, при исследовании R004, неустойчивого к ферментативному гидролизу, производилось снижение pH среды с использованием 250мМ раствора ацетата аммония (pH=4,0). Разложение данного аналита, вероятно, вызвано защелачиванием мочи как в процессе отбора холостых образцов, так и в процессе испытаний STS и FTS при комнатной температуре.



Примечание: «+» положительный результат теста (85-115% от начальной концентрации аналита); «-» отрицательный результат теста

Рисунок 12 - Алгоритм разработки методики для определения нестабильных соединений в моче крысы

На этапе скрининга целесообразно оценивать не только концентрацию неустойчивого аналита в рамках испытаний ASS и STS, но и влияние его распада на селективность определения продуктов разложения. При этом площадь пика производных нестабильного соединения в испытуемых образцах не должна превышать 20% от их площади в LLOQ-образцах, как и при изучении обратной конверсии метаболитов. После выбора окончательных мер по стабилизации изучаемых соединений необходимо провести подтверждающие испытания STS, FTS и ASS. В случае соответствия полученных результатов критериям приемлемости, проводится полная валидация методики (рисунок 12).

Порядок разработки биоаналитической методики для количественного определения нестабильных соединений в кале крысы практически совпадает с порядком, использованным для исследования органов и тканей. В фекалиях, как и в моче, требуется дополнительно измерять

концентрацию продукта разложения химически неустойчивого аналита, если он не входит в число метаболитов.

Следует отметить, что предварительное добавление стабилизаторов в тару для сбора экскрементов невозможно, так как объем экскрета заранее не известен. Пропорция «стабилизатор: экскремент» в каждом образце будет разной. Это исказит концентрацию аналитов и не позволит провести их корректное количественное определение.

При выполнении исследования был предложен новый, научно обоснованный методологический подход для сокращения количества валидационных тестов для одинаковых биоаналитических методик количественного определения нестабильных соединений (рисунок 2). Данный подход является универсальным и может быть использован для исследований химически устойчивых аналитов. Основаниями для его применения являются совпадение параметров хромато-масс-спектрометрического определения, стабилизации, подготовки проб, аналитических диапазонов и близость результатов изучения эффекта матрицы и селективности. Это позволяет сократить количество валидационных экспериментов. В случае расхождений следует выполнить полный объем испытаний для каждой матрицы. В нормативной документации также предусмотрена процедура частичной валидации в случае данных различий. Однако, ее объем не указан и требует обоснования.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

По итогам проведенных исследований кандидатов в лекарственные препараты для терапии ревматоидного артрита и открытоугольной глаукомы сформулирована новая научная концепция для анализа нестабильных соединений в биологических объектах животных. Все разработанные при этом методики являются оригинальными.

Эксперименты по выбору химических мер по стабилизации неустойчивых соединений предложено проводить в два этапа. На этапе скрининга следует опробовать все возможные способы и условия для предотвращения разложения изучаемых веществ в пробах и выбрать оптимальный вариант. При этом достаточно использовать 24-часовые тесты краткосрочной стабильности аналитов в образцах биоматериала и их стабильности в приготовленных образцах в автосемплере. Далее переходят к этапу подтверждения, где эксперименты повторяют с использованием выбранных условий на большем количестве проб. На данном этапе следует оценить устойчивость изучаемого соединения в пробах после 3 циклов их заморозки и разморозки. Также было показано, что сохранение концентрации в рамках допустимых интервалов 85-115% от номинального значения не гарантирует полное отсутствие распада аналита. Поэтому, если исследуемые вещества могут разлагаться с образованием других исследуемых веществ, на стадии скрининга параллельно с изучением стабильности необходимо

проводить изучение селективности методики. Данные меры были апробированы при создании методики измерения концентрации моноаминовых нейромедиаторов и их метаболитов в тканях мозга крыс.

В рамках предложенной концепции меры по стабилизации аналитов в биоматериале животных следует применять уже на этапе идентификации метаболитов кандидата в лекарственное средство. Для заведомо неустойчивых действующих веществ условия подготовки, хранения и анализа проб подбирают экспериментально. В случае, если в процессе биотрансформации могут образовываться легкоразлагающиеся производные изучаемого соединения, целесообразно применять способ для предотвращения разложения, опираясь на данные научных публикаций или опыт предыдущих исследований схожих по структуре аналитов.

