

На правах рукописи



Савицкий Марк Владиславович

**Клинико-экспериментальная фармакокинетика нового антибактериального средства
Фтортиазинон**

3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Москва – 2024

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Научные руководители:

доктор фармацевтических наук, доцент
кандидат химических наук

Тарасов Вадим Владимирович
Апполонова Светлана Александровна

Официальные оппоненты:

Калёкин Роман Анатольевич – доктор фармацевтических наук, федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский центр судебно-медицинской экспертизы» Министерства здравоохранения Российской Федерации, лаборатория судебно-химических и химико-токсикологических исследований, заведующий лабораторией

Маркин Сергей Сергеевич – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича», главный научный сотрудник

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Смоленский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «22» октября 2024 г. в 14:00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.001.20 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной учебной библиотеке ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, Зубовский бул., д. 37/1 и на сайте организации: <https://sechenov.ru>.

Автореферат разослан «___» _____ 2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
Доктор медицинских наук, профессор

Дроздов Владимир Николаевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Снижение чувствительности бактерий к антибиотикам повышает риски, связанные с получением медицинской помощи, и коморбидность пациентов с хроническими заболеваниями, что снижает эффективность лечения и увеличивает затраты системы здравоохранения (Dadgostar, 2019; Shrestha и др., 2018). Терапия инфекций, вызванных устойчивыми штаммами, включает использование антибиотиков и антибактериальных средств, которые оказывают селективное воздействие на бактериальную популяцию и стимулируют появление новых антибиотикорезистентных штаммов, поэтому существует потребность в новых лекарственных средствах с иным механизмом воздействия (Akash и др., 2020; Pfeifer и др., 2010).

В ФГБУ «Национальном исследовательском центре эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России был разработан инновационный лекарственный препарат фтортиазинон (ФТ), низкомолекулярный ингибитор системы секреции III типа, фактора вирулентности многих грамотрицательных бактерий, и жгутиковой подвижности. Благодаря ингибированию факторов вирулентности, бактерии теряют способность оказывать токсическое влияние на организм хозяина. Несмотря на то что при таком воздействии не происходит полное уничтожение патогена, подавление факторов вирулентности блокирует токсическое влияние патогена, а также препятствует развитию резистентных инфекций и снижает вероятность передачи механизмов резистентности (Rasko & Sperandio, 2010; Rello и др., 2016).

Исследования показали, что субстанция ФТ подавляет острые и хронические инфекции, вызванные *Chlamydia trachomatis*, *Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* и *Escherichia coli in vivo* (Bondareva и др., 2022; Koroleva и др., 2023; Sheremet и др., 2018; Tsarenko и др., 2023; Zigangirova и др., 2016, 2021). Введение ФТ увеличивает выживаемость лабораторных животных, обеспечивает эрадикацию возбудителя из крови и органов, снижает проявление патоморфологических нарушений и иммунодефицита, а также ограничивает развитие патологического воспалительного ответа в исследованных моделях.

Важным этапом разработки инновационного лекарственного средства является изучение его экспериментальной и клинической фармакокинетики. Исследование всасывания, распределения, метаболизма и выведения нового лекарственного средства необходимо для разработки схемы лечения, выбора дозы, а также установления взаимосвязей между вводимой дозировкой, концентрацией лекарственного средства и оказываемым терапевтическим

эффектом. Чтобы успешно перенести терапевтические эффекты ФТ с лабораторных животных на человека, необходимо изучить его клинико-экспериментальную фармакокинетику.

Для фармакокинетических исследований необходим надежный аналитический метод, который позволит провести точное и достоверное определение концентрации исследуемого препарата в сложных биологических матрицах. Разработка новых аналитических методик является приоритетной задачей развития фармацевтической отрасли Российской Федерации.

Степень разработанности темы исследования

Химическая структура ФТ была получена в результате компьютерного моделирования, направленного синтеза и последующей химической оптимизации ингибиторов системы секреции 3 типа (Zigangirova и др., 2012). Терапевтическая активность соединения была изучена *in vitro* и *in vivo* в отношении ряда бактериальных патогенов, характеризующихся устойчивостью к антибиотикам, например, *Chlamydia spp.*, *Salmonella enterica*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* и *Klebsiella pneumonia* (Bondareva и др., 2022; Koroleva и др., 2015, 2023; Nesterenko и др., 2016; Sheremet и др., 2018; Tsarenko и др., 2023; Zigangirova и др., 2016, 2021). Исследования показали, что введение ФТ статистически значимо уменьшает количество бактериальных колониеобразующих единиц в крови и органах животных, увеличивает выживаемость модельных организмов и обеспечивает эрадикацию бактерий из организма. Также были проведены пилотные эксперименты по оценке фармакокинетики изучаемой субстанции (Nesterenko и др., 2016; Zigangirova и др., 2021). Имеющиеся результаты доклинического исследования фармакодинамики ФТ доказали перспективность соединения, вследствие чего была разработана лекарственная форма препарата «Фтортиазинон, таблетки, 300 мг» (Зигангирова Н. А. и др., 2021).

Цель и задачи исследования

Разработать методику количественного определения фтортиазинона и его метаболита методом высокоэффективном жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) и провести клинико-экспериментальное изучение фармакокинетики нового оригинального антибактериального средства Фтортиазинон.

Для достижения цели данного исследования были поставлены следующие задачи:

1. Разработать и валидировать методику количественного определения фтортиазинона и глюкуронида фтортиазинона в биологических матрицах для проведения фармакокинетического анализа методом ВЭЖХ-МС/МС.

2. Изучить фармакокинетику фтортиазинона и глюкуронида фтортиазинона у кроликов при пероральном введении препарата: оценить абсолютную и относительную биодоступность и экскрецию с мочой и калом.

3. Исследовать фармакокинетику фтортиазинона и глюкуронида фтортиазинона у крыс после перорального введения препарата в различных дозировках: проверить гипотезу линейности, изучить накопление в органах.

4. Провести оценку фармакокинетики фтортиазинона и глюкуронида фтортиазинона у мышей с острой пневмонией, вызванной *Pseudomonas aeruginosa*, в сравнении с не зараженными животными в крови и органах. Выявить особенности действия фтортиазинона на сигнальные молекулы quorum sensing и его влияние на организм животных при помощи целевых метаболомных методов.

5. Исследовать фармакокинетику фтортиазинона и глюкуронида фтортиазинона у здоровых добровольцев при однократном, суточном и курсовом применении препарата.

6. Провести изучение биологической трансформации лекарственного препарата Фтортиазинон у здоровых добровольцев после перорального применения.

7. Изучить межвидовые различия в фармакокинетике фтортиазинона у мышей, крыс, кроликов и людей, провести экстраполяцию фармакокинетических параметров вещества с модельных организмов на человека.

Научная новизна

Разработана и валидирована методика количественной оценки вещества ФТ и его метаболита глюкуронида ФТ методом ВЭЖХ-МС/МС, позволяющая определять концентрацию препарата в биологических образцах лабораторных животных и человека. Изучена абсолютная и относительная биодоступность ЛП «Фтортиазинон, таблетки, 300 мг» у кроликов. Исследована фармакокинетика ФТ и распределение по органам у крыс в широком диапазоне доз.

Впервые исследованы изменения фармакокинетики, тканевой доступности и метаболизма ФТ при наличии острой легочной инфекции, вызванной синегнойной палочкой. Показано влияние ФТ на сигнальные молекулы quorum sensing (QS) и метаболизм обмена триптофана. Впервые изучены всасывание, распределение и метаболизм ФТ у здоровых добровольцев при однократном, двукратном и курсовом приеме ЛП. Установлены общие закономерности и отличия фармакокинетики ФТ у лабораторных животных и человека, осуществлен перенос фармакокинетических показателей с животных на человека.

