

ФАРМАКОКИНЕТИКА

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ СРАВНЕНИЕ ФАРМАКОКИНЕТИКИ ТРИАЗАВИРИНА И ЛЕВОФЛОКСАЦИНА, А ТАКЖЕ КОНЬЮГАТА, ПОЛУЧЕННОГО НА ИХ ОСНОВЕ

И. В. Блаженникова¹, А. Ф. Курпякова², В. Н. Быков², Д. С. Гейбо¹, А. С. Никифоров², А. В. Степанов², В. Н. Чарушин^{3,4}, О. Н. Чупахин^{3,4}, С. К. Котовская^{3,4}, В. Л. Русинов^{3,4}

В экспериментах на крысах проведено сравнительное изучение фармакокинетики левофлоксацина и триазавирина, а также 2-метилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-[1,2,4]триазин-7(4Н)-онида (3S)-(-)-9-фтор-3-метил-10-(4-метилпиперазин-1-ил)-7-оксо-2,3-дигидро-7Н-пиридо[1,2,3-*d,e*][1,4]бензоксазин-6-карбоновой кислоты (конъюгата **2**), полученного при конъюгировании триазавирина и левофлоксацина и представляющего новый класс фармакологических средств. Показано, что конъюгат **2** в сравнении с индивидуальными левофлоксацином и триазавирином характеризуется более высокой относительной биодоступностью и более низкой скоростью элиминации, что может лежать в основе повышения эффективности терапии, снижения дозы и кратности приема.

Ключевые слова: фармакокинетика; конъюгат; триазавирин; левофлоксацин; внутримышечное введение.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в клинической практике отмечается нарастание частоты микст-инфекций бактериально-вирусной природы [6]. На долю гриппа и острых респираторных вирусных инфекций приходится 90 – 95 % всех инфекционных заболеваний, при этом осложнения инфекции развиваются у 10 – 15 % заболевших [1, 2].

При развитии микст-инфекций целесообразно совместное применение антибактериальных и противовирусных препаратов. Такая тактика применяется при лечении бактериальных осложнений гриппа (облитерирующий бронхит, обострение хронического бронхита, первичная вирусная и вторичная бактериальная пневмония) и при присоединении гриппозной инфекции у пациентов, страдающих хроническими заболеваниями верхних дыхательных путей (бронхит, трахеит, фарингит) [7, 9].

В качестве одного из направлений повышения эффективности терапии можно рассматривать конъюгирование антибактериального и противовирусного

средств в составе одной молекулы. Синтез конъюгата **2** на основе антибактериального препарата широкого спектра действия из группы фторхинолонов — левофлоксацина [(3S)-(-)-9-фтор-3-метил-10-(4-метилпиперазин-1-ил)-7-оксо-2,3-дигидро-7Н-пиридо[1,2,3-*d,e*]-[1,4]бензоксазин-6-карбоновой кислоты (LF)] и противовирусного препарата из группы азолозинов — триазавирина [натриевой соли 2-метилтио-4(Н)-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-она, дигидрата (TAV)] был выполнен в Институте органического синтеза им. И. Я. Постовского Уральского отделения Российской академии наук. Триазавирин является новым отечественным препаратом, зарегистрированным в Российской Федерации и предназначенным для лечения гриппа у взрослых. В экспериментальных и клинических исследованиях триазавирин показал высокую эффективность в подавлении репродукции вируса гриппа, включая штамм H5N1, а также способность действовать на любой стадии инфекционного процесса [3, 8].

Триазавирин в N-H форме, а именно 2-метилтио-4(Н)-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-он (**1**) по своей химической природе является довольно сильной кислотой (рКа 1,1), способной образовывать соли с основаниями. Это свойство TAV, показанное ранее [5], использовано в настоящем исследовании для получения конъюгата с левофлоксацином, обладающим N-основностью. Такой конъюгат является индивидуальным химическим соединением, имеющим солевую (ионную) структуру **2** (рис. 1).

¹ ООО “ИФК “Сильвер Фарм”, 195279, Санкт-Петербург, Индустриальный пр. 45А.

² Научно-исследовательский испытательный институт (военной медицины) Военно-медицинской академии им. С. М. Кирова, 195043, Санкт-Петербург, ул. Лесопарковая, 4.

