

Исследование фармакокинетики и биодоступности в создании новых оригинальных лекарственных средств пептидной структуры и их оптимальных лекарственных форм

*Иванникова Е.В., Жердев В.П., Бойко С.С.,
Блынская Е.В., Турчинская К.Г., Алексеев К.В.*
ФГБУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова»
Российской академии медицинских наук, г. Москва

Резюме

В обзоре акцентируется внимание на исследованиях фармакокинетики и биодоступности при создании новых оригинальных препаратов пептидной структуры. Большое внимание уделяется методам количественного определения пептидных соединений в биоматериале, изучению их фармакокинетических характеристик, факторам, влияющих на биодоступность этих веществ, а также приводятся некоторые фармакокинетические данные по внедрённым в медицинскую практику лекарственным препаратам пептидной структуры.

Ключевые слова: фармакокинетика, короткие пептиды, биодоступность, вспомогательные вещества

Study the pharmacokinetics and bioavailability in the creation of new original drugs peptide structures and their optimum dosage forms

Ivannikova E.V., Zherdev V.P., Boyko S.S., Blynskaya E.V., Turchinskaya K.G., Alekseev K.V.

FGBI «Institute of Pharmacology the V.V. Zakusov», Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

Summary

The review focuses on the pharmacokinetics and bioavailability studies for creating new original drugs peptide structure. Much attention is paid to methods for the quantitative determination of peptide compounds in biological material, the study of their pharmacokinetic characteristics, factors that affect the bioavailability of these substances, as well as provide some pharmacokinetic data embedded in the practice of medicines peptide structure.

Keywords: pharmacokinetics, short peptides bioavailability

Введение

Тревожные расстройства — психические расстройства, характеризующиеся общей устойчивой тревогой, паталогическим страхом, напряжением и нервозностью. В настоящее время распространённость заболеваний, связанных с тревожными расстройствами, составляет в западных странах от 13,6 до 28,8% и постоянно возрастает в связи с высоким темпом жизни, экологической и социальной напряжённостью [1-3].

В связи со значительным ростом заболеваний, связанных с тревожными и депрессивными расстройствами, актуальным является разработка и внедрение новых анксиолитических средств. На сегодняшний день препараты, обладающие таким фармакологическим эффектом, представлены в основном группой соединений бензодиазепинового ряда, для которых характерны утомляемость, сонливость, нарушение памяти, психическая и физическая лекарственная зависимость, синдром отмены, что снижает качество жизни пациентов.

Одним из таких анксиолитиков, лишённых этих побочных эффектов, является препарат — афобазол [4-7]. Вышесказанное подтверждает необходимость поисков других высокоэффективных препаратов, лишённых нежелательных реакций бензодиазепинов. Наука уделяет большое внимание эндогенным пептидам. К настоящему времени установлена важная роль эндогенного нейропептида холецистокинина в патогенезе тревожных расстройств. Известно, что холецистокинин, действуя на ХЦК-Б рецепторы, расположенные в ЦНС, проявляет анксиогенную активность — индуцирует панические атаки, взаимодействует с опиатной системой и таким образом может оказывать антианальгетический эффект. Также возможно, что холецистокинин играет роль в патогенезе депрессии и шизофрении [8-12].

Так как эндогенные нейропептиды имеют низкую энзиматическую устойчивость, подвержены гидролизу в ЖКТ, активны только после проникновения через ГЭБ, возникла необходимость поиска потенциальных анксиолитиков (антагонистов холецистокининовых

рецепторов) с более компактной и защищённой структурой, эффективных при системном введении.

Исходя из гипотезы, разработанной *Гудашевой Т.А.* ещё в 1985 г., о возможности имитации структуры не-пептидного прототипа с определённой нейротропной активностью, а также активного фрагмента исходного пептида с аналогичной активностью, был синтезирован новый дипептидный анксиолитик ГБ-115 (амид N-фенил-N-гексаноил-L-глицил-L-триптофан) — ретроаналог холецистокинина-4 [13-15]. Установлена фармакологическая активность соединения: экспериментально доказано, что ГБ-115 проявляет анксиолитические, антиалкогольные, антидепрессивные и анальгетические свойства. При пероральном введении ГБ-115 продемонстрировал свою максимальную анксиолитическую активность в дозе 0,1 мг/кг. Препарат купирует анксиогенную реакцию, индуцированную отменой этанола, в дозе 0,2 мг/кг, п/о. Максимальная анальгетическая активность проявляется в дозе 10 мг/кг, а антидепрессивный эффект — в дозе 0,025-0,05 мг/кг, в/б [16].

Проведение экспериментальных фармакокинетических исследований лекарственного препарата является необходимым этапом для его дальнейшего продвижения в медицинскую практику. Улучшить фармакокинетические параметры позволяет создание оптимальной лекарственной формы, которая бы отличалась подходящими степенью и скоростью всасывания, особенностями распределения, путями метаболизма и экскреции. Оценка же относительной биодоступности позволяет сделать выбор в пользу лекарственной формы с наилучшими для изучаемого соединения фармакокинетическими параметрами.

Фармакокинетика — современная, быстро развивающаяся наука, изучающая особенности проникновения лекарства в организм, распределения, биотрансформации и элиминации. Исследование этих процессов, включая их количественную оценку, и является основной целью фармакокинетики [17-20].

Фармакокинетическое изучение новых фармакологически активных веществ в эксперименте является обязательным этапом при исследовании, разработке и внедрении их в медицинскую практику. Эффективность препарата напрямую зависит от процессов всасывания, распределения и выведения лекарственных веществ из организма.

Фармакокинетические данные позволяют определить путь и метод введения, место проникновения лекарственного препарата, ориентировочную схему дозирования, а также основные пути элиминации лекарственного средства [17].

Всасывание, распределение, метаболизм и выведение лекарственного соединения — взаимосвязанные процессы. Все они подвержены влиянию множества факторов: скорость всасывания зависит от лекарственной формы препарата, концентрации действующего вещества, pH среды, в которой происходит растворение вещества, перистальтики кишечника и состояния

площади поверхности всасывания. На показатели распределения и биотрансформации лекарственного препарата влияют пол, возраст, соматическое состояние организма пациента, а также состояние ферментативных систем организма, что часто обусловлено индивидуальными различиями. Так, скорость метаболизма некоторых психотропных препаратов может варьироваться от 6 до 30 ч у разных пациентов. На выведение метаболитов из организма могут влиять сопутствующие заболевания, а также влияние других лекарственных веществ [21].

Для оценки различных фармакокинетических процессов лекарственных средств в организме животных и человека рассчитывают соответствующие фармакокинетические параметры, в том числе биодоступность (F, %) — часть дозы препарата, достигшая системного кровотока, после его внесосудистого введения [18-20].

Важно отметить условия проведения фармакокинетических экспериментов в доклинических испытаниях новых фармакологически активных соединений.

Изучаемые фармакологические средства принято считать объектом исследований, которые в доклинической практике проводятся на здоровых животных: крысах, мышах, кроликах, собаках, обезьянах и других, масса которых не должна отличаться от стандартной для каждого вида более чем на 10%.

Основными видами биологического материала являются плазма сыворотки крови, цельная кровь, различные органы и ткани, моча, фекалии.

Путь введения определяется формой лекарственного средства, рекомендованного на основании фармакокинетических исследований для дальнейшего фармакологического изучения. Методы введения могут быть различные: внутривенное, внутрибрюшинное, внутримышечное, подкожное, пероральное и др. Внутрь лекарственное средство вводят животным с помощью глоточного или дуоденального зонда натошак во избежание взаимодействия лекарственного вещества с пищей.

Введение возможно многократное или однократное. При однократном введении необходимо изучить фармакокинетику активной субстанции при использовании не менее трёх уровней дозы. Это необходимо для проверки линейности фармакокинетики.

Длительность эксперимента должна соответствовать времени в 5 раз продолжительнее периода полувыведения.

Число животных на одну точку (соответствующее значению концентрации) должно быть не менее 5, если у каждого животного из выборки отбирается только одна проба (в экспериментах на крысах в случае декарпитации: одно животное — одна точка).

Одним из важных этапов фармакокинетического и биофармацевтического изучения нового фармакологически активного соединения является исследование его абсолютной и относительной биодоступности (см. раздел «Биодоступность лекарственных веществ»).

1. Аналитические методы определения пептидов и их производных

Существуют различные методы качественного и количественного определения аминокислот, пептидов и их производных. И необходимо обоснованно подобрать оптимальный метод для анализа потенциального лекарственного препарата пептидной структуры. Это позволит добиться чувствительного анализа и получить точные и воспроизводимые результаты, которые показали бы особенности фармакокинетики того или иного соединения.

Классификация:

- Методы жидкостной хроматографии:
 - тонкослойная жидкостная хроматография
 - высокоэффективная жидкостная хроматография
- Газовая хроматография
- Иммунохимические методы анализа
- Капиллярный электрофорез

1.2 Хроматография аминокислот и пептидов

Хроматография — физико-химический метод разделения компонентов анализируемой смеси, основанный на разности коэффициентов их распределения между двумя фазами: неподвижной и подвижной [22]. Наиболее перспективными методами хроматографии являются: газовая хроматография (ГХ) и высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) в сочетании с масс-спектрометрическим детектором — ГХ-МС и ВЭЖХ-МС. Эти методы развиваются большими темпами, что связано с ростом задач, возникших в последние годы: протеомика, метаболомика, анализ биотоплив, определение биомаркеров заболеваний, создание и контроль качества лекарственных средств, контроль качества и безопасность пищевых продуктов, а также терроризм (определение отравляющих веществ, вредных веществ и боевых веществ) и экспрессное определение последствий чрезвычайных ситуаций [23].

1.2.1 Методы жидкостной хроматографии

1.2.1.1. Высокоэффективная жидкостная хроматография

ВЭЖХ — физико-химический метод разделения компонентов смеси веществ, основанный на их различном распределении между двумя несмешивающимися фазами, одна из которых подвижна, а другая неподвижна. В зависимости от полярности подвижной и неподвижной фаз ВЭЖХ принято разделять на нормально-фазовую (неподвижная фаза более полярная, чем подвижная) и на обращённо-фазовую (неподвижная фаза менее полярная, чем подвижная) [24–26].

Для разделения аминокислот и пептидов чаще используют обращённо-фазовую ВЭЖХ вследствие того, что большинство аналитов хорошо растворимы в водных подвижных фазах и ограниченно растворимы в большинстве неполярных растворителей [27–29]. Однако нормально-фазовую ВЭЖХ используют

для хроматографирования производных аминокислот и пептидов с короткой цепью, а также с низкой гидрофобностью, которые не удерживаются неподвижной фазой в обращённо-фазовой ВЭЖХ. Обращённо-фазовая ВЭЖХ была золотым стандартом для разделения и очистки пептидов до применения масс-спектрометрии в этой области. Для ОФ-ВЭЖХ характерны следующие преимущества по сравнению с другими методами хроматографического анализа: воспроизводимость результатов, высокая разделительная способность, селективность (возможность дифференцировать пептиды с разницей в одну аминокислоту), чувствительность, высокая скорость исполнения, а также использование маленького объёма летучих растворителей.