Теоретическая и практическая значимость работы

Представлен методический подход для количественного определения ФТ и его глюкуронида в биологических матрицах животных и человека. В результате комплексного фармакокинетического исследования были установлены ключевые фармакокинетические параметры у наиболее распространенных видов лабораторных животных (мыши, крысы, кролики). При изучении межвидовых различий показано, что использование крыс наиболее достоверно позволяет прогнозировать фармакокинетические параметры ФТ у человека. Более того, оценка сравнительной фармакокинетики ФТ при наличии бактериального воспаления указывает направление изменений в фармакокинетике ЛП могут проявиться при назначении ФТ пациентам.

Разработанная лекарственная форма таблетки показала свою эффективность для достижения целевых концентраций препарата в крови и органах.

Результаты исследования фармакокинетики препарата у здоровых добровольцев были использованы для разработки режима дозирования и организации исследований по установлению зависимости «доза-концентрация-эффект» у целевой популяции пациентов.

Методология и методы исследования

В основе методологии настоящего исследования лежит комплексный принцип исследования фармакокинетики для изучения основных фармакокинетических параметров, режимов дозирования и комбинаций совместного приема «Фтортиазина». С целью получения концентраций препарата в исследованных биологических матрицах был использован аналитический метод ВЭЖХ-МС/МС. Для поиска метаболитов был выбран метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором высокого разрешения (ВЭЖХ-МСВР). Для расчета фармакокинетических параметров был проведен некомпартментный метод анализа данных концентраций препарата. В работе также были использованы методы математической статистики.

Личный вклад автора

Автор самостоятельно проводил поиск и анализ литературных данных по вопросам антивирулентных средств, механизмов и роли фармакокинетики новых лекарственных средств. Автор лично разработал и провел валидацию аналитической методики определения

действующего вещества ФТ и его основного метаболита в биологических матрицах методом ВЭЖХ-МС/МС.

Роль автора в выполнении исследований фармакокинетики ФТ у мышей, крыс, кроликов заключалась в планировании эксперимента, подготовки биологических образцов к анализу, проведению инструментального анализа, обработке результатов, выборе и применении методов статистического анализа данных и последующей интерпретации результатов. Автор провел клиническое исследование фармакокинетики «Фтортиазина» у здоровых добровольцев, изучил пути биологической трансформации действующего вещества в организме человека. Вклад автора сыграл решающую роль на каждом этапе исследования от постановки цели и задач исследования до оценки полученных результатов, формулирования положений и выводов и подготовки результатов экспериментов к публикации.

Положения, выносимые на защиту

1. Аналитическая методика высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием пригодна для количественного определения фтортиазина. Валидационные показатели разработанной аналитической методики количественного определения фтортиазина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием соответствуют валидационным характеристикам, установленными требованиями ЕАЭС, FDA и ЕМА.

2. Пероральный прием таблетированной формы фтортиазина показал умеренный уровень биодоступности у кроликов. Установлено, что основной вид экскреции фтортиазина – через кишечник.

3. Увеличение вводимой дозы приводит к линейному увеличению фармакокинетических параметров фтортиазина у крыс. Однократное пероральное применение препарата создает высокие концентрации действующего вещества в органах.

4. Легочная синегнойная инфекция приводит к изменению фармакокинетики фтортиазина за счет увеличения абсорбции и снижения метаболизма препарата. Фтортиазин снижает уровень сигнальных молекул quorum sensing синегнойной палочки, отвечающих за вирулентность патогена, и увеличивает концентрации метаболитов кинуренинового и индолового путей обмена триптофана.

5. После однократного приема фтортиазин создает низкие концентрации в крови и длительно выводится. Двукратный прием препарата кратно увеличивает период полувыведения.

6. Основной путь биотрансформации фтортиазина у человека заключается в образовании конъюгатов с глюкуроновой кислотой.

7. Фармакокинетические показатели фтортиазинона демонстрировали межвидовое сходство. Данные, полученные у крыс, позволили наиболее точно экстраполировать период полувыведения препарата человека.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Настоящая научно-квалификационная работа соответствует следующим пунктам специальности 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология: исследование механизмов действия фармакологических веществ в экспериментах на животных, на изолированных органах и тканях, а также на культурах клеток (п.5); изучение фармакодинамики, фармакокинетики и метаболизма лекарственных средств. Установление связей между дозами, концентрациями и эффективностью лекарственных средств. Экстраполяция полученных данных с биологических моделей на человека (п.6); и пункту 4 специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия - разработка методов анализа лекарственных веществ и их метаболитов в биологических объектах для фармакокинетических исследований.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Достоверность результатов подтверждается тем, что каждый эксперимент исследования был выполнен на надлежащем экспериментальном материале с использованием адекватных методов оценки на поверенном оборудовании. Для оценки различий полученных данных были выбраны соответствующие методы статистической обработки. Организация исследований и расчеты были выполнены в соответствии с требованиями «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств» (Миронов А.Н. и др., 2012), РФ ГОСТ Р 52379-2005 «Надлежащая клиническая практика» и РФ ГОСТ Р 33647-2015 «Надлежащая лабораторная практика».

Результаты диссертационной работы представлены на III Китайско-Российском международном форуме (Москва, Харбин, 2022); на международной научно-практической конференции молодых ученых «Фармация. Вызовы времени» (Москва, Витебск, 2022); на I международной Российско-Сербской конференции молодых ученых памяти академика А.П. Арзамасцева (Москва, Крагуевац, 2023); на IV всероссийской конференции по аналитической спектроскопии с международным участием (Краснодар, 2023).

Апробация результатов диссертационного исследования состоялась на заседании научно-методической конференции кафедры фармакологии Института фармации имени А. П. Нелюбина, кафедры фармацевтической и токсикологической химии имени А.П. Арзамасцева Института

фармации имени А.П. Нелюбина, кафедры клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней, Института клинической медицины имени Н.В. Склифосовского, кафедры фармакологии Института цифрового биодизайна и моделирования живых систем Научно-технологического парка биомедицины, Центра биофармацевтического анализа и метаболомных исследований Института трансляционной медицины и биотехнологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), протокол № 12 от «22» мая 2024 г.

Публикации по теме диссертации

По результатам исследования автором опубликовано 6 работ, в том числе 1 научная статья в журнале, включенном в Перечень рецензируемых научных изданий Сеченовского Университета и/или Перечень Высшей аттестационной комиссии при Минобрнауки России, в котором должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук; 3 статьи в изданиях, индексируемых в международных базах Web of Science, Scopus, PubMed, MathSciNet, zbMATH, Chemical Abstracts, Springer), 2 иные публикации по результатам исследования.

Внедрение результатов исследования

Основные научные положения, выводы и рекомендации настоящей кандидатской диссертации были внедрены в учебный процесс кафедры фармакологии Института фармации имени А.П. Нелюбина при изучении дисциплины «Фармакология» для студентов по направлению подготовки (специальности) «33.05.01 Фармация» (акт № 391 от 18 марта 2024 г.).

Результаты диссертационной работы внедрены в научно-исследовательский процесс Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, вошли в состав отчета о научно-исследовательской работе, который, в свою очередь, был включен в пакет документов, представленных в Минздрав России в рамках процедуры регистрации ЛП (акт б/н от 27 марта 2024 г.).

