

Влияние физико-химических свойств на фармакокинетические параметры нового представителя бензотиазинонов – противотуберкулезного препарата макозинов

А.Л. Хохлов¹, А.О. Марьяндышев², В.С. Шербакова³, И.В. Озерова⁴, Ю.Г. Казаишвили³, О.В. Игумнова³, А.А. Болгарина³, Б.А. Рудой³

¹ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Минздрава России, Ярославль, Россия;

²ФГБОУ ВО «Северный государственный медицинский университет» Минздрава России, Архангельск, Россия;

³ООО «НИАРМЕДИК ФАРМА», Обнинск, Россия;

⁴ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии им. В.В. Закусова», Москва, Россия

Резюме

Введение. Туберкулез (ТБ) входит в десятку наиболее распространенных причин смертности в мире. Одной из ключевых задач повышения эффективности борьбы с ТБ является поиск новых лекарственных препаратов и схем лечения, которые наиболее удобны для пациентов и, при этом, достаточно эффективны. Поскольку создание новых режимов терапии с минимизацией количества используемых препаратов и сокращением длительности сроков лечения – наиболее перспективное направление, макозинов, новый кандидат бензотиазинонового ряда, может стать основой для создания новых режимов химиотерапии лекарственно-устойчивых форм ТБ, в том числе и в комбинации с наиболее эффективными на сегодняшний день противотуберкулезными лекарственными средствами.

Цель. Сравнительная оценка фармакокинетических свойств лекарственной формы макозинов капсулы 80 мг и новой лекарственной формы – диспергируемая таблетка для приготовления раствора для приема внутрь 320 мг.

Материалы и методы. Проводились оценка растворимости макозинов в биорелевантных средах *in vitro*, изучение проницаемости макозинов в тесте Сасо-2 *in vitro*, а также исследование фармакокинетики на собаках *in vivo*.

Результаты. Оценка растворимости в биорелевантных средах показала, что в среднем предел растворения субстанции макозинов в среде ацетатного буферного раствора pH 5,0 составил от 6 до 9 мг/л, в среде FaSSIF (натощак) – от 2,5 до 4 мг/л, а в среде FeSSIF (после еды) – от 16,8 до 29 мг/л. Также установлено, что клеточная проницаемость фармацевтической субстанции макозинов в тест-системе Сасо-2 составляет в среднем $2,5 \times 10^{-6}$ см/с в прямом направлении от апикальной к базолатеральной мембране клеток и $1,5 \times 10^{-6}$ см/с в обратном направлении, что соответствует низкой проницаемости. Представлены основные фармакокинетические параметры макозинов после дозирования диспергируемой таблетки на фоне приема пищи и натощак, а также капсул 80 мг при введении их натощак собакам.

Обсуждение. В данной работе описаны специфические физико-химические свойства макозинов, проблемы, с которыми пришлось столкнуться в процессе разработки лекарственной формы препарата, а также способы решения некоторых из них.

Заключение. При разработке перспективных для применения в клинической практике лекарственных форм макозинов необходимо учитывать существующие химические свойства субстанции макозинов. Одним из перспективных направлений решения проблемы биодоступности, а следовательно, и эффективности является создание принципиально новой лекарственной формы с модифицированным высвобождением, учитывающей узкое окно абсорбции макозинов.

Ключевые слова: туберкулез, макозинов, PBTZ169, бензотиазиноны, ингибиторы DprE1, DprE1, фармакокинетика, растворимость, проницаемость, биофармацевтическая классификационная система (БКС класс), параметры всасывания, лекарственная форма, узкое окно абсорбции.

Для цитирования: Хохлов А.Л., Марьяндышев А.О., Шербакова В.С. и др. Влияние физико-химических свойств на фармакокинетические параметры нового представителя бензотиазинонов – противотуберкулезного препарата макозинов. *Терапевтический архив.* 2020; 92 (12): 165–171. DOI: 10.26442/00403660.2020.12.200482

Effect of physicochemical properties on the pharmacokinetic parameters of the new representative of benzothiazinones antituberculosis drug macozinone

A.L. Khokhlov¹, A.O. Mariandyshchev², V.S. Shcherbakova³, I.V. Ozerova⁴, Yu.G. Kazaiashvili³, O.V. Igumnova³, A.A. Bolgarina³, B.A. Rudoy³