Селективность и качество анализа пептидов в обращённо-фазовой ВЭЖХ зависит от правильного выбора фаз: подвижной и неподвижной.

В качестве неподвижной фазы используют адсорбенты, представляющие собой модифицированный различными производными хлорсиланов силикагель. Такая фаза обладает высокой прочностью и индифферентностью к органическим растворителям. Обращённая фаза отличается характеристиками матрицы — силикагеля и строением привитого радикала, который отличается составом и строением углеродного фрагмента. При хроматографировании пептидов выбор обращённой фазы определяется размерами и гидрофобностью пептидов: для пептидов с короткой цепью, гидрофильных пептидов используют фазы C8 (н-октил) и C18 (н-октадецил), для крупных и гидрофобных — фазы C3 (триметил- или диметилпропил), C4 (н-бутил), C6 (фенил).

Для правильного выбора подвижной фазы необходимо учитывать pH, состав и концентрацию органического растворителя:

Для уменьшения полярности пептидов и обеспечения лучшего удерживания адсорбентом, pH элюента должен находиться в диапазоне 2–3. Также для увеличения времени удерживания пептидов в состав подвижной фазы вводят так называемые модификаторы или ион-парные реагенты (противоионы), которые способны образовывать ион-пары с положительно заряженными группировками пептидов. Основным ионным модификатором в ОФ ВЭЖХ служит трифторуксусная кислота. Она легко удаляется из элюатов упариванием, хорошо растворяет пептиды, УФ-прозрачна в области коротких длин волн, что не создаёт дополнительных пиков при детектировании. Муравьиная кислота также используется как модификатор и обеспечивает хорошее разделение, но её применение ограничено сильным поглощением в УФ-области [30–33].

Влияние органического растворителя на элюирующую способность подвижной фазы очень велико. Итак, элюирующая сила растворителя возрастает в следующем порядке: вода — метанол — ацетонитрил —

этанол — диоксан — тетрагидрофуран — 2-пропанол — 1-пропанол. Такая последовательность обусловлена уменьшением полярности органических веществ в данном ряду. Наиболее часто в качестве органического компонента подвижной фазы используется ацетонитрил, так как он прозрачен в УФ-области до 200 нм, обладает низкой вязкостью, высоко летуч, что позволяет, при необходимости, легко удалить его из собранной фракции элюата, характеризуется хорошей селективностью [34].

Разделение пептидных соединений может производиться в изократических условиях, где концентрация органического растворителя постоянная или же посредством градиентного элюирования — в этом случае концентрация органического растворителя увеличивается с течением времени. Исследуемые вещества элюируются в порядке увеличения гидрофобности [27].

1.2.1.2. Методы детектирования пептидов в высокоэффективной жидкостной хроматографии: УФ детектирование, масс-спектрометрия.

Для точного проведения качественного и количественного анализа после разделения лекарственных веществ методом ВЭЖХ необходимо использовать аппаратуру для их детектирования, к которой в свою очередь предъявляются следующие требования: детекторы должны обладать высокой чувствительностью (хороший сигнал, отсутствие шума), быстродействием, широким линейным динамическим диапазоном, стабильностью, отсутствием взаимодействия с подвижной фазой.

Одним из наиболее распространённых методов детектирования в высокоэффективной жидкостной хроматографии является ультрафиолетовое, что объясняется высокой чувствительностью анализа, простотой, доступностью с экономической точки зрения [27, 35–37]. Однако, УФ-детектор является менее чувствительным методом, чем масс-спектрометрия. УФ-детекторы представлены четырьмя основными видами на сегодняшний день:

1. с фиксированной длиной волны;
2. с монохроматором, который позволяет изменять длин волны в своём диапазоне;
3. с автоматически перестраиваемым монохроматором, который позволяет осуществлять многоволновую многоканальную детекцию;
4. диодно-матричные детекторы, позволяющие получать полную спектральную информацию в заданном диапазоне.

Благодаря наличию некоторых хромофоров в составе аминокислот, а также самой пептидной связи, стало возможным детектировать пептидные соединения с помощью УФ-излучения одним из четырёх выше перечисленных видов аппаратуры.

Пептидные соединения способны поглощать УФ-излучение в трёх областях:

- Выше 250 нм ($\lambda=280$ нм), что обусловлено присутствием в составе анализируемого соединения ароматических аминокислот — триптофана ($\lambda=278$ нм), тирозина ($\lambda=275$ нм) и фенилаланина.
- При 210–250 нм — такой сигнал могут давать другие аминокислоты с внутри- и межмолекулярными водородными связями в белковых молекулах.
- При 190 нм, что объясняется наличием пептидных связей [38].

Однако детектирование исследуемых соединений не проводят при длине волны ниже 210 нм ввиду влияния растворителей, используемых в ВЭЖХ, которые имеют собственное поглощение при длинах волн короче 210 нм, а также ввиду наличия примесей. Поэтому при детектировании пептидных веществ чаще используют диапазон длин волн — выше 250 нм. Если же соединения не содержат хромофоров, которые поглощали бы УФ-излучение в этой области, то прибегают к методу дериватизации.

Дериватизация — это химическая модификация анализируемого вещества с получением производного соединения, обладающего усовершенствованными аналитическими свойствами. В работе с ВЭЖХ-УФ посредством дериватизации необходимо получить соединение, регистрируемое в УФ-спектре в области, удобной для анализа биологического материала. Так в работе Руденко А.О. при определении важнейших аминокислот в сложных биологических матрицах был использован метод дериватизации 16 аминокислот. В качестве дериватирующего агента использовали *о*-фталевый альдегид [39].

Метод масс-спектрометрического детектирования состоит из трёх этапов: ионизации, разделения по принципу отношения массы к заряду и последующей детекции с использованием масс-анализатора [40–48]. Для анализа лекарственных соединений используют «мягкие» техники ионизации: ионизация электрораспылением, а также матрично-активированная лазерная десорбция (MALDI). Эти методы представляют собой щадящий режим ионизации, что особенно актуально для термически нестабильных биомолекул [40, 41, 49]. Однако данные виды ионизации являются недостаточно информативными, поэтому часто прибегают к тандемной масс-спектрометрии (МС/МС) — метод регистрации фрагментов анализируемых веществ. Если быть более точным, этот метод состоит из нескольких стадий: сначала анализируемые соединения ионизируются мягким способом, проходят через первый анализатор, затем их энергию повышают, за счёт чего исследуемые молекулы фрагментируются и второй анализатор фиксирует полученный масс-спектр [50–52].

Для количественного определения новых лекарственных соединений используют следующие типы масс-анализаторов:

- Квадрупольный (масс-анализатор на основе трёх квадруполов), который является «золотым стандартом» в исследовании новых лекарственных соединений [40, 41, 53];

- Времяпролётный (TOF), при использовании которого достигают меньшей чувствительности, чем при использовании тройных квадрупольных анализаторов [54-56].
- Ионно-циклотронного резонанса и орбитальной ионной ловушки, которые являются масс-анализаторами высокого разрешения и пока что редко используются ввиду высокой стоимости и сложности таких приборов [57-58].

Использование детектирования методом масс-спектрометрии в сочетании с ВЭЖХ позволило достичь высоких темпов анализа, повысить предел обнаружения лекарственных соединения, а также значительно повысить стабильность и точность исследований.

1.2.1.3 Тонкослойная хроматография

Сегодня ТСХ используется гораздо в меньшей степени, так как стали доступны более высоко-технологичные методы разделения пептидов, такие как ВЭЖХ, жидкостная колоночная хроматография, ионно-обменная хроматография, электрофорез белков в полиакриламидном геле, капиллярный электрофорез. Однако, ТСХ проявила себя в своё время как количественный, высокотехнологичный, относительно недорогой и легко воспроизводимый метод. Тонкослойная хроматография была популярна в 80-е годы — аминокислоты выделялись из растений, животных и различных биологических жидкостей [59].

1.2.1.4. Газовая хроматография пептидов

Качественный и количественный метод.

Метод разделения летучих компонентов, при котором подвижной фазой служит инертный газ (газ-носитель: водород, гелий, азот, аргон, углекислый газ), протекающий через неподвижную фазу (твёрдый носитель (силикагель, уголь, оксид алюминия) — газо-твёрдо-фазная хроматография; жидкость, нанесённая на поверхность инертного носителя — газо-жидкостная хроматография) с большой поверхностью [60].

Метод чувствительный и высокоселективный позволяет разделять пептиды и аминокислоты в сложных биологических матрицах. Однако, газовая хроматография не может быть использована для точного определения субстратов смесей самостоятельно, поэтому этот метод наиболее часто применим в сочетании с масс-спектрометрическим детектором, который позволяет проводить количественное определение после должного разделения веществ [61-66].

ГХ осложняется необходимостью дериватизации веществ для достижения их летучести, термостабильности и инертности. Использование дериватизации и гидролиза существенно затрудняет проведение анализа пептидов — это занимает время, вовлекает ряд дополнительных стадий, может увеличить возможные систематические и несистематические погрешности анализа [67-69].

Метод применим в различных областях: проверка лекарственных средств, контроль качества в производстве, проверка состояния окружающей среды.

1.3 Иммунохимические методы анализа

Качественные и количественные методы.

Объекты исследования: от низкомолекулярных соединений до вирусов и бактерий.

Методы основаны на специфическом связывании определённого соединения соответствующим антителом и, как правило, последующем определении данного комплекса каким-либо физико-химическим методом: спектрофотометрическим, флуориметрическим, люминесцентным и т.д. [70, 71].

1.4. Капиллярный электрофорез

Наряду с обращённо-фазовой ВЭЖХ капиллярный электрофорез является основным методом разделения пептидов. Каждый метод имеет свои преимущества. В свою очередь капиллярный электрофорез отличается быстротой проведения анализа, экспрессностью, микрообъёмами аналита, минимизацией использования токсических органических растворителей, экономичностью, высокой эффективностью разделения, что сводит к минимуму размытие пиков [72-76]. В основе метода капиллярного электрофореза лежит разделение заряженных компонентов сложной смеси в кварцевом капилляре под действием электрического поля, создаваемого подачей высокого напряжения к концам капилляра. Разделение исследуемых веществ анализируемой смеси происходит за счёт различной скорости перемещения компонентов в электрическом поле [77-78].