³ Институт органического синтеза им. И. Я. Постовского УРО РАН, 620041, Екатеринбург, ул. С. Ковалевской/ Академическая, 22/ 20.

⁴ Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б. Н. Ельцина, 620002, Екатеринбург, ул. Мира, 19.

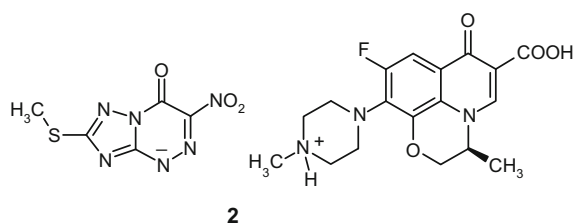


Рис. 1. 2-Метилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7(4Н)-онид(3S)-(-)-9-фтор-3-метил-10-(4-метилпиперазин-1-ил)-7-оксо-2,3-дигидро-7Н-пиридо[1,2,3-*d,e*][1,4]-бензоксазин-6-карбоновой кислоты (**2**). Соединение представляет собой ионную структуру (соль), в которой в качестве катиона выступает фрагмент левофлоксацина, а анионом является триазавирина. Знаки заряда локализованы на соответствующих атомах азота.

Исследования противовирусной и антибактериальной активности соединения **2** не выявили выраженных различий в его эффективности на экспериментальных моделях бактериальных и вирусных инфекций по сравнению с индивидуальными препаратами триазавирином и левофлоксацином.

Цель настоящего исследования состояла в сравнительном экспериментальном изучении фармакокинетики конъюгата **2**, полученного на основе триазавирина и левофлоксацина химическим синтезом, с монопрепаратами левофлоксацином и триазавирином при внутримышечном введении.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Конъюгат **2** получен по схеме, приведенной на рис. 2. К 3 ммоль левофлоксацина (**LF**) в 60 мл этанола добавили 5 ммоль 2-метилтио-4(Н)-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-она (**1**) при 50 – 70 °С, смесь перемешивали при 20 – 25 °С в течение 3 ч. Выпавший осадок отфильтровали, промыли на фильтре 80 мл этанола в два приема, высушили и перекристаллизовали из смеси этанол — вода. Выход 71,9 %. Т. пл. ≥ 250 °С. Найдено, %: С 46,75; Н 3,92; N 21,27. Брутто-формула C₂₃H₂₄FN₉O₇S. Вычислено, %: С 46,86; Н 4,10; N 21,39. Спектр ¹Н ЯМР (400 МГц, D₂O), δ (м.д.): 1,49 (д, 3Н, СН-СН₃), 2,62 (с, 3Н, SCH₃), 2,94 (с, 3Н, N-CH₃), 2,9 – 3,5 [м, 8Н, 2N(CH₂)₂], 4,39 (дд, 1Н, Н-2^а), 4,58 (дд, 1Н, Н-2^б), 4,95 (м, 1Н, Н-3), 7,55 (д, 1Н, Н-8), 8,97 (с, 1Н, Н-5), 14,84 (уш.с, 1Н, ОН).

Исследование выполнено на беспородных белых крысах-самцах массой 180 – 220 г, полученных из питомника РАН “Рапполово”. Животные, которых содержали в условиях вивария на стандартном рационе, до начала экспериментов находились в карантине не менее 14 сут [4]. Все манипуляции проводили в соответствии с правилами и принципами гуманного обращения с животными.

Распределение **TAV** и **LF** в крови изучали в течение первых суток после однократного внутримышечного введения крысам конъюгата **2** и отдельно левофлоксаци-

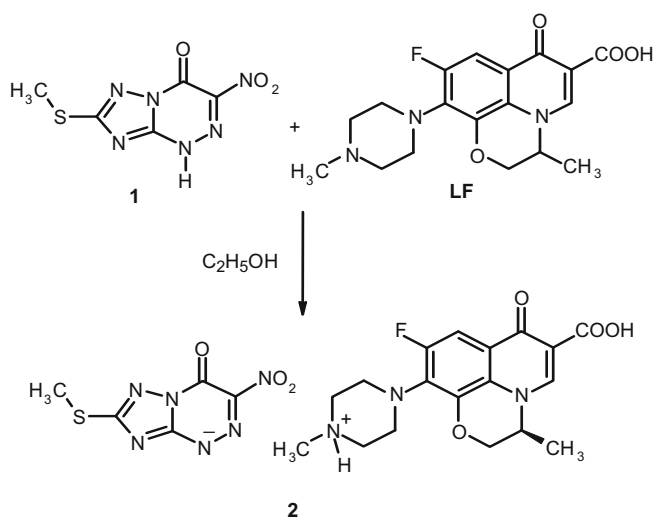


Рис. 2. Схема получения конъюгата **2**.