Предложенные алгоритмы разработки биоаналитических методик для определения легкоразлагающихся соединений имеют различия в зависимости от биологического объекта. Так, при изучении крови и плазмы требуется выбрать оптимальный антикоагулянт. Для исследований мочи в данной стадии нет необходимости. При создании методик для органов, тканей и кала на начальном этапе вместе с испытаниями краткосрочной стабильности и стабильности в автосемплере проводят испытания стабильности аналитов в процессе гомогенизации. Меры по предупреждению распада неустойчивых соединений в биологических объектах можно подразделить на физические и химические. К физическим мерам относятся использование глубокой заморозки до температуры не выше  $-70^{\circ}\text{C}$  или не выше  $-90^{\circ}\text{C}$ , а также защита образца от попадания ультрафиолетового излучения. Последняя мера предназначена не только для фотолabileных, но и для легкоокисляющихся веществ, так как позволяет уменьшить количество свободных радикалов и других активных форм кислорода. Химические способы предусматривают добавление к биоматериалу специальных реактивов. К ним относятся антикоагулянты, растворы стабилизаторов, экстрагенты для приготовления гомогенатов органов и тканей, дериватирующие агенты.

Для изучения экскреции отдельных групп нестабильных соединений, продукт разложения которых не является метаболитом исследуемого кандидата в лекарственный препарат, требуется их косвенное определение. Предложенные меры обоснованы отсутствием возможности устранить распад неустойчивых соединений в мочевыводящих путях и кишечнике. Данный способ успешно апробирован при изучении экскреции N-гидроксисульфонамидов ингибиторов карбоангидразы TFISA и ODASA.

По результатам исследования был предложен методологический подход, позволяющий сократить объем валидационных тестов идентичных биоаналитических методик для схожих биологических матриц. Основаниями для его применения являются совпадение условий

хромато-масс-спектрометрического определения, стабилизации, подготовки проб, аналитических диапазонов и близости результатов изучения эффекта матрицы и селективности. Он предусматривает сокращение большей части испытаний стабильности за счет достаточного объема предварительных скрининговых и подтверждающих испытаний на этапе разработки. Надежность применения созданного подхода доказана в результате повторного анализа всех видов образцов животных, отобранных в ходе фармакокинетических и фармакодинамических исследований.

## ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. Предложен подход к проведению исследования по идентификации продуктов биотрансформации нестабильных кандидатов в лекарственные препараты и стабильных кандидатов в лекарственные препараты, потенциально образующих химически неустойчивые метаболиты, на животных. Он предусматривает применение мер для предотвращения разложения данных аналитов в биоматериале на протяжении всего исследования. Установлена необходимость выполнения второго повторного этапа введения изучаемых веществ и отбора биоматериала для подтверждения структуры обнаруженных метаболитов на свежих пробах.

2. Обоснован перечень и объем экспериментов по подбору условий для стабилизации неустойчивых соединений в биологических объектах. Данный процесс следует разделить на два этапа: скрининговый, на котором осуществляют апробацию возможных мер по предотвращению разложения, и подтверждающий, на котором воспроизводятся полученные результаты на большем количестве образцов. Тесты при этом следует проводить на пробах плазмы или крови каждого изучаемого вида, и на пробах каждого изучаемого органа и ткани животного. Положительные результаты испытаний стабильности аналита в процессе разработки биоаналитической методики не гарантируют полного отсутствия его разложения в пробе. В случае необходимости параллельного количественного определения продукта деградации легкоразлагающегося вещества на этапе скрининга следует оценивать селективность.

3. Разработаны методики количественного определения 3-(2-бутил-5-хлор-1*H*-имидазол-4-ил)-*N*-[4-метокси-3-(трифторметил)-фенил]-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоксамиды, 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида, 4-(5-метил-1,3,4-оксадиазол-2-ил)-бензолсульфонамида совместно с их основными метаболитами в биологических объектах лабораторных животных. Результаты их валидации соответствовали требованиям российской и международной нормативной документации.