Капиллярный электрофорез (КЭ) методика с высокой разрешающей способностью. В лабораториях и клиниках метод применяют при анализе белков сыворотки крови, маркеров заболеваний. Очень часто КЭ используется в сочетании с масс-спектрометрией, что позволяет повысить эффективность проведения анализов. КЭ-МС позволил провести быстрый и точный анализ структуры белков в моче пациентов, страдающих иммуноглобулин-А нефропатией. КЭ широко используется в фармацевтической промышленности. Так, пептированные пептидные соединения были разделены и проанализированы данным методом [77].

2. Валидация методики

В основе любого эксперимента лежит валидация методики анализа, основной задачей которой является проверка её надёжности. Основными её характеристиками являются:

- *Селективность* — способность разработанной методики определять исследуемые вещества в биологической матрице среди множества других эндогенных компонентов;

- **Нижний предел количественного определения** исследуемого вещества — минимальная концентрация исследуемого вещества, которую можно количественно измерить с достаточной точностью и прецизионностью;
- **Воспроизводимость калибровочной кривой:** на начальном этапе необходимо обозначить диапазон концентраций, ограниченный нижним пределом количественного определения (НПКО) и верхним пределом количественного определения (ВПКО), с целью наиболее полного описания фармакокинетики исследуемого вещества. Для построения калибровочной кривой необходимо использовать не менее 6 различных калибровочных концентраций. В результате их анализа необходимо описать параметры полученной калибровочной кривой, то есть обозначить функцию отклика (в случае линейной калибровочной кривой — наклон и свободный член);
- **Точность методики** определяется близостью полученных значений к действительной концентрации аналита, выражается в % и оценивается по образцам, к которым заранее добавлено известное количество исследуемого вещества. Эти образцы анализируются по калибровочной кривой, экспериментальные значения которых сравнивают с номинальными. Для одной калибровочной кривой необходимо оценить 5 образцов 1-ой концентрации для не менее, чем 4-х отличных концентраций, перекрывающих собой диапазон калибровочной кривой;
- **Прецизионность** — степень близости значений между повторными измерениями. Для подтверждения того, что полученные в ходе эксперимента значения достаточно близки, необходимо сравнить 5 образцов 1-ой концентрации для не менее, чем 4-х отличных концентраций, перекрывающих собой диапазон калибровочной кривой;
- **Эффект матрицы:**
При использовании методов масс-спектрометрии эффект матрицы оценивают по 6 образцам холостой матрицы от разных доноров. Для этого необходимо выполнить 3 этапа расчётов:
— вычислить фактор матрицы MF: площадь пика аналита в присутствии заранее экстрагированной матрицы/ площадь пика чистого аналита;
— точно так же MF рассчитывают по внутреннему стандарту — ВС;
— MF нормализуют по внутреннему стандарту, исходя из отношения MF аналита/ MF внутреннего стандарта.
Коэффициент вариации MF, нормализованному по ВС, не должен превышать 15%.
- **Стабильность:**
Необходимо подтвердить для каждого этапа биоаналитической методики, чтобы показать, что ни условия хранения, ни этапы анализа не влияют на концентрацию исследуемого вещества [79].

3. Биодоступность лекарственных веществ

Существуют различные определения, характеризующие биологическую доступность лекарственного вещества:

Понятие, принятое ВОЗ: Биологическая доступность (БД) — это степень всасывания лекарственного вещества из места введения в системный кровоток и скорость, с которой этот процесс происходит [80].

Однако, в понятие биодоступности входит не только скорость и степень всасывания активной субстанции, а также другие её характеристики: доступность активного вещества и образовавшихся метаболитов в месте действия. Это подтверждают следующие определения:

Биологическая доступность — это степень и скорость, с которой активная лекарственная субстанция абсорбируется из фармацевтической формы и становится доступной в месте её действия [81-83].

Биодоступность — часть принятой внутрь дозы лекарственного вещества, которая достигла системного кровотока в неизменном виде и в виде активных метаболитов, образовавшихся в процессе всасывания и пресистемного метаболизма [80].

Итак, суть всех определений заключается в том, что биологическая доступность лекарственных препаратов зависит от скорости и степени всасывания активных фармакологических ингредиентов из места введения в системный кровоток, а также доступности этих веществ и образовавшихся метаболитов в месте действия.

Для определения биодоступности используют методы *in vitro* и *in vivo*.

Биодоступность *in vitro* — это высвобождение лекарственного вещества вне биологической системы. Она является синонимом фармацевтической доступности. Это исследования, проводимые на различных культурах клеток, выступающих в качестве моделей биологических систем. Тест «Растворение» также относится к исследованиям *in vitro* [82].

Биодоступность *in vivo* — высвобождение лекарственного вещества в месте всасывания, определяемая с помощью фармакокинетических исследований на животных.

При фармакокинетическом методе определения биодоступности последовательно забирают пробы биожидкостей в течение определённого времени из различных мест (венозная, артериальная кровь, моча) после однократной или многократно повторяющихся доз.

Биодоступность вычисляется по формуле:

$$A_{ис.}/A_{ст.} \times 100\%,$$

где $A_{ис.}$ — количество препарата, всосавшегося из исследуемой лекарственной формы;

$A_{ст.}$ — количество препарата, всосавшегося из стандартной лекарственной формы.

Биодоступность определяют абсолютную и относительную. Важно отметить, что определение относительной биодоступности имеет большое значение при выборе оптимальной лекарственной формы, а абсолютная биодоступность больше важна для определения полноты всасывания, перспективности пути введения и влияющих на неё различных факторов.

Абсолютная биологическая биодоступность — это количество лекарственного вещества, введённого в лекарственной форме внутривенно или внутрисосудисто, которое поступает в кровообращение без влияния эффекта первого прохождения через печень или после корреляции на этот эффект, и скорость протекания этого процесса [80].

Итак, принято считать, что при абсолютной биодоступности вся доза препарата, введённого внутривенно, поступает в большой круг кровообращения, и биодоступность вещества в этом случае принимается за 100%. Однако, есть работы, которые доказывают обратное: лекарственные соединения после внутривенного введения поступают сначала в лёгочный круг кровообращения, проходят через лёгкие, которые могут кумулировать экзогенные соединения, подвергать их экскреции или же метаболизму [85-86]. Таким образом, лёгкие выполняют роль фильтра для частиц, которые могут попадать в организм при парентеральном введении.

Относительная биодоступность — это выраженное в процентах количество лекарственного вещества, высвобождённое из лекарственной формы, которое после введения достигает рецептора в количестве, достаточном для того чтобы вызвать биологический эффект.

Данное определение относительной биодоступности свидетельствует о том, что лекарственное вещество не полностью достигает места действия, а становится доступным в определённом процентном содержании.

Относительную биодоступность определяют для различных лекформ, для лекарственных средств при изменении технологии производства, для препаратов различных производителей и даже для различных серий препаратов, выпускаемых одной фармацевтической компанией. Обычно относительную биодоступность измеряют при одном и том же пути введения лекарственных средств. Однако этот показатель можно определять и при различных путях введения препаратов [86].

Проблемами и принципами биологической доступности занимается наука биофармация, которая представляет собой научную дисциплину фармации, занимающуюся исследованием влияния физических и физико-химических свойств действующих и вспомогательных веществ в лекарственных препаратах, производимых в различных лекарственных формах и по различным технологиям, но в одинаковых дозах, на их терапевтический эффект [80].

3.1 Фармацевтические факторы, влияющие на биодоступность лекарственных веществ

В ходе различных исследований было установлено, что фармацевтические факторы оказывают существенное влияние на динамику биодоступности лекарственных веществ, стабильность лекарственных препаратов в процессе хранения, терапевтическую активность действующих веществ и на многие другие показатели.

Фармацевтические факторы делятся на пять групп:

1. химическая модификация ЛВ;
2. физико-химические свойства ЛВ;
3. вид ЛВ и способ введения ЛС;
4. природа используемых вспомогательных веществ;
5. способ или технология изготовления лекарственной формы.

Также на биодоступность лекарственных веществ влияют так называемые эндогенные факторы. К ним относятся:

- физиологические факторы: возраст, пол, состояние организма пациента;
- биохимические факторы: состояние клеточных мембран, активность клетки, наличие эндогенных субстратов, накапливаемых при различных заболеваниях (билирубин, жирные кислоты и т.д.);
- патофизиологические: патологические состояния желудочно-кишечного тракта, печени, почек, сердечно-сосудистой системы, уровень транспортных белков в крови, генетически обусловленная разница в биотрансформации лекарственных веществ с пресистемным метаболизмом;
- клинические: выбор схемы дозирования, путь введения, место инъекции, интеракция одновременно или последовательно вводимых лекарственных веществ [80, 87].

В данном обзоре более подробно будут рассмотрены фармацевтические факторы, оказывающие влияние на биодоступность лекарственных препаратов, а именно: физическое состояние лекарственного вещества, вспомогательные вещества, а также виды лекарственных форм пептидных препаратов и технология их изготовления.

3.2. Влияние физического состояния лекарственных веществ на биодоступность лекарственных препаратов

Под физическим свойством лекарственных веществ понимают:

- степень измельчения или дисперсность лекарственных веществ;
- полиморфизм лекарственных веществ;
- агрегатное состояние (аморфность, кристалличность, форма и характер кристаллов);
- физико-химические свойства (рН, растворимость, оптическая активность, электропроводимость, температура плавления);

- поверхностные свойства лекарственного вещества (поверхностное натяжение);
- степень чистоты (вид и количество загрязнений, в том числе наличие микроорганизмов, аллергенов, вяжущих веществ и др.).

Физическое состояние лекарственных веществ оказывает влияние на стабильность лекарственного препарата в процессе хранения, терапевтическую эффективность, скорость всасывания, проницаемости и выведения его из организма.

Наиболее существенно влияет на фармакотерапию степень измельчения и полиморфизм лекарственных веществ [80, 87].

3.3. Влияние микронизации лекарственных веществ на биодоступность лекарственных препаратов

Степень измельчения лекарственных веществ определяет скорость растворения, абсорбции и терапевтический эффект лекарственного препарата. В ряде случаев микронизация оказывает положительных эффект на биодоступность лекарственных веществ. Но выбор степени измельчения порошка должен быть научно обоснован, так как не всегда стремление к получению микронизированного порошка имеет преимущества. В табл. 1 рассмотрены положительные и отрицательные эффекты данного технологического приёма как микронизация на конкретных примерах:

Часто к микронизации прибегают для получения ингаляционных препаратов, в которых строго регламентирован размер частиц [88]. Влияние микронизации на терапевтическую активность было доказано для различных групп препаратов: сульфаниламидных, стероидных, производных фурана, кислоты салициловой, антибиотиков, в настоящее время — для противосудорожных, обезболивающих, мочегонных, противотуберкулёзных, антидиабетических и кардиотонических средств [87].