¹Yaroslavl State Medical University, Yaroslavl, Russia;

²Northern State Medical University, Arkhangelsk, Russia;

³NEARMEDIC PHARMA LLC., Obninsk, Russia;

⁴Zakusov Research Institute of Pharmacology, Moscow, Russia

Introduction. Tuberculosis (TB) is one of the top ten causes of death worldwide. Improvement of the treatment options via development of new drugs and treatment regimens that would be more convenient for patients is one of key options of improving the efficacy of the TB prevention and care. Since the creation of new treatment regimens by minimizing the number of the drugs used and reducing the duration of treatment is the most promising and correct direction, macozinone, a new candidate of the benzothiazinone series, can become the basis for development of new chemotherapy regimens for drug-resistant forms of TB including the combination of macozinone with the most effective modern anti-TB drugs.

Aim. Comparative evaluation of the pharmacokinetic properties of macozinone capsules 80 mg and the new dosage form – a dispersible tablet for preparation of oral solution.

Materials and methods. Solubility of the substance macozinone in biorelevant media *in vitro*, permeability of macozinone in the test Caco-2 *in vitro*, as well as pharmacokinetics of macozinone in dogs *in vivo* were evaluated.

Results. The solubility assessment in biorelevant media showed that the average limit of macozinone substance dissolution in the pH 5.0 acetate buffer solution was from 6 to 9 mg/l, in FaSSIF medium (fasted) – from 2.5 to 4 mg/l, and in FeSSIF medium (after meals) – from 16.8 to 29 mg/l.

It is established that the cell permeability of the pharmaceutical substance macozinone in the CACO-2 test system is on average 2.5×10^{-6} cm/s in the forward direction from the apical to basolateral cell membrane, and 1.5×10^{-6} cm/s in the reverse direction, which corresponds to low permeability. The main pharmacokinetic parameters of macozinone dispersible tablets 160 mg, after dosing with food and on an empty stomach, as well as capsules 80 mg, when administered on an empty stomach in vivo studies in dogs are presented.

Discussion. The specific physicochemical properties of macozinone, the problems of developing the new dosage form, as well as ways of solving some of them are presented.

Conclusion. In the process of new dosage forms development, the existing chemical properties of the macozinone substance should be considered. One of the promising ways of increasing bioavailability and, consequently, efficacy is development a fundamentally new drug form with modified release within the absorption window.

Keywords: tuberculosis, macozinone, PBTZ169, benzothiazinones, DprE1, DprE1 inhibitors, pharmacokinetic, solubility, permeability, Biopharmaceutics Classification System (BCS) class, absorption parameters, dosage form, the narrow absorption window.

For citation: Khokhlov A.L., Mariandyshev A.O., Shcherbakova V.S., et al. Effect of physicochemical properties on the pharmacokinetic parameters of the new representative of benzothiazinones antituberculosis drug macozinone. *Therapeutic Archive*. 2020; 92 (12): 165–171. DOI: 10.26442/00403660.2020.12.200482

БКС – биофармацевтическая классификационная система
ДТ – диспергируемая таблетка
ЛП – лекарственный препарат
ЛФ – лекарственная форма
МБТ – микобактерия туберкулеза
МЛУ-ТБ – туберкулез с множественной лекарственной устойчивостью
ППП – противотуберкулезные препараты
ТБ – туберкулез

ФК – фармакокинетика
 AUC_{last} – площадь под фармакокинетической кривой «концентрация лекарственного вещества – время» в интервале времени от 0 до момента отбора последней пробы крови с измеряемой концентрацией
 C_{max} – максимальная концентрация
 K_{el} – конечная константа элиминации
 T_{max} – время достижения максимальной концентрации
 MRT_{last} – среднее время удерживания

Введение

Туберкулез (ТБ) как острое и хроническое инфекционное заболевание до сих пор входит в десятку наиболее распространенных причин смертности в мире и чаще других инфекционных возбудителей (включая ВИЧ/СПИД) становится причиной смерти людей. Риск заболеть ТБ для каждого индивида на протяжении жизни составляет около 5–10% [1].