на и триазавирина. Дозы препаратов: триазавирина – 10 мг/кг (9,1 мг/кг при пересчете на действующее вещество), левофлоксацина (водный раствор) – 14,5 мг/кг, конъюгата **2** – 23,6 мг/кг. Препараты растворяли в 5 % водном растворе твина-80 и вводили животным из расчета 1 мл на 100 г массы тела. Содержание **TAV** и **LF** определяли в плазме крови через 5, 15, 30, 60, 120, 240, 360, 780, 1440 и 2880 мин.

Для проведения пробоподготовки кровь (4 мл) отбирали в пробирки с цитратом натрия (3,8 %), центрифугировали в течение 10 мин при 8000 об/мин, отбирали надосадочный слой. К полученной плазме добавляли 0,5 г хлорида натрия, 3 мл ацетонитрила, перемешивали в течение 5 мин и центрифугировали в течение 10 мин при 3000 об/мин. Экстракцию проводили 2 раза. Отобранный органический слой объединяли и упаривали досуха. Для определения **TAV** сухой остаток растворяли в 1 мл ацетонитрила, для определения **LF** — в смеси 5 % ацетонитрила, 95 % воды и 0,1 % муравьиной кислоты. Все процедуры выполняли при температуре 22 – 24 °С.

Измерение содержания **TAV** и **LF** проводили на жидкостном хроматографе “Dionex Ultimate 3000 RS” с масс-спектрометрическим детектором “TSQ Quantum Access Max” и источником ионизации H-ESI-II (производство Thermo Scientific, США).

Хроматографирование **TAV** проводили в режиме гидрофильной ВЭЖХ (HILIC) на колонке Hypersil GOLD HILIC (150 × 2,1 мм, 3 мкм) при 35 °С и скорости подвижной фазы 0,5 мл/мин. Стартовая подвижная фаза содержала 100 % элюента В (5 мМ ацетата аммония, 95 % ацетонитрила, 5 % деионизированной воды) и не менялась в течение 2 мин. Со 2 до 15 мин применяли линейный градиент до соотношения 50:50 элюента А (5 мМ ацетата аммония, деионизированная вода) и В. С 16 мин подвижную фазу приводили к начальным условиям анализа. Объем вводимой пробы составил 10 мкл, время анализа — 16 мин. Детектиро-

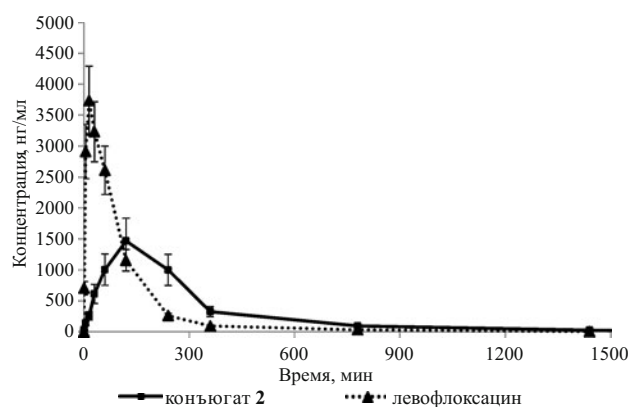


Рис. 3. Фармакокинетические кривые LF после внутримышечного введения конъюгата 2 и левофлоксацина (водный раствор).

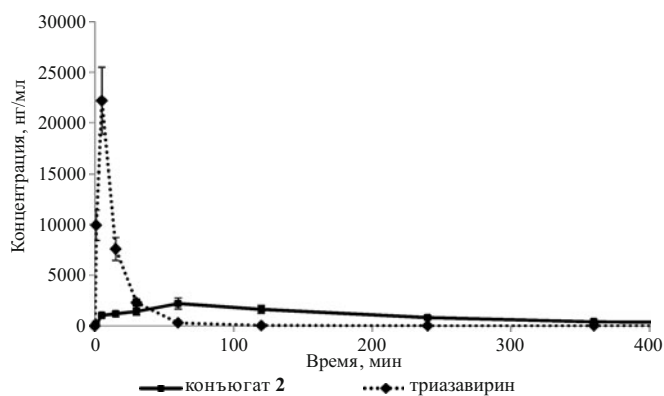


Рис. 4. Фармакокинетические кривые TAV после внутримышечного введения конъюгата 2 и триазавирин.