Так, для ацетилсалициловой кислоты (АСК) как противовоспалительного, обезболивающего и жаропонижающего препарата была разработана формула,

состоящая из микронизированной субстанции АСК, а также мощного дезинтегранта (эфффересцентного компонента или газообразующего компонента). Было проведено исследование, в котором сравнивались обычный аспирин с микронизированным в дозировке 500 мг. Пациенты принимали лекарственный препарат от острой зубной боли. По результатам фармакокинетических исследований было отмечено, что значительно повысилась скорость всасывания при использовании микронизированной субстанции: время достижения максимальной концентрации сократилось до 17,5 мин в сравнении с 45 мин для обычной субстанции. Увеличилась и сама максимальная концентрация с 4,4 мкг/мл до 13,8 мкг/мл. Однако, площадь под фармакокинетической кривой (степень всасывания) осталась почти неизменной (рис. 1). Полученные данные свидетельствуют о явных преимуществах микронизированной формулы для аспирина в лечении острой боли [89-90].

Микронизация позволяет снизить дозировку лекарственного препарата и достигнуть аналогичных фармакокинетических параметров, как и после введения более высокой дозы (рис. 2). К примеру, после приёма сахароснижающего препарата глибенкламид в дозе 3 мг, содержащего микронизированную активную субстанцию, концентрация действующего вещества в плазме крови составила — 97,2 нг/мл, что выше достигнутой максимальной концентрации (87,5 нг/мл) после введения стандартной субстанции в дозе 5 мг. Степень всасывания же составила 746 нг×ч/мл для немикронизированной субстанции вещества в дозе 5 мг и 568 нг×ч/мл для микронизированной субстанции в дозе 3 мг [91].

Однако микронизация и не всегда увеличивает скорость растворения и абсорбцию лекарственного вещества, в частности, вследствие плохой смачиваемости труднорастворимых веществ. Важно учитывать и то, что появление на измельченном материале электростатического заряда приводит к его комкованию, потере сыпучести, плохой смачиваемости, понижению химической стабильности, уменьшению сроков годности и др.

Эффекты микронизации [80, 87]

Таблица 1

Положительный эффект микронизации	Отрицательный эффект микронизации
Для сульфадимезина максимальная концентрация достигается на 2 ч раньше.	Для бисгидроксикумарина ускорение всасывания может привести к летальному исходу.
Для гризеофульвина позволяет в 2 раза снизить терапевтическую дозу.	Снижение терапевтической активности эритромицина и пенициллина вследствие усиления процессов гидролитической деструкции в присутствии пищеварительных соков.
При измельчении АСК в 30 раз возрастает терапевтический эффект в 2 раза.	Приём нитрофурантоина в виде сверхтонкого порошка увеличивает токсичность препарата на слизистые оболочки ЖКТ.
Кальциферол способен оказывать лечебное действие, если размер частиц не превышает 10 мкм.	<ul style="list-style-type: none"> • Быстрая инактивация, • Быстрое выведение из организма, • Усиление побочного действия, • Снижение стабильности.

Примечание. АСК — ацетилсалициловая кислота.

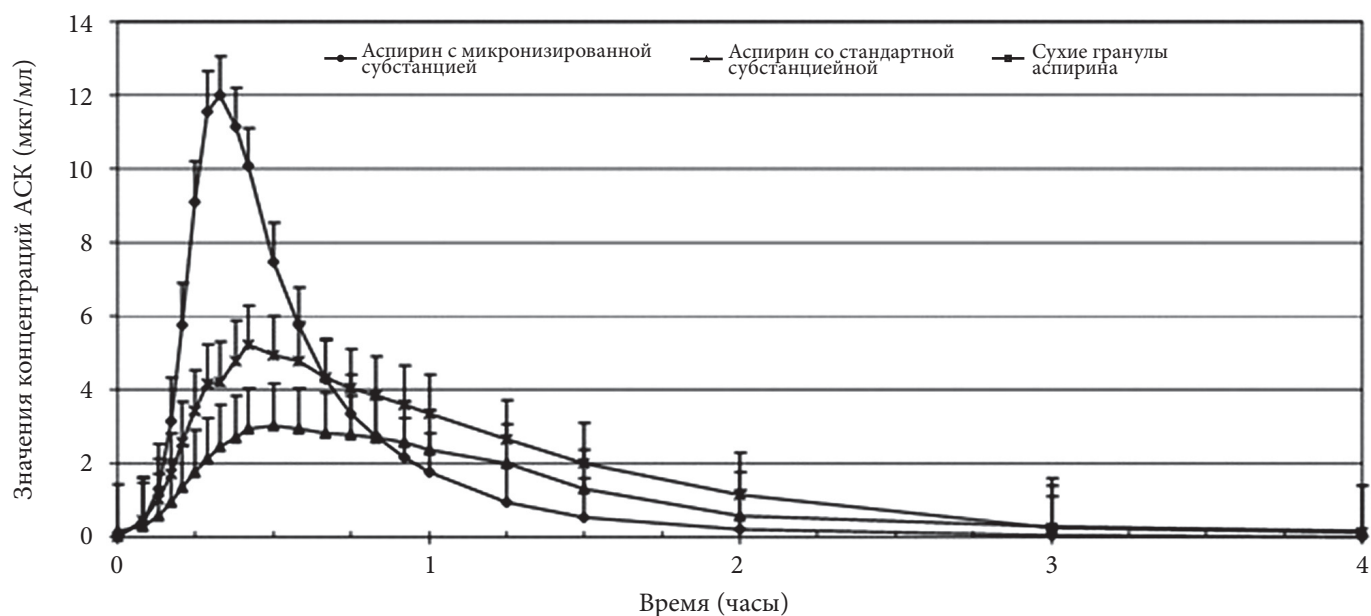


Рис. 1. Фармакокинетические кривые АСК после приёма таблеток в дозе 500 мг с микронизированной субстанцией, таблеток со стандартной субстанцией, сухих гранул аспирина

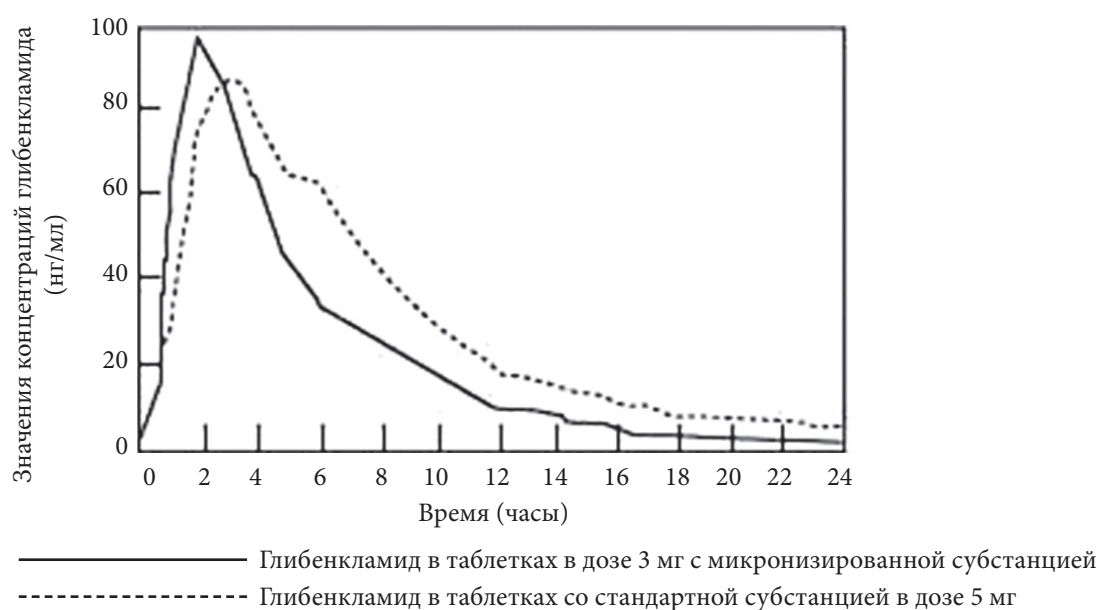


Рис. 2. Фармакокинетические кривые глибенкламида после приёма таблеток в дозе 3 мг с микронизированной субстанцией, таблеток со стандартной субстанцией в дозе 5 мг

3.4. Влияние вспомогательных веществ на биодоступность лекарственных средств и на их фармакотерапевтические свойства

Вспомогательные вещества не только имеют формообразующие и технологические функции, но и являются активными компонентами лекарственной композиции. Установлено, что ни один фармацевтический фактор не оказывает столь существенного и сложного влияния на действие лекарственного препарата как вспомогательные вещества. Влияние вспомогательных веществ на биодоступность и тера-

певтическую активность велико. Важно учитывать и безопасность используемых вспомогательных веществ, так как их неразумный подбор может привести к ослаблению терапевтической активности, а также к всевозможным побочным реакциям [92-95]. В связи с этим современная фармацевтическая наука выдвигает требования установить степень влияния вспомогательных веществ на терапевтическую эффективность лекарств. Иначе говоря, вспомогательные вещества должны применяться с определённой лекарственной субстанцией.

Возможные влияния вспомогательных веществ:

- усиление или снижение терапевтической активности;
- изменение характера действия лекарственных веществ;
- обеспечение локализации и продолжительности действия лекарственных веществ;
- регулирование скорости всасывания лекарственных веществ;
- обеспечение стабильности лекарственных препаратов.

Помимо влияния на биодоступность самого лекарственного вещества, вспомогательные вещества взаимодействуют и оказывают влияние на организм человека, поэтому целесообразно привести предъявляемые к эксципиентам требования:

1. Способствование проявлению надлежащего фармакологического эффекта активного лекарственного вещества.
2. Отсутствие нежелательных явлений, например: аллергических и токсических реакций.
3. Соответствие своему назначению и функциям (наполнители, связующие, дезинтегранты и т.д.), а также обеспечение биодоступности лекарственных субстанций.
4. Отсутствие химических или физико-химических взаимодействий с лекарственными веществами во избежание снижения эффективности лекарственного соединения или же возникновения побочных реакций.
5. Контроль чистоты вспомогательных веществ во избежание микробной контаминации [80, 87].

Существуют различные классификации вспомогательных веществ. Ниже приведены классификации вспомогательных веществ по происхождению, по своему назначению в производстве твёрдых лекарственных форм, а также обобщённая химическая классификация и роль фармацевтических вспомогательных веществ:

Классификация вспомогательных веществ по происхождению:

- животного происхождения: лактоза, желатин, стеариновая кислота;
- растительного происхождения: крахмал, сахара, целлюлоза, альгинаты;
- минерального происхождения: фосфат кальция, кремний;
- синтетического происхождения: полиэтиленгликоль, полисорбаты, повидон.