4. Предложена новая методика количественного определения моноаминовых нейромедиаторов совместно с их основными метаболитами в тканях мозга крысы. Она создавалась с использованием перечня и объема скрининговых и подтверждающих испытаний, выбранных в ходе биоаналитических исследований кандидатов в лекарственные препараты для

лечения ревматоидного артрита и глаукомы. Отклонение среднего значения рассчитанных концентраций всех аналитов от теоретического в рамках валидационных испытаний стабильности находилось в диапазоне от -9,36 до 7,47%, что соответствовало установленным требованиям.

5. Разработан методологический подход, позволяющий сократить объем валидационных испытаний для идентичных биоаналитических методик определения нестабильных аналитов в биологических жидкостях разных видов животных и в разных органах одного вида животного. Основанием для его применения является соответствие результатов изучения эффекта матрицы и селективности, полученных на каждом виде биоматериала. Он предполагает проведение всего перечня тестов на одном из исследуемых биологических объектов и оценку внутрисерийной правильности и прецизионности, долгосрочной стабильности на оставшихся биологических объектах.

6. Проведена апробация и внедрение всех разработанных биоаналитических методик. Выполнены полные доклинические исследования фармакокинетики 3-(2-бутил-5-хлор-1*H*-имидазол-4-ил)-*N*-[4-метокси-3-(трифторметил)-фенил]-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоксамид, 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида, 4-(5-метил-1,3,4-оксадиазол-2-ил)-бензолсульфонамида, а также измерения уровня моноаминовых нейромедиаторов и их метаболитов в стриатуме крыс при оценке эффективности кандидатов в лекарственный препарат для терапии болезни Паркинсона. Надежность предпринятых для стабилизации аналитов мер доказана высокой воспроизводимостью результатов повторного анализа испытуемых образцов животных, полученных при выполнении фармакокинетических исследований. Концентрации более 94% реанализированных проб входили в требуемый интервал  $\pm 20\%$  от первоначального значения.

7. Предложен способ изучения экскреции легкоразлагающихся соединений, продукт разложения которых не является метаболитом. Он заключается в косвенном определении нестабильных аналитов в экскрементах животных с последующим пересчетом концентрации. Данный способ был апробирован в ходе фармакокинетического исследования 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида и 4-(5-метил-1,3,4-оксадиазол-2-ил)-бензолсульфонамида. Различия между введенным посредством внутривенной инъекции и элиминированным количеством данных соединений при расчете материального баланса находились в пределах погрешности метода.

8. Сформулирована концепция разработки методик для определения нестабильных соединений в различных видах биоматериала лабораторных животных. В рамках данной концепции предложены алгоритмы для выбора мер по предотвращению разложения неустойчивых аналитов в биологических жидкостях, экскрементах, органах и тканях. Их

применение позволяет подобрать оптимальные условия хранения и подготовки проб, а также ВЭЖХ-МС/МС-анализа легкоразлагающихся веществ при доклиническом изучении оригинальных лекарственных препаратов.

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. При проведении исследований по идентификации метаболитов новых фармакологически активных соединений в биоматериале животных рекомендуется выполнять пробоподготовку и анализ образцов сразу после их отбора. При этом будут минимизированы потери химически неустойчивых продуктов биотрансформации.

2. Гомогенизацию кала, органов и тканей животных рекомендуется выполнять с применением органических растворителей в случае необходимости количественного определения нестабильных аналитов в данных объектах.

3. Для предотвращения разложения ароматических производных N-гидроксисульфонида в биологических жидкостях и гомогенатах органов и тканей следует использовать водные растворы аскорбиновой кислоты.

4. При выявлении различий в величине нормализованного фактора матрицы или площади пиков с временем удерживания аналитов и внутренних стандартов в холостом образце на начальных этапах валидации идентичных биоаналитических методик для биологических жидкостей разных видов животных или органов и тканей одного вида животного рекомендуется внести изменения в процедуру подготовки, стабилизации проб или хромато-масс-спектрометрического определения. Это позволит воспользоваться оптимизированной схемой проведения валидации.