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 227 страницах печатного текста, содержит 63 рисунка, 81 таблицу, 4 приложения. Диссертационное исследование включает в себя введение, обзор

литературы, описание материалов и методов, результатов, содержит обсуждение, заключение и выводы. Список литературы включает 148 литературных источника, из которых 19 отечественных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Стандартные образцы субстанции ФТ, внутреннего стандарта CL-130 (BC) и лекарственное средство «Фтортиазинон, таблетки, 300 мг» были предоставлены ФГБУ «НИЦЭМ имени Н.Ф. Гамалеи» Минздрава РФ. Стандартные образцы сигнальных молекул HHQ (2-гептил-4-гидроксихинолон) и PQS (2-гептил-3-гидрокси-4(1H)-хинолон) системы QS *Pseudomonas aeruginosa* и внутренний стандарт 4-гидрокси-2-метилхинолон были получены от Sigma-Aldrich (Германия). Стандартные образцы метаболитов и их изотопно-меченые стандарты были предоставлены Toronto Research Chemicals (Канада) для проведения метаболомного профилирования. В экспериментах были использованы ацетонитрил «для хроматографии» (Carlo Erba, Франция), муравьиная кислота, метанол «для хроматографии», фосфат натрия, дигидрофосфат натрия, азид натрия, карбонат натрия и гидрокарбонат натрия (Sigma Aldrich, Германия), фосфорная кислота (Biochem Chemopharma, Франция), этилацетат и диэтиловый эфир (PanReas AppliChem, Германия), ацетилацетон (Honeywell, США), β -глюкуронидаза *E. coli* K12 (Roche, Швейцария). Вода деионизированная была получена системой Millipore Direct Q-3 UV (Merck, Германия).

Было использовано аналитическое оборудование: жидкостной хроматограф Agilent 1290 Infinity II, оснащенный автосамплером, бинарным насосом, отсеком для термостатирования колонок и tandemным квадрупольным масс-спектрометрическим детектором Agilent 6470 (Agilent Technologies, США); хромато-масс-спектрометр высокого разрешения Orbitrap Exploris 120, сопряженный с жидкостным хроматографом Vanquish (Thermo Fisher Scientific, США), аналитические колонки Acquity UPLC BEH C18 (2,1 × 50 мм; 1,7 мкм) (Waters Corporation, США), Discovery PFP HS F5 (2,1 × 150 мм; 3 мкм) (Supelco, Германия), Accucore Phenyl Hexyl (2,1 × 100 мм; 2,6 мкм) (Thermo Fisher Scientific, США).

Состав исследуемого ЛП: ФТ – 300 мг, микрокристаллическая целлюлоза – 100 мг, лактоза моногидрат – 50,0 мг, натрия крахмал гликолят – 30,0 мг, поливиниловый спирт – 6,75 мг, натрия лаурилсульфат – 6,00 мг, магния стеарат – 5,00 мг, полиэтиленгликоль 6000 – 2,25 мг. Масса таблетки – 500 мг.

Экспериментальные животные

Кролики. Для исследования биодоступности кролики-самцы породы Советская шиншилла были распределены на три группы для получения однократной дозы 40 мг/кг ФТ внутривенно, либо перорально в водном или крахмальном растворе, после чего у животных отбирали образцы крови. У кроликов, которые получили водный раствор ЛП, были также собраны суточная моча и кал.

Крысы. Взрослые аутбредные крысы-самцы были распределены по три группы для однократного введения 50, 100 или 200 мг/кг ФТ перорально, затем были взяты образцы крови для фармакокинетического исследования. У группы, получившей 100 мг/кг ЛП, были отобраны образцы печени, селезенки, почек, предстательной железы, мочевого пузыря и легких, и собран суточный кал.

Мыши. Взрослые мыши-самцы линии DBA были распределены в три группы. Первая группа мышей была заражена интраназальным введением бактериальной суспензии *Pseudomonas aeruginosa* для получения мышинной модели острой пневмонии и получила 400 мг/кг ФТ перорально. Вторая группа мышей была заражена аналогично и получила равный объем плацебо (водный раствор крахмала). Третья группа не была заражена, но получила такую же дозу ФТ, что и первая группа. У животных проводили отбор образцов крови и органов (печень, почки, легкие) для исследования фармакокинетики, профилирования сигнальных молекул QS и метаболомного исследования.

Добровольцы

Клиническое исследование ФТ было проведено согласно протоколу № 05-ФТ-2021 «Открытое исследование безопасности и фармакокинетики лекарственного препарата “Фтортиазинон, таблетка 300 мг” при суточном и курсовом применении с эскалацией доз у здоровых добровольцев». Было сформировано четыре группы: группа 1 получила однократную дозу 1800 мг ЛП (n=5); группа 2 получила две дозы ЛП по 900 мг каждые 12 часов (суточная доза 1800 мг) (n=5); группа 3 получила две дозы ЛП по 1200 мг каждые 12 часов (суточная доза 2400 мг) (n=4). Добровольцы группы 4 прошли курсовой прием, получая 900 мг ЛП каждые 12 часов в течение семи дней (суточная доза 1800 мг) (n=14). У добровольцев групп 1, 2 и 3 были взяты образцы крови до приема препарата и через 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 48 и 72 ч после приема первой дозы препарата, а также у добровольцев групп 2 и 3 была собрана суточная моча. У добровольцев группы 4 взятие образцов крови проводили до введения ФТ и через каждые 4 часа после приема дозы препарата.

Методика количественного определения фтортиазинона в биологических матрицах

Количественное определение ФТ проводили методом ВЭЖХ-МС/МС при помощи жидкостного хромато-масс-спектрометра Agilent. Хроматографическое разделение ФТ, глюкуронида ФТ и ВС проводили с использованием аналитической колонки Acquity UPLC BEH C18 (2.1 × 50 мм; 1.7 мкм) при температуре 40 °С. Определение веществ проводилось на основании характеристичных переходов: m/z 422.0 → 151.1 для ФТ, m/z 440.2 → 151.1 для ВС. Подготовку проб к анализу проводили осаждением белков ацетонитрилом. Для определения количества ФТ, свободного от глюкуроновой кислоты, проводили ферментативный гидролиз с использованием β-глюкуронидазы *E. coli* K12.

Методика определения сигнальных молекул QS в легких зараженных и незараженных мышей

Сигнальные молекулы HHQ и PQS определяли методом ВЭЖХ-МС/МС в системе Agilent. Определение соединений проводилось в режиме мониторинга множественных реакций в положительной области с использованием 4-гидрокси-2-метилхинолона в качестве внутреннего стандарта. Характеристичные переходы аналитов m/z 244,1 → 159,1; m/z 260,1 → 175 и m/z 160,1 → 77,1 были выбраны для HHQ, PQS и QS ВС, соответственно. Подготовка образцов легких к анализу проводилась методом жидкость-жидкостной экстракции смесью этилацетата и диэтилового эфира.

Методика определения метаболитов обмена триптофана для метаболомного исследования

Биоаналитическая методика количественного определения метаболитов триптофанового обмена методом ВЭЖХ-МС/МС подробно описана в работе (Markin и др., 2023). Хроматографическое разделение проводили на аналитической колонке Discovery PFP HS F5 (2,1 × 150 мм; 3 мкм) при температуре 45 °С в системе Agilent.

Методика исследования биотрансформации фтортиазинона

Исследование биотрансформации ФТ проводилось методом ВЭЖХ-МС/ВР при помощи Orbitrap Exploris 120, оснащенного аналитической колонкой Accucore Phenyl Hexyl (2,1 × 100 мм; 2,6 мкм). Для поиска метаболитов проводили анализ образцов крови и мочи до и через 2 часа после приема ЛП в режиме FullMS-ddMS2, включающем полное сканирование и фрагментацию

ионов. Полученные данные обрабатывались программным обеспечением Compound Discoverer (Thermo Scientific, США) для поиска метаболитов ФТ.