Классификация вспомогательных веществ по своему назначению в производстве твёрдых лекарственных форм:

- разбавители или наполнители (*микrokристаллическая целлюлоза, лактоза, маннит, сорбит, крахмал, глицин, кальция сульфат и др.*): обеспечивают стабильность лекарственных веществ, определяют степень и скорость всасывания, органолептические свойства таблеток;

- разрыхлители или дезинтегранты (*поливинилпирролидон, твины, сены, неионогенные ПАВ*): ускоряют всасывания за счёт быстрого механического разрушения таблетки в жидкой среде;
- склеивающие или связующие вещества (*слизь крахмала, метилцеллюлоза, этилцеллюлоза, поливинилпирролидон*): придают прочность таблеткам, влияют на скорость растворения лекарственных веществ;
- скользящие вещества или лубриканты (*тальк, каолин, аэросил, крахмал*): улучшают сыпучесть лекарственных субстанций.

Из классификации, приведённой выше, видно, что некоторые из вспомогательных веществ могут одновременно выполнять несколько функций, и соответственно относятся к разным группам, поэтому такое деление условно (табл. 2).

Таблица 2

Обобщённая химическая классификация и роль фармацевтических вспомогательных веществ [92]

Химическая классификация	Выполняемые функции
Вода, спирты	Пластичность
Эфиры, карбоксильные кислоты	Точность дозирования
Глицериды, воска	Стабильность
Углеводы	Технологичность
Углеводороды, производные галогенов	Переносимость
Полимеры	Распадаемость
Минералы	Растворение
Протеины	Контролируемое высвобождение

Важно ещё раз подчеркнуть, что вспомогательные вещества должны быть подобраны индивидуально в каждом случае, и этот выбор должен быть научно обоснован. Ниже будут приведены частные случаи взаимодействия вспомогательных веществ с действующими в табл. 3.

3.4.1 Технологические характеристики неусиллина, лудипресса, твёрдой дисперсии на основе поливинилпирролидона

Сегодня фармацевтические предприятия стремятся создать вспомогательные вещества, которые бы способствовали увеличению биодоступности активной лекарственной субстанции, не взаимодействовали бы с ней, делали бы процесс производства быстрым и экономичным. Полимерные вспомогательные вещества пользуются популярностью у производителей и соответствуют выше перечисленным требованиям [96-97].

Неусиллин — многофункциональное вспомогательное вещество, которое представляет собой синтетическую аморфную форму магния аммония метасиликата. Неусиллин достаточно часто применяется в фармацевтическом производстве и обладает следующими положительными характеристиками: придаёт прочность таблеткам, обладает высокой поглощаю-

Таблица 3

Взаимодействия вспомогательных веществ с лекарственными субстанциями [87]

Положительное влияние	Отрицательное влияние
Разбавители	
Лактоза усиливает действие тестостерона.	Лактоза сводит к минимуму действие изониазида. Лактоза замедляет действие барбитала. Лактоза в сочетании с АЦСК резко угнетает процессы её всасывания, что приводит к снижению терапевтической активности. Лактоза в сочетании с противоэпилептическим препаратом фенитоин за счёт усиления всасывания и резкого увеличения концентрации может привести к летальному исходу.
Разрыхлители	
Твин-80 усиливает абсорбцию витаминов А, Д, Е.	
Связующие вещества	
Преднизолон, гризеофульвин, салициламид в сочетании с поливинилпирролидоном характеризуются высокой степенью растворения и биодоступности.	
Скользкие вещества	
	Скользкие вещества гидрофобного характера затрудняют проникновение пищеварительных жидкостей в пористую систему таблетки, ухудшая её распадаемость и всасывание.

щей способностью масла и воды, улучшает свойства других наполнителей и связующих веществ, помогает продлить срок хранения лекарственных препаратов, служит для стабилизации чувствительных к влаге, а также липофильных активных фармацевтических ингредиентов. Неусиллин отличается отсутствием побочных явлений, одобрен национальными институтами США и Японии. Неусиллин также используется как активное антацидное лекарственное вещество. Таким образом, многие субстанции могут иметь многофункциональное назначение и выступать в роли как вспомогательного, так и активного вещества [98-101].

Сейчас создание эффективных лекарственных препаратов не требует применения большого числа вспомогательных веществ, так как были разработаны многофункциональные комплексные смеси, что значительно упрощает процесс производства, транспортировки и хранения веществ.

Лудипресс — инновационный продукт немецкой компании BASF, который представляет собой комбинированное вспомогательное вещество, состоящее из наполнителя (лактоза), связующего вещества (Коллидон — поливинилпирролидон, растворимый в воде) и дезинтегранта (Коллидон CL — поливинилпирролидон, не растворим ни в одном из разрешённых к медицинскому применению растворителей, что определяет введение в таблетлируемую массу в сухом виде). Лудипресс характеризуется отличной сыпучестью, что обеспечивает точность смешения и дозирования, низкой гигроскопичностью, что способствует стабильности при хранении. Использование комплексных вспомогательных веществ делает процесс производства лекарственных средств более быстрым, экономичным, менее энергозатратным. Данная комбинация отличается высоким качеством. Для производства таблетирован-

ной лекформы достаточно использовать Лудипресс, лубрикант и активное фармацевтическое вещество, это упрощает процессы дозирования и хранения веществ. Пероральные лекарственные формы, содержащие Лудипресс, характеризуются высокой прочностью, что обеспечивает связующее вещество, а также мгновенной распадаемостью в ЖКТ и быстрым высвобождением активной лекарственной субстанции, что стало возможным благодаря использованию отличного дезинтегранта — Коллидон С1.

Повышение биодоступности нерастворимых в воде активных субстанций является актуальной задачей на этапе разработки лекарственных препаратов. Существуют различные методы для достижения желаемого эффекта, такие как образование солей, солюбилизация, микронизация, а также образование твёрдых дисперсий на основе гидрофильного носителя [105-106]. Последние представляют собой дисперсии одного или более активных ингредиентов в инертном носителе или матрице. В качестве матриц используют полимерные соединения: поливинилпирролидон (ПВП), полиэтиленгликоль (ПЭГ), сополимеры акриловой кислоты, эфиры целлюлозы. Использование твёрдых дисперсий позволяет увеличить скорость растворения некоторых активных фармацевтических субстанций в сотни раз. Твёрдые дисперсии получают методом сплавления или растворения (с последующей отгонкой растворителя) лекарственного вещества в матрице. Были проведены различные сравнительные работы по биодоступности активных фармацевтических субстанций в форме твёрдых дисперсий с ПВП и в качестве одиночного составляющего, и было установлено, что скорость и продолжительность действия лекарственного вещества, диспергированного в матрице, может быть повышена в 2-3 раза [107-112].

4. Современные подходы в технологии изготовления лекарственных форм пептидных препаратов

Пептидные лекарственные препараты имеют ряд недостатков, связанных с их структурой и фармакокинетическими характеристиками. К ним относятся: большой размер молекул, высокая гидрофильность и как следствие низкая проницаемость в ткани, метаболическая нестабильность (ферментативная деградация и подверженность гидролизу в кислой среде ЖКТ), короткий период полужизни, быстрый метаболизм и высокий клиренс, иммуногенность. Как следствие при пероральном применении пептидных препаратов уровень абсолютной биодоступности достигает в большинстве случаев 1% [13, 14, 113].

Чтобы увеличить биодоступность пептидных препаратов используют следующие приёмы: модификация физико-химических свойств активной субстанции (микронизация, конъюгация с полиэтиленгликолем), добавление новых функций к лекарственному препарату (введение в состав рецептуры ингибирующих ферментов, использование мукоадгезивных полимеров в составе лекарственных препаратов, добавление молекул-переносчиков к пептидным препаратам), использование усовершенствованных систем доставки, а также новых лекарственных форм [114-119]. Далее будут рассмотрены частные примеры техник повышения биодоступности пептидных препаратов.

Увеличение периода полувыведения ($T_{1/2}$) протеинов может быть достигнуто посредством пегилирования. Эта модификация активной субстанции представляет собой конъюгирование пептида с полиэтиленгликолем (ПЭГ), что повышает гидрофобность вещества, служит защитой от ферментативной деградации, уменьшает иммуногенность, которой могут обладать пептиды. Этот метод также способствует стерической стабилизации молекулы, тем самым увеличивая время её циркуляции в крови. Модификация пептидной структуры может быть достигнута не только посредством конъюгации с ПЭГ, а также с другими липофильными компонентами [113-114, 120]. Например, в соединении ГБ-115 для увеличения липофильности дипептида был предложен фрагмент фенилгексаноил [15].

Чтобы избежать возможности ферментативного разрушения пептидных лекарственных веществ, в состав лекарственных форм вводят ингибиторы протеаз. Однако увеличение всасывания лекарственных пептидов посредством ингибирования протеаз может привести к всасыванию нежелательных протеинов. Данная модификация не получила широкого применения на сегодняшний день и требует дальнейшего развития [121].

Добавление молекул-переносчиков к пептидным соединениям может повысить биодоступность лекарственных веществ. Однако такие препараты пока не доступны. В основе данной технологии лежит распознавание лигандов, конъюгированных с активной субстанцией, рецепторами межклеточных систем доставки организма. Такими лигандами являются лектины, ток-

сины, вирусные гемагглютинины, инвазины, трансферрин, витамин B_{12} , фолат, рибофлавин, биотин [114].

Использование различных систем доставки актуально для защиты от ферментативной и кислотной деградации лекарственных веществ в ЖКТ, способствует пролонгированному высвобождению лекарственного вещества из матрицы и как следствие пролонгированному действию, таргетной доставке, снижению иммуногенности. Для создания таких систем используют полимерные материалы. Данная технология заключается в стабилизации препаратов протеинов в материале-носителе путём заключения в матрицу, инкапсулирования или же ковалентного связывания. Полимерные системы доставки делятся на гидрогели, наночастицы, микросферы, а также системы доставки на основе липидов (микроэмульсии, липосомы, твёрдые липидные наночастицы) [122-124].

Для пептидных лекарственных субстанций, медленно растворимых в системе ЖКТ (особенно, если продолжительность растворения дольше, чем продолжительность физиологического транзита), помимо микронизации, используют специальные лекарственные формы, обеспечивающие их дисперсию в водной среде. К таким лекарственным формам относятся пеллеты, которые представляют собой агломераты тонко измельчённых порошков, имеют большую площадь свободной поверхности, что уменьшает время растворения лекарственного вещества в ЖКТ. Пеллеты покрывают кишечнорастворимой оболочкой и помещают в твёрдую желатиновую капсулу. Данная лекформа защищает пептидные лекарственные средства от ферментативной деградации и кислого содержимого желудка [125-126].