вание TAV проводили в режиме регистрации отрицательных ионов; температура капилляра составила 300 °С, температура десольвации — 350 °С, давление Sheath gas — 60 psi, давление Sweep gas — 5 psi, скорость потока Auxiliary gas — 30 arb, напряжение на капилляре — 3000 В, давление в ячейке соударений — 1,4 mTorr. По условиям эксперимента, независимо от того, изучалась фармакокинетика триазавирин (натриевой соли 2-метилтио-4(Н)-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-она) или конъюгата 2, хроматографическим анализом фиксировали содержание аниона 2-метилтио-4(Н)-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-она, что позволяет корректно сравнивать фармакокинетические характеристики этих препаратов.

Содержание LF определяли методом обращенно-фазовой жидкостной хроматографии с использованием колонки Nupersil GOLD aQ (50 × 2,1 мм, 3 мкм) и предколонки Nupersil GOLD aQ. Температура термостата составила 40 °С, скорость потока элюента — 0,5 мл/мин. Начальные условия анализа: 95 % фазы А (0,1 % муравьиной кислоты в деионизированной воде) и 5 % фазы В (0,1 % муравьиной кислоты, 90 % ацетонитрила, 10 % деионизированной воды). С 1 до 3 мин градиент изменялся до соотношения 50:50 элюента А и В и сохранялся до 5 мин, после чего доля фазы В увеличивалась до 100 % и не менялась до 9 мин. Затем соотношение фаз возвращалось к начальным условиям. Объем вводимой пробы составил 10 мкл. Детектирование LF проводили в режиме регистрации положительных ионов; температура капилляра составила 350 °С, температура десольвации — 350 °С, давление Sheath gas — 60 psi, давление Sweep gas — 5 psi, скорость потока Auxiliary gas — 30 arb, напряжение на капилляре — 3000 В, давление в ячейке соударений — 1,5 mTorr. По условиям эксперимента, независимо от того, изучалась фармакокинетика левофлоксацина или конъюгата 2, хроматографическим анализом фиксировали катион (3S)-(-)-9-фтор-3-метил-10-(4-метилпиперазин-1-ил)-7-оксо-2,3-дигидро-7Н-пиродо[1,2,3-d,e]-[1,4]бензоксазин-6-карбоновой кислоты, что позволя-

ет корректно сравнивать фармакокинетические характеристики этих препаратов.

Детектирование ионов проводили в режиме SRM (режиме селективного мониторинга реакций) с использованием ионных переходов с m/z 227,0 → 66 для TAV и 362,0 → 318,0 для LF. Энергия разбиения составила 29 и 16 эВ для TAV и LF соответственно. Параметры SRM были определены с помощью опции автоматической оптимизации прибора. Чувствительность метода количественного определения TAV и LF составила 1 нг/мл.

Расчет параметров фармакокинетики был проведен с помощью программы Kinetica версия 5.1 (Thermo Electron Corporation, США). Рассчитывали такие параметры как площадь под кривой “концентрация — время” (AUC_{tot} , нг/мл · мин); общий клиренс (Cl , мл/мин); среднее время удержания препарата в тест-ткани (MRT , мин); стационарный объем распределения (V_{ss} , мл); период полувыведения ($T_{1/2}$, мин); константа скорости всасывания (K_{abs} , мин⁻¹) и элиминации (K_{el} , мин⁻¹); максимальная концентрация препарата в крови (C_{max} , мг/мл) и время ее достижения (T_{max} , мин). Также оценивали относительную биодоступность (f_a , %) препаратов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение распределения левофлоксацина в крови

Усредненные фармакокинетические кривые для LF после однократного внутримышечного введения конъюгата 2 и левофлоксацина (водный раствор) представлены на рис. 3, рассчитанные фармакокинетические параметры — в табл. 1.