Расчет фармакокинетических параметров и статистическая обработка результатов

Некомпарментный анализ концентрационных данных был проведен в расширении PKSolver для Microsoft Excel для расчета фармакокинетических параметров. Для расчета концентрации вещества в органах концентрация аналитов в образце была нормализована относительно массы ткани. Для полученных результатов рассчитывали параметры описательной статистики. Для сравнения двух групп были использованы следующие статистические подходы: критерий Шапиро-Уилка, t-критерий Стьюдента, U-критерий Манна-Уитни. При сравнении трех групп использовали односторонний дисперсионный анализ критериями Фишера или Уэлча, либо дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса. Зависимость фармакокинетических параметров от дозы проверяли односторонним дисперсионным анализом с post-hoc критерием Тьюки. Для оценки линейности дозирования использовали точный критерий Фишера.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

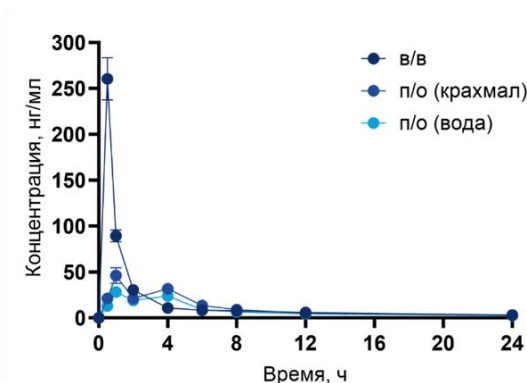
Разработка и валидация методики количественного определения фтортиазина

Для качественной и количественной характеристики процессов фармакокинетики нового лекарственного средства в организме была разработана и валидирована аналитическая методика количественного определения ФТ методом ВЭЖХ-МС/МС. В ходе разработки методики были определены характеристичные переходы и время удерживания аналита и ВС, подобраны оптимальные условия хроматографии и параметры детектора, калибровочный диапазон, а также разработана процедура подготовки биологических образцов к анализу при помощи ферментативного гидролиза β -глюкуронидазой *E. coli*. Пригодность аналитической методики для использования в исследованиях фармакокинетики подтверждена процедурой валидации, проведенной согласно требованиям ЕАЭС, FDA и ЕМА. Были определены следующие валидационные характеристики: селективность, градуировочная кривая, нижний предел количественного определения, эффект переноса, влияние разбавления, правильность и прецизионность, эффект матрицы, степень извлечения аналита и стабильность.

Фармакокинетика фтортиазинона и глюкуронида фтортиазинона у кроликов

У кроликов оценивали абсолютную и относительную биодоступности таблетированной формы препарата. Для этого животным вводили дозу 40 мг/кг ЛП однократно внутривенно или перорально в крахмальном или водном растворе. Фармакокинетические кривые ФТ и глюкуронида ФТ представлены в крови кроликов на Рисунке 1.

А - ФТ



Б – глюкуронид ФТ

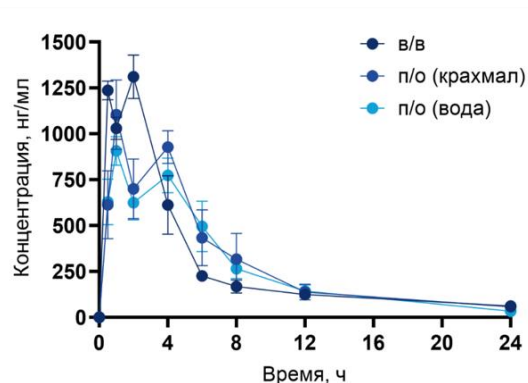


Рисунок 1 – Фармакокинетические кривые ФТ (А) и глюкуронида ФТ (Б) в крови кроликов, получивших 40 мг/кг ФТ внутривенно (в/в) или перорально (п/о) в комбинации с водой или крахмалом

Абсолютная биодоступность ФТ составила 68,5 и 51,5 % для водной и крахмальной суспензии, соответственно. Полученные результаты подтверждаются предыдущими исследованиями фармакокинетики субстанции ФТ у кроликов (Zigangirova и др., 2021). После перорального приема наблюдался второй пик концентрации ФТ. Концентрация глюкуронида ФТ значительно превышает концентрацию исходного соединения (Рисунок 1Б). Статистический анализ не показал значимые отличия в фармакокинетических параметрах метаболита между группами, что говорит о независимости фармакокинетики глюкуронида ФТ от путей введения.

Впервые была исследована экскреция ФТ и глюкуронида ФТ. Установлено, что с калом в течение суток около $31,0 \pm 11,6$ % и $18,7 \pm 6,8$ % дозы выводится в виде исходного вещества и метаболита, соответственно. Выведение ФТ и его метаболита с мочой незначительно, поскольку за сутки было выведено $0,062 \pm 0,011$ % и $0,129 \pm 0,014$ % от введенной дозы в виде нативного соединения и глюкуронида, соответственно.

Фармакокинетика фтортиазинона и глюкуронида фтортиазинона у крыс

У крыс изучали линейность дозирования, распределение по органам и выведение с калом ФТ и глюкуронида ФТ. В ходе эксперимента крысы получали пероральную дозу ФТ в размере 50 мг/кг, 100 мг/кг или 200 мг/кг однократно. Фармакокинетические кривые ФТ и его метаболита в крови крыс представлены на Рисунке 2.

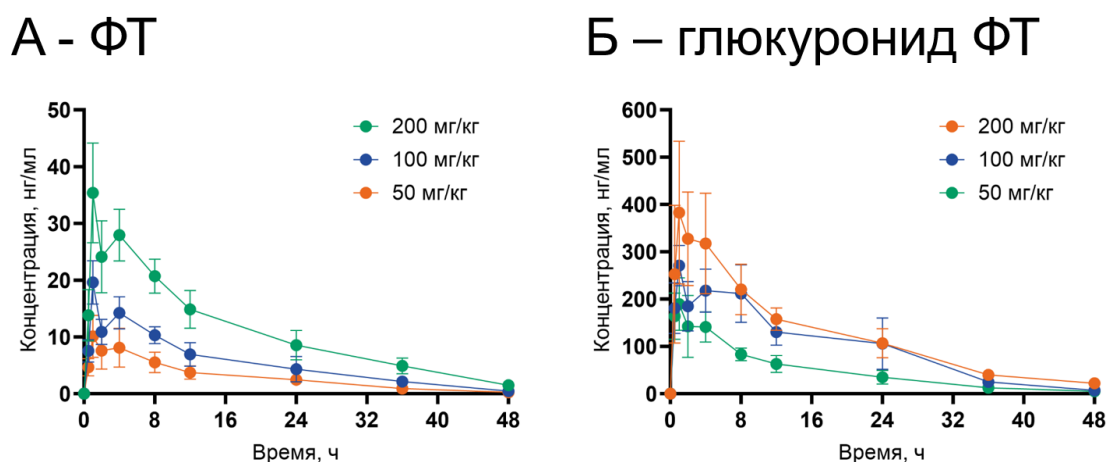


Рисунок 2 – Фармакокинетические кривые ФТ (А) и глюкуронида ФТ (Б) в крови крыс, которым однократно перорально вводили ЛП в диапазоне доз 50 – 200 мг/кг

При увеличении вводимой дозы наблюдаются статистически значимые увеличения фармакокинетических параметров C_{max} , AUC, но различий в величине нормализованных по дозе фармакокинетических параметров и не зависящих от дозы параметров обнаружено не было. Точный тест Фишера для зависимости параметра $AUC_{0-\infty}$ ФТ от дозы указывает на линейность дозирования ФТ, следовательно, фармакокинетика ФТ в крови крыс характеризуется линейной зависимостью от дозы в диапазоне доз от 50 до 200 мг/кг.

Для глюкуронида ФТ, показано, что при увеличении дозы происходит статистически значимое изменение фармакокинетических параметров AUC, K_{el} , $T_{1/2}$, MRT. Нормализованные по дозе фармакокинетические показатели незначимо отличались между группами. Статистический анализ показывает отсутствие линейности дозирования для глюкуронида ФТ.

У крыс также изучали распределение ФТ и его метаболита по органам (печени, селезенки, почек, предстательной железы, мочевого пузыря и легких) после однократного перорального введения 100 мг/кг ЛП. Распределение ФТ и глюкуронида ФТ по органам показано на Рисунке 3.