5. Фармакокинетические особенности коротких нейропептидов при различных способах введения

Нейропептиды или регуляторные пептиды — класс биоактивных веществ белковой природы, образующихся в центральной или периферической нервной системе и регулирующий физиологические функции организма. Нейропептиды как эндогенные вещества имеют ряд преимуществ с фармакологической точки зрения, а именно: высокая физиологическая активность, многофункциональность, минимум побочных эффектов. Но их использование в качестве лекарственных препаратов, особенно в пероральных формах не представляется возможным, так как пептиды обладают низкой энзиматической устойчивостью, плохой проницаемостью через ГЭБ, гидролизуются в кислой среде желудка, подвергаются пресистемному метаболизму, ограниченно всасываются ввиду большой молекулярной массы и присущей им гидрофильности.

Поэтому возникла необходимость синтеза коротких активных пептидов, среди которых особое место занимают дипептиды, защищённые химической группировкой, которая также придаёт молекуле препарата липофильность. Такая модификация дипептидов способствует стабильности и хорошей биодоступности.

Гудашевой Т.А. ещё в 1985 г. предложен подход в дизайне дипептидов, которые бы имитировали структуру не-пептидного прототипа с определённой нейротропной активностью, а также активного фрагмента исходного пептида с аналогичной активностью [13].

С использованием этого дизайна в институте ФГБУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» РАМН были синтезированы пептидные препараты ноопепт и дилепт. Дипептидный ноотропный препарат с анксиолитической активностью ноопепт (N-фенилацетил-L-пролил-глицина), который представляет собой пептидный аналог пирацетама, успешно применяется в клинической практике. Ранее были проведены доклинические исследования фармакокинетики препарата после его перорального введения крысам и кроликам: при этом значение абсолютной биодоступности составило 7,1% у крыс и 9,33% — у кроликов, что значительно выше, чем это было установлено для многих других пептидных веществ. Именно поэтому на основании фармакокинетических данных ноопепта было рекомендовано создание пероральной лекформы этого препарата [128].

Этот принцип лежал и в основе создания нового дипептидного анксиолитика ГБ-115 (амид N-фенил-N-гексаноил-L-глицил-L-триптофан) — ретроаналога холецистокинина-4, фармакокинетика которого изучена в данной работе [14, 15, 127].

Далее целесообразно привести описание фармакокинетического исследования препарата на беспородных крысах-самцах: препарат вводился в дозе 50 мг/кг *per os* и определялся в плазме крови крыс через 5, 10, 15, 20, 25 мин после введения препарата. Результаты исследования таковы: препарат быстро всасывался в ЖКТ и поступал в системный кровоток уже через 5 мин после введения, достигал максимальной концентрации через 10 мин, затем его уровень снижался и через 25 мин ноопепт в плазме крови крыс не обнаруживался. Полученные в результате эксперимента основные фармакокинетические параметры представлены в табл. 4 [128].

Таблица 4

Фармакокинетические параметры препарата ноопепт после перорального введения в дозе 50 мг/кг крысам

Параметры	Значения в плазме крови
AUC, нг/мл×ч	216
T _{макс} , мин	10
C _{макс} , нг/мл	820
C _{ро} , л/мин	3.86
K _{эл} , мин ⁻¹	0.10
T _{1/2} , мин	6.96
M _{RT} , мин	15.36
Vzpo, л	38.75

Другой модифицированный пептид — дилепт (метиловый эфир N-капроил-L-пролил-L-тирозина) является трипептоидным аналогом нейротензина, обладает антипсихотическим действием, способен

улучшать когнитивные функции и оказывать нейропротективное действие. Однако величина абсолютной биодоступности данного соединения у крыс составила 0,1%. Столь низкое значение обусловлено, скорее всего, эффектом первого прохождения через печень. В отношении данного препарата также были проведены исследования, результатом которых явились следующие фармакокинетические показатели (табл. 5): препарат достаточно долго определяется в крови и имеет период полувыведения 27 мин, величина среднего времени удерживания дипептида составила 42 мин. Максимальная концентрация препарата не превышает 8,5 нг/мл через 15 мин после введения препарата, что является очень низким показателем при введении достаточно высокой дозы — 200 мг/кг. Поэтому и наблюдаются высокие значения клиренса — 1341,7 л/мин и гипотетического объёма распределения — 52968 л. Степень всасывания, оцениваемая по величине AUC, невелика и составляет — 2,5 нг/мл×ч [129]. Однако следует отметить, что в процессе первого прохождения дилепта через печень в значительных количествах в крови животных определялся его активный метаболит М-1, что указывает на перспективность разработки пероральной лекформы этого соединения.

Таблица 5

Фармакокинетические параметры препарата дилепт после перорального введения активной субстанции крысам в дозе 200 мг/кг в виде водной суспензии

Параметры	Значения в плазме крови
AUC, нг/мл×ч	2.5
T _{макс} , мин	15
C _{макс} , нг/мл	8.5
C _{ро} , л/мин	1341.7
K _{эл} , мин ⁻¹	0.025
T _{1/2} , мин	27
M _{RT} , мин	42
Vzpo, л	52968

Изучена также фармакокинетика другого пептидного препарата селанк [130], обладающего психотропной активностью и по структуре представляющего собой гептапептид — треонил-лизил-пролил-аргинил-пролил-глицил-пролил-диацетат, который выпускается в форме назальных капель 0,15%. Ввиду интраназального применения препарата целесообразно было проводить исследования после в/в введения крысам.

Гептапептид вводили в хвостовую вену крыс в дозе 20 мг/кг в водном растворе в течение 10 с. Крыс декапитировали через 1, 2, 5, 7 и 10 мин. В результате проведённого эксперимента было установлено, что через 1 мин после введения концентрация гептапептида в плазме крови составляет 950±150 нг/мл плазмы, через 2 мин она снижается до 560±200 нг/мл, а через 5 мин — до 333±150 нг/мл. Через 10 мин гептапептид в плазме крови крыс не обнаруживался. Итак, наблюдается

очень резкое снижение концентрации препарата после в/в введения и очень непродолжительное удерживание селанка в плазме крови крыс.

Как видно из представленных данных в табл. 6, гептапептид имеет короткий период полувыведения, равный 3,158 мин, величина же среднего времени удерживания препарата составляет — 4,283 мин, что также является низким показателем. При этом отмечаются большие значения клиренса и объёма распределения, которые при небольшой величине степени всасывания, свидетельствуют о его быстром метаболизме и переходе из кровеносного русла в периферические органы и ткани [130].

Таблица 6

Фармакокинетические параметры препарата селанк после в/в введения активной субстанции крысам в дозе 20 мг/кг в виде водной суспензии

Параметры	Значения в плазме крови
AUC, нг/млхч	4.596
T _{макс} , мин	1
C _{макс} , нг/мл	950
Cl _{po} , л/мин	4.352
Кэл, мин ⁻¹	0.2195
T _{1/2} , мин	3.158
M _{RT} , мин	4.283
Vz _{po} , л	15.290

Литература

1. Michael T., Zetsche U., Margraf J. Epidemiology of anxiety disorders. // Psychiatry. 2007. 6 issue 4. P. 136-142.
2. Хабиров Ф.А., Хайбуллин Т.И., Бабичева Н.Н. и др. Клинико-нейрофизиологическая оценка эффективности применения мексидола в лечении тревожных расстройств у больных рассеянным склерозом хронической ишемией головного мозга. // Бюлл. exper. биол. и мед. 2012. С. 6-10.
3. Andrews G., Sanderson K., Slade T. et al. Why does the burden of disease persist? Relating the burden of anxiety and depression to effectiveness of treatment. // Bulletin of the World Health Organization 2000. 78 (4). P. 446-454.
4. Аведисова А.С., Чахава В.О., Лесс Ю.Э. и др. Новый анксиолитик «Афобазол» при терапии генерализованного тревожного расстройства (результаты сравнительного исследования с диазепамом). // Психиатр. и психофармакотер. 2006. 8 (3). С. 116-119.
5. Аведисова А.С., Ахапкин Р.В. Эффективность и переносимость терапии Афобазолом. // Психиатр. и психофармакотер. 2007. 9 (3). С. 16-20.
6. Краснов В.Н., Вельтищев Д.Ю., Немцов А.В. и др. Новые подходы к лечению стрессовых и тревожных расстройств: результаты многоцентрового исследования эффективности Афобазола в психиатрической практике. // Психиатр. и психофармакотер. 2007. 9 (4). С. 16-20.
7. Незнамов Г.Г., Давыдова И.А., Сюняков С.А. и др. Новый анксиолитик Афобазол: результаты сравнительного клинического исследования с диазепамом при генерализованном тревожном расстройстве. // Психиатр. и психофармакотер. 2006. 8 (4). С. 8-13.
8. Fink H., Rex A., Voits M. et al. Major biological actions of CCK — a critical evaluation of research findings. // Exp. Brain Res. 1998. 123(1-2). P. 77-83.
9. Bourin M., Malinge M., Vasar E. et al. Two faces of cholecystokinin: anxiety and schizophrenia. // Fundam. Clin. Pharmacol. 1996. 10(2). P. 116-126.
10. Bradwejn J., Koszycki D. Cholecystokinin and panic disorder: past and future clinical research strategies. // Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl. 2001. 234. P. 19-27.
11. Zwanzger P., Domschke K., Bradwejn J. Neuronal network of panic disorder: the role of the neuropeptide cholecystokinin. // Depress Anxiety. 2012.
12. Del Boca C., Lutz P.E., Le Merrer J. et al. Cholecystokinin knock-down in the basolateral amygdala has anxiolytic and antidepressant-like effects in mice. // Neuroscience. 2012. T. 218. P. 185-195.
13. Гудашева Т.А. Стратегия создания дипептидных лекарств. // Вестн. Рос. акад. мед. наук. 2011. Т.7. С. 8-15.
14. Гудашева Т.А., Кирьянова Е.П., Колик Л.Г. и др. Дизайн и синтез дипептидных аналогов холецистокинина-4 с анксиолитической и анксиогенной активностью. // Биоорг. хим. 2007. 33(4). С. 413-420.
15. Гудашева Т.А., Середенин С.Б., Лезина В.П. и др. Синтез, анксиолитическая активность и конформационный анализ ретропептидных аналогов холецистокинина-4. // Хим-фарм. Журнал. 2006. Т. 7. С. 21-26.

В случае Селанка фармакокинетические исследования на животных не позволили рекомендовать создание его пероральной лекформы в связи с невозможностью количественного определения препарата при этом способе введения. Поэтому была изучена интраназальная лекформа, фармакокинетические результаты которой представлены выше и которая была внедрена в медицинскую практику.

Таким образом, на нескольких примерах показана важность проведения фармакокинетических исследований в особенности касающихся пептидных соединений, отличающихся своей спецификой, описанной выше. Эти исследования уже на фармакокинетическом уровне позволяют рекомендовать перспективный путь введения данного соединения, дают полную картину его фармакокинетических характеристик, путей его биотрансформации и позволяют дать ряд других ценных рекомендаций.