Сравнительный анализ основных фармакокинетических параметров показал, что конъюгат 2 после внутримышечного введения всасывается медленнее, чем левофлоксацин (водный раствор). Константа скорости абсорбции LF для конъюгата (0,003 мин⁻¹) в 3 раза меньше, чем соответствующий показатель (0,009 мин⁻¹) для левофлоксацина (водный раствор), а время достижения максимальной концентрации LF

Таблица 1. Фармакокинетические параметры LF после внутримышечного введения конъюгата 2 и левофлоксацина (водный раствор)

Показатель	Препарат	
	левофлоксацин (водный раствор)	конъюгат 2
C_{max} , нг/мл	3734	1469
T_{max} , мин	15	120
AUC_{tot} , (нг/мл) · мин	412841	453947
$T_{1/2}$, мин	197	337
K_{abs} , мин ⁻¹	0,009	0,003
MRT , мин	133	354
K_{el} , мин ⁻¹	0,0035	0,0021
Cl , мл/мин	7,0	6,4
V_{ss} , л	0,9	2,3
f_s , %	100	110

возрастало с 15 до 120 мин (для конъюгата 2). В то же время значение максимальной концентрации LF после введения конъюгата 2 (1469 нг/мл) более чем в 2 раза уступало соответствующему показателю (3734 нг/мл) после введения левофлоксацина (водный раствор).

Снижение концентрации в обоих случаях носило двухфазный характер. В фазе распределения концентрация LF снижалась в 14 раз после введения монопрепарата и в 4,5 раза — после введения конъюгата 2. Терминальная фаза элиминации LF в случае конъюгата начиналась с 360 мин, а для левофлоксацина — с 240 мин. Отмечено более длительное определение LF в крови при введении конъюгата (2 сут), по сравнению с соответствующим значением для левофлоксацина (1 сут), что подтверждается более высокими значениями периода полувыведения и среднего времени удерживания.

Относительная биодоступность LF после введения конъюгата 2 превосходила биодоступность после введения левофлоксацина (водный раствор) и составила 110 %. Увеличение площади под фармакокинетической кривой связано с более медленной элиминацией конъюгата 2, в частности, за счет более интенсивного распределения в органы и ткани, что подтверждается ростом объема распределения с 0,9 до 2,3 л.

Изучение распределения триазавирина в крови

Динамика средних значений концентрации TAV в крови крыс после внутримышечного введения триазавирина и конъюгата 2 представлена на рис. 4, а рассчитанные фармакокинетические параметры — в табл. 2.

После внутримышечного введения конъюгата 2 значение максимальной концентрации TAV в крови было в 10 раз меньше, чем после введения триазавирина. При этом время ее достижения увеличивалось с 5 мин (триазавирин) до 60 мин (конъюгат 2). В последующие сроки снижение концентрации TAV происходило значительно медленнее. Более длительная элиминация TAV из крови после введения конъюгата 2 определяла

Таблица 2. Фармакокинетические параметры TAV после внутримышечного введения конъюгата 2 и триазавирина

Показатель	Препарат	
	триазавирин	конъюгат 2
C_{max} , нг/мл	22171	2194
T_{max} , мин	5	60
AUC_{tot} , (нг/мл) · мин	311376	550190
$T_{1/2}$, мин	323	157
K_{abs} , мин ⁻¹	0,071	0,004
MRT , мин	21	264
K_{el} , мин ⁻¹	0,0021	0,0044
Cl , мл/мин	5,8	3,3
V_{ss} , л	0,12	0,87
f_s , %	100	177

более высокие значения среднего времени удержания и общей площади под фармакокинетической кривой в сравнении с триазавирином. Значение MRT составило 264 мин против 21 мин, а AUC_{tot} — 550190 (нг/мл) · мин против 311376 (нг/мл) · мин для конъюгата 2 и триазавирина соответственно.

Относительная биодоступность TAV после введения конъюгата 2 превосходила биодоступность после введения триазавирина и составила 177 %.

Таким образом, конъюгирование левофлоксацина и триазавирина в составе одной молекулы (конъюгат 2) способствует повышению их биодоступности после внутримышечного введения на 77 и 10 %, соответственно, по сравнению с монопрепаратами. Более медленная элиминация активных действующих веществ после введения конъюгата 2 может способствовать уменьшению частоты введения препаратов. Полученные результаты позволяют заключить, что конъюгирование противовирусных (азолозины) и антибактериальных (фторхинолоны) средств является перспективным направлением оптимизации их фармакокинетических свойств.