5. Исследования экскреции лекарственных средств для местного применения на животных предлагается проводить не только после терапевтического способа применения, но и после внутрибрюшинной или внутривенной инъекции. При данных способах введения вся доза препарата попадает в организм. Эта мера позволит получить достоверные результаты расчета материального баланса, а также выявить дополнительные пути выведения или наличие неидентифицированных метаболитов.

6. Разработанный подход для оптимизации объема валидационных испытаний идентичных биоаналитических методик рекомендуется применять при исследовании как нестабильных, так и химически устойчивых аналитов.

### **ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ**

Предложенная концепция разработки методик для определения нестабильных веществ в биологических объектах лабораторных животных может быть адаптирована для изучения образцов человека.

Разработанные методики количественного определения 3-(2-бутил-5-хлоро-1H-имидазол-4-ил)-N-[4-метокси-3-(трифторметил)-фенил]-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоксамид, 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида, 4-(5-метил-1,3,4-оксадиазол-2-ил)-бензолсульфонамида и их метаболитов возможно модифицировать для проведения первой фазы клинических исследований данных кандидатов в лекарственные препараты.

### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Изучение биотрансформации нового селективного ингибитора карбоангидразы II 4-(2-метил-1,3-оксазол-5-ил)-бензолсульфонамида / А.Л. Хохлов, **И.И. Яичков**, А.А. Шетнев, С.А. Ивановский, М.К. Корсаков, О.А. Гасилина, Н. Н. Вольхин, С.С. Петухов // **Фармация и фармакология**. -2023.- Т.11, №3.- С.240-254. - DOI: 10.19163/2307-9266-2023-11-3-240-254 [Scopus].

2. Development of quantification methods of a new selective carbonic anhydrase II inhibitor in plasma and blood and study of the pharmacokinetics of its ophthalmic suspension in rats/ A.L. Khokhlov, **I.I. Yaichkov**, M.K. Korsakov, A.A. Shetnev, N.N. Volkhin, S.S. Petukhov // **Research Results in Pharmacology**. – 2023.- V. 9, №4.- P. 53–64. - DOI: 10.18413/rrpharmacology.9.10056 [Scopus].

3. Разработка и валидация методики количественного определения моноаминовых нейромедиаторов и их метаболитов в тканях мозга крыс с помощью ВЭЖХ-МС/МС/ А.Л. Хохлов, **И.И. Яичков**, М.К. Корсаков, И.Н. Каграманян, Н.Н. Вольхин, С.С. Петухов, В.Е. Зайкова // **Acta Biomedica Scientifica**. -2024. -Т.9, №1.- С.177-191. - DOI: 10.29413/ABS.2024-9.1.18 [Scopus].

4. Identification and synthesis of metabolites of the new antiglaucoma drug / A.L. Khokhlov, **I.I. Yaichkov**, M.K. Korsakov, S.A. Ivanovsky, M.K. Korsakov, M.A. Alexeev, O.A. Gasilina, N.N. Volkhin, S.S. Petukhov // **Research Results in Pharmacology**. -2024. -V.10, №1. -P. 53–66. - DOI: 10.18413/rrpharmacology.10.431 [Scopus].

5. Разработка и валидация методики количественного определения 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида и его метаболитов в плазме лабораторных животных/ **И.И. Яичков**, М.К. Корсаков, А.А. Шетнев, Н.Н. Вольхин, С.С. Петухов // **Разработка и регистрация лекарственных средств**. – 2024. – Т.13, №3. -С.219–230. - DOI: 10.33380/2305-2066-2024-13-3-1771 [Scopus].

6. Identification and synthesis of metabolites of the new 4,5-dihydroisoxazol-5-carboxamide derivate / A.L. Khokhlov, **I.I. Yaichkov**, M.A. Alexeev, M.K. Korsakov, A.A. Shetnev, S.A. Ivanovsky, N.N. Volkhin, S.S. Petukhov, E.A. Vasilyeva // **Research Results in Pharmacology**. – 2024. -V.10, №2. -P. 83–95. – DOI: 10.18413/rrpharmacology.10.482 [Scopus].