Недавно в ФГБУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» РАМН был создан новый дипептидный анксиолитик ГБ-115 (амид N-фенил-N-гексаноил-L-глицил-L-триптофан), обладающий анксиолитической, антиалкогольной, антидепрессивной и анальгетической активностью. Поэтому важным и необходимым является изучение доклинической фармакокинетики и биодоступности соединения ГБ-115 с целью получения необходимой информации для выбора путей введения этого соединения и оптимальной лекформы.

16. Колик Л.Г. Разработка оригинального анксиолитика с антиалкогольной активностью на основе фармакологического изучения новых производных холецистокинина (Диссертация на соискание учёной степени доктора биологических наук). Москва; 2012.
17. Каркищенко Н.Н., Хоронько В.В., Сергеева С.А. и др. Фармакокинетика. Ростов Феникс; 2001.
18. Кукеса В.Г. Клиническая фармакокинетика: теоретические, прикладные и аналитические аспекты: руководство. М.: ГЭОТАР_Медиа. 2009.
19. Urso R., Blardi P., Giorgi G. A short introduction to pharmacokinetics. // Eu Rev. for Med. and Pharmacol. Sci. 2002. 6. P. 33-44.
20. Panchagnula R., Narisetty S. Biopharmaceutics and pharmacokinetics in drug research. // Int. Jour. of Pharm. 2000. 201. P.131—150.
21. Srivastava P. Drug Metabolism and Individualized Medicine. // Current Drug Metabolism. 2003. 4: P. 33-44.
22. Kenndler E. Introduction to chromatography. Vienna: Institute for Analytical Chemistry, 2004.
23. Шнигун О. А., Яшин Я. И. Состояние и перспективы развития хроматографических методов и аппаратуры. Всероссийская конференция «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез». Краснодар. — 26 сентября — 01 октября 2010 г.
24. McPolin O. An introduction to HPLC for pharmaceutical analysis. Mourne training services. 2009.
25. Settle F. Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry, Editor: «High Performance Liquid Chromatography», Phyllis Brown, Kathryn DeAntonois, Prentice Hall. 1997. P.147-164.
26. Skoog, Holler, Nieman. Principles of Instrumental Analysis., 5th Edition., Saunders College Publishing. 1998. P. 673-697, 725-766.
27. HPLC of peptides and proteins: methods and protocols / edited by Marie-Isabel Aguilar. Humana Press Inc. 2004.
28. Vydac G. The Handbook of analysis and purification of peptides and proteins by reversed-phase HPLC, third edition. 2002.
29. Carr D. A guide to the analysis and purification of proteins and peptides by reversed-phase HPLC: www.ace-hplc.com
30. Chen, Y., Mehok, A.R., Mant, C.T. et. al. Optimum concentration of trifluoroacetic acid for reversed-phase liquid chromatography of peptides revisited. // J. of Chromatogr. 2004. № 1043. P. 9 — 18.
31. Chen Y., Mant C.T., Hodges R.S. The selectivity differences in the separation of amphipathic α -helical peptides during reversed phase liquid chromatography at pHs 2.0 and 7.0 Effects of different packings, mobile phase conditions and temperature. // J.Chromatogr., 1043. P. 99-111.
32. Corradini D., Kalghatgi K., Horvath C. Effect of mobile phase additives on peptide retention in reversed phase chromatography with pellicular and totally porous sorbents. // J. Chromatogr. 1996. P. 225-233.
33. McCalley D.V. Effect of the ionic strength of salts on retention and overloading behavior of ionizable compounds in reversed-phase liquid chromatogr. 2004. P. 43-55.
34. Dr. Stuart Jones. HPLC in a World Without Acetonitrile. Laserchrom HPLC Laboratories Ltd, Rochester, Kent ME2 4HU, UK.
35. E. Lendi B., R. Meyer V. The UV Detector for HPLC — An Ongoing Success Story OmniLab Ltd, Mettmensstetten, Switzerland, EMPA St. Gallen, Swiss Federal Laboratories for Materials Testing and Research, St. Gallen, Switzerland. LC • GC Europe. 2005. 18(3). P. 156—163.
36. Бражников В.В. Детекторы для хроматографии. М.: Машиностроение. 1992. С. 320.
37. Sutariya V., Wehrung D., J. Geldenhuys W. Development and Validation of a Novel RP-HPLC Method for the Analysis of Reduced Glutathione. // Journ. of Chrom. Science. 2012. V.50. P. 271—276.
38. Hamrnikova I., Miksik I., Uhrova M. et. al. Ultraviolet detector response of glycine and alanine homopeptides: Some specific features in capillary electrophoresis. // Analytica Chimica Acta. 1998. V.372. P. 257-272.
39. Руденко А.О., Карцова Л.А. Снарский С.И. Определение важнейших аминокислот в сложных объектах биологического происхождения методом обращённо-фазовой ВЭЖХ с получением фенилтиогидантоинов аминокислот. // Сорб. и хром. процессы. 2010. Т. 10(2). С. 223-230.
40. Scott E. Van Bramer. An Introduction to Mass Spectrometry. Chester. 1998.
41. Dr Alison E. Ashcroft. An Introduction to Mass Spectrometry. Leeds
42. Lee M. S. LC/MS Applications in Drug Development. John Wiley & Sons, New York. 2002.
43. Rohrs H. W., Gross M. L. The Encyclopedia of Mass Spectrometry. 2007. V. 6. P. 285.
44. Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A. et. al. The Proteomics Protocols Handbook. ed. J. M. Walker, Humana Press, Clifton, New Jersey. 2005. P. 751.
45. Chakraborty A.B., Berger S.J. Optimizatio of Reversed-Phase Peptide Liquid Chromatography Ultraviolet Mass Spectrometry Analyses Using an Automated Blending Methodology. Journal of Biomol. Techn. 2005. V.16 P. 325—333.
46. Downard K. Mass Spectrometry: A Foundation Course. Royal Society of Chemistry, UK. 2004.
47. Dass C. An Introduction to Biological Mass Spectrometry. Wiley, USA. 2002.
48. Siuzdak G. The Expanding Role of Mass Spectrometry in Biotechnology. MCC Press, San Diego. 2004.
49. Ashcroft A.E. Ionization Methods in Organic Mass Spectrometry. Analytical Monograph, Royal Society of Chemistry, UK. 1997.
50. Mamyrin B.A. Time-of-flight mass spectrometry (concepts, achievements, and prospects). // Intern. Journ. of Mass Spectr. 2001. V. 206. P. 251-266.
51. John H., Walden M., Schafer S. et. al. Analytical procedures for quantification of peptides in pharmaceutical research by liquid chromatography-mass spectrometry. // Anal. Bioanal. Chem. 2004. V. 378. P. 883-897.
52. Qin W., Zhang Z., Tian Y., Xu F. et. al. Rapid quantification of lisinopril in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. // Biomed. Chromatogr. 2007. V. 21. P. 415-421.
53. Chernushevich I.V., Loboda A.V., Thomson, B.A. An introductionto quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. // J. Mass. Spectrom. 2001. V. 36. P. 849-865.
54. Hortin G.L. The MALDI-TOF mass spectrometric view of the plasma proteome and peptidome. // Clin. Chem'. 2006. V. 52. P. 1223-1237.
55. Na D.H., DeLuca P.P., Lee K.C. Direct determination of the peptide content in microspheres by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. // Anal. Chem. 2004. V. 76. P. 2669-2673.
56. Amini A., Nilsson E. Quantitative analysis of polypeptide pharmaceuticals by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. // J. Pharm. Biomed. Anal. 2008. V. 46. P. 411-417.
57. Qizhi Hu, Robert J. N., Hongyan Li et. al. The Orbitrap: a new mass spectrometer. // J. Mass Spectrom. 2005. V. 40. P. 430—443.
58. Scigelova M., Makarov A. Orbitrap Mass Analyzer — Overview and Applications in Proteomics. // Practical Proteomics. 2006. P. 16-21.
59. Bhusan R., Mahesh V. K., Mallikharjun P. V. Thin layer chromatography of peptides and proteins: A review. // Biomed. Chrom. 1989. V.3 (3). P. 95—104.
60. Thermo scientific Pierce GC and HPLC technical handbook. Thermo Fisher Scientific Inc. 2008. www.thermo.com.
61. Priddle J.D., Rose K., Offord R.E. The Separation and Sequencing of Permethylated Peptides by Mass Spectrometry Directly Coupled to Gas-Liquid Chromatography. // Biochem. J. 1976. V.157. P. 777-780.