ВЫВОДЫ

1. Конъюгирование триазавирина и левофлоксацина в составе одной молекулы (конъюгат 2) обеспечивает уменьшение скорости элиминации активных действующих веществ и пролонгирование времени их пребывания в крови после внутримышечного введения.

2. При внутримышечном введении конъюгата 2 время достижения максимальной концентрации левофлоксацина в крови увеличивается с 5 до 60 мин, а триазавирина — с 15 до 120 мин, по сравнению с соответствующими монопрепаратами.

3. Значения максимальной концентрации активных действующих веществ в плазме крови после введения конъюгата 2 уменьшается в 10 раз (для триазавирина) и в 2,5 раза (для левофлоксацина).

ЛИТЕРАТУРА

1. И. Б. Анготоева, *Мед. совет*, № 4, 16 – 22 (2013).
2. Ю. А. Горностаева, Т. С. Романова, *Мед. совет*, № 7, 98 – 102 (2012).
3. С. Я. Логинова, С. В. Борисевич, В. А. Максимов и др., *Антибиот. и химиотер.*, № 55, 9 – 10 (2010).
4. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*, А. Н. Миронов, Н. Д. Бунатян (ред.), Гриф и К, Москва (2012).
5. В. Л. Русинов, Е. Н. Уломский, О. Н. Чупахин и др., *Хим.-фарм. журн.*, **24**(9), 41 – 44 (1990); *Pharm. Chem. J.*, **24**(9), 646 – 650 (1990).
6. Е. П. Шувалова, *Инфекционные болезни*, Медицина, Москва (2005).
7. R. K. Gupta, R. C. George, J. S. Nguyen-Van-Tam, *Emerging Infectious Diseases*, **14**(8), 1187 – 1192 (2008).
8. I. Karpenko, S. Deev, O. Kiselev, et al., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **54**(5), 2017 – 2022 (2010).
9. J. A. McCullers, *Clin. Microbiol. Rev.*, **19**(3), 571 – 582 (2006).

Поступила 10.11.14

EXPERIMENTAL COMPARATIVE PHARMACOKINETICS OF LEVOFLOXACIN, TRIAZAVIRINE, AND RELATED CONJUGATE

I. V. Blazhennikova¹, A. F. Kurpyakova², V. N. Bykov², D. S. Geibo¹, A. S. Nikiforov²,
A. V. Stepanov², V. N. Charushin^{3,4}, O. N. Chupakhin^{3,4}, S. K. Kotovskaya^{3,4}, and V. L. Rusinov^{3,4}

¹ Innovative Pharmaceutical Company “Silver Pharm”, Industrialnyi prosp. 45a, St. Petersburg, 195279 Russia;

² Scientific Research Institute of Military Medicine, Ministry of Defense of Russian Federation, ul. Lesoparkovaya, 4, St. Petersburg, 105043 Russia;

³ I. Ya. Postovsky Institute of Organic Synthesis, Ural Branch of Russian Academy of Sciences, ul. S. Kovalevskoi 22/20, Yekaterinburg, 620041 Russia;

⁴ Ural Federal University, ul. Mira 19, Yekaterinburg, 620002 Russia

A comparative study of the pharmacokinetics of levofloxacin and triazavirine as well as 2-methylthio-6-nitro-1,2,4-triazolo[5,1-*h*]-1,2,4-triazine-7(4*f*)-ide (3*S*)-(-)-9-fluoro-2,3-dihydro-3-methyl-10-(4-methylpiperazin-1-yl)-7-oxo-7H-pyrido[1,2,3-*d*, *e*]-1,4-benzoxazine-6-carboxylic acid (conjugate 2) obtained by conjugation of triazavirine and levofloxacin, representing a new class of pharmacological agents, was carried out in experiments on rats. It is established that conjugate 2 in comparison to individual levofloxacin and triazavirine has a higher relative bioavailability and lower rate of elimination, which can lead to improved effectiveness of therapy at reduced dose and frequency of drug administration.

Keywords: pharmacokinetics, conjugate; triazavirine; levofloxacin; intramuscular injection.