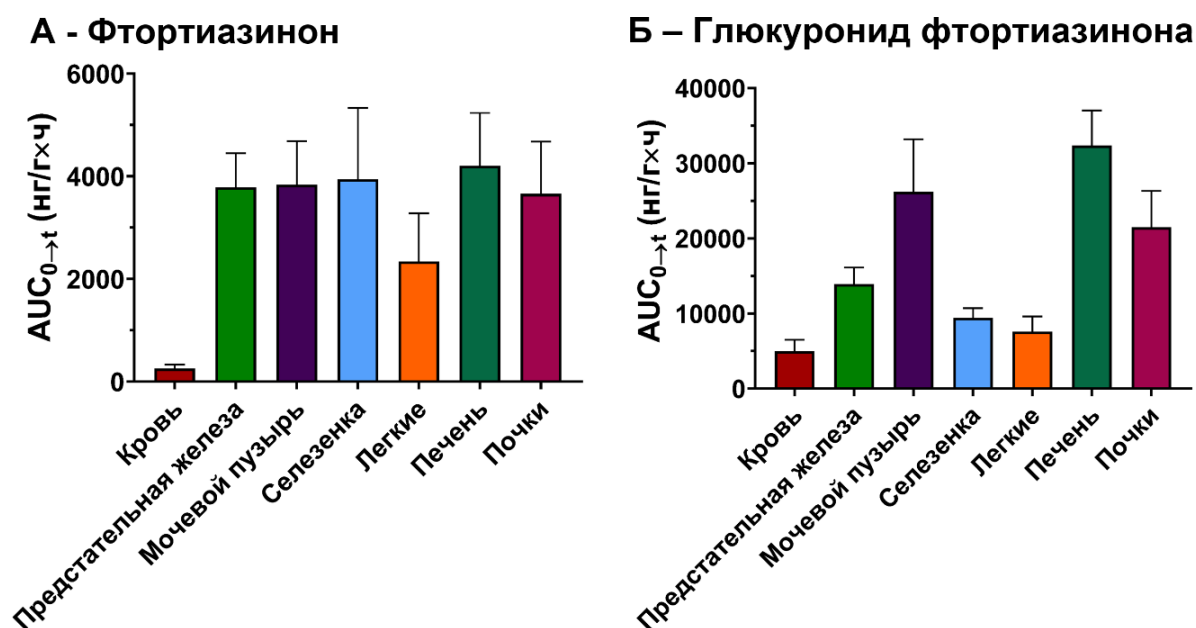


Рисунок 3 – Распределение ФТ по органам крыс после однократного перорального введения ЛП в дозе 100 мг/кг

Концентрация ФТ в органах кратно превышает концентрацию соединения в крови, что говорит о том, что средство хорошо проникает во все исследованные органы. Полученные результаты подтверждаются фармакодинамическими исследованиями. Например, при введении ФТ мышам с острой инфекцией, вызванной *Acinetobacter baumannii*, наблюдали значимое снижение количества колониеобразующих единиц в селезенке и легких животных (Bondareva и др., 2022). Высокая тканевая доступность ФТ для клеток предстательной железы и мочевого пузыря объясняет его эффективность при урогенитальных инфекциях, вызванных *E. coli*.

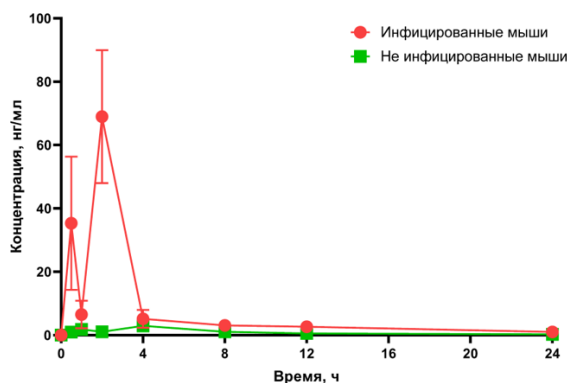
Высокие концентрации препарата в печени, длительный период полувыведения и наличие двух максимумов концентрации дают основания считать, что энтерогепатическая рециркуляция играет роль в фармакокинетике ФТ (Talevi, 2022). Распределение глюкуронида ФТ между тканями было неоднородным: в мочевом пузыре, печени и почках наблюдались наиболее высокие значения, а разница между другими органами была незначительна. Также установлено, что в течение суток у крыс $45,1 \pm 5,4 \%$ и $9,46 \pm 2,29 \%$ дозы с калом в неизменном виде и в виде глюкуронида, соответственно.

Фармакокинетика фтортиазинона и глюкуронида фтортиазинона у мышей

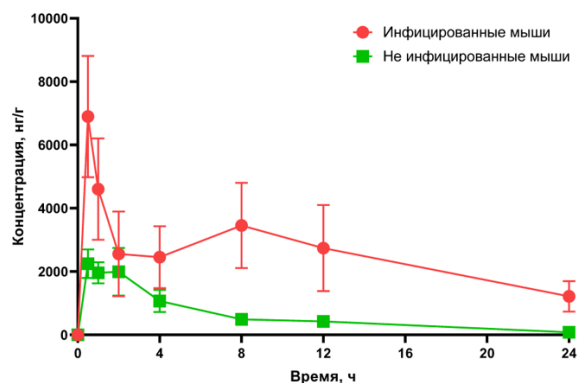
У мышей была изучена фармакокинетика ФТ и его глюкуронида в условиях бактериального заражения – острой пневмонии, вызванной клиническим изолятом *Pseudomonas aeruginosa*. Установлено, что после однократного введения 400 мг/кг препарата значительно повышаются C_{max} , AUC и отношение AUC ФТ к AUC глюкуронида ФТ в крови у зараженных

мышей по сравнению с не зараженными мышами. Соответствующие фармакокинетические кривые представлены на Рисунке 4А. В органах наблюдалась схожая картина: у инфицированных мышей в печени, почках и легких значительно увеличивались показатели абсорбции и уменьшались параметры элиминации. Сравнение фармакокинетических профилей ФТ в органах зараженных и не зараженных животных представлено на Рисунках 4Б-4Г.

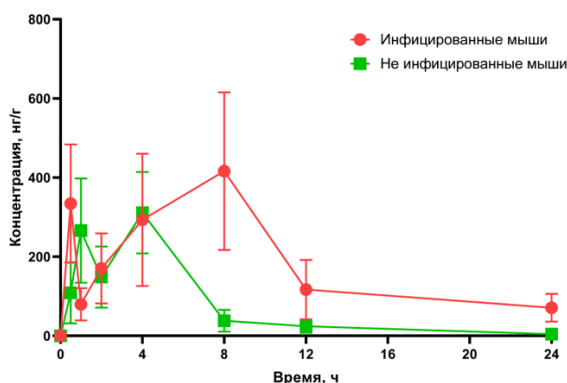
А - Кровь



Б – Печень



В - Почки



Г - Легкие

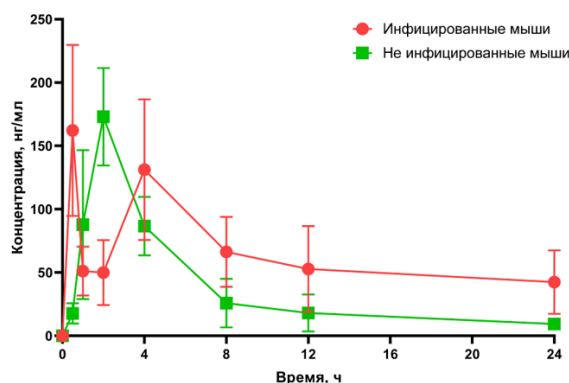


Рисунок 4 – Сравнительные фармакокинетические профили ФТ в крови (А), печени (Б), почках (В) и легких (Г) после однократного перорального введения ЛП инфицированным и не инфицированным мышам в дозе 400 мг/кг

Основные изменения фармакокинетики в органах инфицированных и не инфицированных мышей были локализованы в печени, в то время как в почках и легких большинство параметров статистически значимо не изменялись. В легких, являющихся очагом инфекции при бактериальной пневмонии, практически не наблюдалось значимого изменения фармакокинетики, помимо параметра MRT. Коэффициенты тканевой доступности в печени, почках и легких были значительно ниже у инфицированных мышей по сравнению с неинфицированными. При пневмонии, вызванной *Pseudomonas aeruginosa*, наблюдалось увеличение скорости всасывания ФТ в кровь, снижение скорости элиминации в печени и

увеличение времени полувыведения как в печени, так и в почках. Также было обнаружено, что при наличии бактериальной инфекции наблюдается изменение метаболического отношения, которое указывает на степень превращения ФТ в его основной метаболит, глюкуронид ФТ, в крови, почках и легких.