7. Изучение фармакокинетики нового производного 4,5-дигидроизоксазол-5-карбоксамид на крысах/ **И.И. Яичков**, М.К. Корсаков, Н.Н. Вольхин, С.С. Петухов, А.Н. Тюшина, В.Е. Зайкова, О.Э. Лазарянц // **Разработка и регистрация лекарственных средств**. -2024. -Т.13, №4. – С. 238-250. – DOI: 10.33380/2305-2066-2024-13-4-1876 [Scopus].

8. Identification and synthesis of metabolites of 4-(5-methyl-1,3,4-oxadiazole-2-yl)-benzenesulfonamide / A.L. Khokhlov, **I.I. Yaichkov**, A.A. Shetnev, V.A. Panova, Y.A. Efimova, S.A. Ivanovskiy, M.K. Korsakov, N.N. Vol'khin, S.S. Petukhov // **Research Results in Pharmacology**. - 2024.-V.10, №4.- P. 15–27. - DOI: 10.18413/rrpharmacology.10.498 [Scopus].

9. The evaluation of pharmacokinetic parameters of 4-(5-methyl-1,3,4-oxadiazole-2-yl)-benzenesulfonamide and its metabolites in rat plasma/ A.L. Khokhlov, **I.I. Yaichkov**, A.A. Shetnev,

M.K. Korsakov, N.N. Volkhin, S.S. Petukhov, A.N. Tyushina, O.E. Lasaryanz // **Research Results in Pharmacology**. – 2024. – V.10, №4. -P. 67–76.- DOI: 10.18413/rrpharmacology.10.523 [Scopus].

10. Изучение фармакокинетики нового производного изоксазола на крысах с применением ВЭЖХ-МС/МС для анализа проб крови/ **И.И. Яичков**, А.Л. Хохлов, М.К. Корсаков, В.Е. Зайкова, О.Э. Лазарянц // **Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств**. - 2024. -Т.14, №3. -С. 304–316. - DOI: 10.30895/1991-2919-2024-14-3-304-316.

11. Изучение экскреции нового производного 4,5-дигидроизоксазол-5-карбоксамида/ **И.И. Яичков**, М.К. Корсаков, Н.Н. Вольхин, В.Е. Зайкова, О.Э. Лазарянц // **Разработка и регистрация лекарственных средств**. – 2025. -V.14, №2. – С.193-203.- DOI: 10.33380/2305-2066-2025-14-2-1916 [Scopus].

12. Изучение экскреции 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида на крысах/ **И.И. Яичков**, А.Л. Хохлов, М.К. Корсаков, Н.Н. Вольхин, С.С. Петухов, О.Э. Лазарянц, А.В. Коровина // Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств. 2025. -DOI: 10.30895/1991- 2919-2025-697.

13. Изучение распределения 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида и его метаболитов на крысах / **И.И. Яичков**, А.Л. Хохлов, М.К. Корсаков, Н.Н. Вольхин , С.С. Петухов , В.Е. Зайкова, О.Э. Лазарянц // **Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств**. -2025.- V.15, №3. -С. 301-312. -doi:10.30895/1991-2919-2025-743

14. The study of systemic exposition of 4-(5-methyl-1,3,4-oxadiazole-2-yl)-benzenesulfonamide in blood on rats / A.L. Khokhlov, **I.I. Yaichkov**, A.A. Shetnev, M.K. Korsakov, N.N. Volkhin, S.S. Petukhov, A.N. Tyushina, O.E. Lasaryanz// **Research Results in Pharmacology**. – 2025.- V.11, №2. – P. 100–111. - <https://doi.org/10.18413/rrpharmacology.11.529> [Scopus].

15. Изучение распределения нового производного 4,5-дигидроизоксазол-5-карбоксамида на крысах/ **И.И. Яичков**, М.К. Корсаков, Н.Н. Вольхин, С.С. Петухов, А.Н. Тюшина, В.Е. Зайкова, О.Э. Лазарянц // Разработка и регистрация лекарственных средств.- 2025- Т.14,№4. -204-215. - <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-4-1879> [Scopus].