62. Mohabbat, T., Drew, B., Caple, M. A Rapid, Simultaneous Determination of 33 Amino Acids and Dipeptides in Spent Cell Culture Media by Gas Chromatography-Flame Ionization Detection Following Solid and Liquid Phase Extraction. 2006.
63. Kaspar H. Amino acid analysis in biological fluids by GC-MS. Regensburg. — 2009.
64. Seifert W.E., McKee R.E., Beckner C.F. et. al. Characterization of mixtures of dipeptides by gas chromatography/mass spectrometry. // *Anal. Biochem.* 1978. V. 88. P.149-161.
65. Kingston E.E., Duffield A.M. Plasma amino acid quantitation using gas chromatography chemical ionization mass spectrometry and ¹³C amino acids as internal standards. // *Biomed. Mass. Spectrom.* 1978. V. 5. P. 621-626.
66. Patzold R., Theis C., Bruckner H. Gas-chromatographic separation of stereoisomers of dipeptides. // *Chirality.* 2006. V. 18. P. 551-557.
67. Monlar-Perl I., Katona Z.F. GC-MS of amino acids as their trimethylsilyl/t-butylidimethylsilyl derivatives: in model solutions III. // *Chromatographia (suppl.)*. -2000. V. 51. P. 228-236.
68. Husek P. Rapid derivatization and gas chromatographic determination of amino acids. // *J. Chromatogr.* 1991. V. 552. P. 289-299.
69. Zahradnicková H., Chvalová D., Hušek P. et. al. HPLC/MS and GC/MS analysis of amino acids, small peptides and biogenic amines in body fluids as their N (O,S) alkoxycarbonyl alkyl ester derivatives. 15th International symposium on pharmaceutical and biomedical analysis, Florence, Italy, Abstract Book. 2004. P. 273.
70. Koivunen M.E., Krogsrud R.L. Principles of Immunochemical Techniques Used in Clinical Laboratories. // *LABMEDICINE.* 2006. V.37 (8).
71. Renshaw S. Immunohistochemistry: Methods Express. Scion Publishing Ltd, Bloxham, UK. 2007.
72. Sedlakova P., Svobodova J., Miksik I. Capillary electrophoresis of peptides and proteins with plug of Pluronic gel. // *J. of Chrom. B.* 2006. V.839. P. 112—117.
73. Surugau L.N. Peptide separation by capillary electrophoresis with ultraviolet detection: some simple approaches to enhance detection sensitivity and resolution. // *The Malaysian Journal of Analytical Sciences.* 2011. V.15 (2). P. 273 — 287.
74. Catai J.R. Efficient capillary electrophoresis of peptides and proteins with bilayer-coated capillaries. — 2006.
75. Heiger D., Grimm R., Marzell H. Peptide mapping and analysis using capillary electrophoresis. Agilent Technologies, Waldbronn, Germany.
76. Schwartz H., Pritchett T. Separation of Proteins and Peptides by Capillary Electrophoresis: Application to Analytical Biotechnology. Beckman Coulter.
77. Sekhon B.S. An overview of capillary electrophoresis: Pharmaceutical, biopharmaceutical and biotechnology applications. // *J Pharm Educ Res.* 2011. V.2 (2).
78. Хомов Ю.А., Фомин А.Н. Капиллярный электрофорез как высокоэффективный метод. // *Совр. пробл. науки и образ.* 2012. Т. 5. С. 349.
79. Руководство по экспертизе лекарственных средств. ФГБУ Научный центр экспертизы средств медицинского применения. 2013. Т.1.
80. Хоружая Т.Г., Чучалин В.С. Биофармация — научное направление в разработке и совершенствовании лекарственных препаратов. 2006.
81. Toutain P.L., Bousquet-Me ?Lou A. Bioavailability and its assessment. // *J.vet. Pharmac.Therapy.* 2004. V.27. P. 455—466
82. Oral bioavailability: prediction using in vitro kinetic data. *Kinetics and Metabolism.* 2009.
83. Guidance for Industry, Bioavailability and Bioequivalence Studies for Orally Administered Drug, Products — General Considerations. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). 2003.
84. Fischer U.M., Harting M.T., Jimenez F. Pulmonary Passage is a Major Obstacle for Intravenous Stem Cell Delivery: The Pulmonary First-Pass Effect. // *Stem cells and devel.* 2009. V.18 (5).
85. Boer F. The role of the lungs in drug distribution. Amsterdam. 1999.
86. Белоусов Ю.Б., Моисеев В.С., Лепахин В.К. Клиническая фармакология и фармакотерапия. Универсум Паблишинг. 1997. С. 532.
87. Тихонов А.И., Ярных Т.Г., Зупанец И.А. Биофармация. Издательство «Золотые страницы». 2003.
88. Larran M. Micronisation of Pharmaceutical Powders for Use in Inhalation. // *Pharmaceutical Manufacturing and Packing Sourcer Spring.* 2005. (5).
89. Voelker M., Hammer M. Dissolution and pharmacokinetics of a novel micronized aspirin formulation. // *Inflammopharmacology.* 2012. V.20(4). P. 225-231.
90. Cooper S.A., Voelker M. Evaluation of onset of pain relief from micronized aspirin in a dental pain model. // *Inflammopharmacology.* 2012. V.20(4). P.233-242.
91. <http://www.drugs.com/pro/glyburide-micronized.html>
92. Pifféri G., Restani P. The safety of pharmaceutical excipients. // *Il Farmaco.* 2003. V.58. P. 541-550.
93. Bharate S.S., Bharateb S.B., Bajajc A.N. Interactions and incompatibilities of pharmaceutical excipients with active pharmaceutical ingredients: a comprehensive review. // *J. Exc. and Food Chem.* 2010. 1 (3).
94. Tekeshwar K., Shailendra K.G., Mukesh K.P. et. al. Natural Excipients: A Review. // *Asian J. of Pharm.and Life Sci.* 2012. V.2 (1). P. 97-108.
95. Patel H., Shah V., Upadhyay U. New pharmaceutical excipients in solid dosage forms — A review. // *Int. J. of Pharm. & Life Sci. (IJPLS), Vol. 2, Issue 8.* 2011.
96. Ipatova O.M., Torkhovskaia T.I., Medvedeva N.V. et. al. Bioavailability of oral drug formulations and methods for its improvement. // *Biomed Khim.* 2010. V. 56(1). P. 101-119.
97. Егошина Ю.А., Поцелуева Л.А. Современные вспомогательные вещества в таблеточном производстве. // *Усп. совр. естесств.* 2009. №10. С. 30-33.
98. <http://www.neusilin.com/>
99. http://www.harke.com/fileadmin/images/pharma/Broschueren/Fuji_Neusilin.
100. Gupta M.K. Formation of physically stable drugs by milling with Neusillin. // *J.Pharm. Sci.* 2003. V. 92(3). P. 536-551.
101. Gupta M.K. Enhanced drug dissolution and bulk properties of solid dispersions granulated with a surface adsorbent. // *Pharm. Dev. Technol.* 2001. V.6(4). P. 563-572.
102. http://www.pharmaingredients.basf.com/Documents/ENP/Brochure/EN/BASF_Ludipress_LCE.pdf
103. http://www.pharmaingredients.basf.com/Statements/Technical%20Informations/EN/Pharma%20Solutions/EMP%20030731e_Ludipress.pdf
104. Heinz R., Wolf H., Schuchmann H., et. al. Formulation and development of tablets based on Ludipress and scale-up from laboratory to production scale. // *Drug Dev Ind Pharm.* 2000. V. 26(5). P. 513-521.
105. Serajuddin A.T.M. Solid dispersions of poorly water-soluble drugs: early promises, subsequent problems and recent breakthroughs. // *I. Pharm. Sci.* 1999. V.88 (10). P. 1058-1066.
106. Leuner C., Dressman J. Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. // *Eur. J. Pharm. u biopharm.* 2000. V.50 P. 47-60.

107. *Craig D.Q.M.* The mechanism of drug release from solid dispersions in water-soluble polymers. // *Int. J. of Pharmaceutics*. 2002. V.231. P. 131-144.
108. *Anupama K., Poddar M.* Solid dispersions: an approach towards enhancing dissolution rate. // *International. J. of Pharm. and Pharm. Sci.* 2011. V. 3(4).
109. *Carina D.* Drugs and polymers in dissolving solid dispersions: NMR imaging and spectroscopy. Doctoral Thesis at the Royal Institute of Technology Stockholm, Sweden. 2010.
110. *Sanjoy K.D., Sudipta R., Yuvaraja K. et. al.* Solid Dispersions: An Approach to Enhance the Bioavailability of Poorly Water-Soluble Drugs. // *Int. J. of Pharmac. and Pharm.Tech.* V. 1(1). P. 37-46.
111. *Tiwari R., Tiwari G., Srivastava B., et.al.* Solid Dispersions: An Overview To Modify Bioavailability Of Poorly Water Soluble Drugs. // *International Journal of PharmTech Research*. 2009. V.1(4). P. 1338-1349.
112. *Хабриев Р.У., Решетняк В.Ю., Попков В.А. и др.* Повышение растворимости мезапама путём получения его твёрдых дисперсий. // *Хим-фарм. Журн.* 2010. №11. С. 25-29.
113. *Ratnaparkhi M.P., Chaudharis S.P., Pandya V.A.* Peptides and proteins in pharmaceuticals. // *Int. J. of Curr. Pharm. research*. 2011. V.3(2).
114. *Morishita M., Peppas N.A.* Is the oral route possible for peptide and protein drug delivery? // *Drug Disc.Today*. 2006. V.11(19/20).
115. *Saltero R., Ekwuribe N.* The oral delivery of protein and peptide drugs. // *Innov.in pharm. tech.* P.106-110.
116. *Sotto C.* Converting a peptide into a drug: strategies to improve stability and bioavailability. // *Curr. Med. Chem.* 2002. V. 9 (9). P. 963-978.
117. *Adessi C., Sotto C.* Strategies to improve stability and bioavailability of peptide drugs. // *Frontiers in Med. Chem.* 2004. V.1 (1). P. 513-527.
118. *Kompella U.B.* Delivery systems for penetration enhancement of peptide and protein drugs: design considerations. // *Adv. Drug Del. Rev.* 2001. V. 46. P.211-245.
119. *Pawan D.* Protein or Peptide drugs: Applications, Problems and Solutions. // *Biotech. Soc. Of Nep.* 2010. V.2.
120. *Harris, J.M., Chess R.B.* Effect of pegylation on pharmaceuticals. // *Nat. Rev.* 2. 2010. P. 214—221.
121. *Herrero E.P., Alonso M.J., Csaba N.* Polymer-based oral peptide nanomedicines. // *Therapeutic Delivery*. 2012. 3(5). P. 657—668.
122. *Bodhankar M.M., Agnihotri V.V., Bhushan S.B.* Feasibility, formulation and characterization of innovative microparticles for oral delivery of peptide drug. // *Int. J. of research in pharm. and chem.* 2011. V.1 (3). P. 630-636.
123. *Almeida A.J., Souto E.* Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for peptides and proteins. // *Adv. Drug. Del. Rev.* 2007. V.59 P. 478—490.
124. *Chunbai H., Fuying C., Lichen Y.A.* A polymeric composite carrier for oral delivery of peptide drugs: bilaminated hydrogel film loaded with nanoparticles. // *Eur. Polymer J.* 2009. V.45. P. 368-376.
125. *Vikash D., Behera S. K., Agarwal R., et.al.* Pelletization technique in drug delivery system. // *J.of Curr. Pharm. Research*. 2012. V. 9 (1). P. 19-25.
126. *Manivannan R.* Maltiparticulate drug delivery system: pellet & pelletization technique. // *Drug Inv.today*. 2010. V.2(5). P. 233-237.
127. *Бойко С.С., Колыванов Г.Б., Жердев В.П. и др.* Экспериментальное исследование фармакокинетики триптофансодержащего дипептида ГБ-115. // *Бюлл. эксп. биол. и мед.* 2007. Т.144(9). С. 285-287.
128. *Бойко С.С., Островская Р.У., Жердев В.П. и др.* Фармакокинетика и проницаемость через гематоэнцефалический барьер нового ацил-пролилдипептида с ноотропными свойствами после перорального введения. // *Бюлл. эксп. биол. и мед.* 2000. Т.129(4). С. 426-429.
129. *Менсонжик Н.В.* Экспериментальное изучение фармакокинетики и метаболизма нового фармакологического препарата дипепт. Диссертация на соискание учёной степени кандидата биологических наук. Москва. 2009.
130. *Бойко С.С., Жердев В.П., Дворянинов А.А. и др.* Фармакокинетика и метаболизм гептапептида — перспективного синтетического аналога тафтсина с психостимулирующим действием у крыс. // *Эксп. и клин. Фармаколог.* 1998. Т.61(5). С. 42-45.