Профилирование сигнальных молекул quorum sensing

Для оценки воздействия антивирулентного средства ФТ на систему QS синегнойной палочки было проведено профилирование сигнальных молекул HHQ и PQS в легких зараженных мышей, получивших ЛП или плацебо. Профили концентрации сигнальных молекул представлены на Рисунке 5.

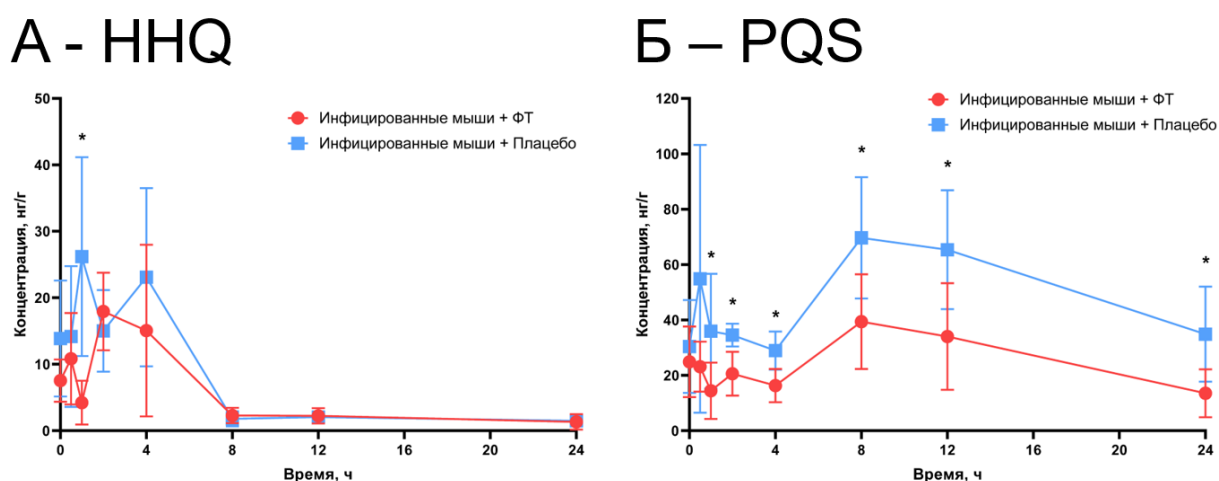


Рисунок 5 – Профилирование сигнальных молекул HHQ (А) и PQS (Б) в легких инфицированных мышей, получивших ФТ или плацебо

Однократное введение ФТ перорально приводит к значимому снижению концентрации PQS, не влияя на HHQ, которая является прекурсором к PQS. В исследованиях по изучению активности ФТ в отношении *Acinetobacter baumannii* было показано подавление активности бактерии, несмотря на отсутствие у нее системы секреции третьего типа. Вероятно, механизм действия ФТ в данном случае можно объяснить влиянием на систему quorum sensing (Bondareva и др., 2022).

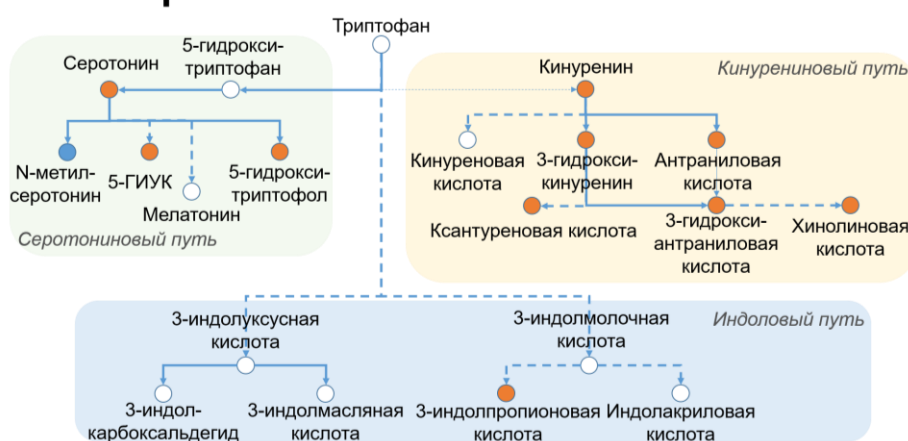
Метаболомное исследование инфицированных мышей после введения фтортиазинона

Метаболиты, связанные с обменом триптофана в организме хозяина, могут быть использованы бактериями для синтеза сигнальных молекул QS (Palmer и др., 2013). Для оценки

влияния ФТ на метаболомный профиль было проведено метаболомное исследование метаболитов триптофана в крови и легких инфицированных мышей, которые получили ЛП или плацебо.

На Рисунке 6 показаны метаболиты и метаболические пути, которые статистически значимо отличались в крови и легких мышей, получивших ЛП, по сравнению с мышами, получившими плацебо. ФТ активирует кинурениновый и индоловый пути катаболизма триптофана в крови и легких. Повышение уровня метаболитов кинуренинового пути связано с выработкой провоспалительных цитокинов (Midttun и др., 2023), что согласуется с данными об иммуностимулирующем эффекте ФТ в ответ на иммунную супрессию бактериальной инфекции (Sheremet и др., 2018). Наблюдаемые изменения в индоловом пути обмена триптофана в легких связывают уменьшением воспаления и восстановлением функции микробиоты легких (Enaud и др., 2020; Hubbard и др., 2015).

А – Кровь



Б – Легкие

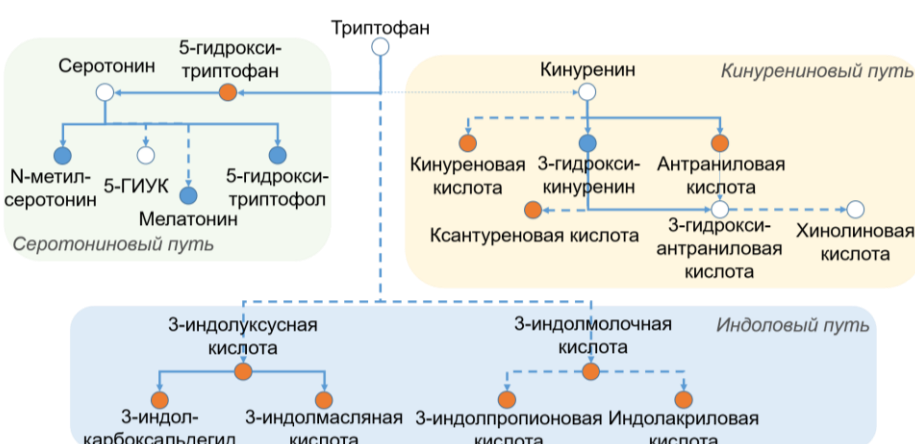
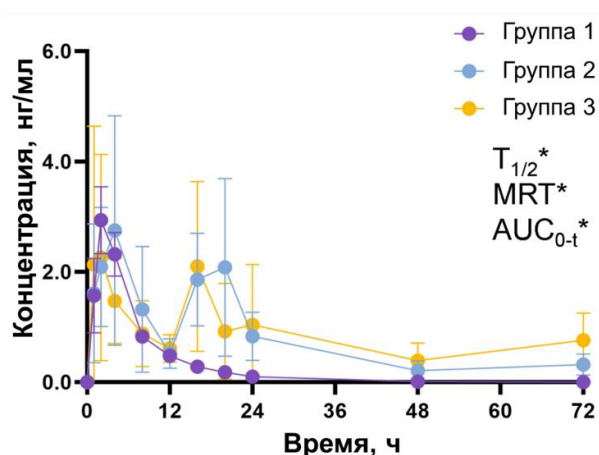


Рисунок 6 – Схематическое изображение значимых изменений метаболитов кинуренинового, индолового и серотонинового путей триптофанового обмена в крови (А) и легких (Б) инфицированных мышей, получивших ФТ, по сравнению мышами, получившими плацебо.