16. The excretion study of 4-(5-methyl-1,3,4-oxadiazole2-yl)-benzenesulfonamide in rats / A.L. Khokhlov, **I.I. Yaichkov**, A.A. Shetnev, M.K. Korsakov, N.N. Volkhin // Research Results in Pharmacology. - 2025.- Vol. 11. -№4. -DOI:10.18413/rrpharmacology.11.524 [Scopus].

17. Идентификация метаболитов нового селективного ингибитора карбоангидразы II 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида / **И.И. Яичков**, А.А. Шетнев, Н.Н. Вольхин, С.С. Петухов, О.А. Гасилина // **Кардиоваскулярная терапия и профилактика**. -2024. -Т. 23, № S6.- С. 115.

18. **Яичков, И.И.** Изучение экскреции 4-(5-метил-1,3,4-оксадиазол-2-ил)-бензолсульфонамида и его метаболитов на крысах после внутрибрюшинного введения / **И.И. Яичков**, Н.Н. Вольхин, С.С. Петухов // **Кардиоваскулярная терапия и профилактика**. -2025. - Т. 24, № S6. -С. 142.

19. Идентификация продуктов биотрансформации 3-(2-бутил-5-хлоро-1H-имидазол-4-ил)-N-[4-метокси-3-(трифторметил)фенил]-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоксамида/ **И.И. Яичков**, М.А. Алексеев, Н. Н. Вольхин, С.С. Петухов- Текст: непосредственный // **Биохимия человека**. Материалы всероссийской конференции с международным участием. -М.: Е-нот, 2024. -С. 310.

20. **Яичков, И.И.** Изучение экскреции 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида и его метаболитов на крысах при внутрибрюшинном способе введения / **И.И. Яичков**, Н.Н. Вольхин- Текст: непосредственный // Актуальные направления исследований в области химии и биофармацевтических технологий. Сборник научных статей II

межрегионального форума «Дороговские чтения». – Ярославль: ЯГПУ им. К.Д. Ушинского, 2025.-С.125-134.

21. **Яичков, И.И.** Разработка методики количественного определения 4-(5-метил-1,3,4-оксадиазол-2-ил)-бензолсульфонамида и его метаболитов в органах и тканях крысах методом ВЭЖХ-МС/МС/ И.И. Яичков - Текст: непосредственный // **Актуальные вопросы медицинской науки.** – 2025. - № 1 (3). - С. 211-212.

22. **Яичков, И.И.** Изучение фармакокинетики капсул 3-(2-бутил-5-хлоро-1Н-имидазол-4-ил)-N-[4-метокси-3-(трифторметил)фенил]-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоксамиды на кроликах / И.И. Яичков- Текст: непосредственный // Тезисы XII Всероссийской конференции с международным участием «Актуальные вопросы доклинических и клинических исследований лекарственных средств и клинических испытаний медицинских изделий». - СПб.: Медиапайп, 2025. - С. 157.

23. **Яичков, И. И.** Изучение относительной биодоступности глазной суспензии 4-(5-метил-1,3,4-оксадиазол-2-ил)-бензолсульфонамида на кроликах/ **И.И. Яичков, Н.Н. Вольхин, С.С. Петухов, О.Э. Лазарянец** // Медицинская этика.- 2025. -№4.-. DOI: 10.24075/medet.2025.020

24. **Яичков, И.И.** Изучение фармакокинетики и относительной биодоступности глазной суспензии 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида на кроликах / **И.И. Яичков.** -Текст: непосредственный// XII Международная конференция молодых ученых: биоинформатиков, биотехнологов, биофизиков, вирусологов, молекулярных биологов и специалистов фундаментальной медицины — Новосибирск : ИПЦ НГУ, 2025. — 748-749 с.

#### **Иные публикации по теме диссертации**

1. **Яичков, И.И.** Практические аспекты проведения доклинических исследований фармакокинетики: учебное пособие для студентов / И.И. Яичков. -Ярославль: ЯГМУ, 2025. – 38 с.- Режим доступа: [http://gw.yma.ac.ru/elibrary/edoc/edoc2025\\_10\\_1.pdf](http://gw.yma.ac.ru/elibrary/edoc/edoc2025_10_1.pdf).