В ходе клинического исследования фармакокинетики здоровые добровольцы принимали разовую дозу 1800 мг ФТ (группа 1), либо по 900 и 1200 мг ЛП каждые 12 часов в течение суток (группа 2 и 3, соответственно). Фармакокинетические кривые ФТ и глюкуронида ФТ представлены на Рисунке 7. Разделение разовой дозы 1800 мг на два приема по 900 мг позволило кратно увеличить $T_{1/2}$ и AUC, обеспечивая длительное поддержание базового уровня концентрации, но при последующем увеличении дозы не наблюдалось пропорциональное увеличение фармакокинетических параметров.

Фармакокинетика глюкуронида ФТ повторяет изменения концентрации не метаболизированного соединения. Наблюдалось статистически значимое изменение параметров $T_{1/2}$, MRT и AUC при приеме двукратной дозы в 900 мг по сравнению с однократным приемом дозы 1800 мг, но при приеме большей дозы в 1200 мг два раза в сутки наблюдалось непропорциональное дозе увеличение параметров.

А - ФТ



Б – Глюкуронид ФТ

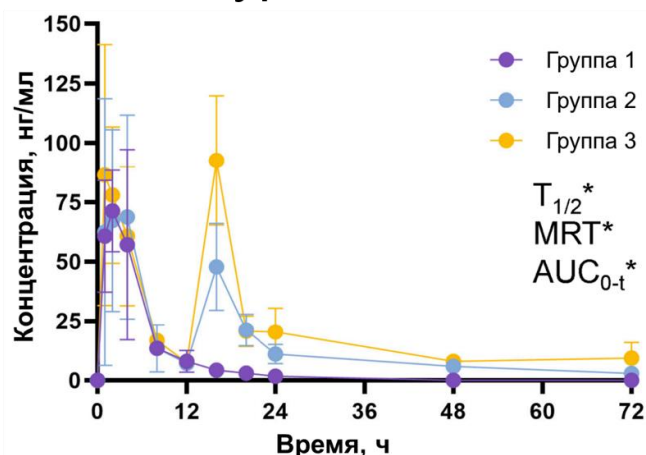
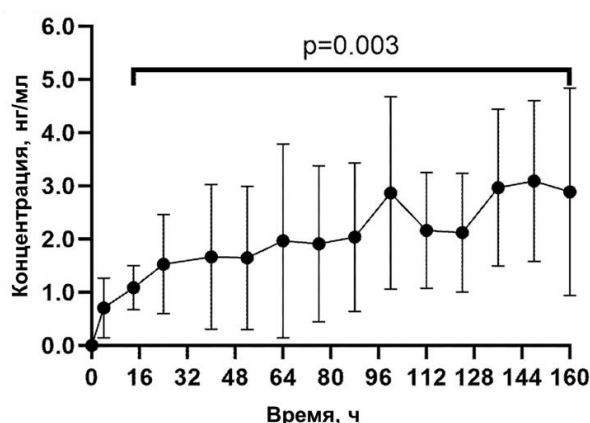


Рисунок 7 – Усредненные фармакокинетические кривые ФТ (А) и глюкуронида ФТ (Б) в крови добровольцев после приема 1800 мг ЛП однократно (группа 1) или 900 и 1200 мг два раза в сутки (группа 2 и 3, соответственно)

На Рисунке 8 представлена фармакокинетика ФТ и глюкуронида ФТ в ходе курсового приема ЛП (группа 4). Концентрация ФТ статистически значимо увеличивается в конце курса по сравнению с концентрацией вещества после приема первой суточной дозы (16 часов). Концентрация глюкуронида ФТ значимо не отличались в течение времени наблюдения, что указывает на стационарное состояние фармакокинетики метаболита. ЛП выводится в крайне малом количестве с мочой: 0.428 ± 0.178 и 0.397 ± 0.188 % от введенной дозы экскретируется у добровольцев групп 2 и 3, соответственно.

А - ФТ



Б – Глюкуронид ФТ

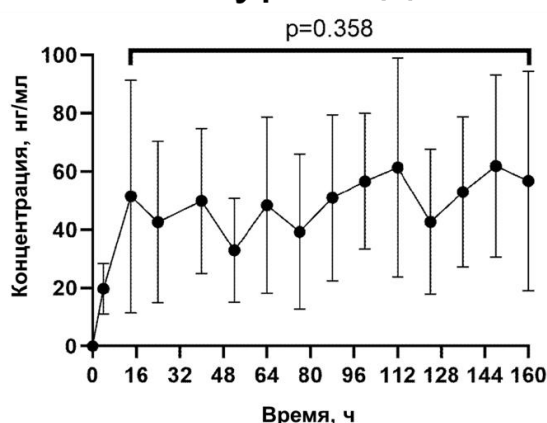


Рисунок 8 – Фармакокинетическая кривая глюкуронида ФТ в крови добровольцев после курсового приема 1800 мг ЛП

Исследование метаболизма фтортиазинона у добровольцев

Для структурной идентификации метаболитов ФТ был проведен анализ образцов крови и мочи добровольцев методом ВЭЖХ-МСВР. На основании полученных данных была составлена схема метаболизма ФТ в организме (Рисунок 9). Основным и преимущественным путем метаболизма ФТ является конъюгация с остатком глюкуроновой кислоты. В организме ФТ образует S-окисленные продукты, гидроксилированные и дефторированные метаболиты и конъюгаты с серной кислотой, суммарное содержание которых составляет менее 1,0 %.