2. **Яичков, И.И.** Современные методы количественного определения низкомолекулярных соединений в биологических аспекта: учебное пособие для студентов / И.И. Яичков. -Ярославль: ЯГМУ, 2025. – 35 с.- Режим доступа: [http://gw.yma.ac.ru/elibrary/edoc/edoc2025\\_10\\_3.pdf](http://gw.yma.ac.ru/elibrary/edoc/edoc2025_10_3.pdf).

#### **Патенты на изобретение**

1. Патент на изобретение №2843964, Российская Федерация, С1, МПК G01N 30/02, G01N 30/46, G01N 30/72, G01N 33/15, А61К 31/34, А61К 31/42. Способ определения концентрации 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида, N-гидрокси-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида и N-ацетил-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида в плазме крови крысы/ - **И.И. Яичков, А.А. Шетнев, М.К. Корсаков.** Патентообладатель: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации. – 2024107644, заявл. 22.03.2024; опублик.22.07.2025.

2. Патент на изобретение №2843963, Российская Федерация, С1, МПК G01N 30/04, G01N 30/60, G01N 30/72. Способ определения концентрации 3-(2-бутил-5-хлоро-1Н-имидазол-4-ил)-N-[4-метокси-3-(трифторметил)фенил]-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоксамиды, 3-(2-бутил-5-хлоро-1Н-имидазол-4-ил)-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоновой кислоты и 4-метокси-3-(трифторметил)анилина в плазме крови крысы/ - **И.И. Яичков, М.К. Корсаков.** Патентообладатель: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации. – 2024120788, заявл. 19.06.2024; опублик. 22.07.2025.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- ASS** - стабильность в приготовленных пробах в автосеплере
- CE** - энергия соударения
- ESI** - электрораспылительная ионизация
- FTS** - стабильность после 3 циклов заморозки/разморозки
- HQC** - образец контроля качества верхнего уровня концентраций
- LLOQ** - нижний предел количественного определения
- LQC** - образец контроля качества нижнего уровня концентраций
- LTS** - долгосрочная стабильность
- MRM** - мониторинг множественных реакций
- MQC** - образец контроля качества среднего уровня концентраций
- NMF** - нормализованный фактор матрицы
- ODASA** - 4-(5-метил-1,3,4-оксадиазол-2-ил)-бензолсульфонамид
- ODASA-M1** - 4-[5-(гидроксиметил)-1,3,4-оксадиазол-2-ил]-бензолсульфонамид
- ODASA-M2** - N-гидрокси-4-(5-метил-1,3,4-оксадиазол-2-ил)-бензолсульфонамид
- ODASA-M3** - 4-(5-метил-1,3,4-оксадиазол-2-ил)-бензолсульфоновая кислота
- OXSA** - 4-(2-метил-1,3-оксазол-5-ил)-бензолсульфонамид
- OXSA-M1** - N-гидрокси-4-(2-метил-1,3-оксазол-5-ил)-бензолсульфонамид
- R004** - 3-(2-бутил-5-хлор-1H-имидазол-4-ил)-N-[4-метокси-3-(трифторметил)-фенил]-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоксамид
- R004-M1** - 3-(2-бутил-5-хлор-1H-имидазол-4-ил)-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоновая кислота
- R004-M2** - 4-метокси-3-(трифторметил)-анилин
- S пика** - площадь хроматографического пика
- SPS** - стабильность в процессе гомогенизации
- STS** - краткосрочная стабильность
- TFISA** - 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид
- TFISA-M1** - N-гидрокси-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид
- TFISA-M2** - N-ацетил-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид
- TFISA-M3** - 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфоновая кислота
- tr** - время удерживания
- АК** - аскорбиновая кислота
- БТ** – биотрансформация
- ВС** - внутренний стандарт
- ВЭЖХ-МС/МС** - высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемным масс-спектрометрическим детектированием
- ИКАП** - ингибиторы карбоангидразы II типа
- КЛП**-кандидат в лекарственный препарат
- ЛС** - лекарственное средство
- МАО-В** - моноаминоксидаза типа В
- ОБ** - относительная биодоступность
- ПФ** - подвижная фаза
- УФ** - ультрафиолетовое излучение
- ФК** – фармакокинетика