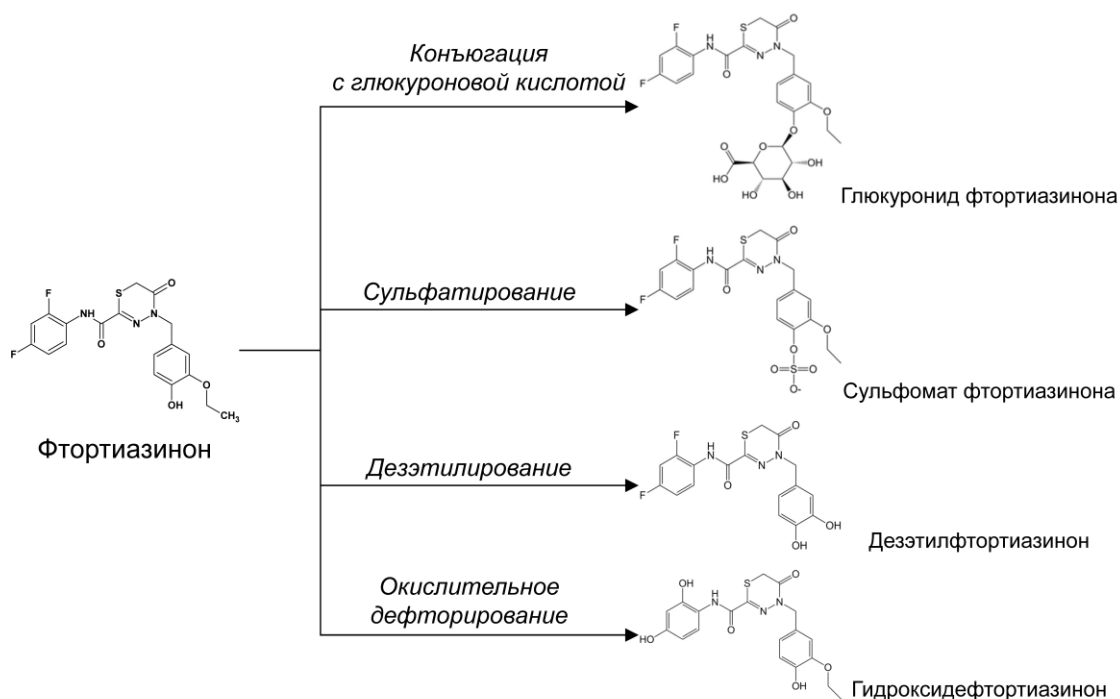


Рисунок 9 – Пути биотрансформации ФТ

Полученные доклинические и клинические данные фармакокинетики были объединены для проведения межвидовой экстраполяции методом аллометрии. Данные от лабораторных животных позволили точно предсказать параметры абсорбции и элиминации человека ($C_{\max}/AUC_{0-t}$, K_{el} и $T_{1/2}$). Наибольшим предсказательным потенциалом для оценки периода полувыведения у человека обладают крысы. Таким образом, аллометрический подход позволяет моделировать фармакокинетические параметры нового лекарственного средства у человека, используя параметры лабораторных животных.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. Разработанная аналитическая методика количественного определения фтортиазинона методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием соответствует валидационным характеристикам, установленными ЕАЭС, FDA и ЕМА, в частности: селективность, эффект переноса, НПКО, линейность, правильность, прецизионность, отсутствие влияния разбавления образцов, эффект матрицы, стабильность исследуемого аналита. Разработанная методика позволяет проводить достоверную количественную оценку исследуемого соединения в биологических образцах.

2. При пероральном введении препарата, биодоступность фтортиазинона у кроликов составила 68,5 и 51,5 % в зависимости от растворителя (крахмал и вода, соответственно). Фармакокинетические профили фтортиазинона и его глюкуронида сопоставимы, выведение препарата происходит преимущественно с калом ($31,0 \pm 11,6\%$), с мочой выводится менее 1% вещества.

3. При введении фтортиазинона крысам в повышающейся дозировке (50-200 мг/кг), наблюдалось линейное изменение фармакокинетических параметров. Несмотря на низкие концентрации соединения в крови, в исследованных органах обнаруживаются высокие концентрации препарата, что говорит о возможности создавать терапевтические уровни фтортиазинона в органах, подверженных бактериальным антибиотикорезистентным инфекциям.

4. В присутствии острой легочной синегнойной инфекции у мышей наблюдается изменение фармакокинетических параметров фтортиазинона, а именно: статистически значимое увеличение $C_{\max}$, AUC_{0-t} и $AUC_{0-\infty}$ вследствие увеличенной абсорбции и сниженной скорости метаболизма препарата. Введение фтортиазинона приводило к стабильному снижению концентраций сигнальных молекул коммуникации QS, связанных с вирулентностью бактерий. Также, было доказано, что введение фтортиазинона приводило к изменению концентраций

метаболитов кинуренинового пути метаболизма триптофана, что связывают с изменением интенсивности воспалительных процессов организма.

5. Фармакокинетика фтортиазинона у здоровых добровольцев характеризуется низким присутствием препарата в крови и периодом полувыведения более 6 часов. При двукратном приеме период полувыведения препарата увеличивается до 26 и 52 ч. Роль мочевой экскреции в элиминации препарата незначительная и составляет менее 1 %.

6. Основной путь метаболизма фтортиазинона у здоровых добровольцев заключается в образовании конъюгатов с остатком глюкуроновой кислоты. Также в незначительном количестве были обнаружены дезэтилированные, гидроксильированные, окисленные по сере метаболиты и продукты конъюгации с серной кислотой.

7. Фармакокинетические параметры фтортиазинона проявляли сходство между различными биологическими видами, а именно: у всех исследованных видов наблюдалось низкое присутствие препарата в крови, длительный период полувыведения, наличие двух пиков концентрации вследствие кишечно-печеночной рециркуляции, а также схожесть абсолютных значений дозозависимых параметров (C_{max}/AUC_{0-t} , $T_{1/2}$, K_{el}). Экстраполяция фармакокинетических параметров фтортиазинона у крыс методом аллометрии позволяет успешно моделировать фармакокинетические параметры у человека.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Разработанная и валидированная методика определения фтортиазинона и глюкуронида фтортиазинона может быть использована для изучения фармакокинетики ЛП, содержащих в своем составе фтортиазинон.

2. При изучении новых антибактериальных средств с антивирулентной активностью необходимо исследовать распределение вещества по органам и тканям.

3. Таблетированная лекарственная форма фтортиазинона обладает благоприятным профилем фармакокинетики, благодаря чему ее можно рекомендовать для дальнейшего исследования и разработки ЛП.

4. Полученные в ходе исследования результаты фармакокинетики фтортиазинона у животных и людей достаточно для обоснованной организации исследований по установлению взаимосвязей между терапевтическим эффектом, концентрацией препарата и применяемой дозировки.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Савицкий М.В.** Исследование фармакокинетики и тканевой доступности нового антибактериального средства фтортиазинон / **М.В. Савицкий**, С.Н. Басханова // Гуманитарные и естественнонаучные исследования как фактор научно-технического прогресса: сборник научных трудов по материалам Международной научно-практической конференции 14 июня 2022г, Белгород, Россия, 2022. – С. 9 – 12.
2. **Савицкий М.В.** Экспериментальная фармакокинетика, изучение метаболизма и тканевого распределения нового антивирулентного средства фтортиазинон / **М.В. Савицкий**, Н.Е. Москалева, Н.А. Зигангирова, [и др.] // **Биомедицина**. – 2023. – Т.19. – №1. – С. 73 – 84.
3. **Savitskii M.V.** Pharmacokinetics, quorum-sensing signal molecules and tryptophan-related metabolomics of the novel anti-virulence drug Fluorothiazinon in a *Pseudomonas aeruginosa*-induced pneumonia murine model / **M.V. Savitskii**, N.E. Moskaleva, A. Brito, [et al.] // **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. – 2023. – V.236. – P. 115739. [Scopus]
4. **Savitskii M.V.** Pharmacokinetics, tissue distribution, bioavailability and excretion of the anti-virulence drug Fluorothiazinon in rats and rabbits / **M.V. Savitskii**, N.E. Moskaleva, A. Brito, [et al.] // **The Journal of Antibiotics**. – 2024. – V.77. – P. 382 – 388. [Scopus]
5. Baskhanova S.N. Development and Validation of a Quantitative Determination Method for Fluorothiazinone in Human Blood Plasma / S.N. Baskhanova, **M.V. Savitskii**, N.E. Moskaleva, [et al.] // **Pharmaceutical Chemistry Journal**. – 2024. – V.57 – P. 1815 – 1821. [Scopus]
6. **Савицкий М.В.** Доклинические и клинические исследования фармакокинетики антивирулентного средства фтортиазинон / **М.В. Савицкий**, Е.Н. Серюков // Современная парадигма развития науки, технологий и образования: сборник научных трудов по материалам Международной научно-практической конференции 16 января 2024г, Белгород, Россия, 2024. – С. 9 – 12.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

AUC	– Площадь под фармакокинетической кривой «концентрация-время»
C _{max}	– Максимальная концентрация
EMA	– Европейское агентство лекарственных средств
FDA	– Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США
Kel	– Константа элиминации
MRT	– Среднее время удерживания действующего вещества в крови и в моче от момента применения препарата в пределах времени наблюдения
QS	– Quorum sensing
T _{1/2}	– Период полувыведения
BC	– Внутренний стандарт

ВЭЖХ-МС/МС	–	Высокоэффективная жидкостная хроматография с тройным квадрупольным масс-спектрометрическим детектором
ВЭЖХ-МСВР	–	Высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектором высокого разрешения
ЕАЭС	–	Евразийский экономический союз
ЛП	–	Лекарственный препарат
ФТ	–	Фтортиазинон