Возбудитель ТБ, *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ), обычно поражает легкие (легочный ТБ), но может поражать и другие участки организма (внелегочный ТБ) [1]. В настоящее время общепризнано, что даже в своем основном месте возбудитель ТБ присутствует в разных микроокружениях и, следовательно, в различных метаболических состояниях, что существенно усложняет лечение [2].

Согласно последним оценкам Всемирной организации здравоохранения в 2018 г. во всем мире ТБ заболели 10 млн человек (диапазон значений 9,0–11,1 млн), у 1,5 млн из которых зарегистрирован ТБ, устойчивый к рифампицину и изониазиду (из них 78% заболели ТБ с множественной лекарственной устойчивостью – МЛУ-ТБ, 9% из которых приходится на Российскую Федерацию – одну из трех стран, внесших наибольшую долю в заболеваемость). Доля случаев

заболевания ТБ с МЛУ-ТБ или устойчивостью к рифампицину во всем мире составила 3,4% среди новых случаев и 18% среди ранее пролеченных случаев и была наиболее высока (свыше 50% среди ранее пролеченных случаев) в странах бывшего Советского Союза [1].

Таким образом, одной из серьезных проблем общественного здравоохранения во всем мире является формирование у МБТ устойчивости к противотуберкулезным препаратам (ППП), что приводит к распространению ТБ с множественной и широкой лекарственной устойчивостью (МЛУ- и ШЛУ-ТБ). С клинической точки зрения причинами возникновения МЛУ-ТБ являются: поздняя диагностика первичной лекарственной устойчивости возбудителя, неадекватное по количеству и дозам или незавершенное лечение, использование некачественных ППП, временные отмены того или иного препарата, несоблюдение сроков химиотерапии пациентами [3, 4]. Последнее связано с низкой комплаентностью больных ТБ и развитием у них большого количества нежелательных явлений, связанных с применяемыми ППП. Как известно, минимальное количество противотуберкулезных и антибактериальных лекарственных препаратов (ЛП), которое следует принимать пациенту одновременно в течение длительного времени (не менее 6 мес для режимов I, II и III и не менее 20 мес для режимов IV и V), равно 4 и может достигать более 10 ЛП, не говоря уже о размерах суточных доз каждого из них. Конечно же, такой колоссальный объем применяемых ЛП приводит к развитию побочных реакций, что, в свою очередь, предотвращается или подвергается коррекции назначением сопутствующей терапии и как следствие – приводит к увеличению общего количества ежедневно применяемых ЛП, что еще больше снижает приверженность больного лечению. В итоге образуется замкнутый круг. Кроме того, следует отметить существенное удорожание лечебного процесса, связанного как с необхо-

Сведения об авторах:

Хохлов Александр Леонидович – чл.-кор. РАН, д.м.н., проф., зав. каф. клинической фармакологии ФГБОУ ВО ЯГМУ. ORCID: 0000-0002-0032-0341

Марьяндышев Андрей Олегович – чл.-кор. РАН, д.м.н., проф., зав. каф. фтизиопульмонологии ФГБОУ ВО СГМУ. ORCID: 0000-0002-8485-5625

Озерова Ирина Витальевна – к.б.н., ст. науч. сотр. ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова». ORCID: 0000-0002-2616-9221

Казашвили Юрий Георгиевич – к.б.н., вед. биолог, ООО «НИАРМЕДИК ФАРМА». ORCID: 0000-0003-0826-4177

Игумнова Ольга Валентиновна – магистр, проектный менеджер, ООО «НИАРМЕДИК ФАРМА». ORCID: 0000-0002-8927-6745

Болгарина Елена Артуровна – магистр, рук. сектора, ООО «НИАРМЕДИК ФАРМА». ORCID: 0000-0003-3345-6998

Рудой Борис Анатольевич – д.б.н., проф., рук. отд., ООО «НИАРМЕДИК ФАРМА». ORCID: 0000-0003-4421-1777

Контактная информация:

Шербакова Виктория Сергеевна – к.б.н., рук. сектора, ООО «НИАРМЕДИК ФАРМА». Тел. +7(964)510-09-48; e-mail: Viktoriya.Shcherbakova@nearmedic.ru; ORCID: 0000-0002-7251-8744

димостью формирования новых алгоритмов диагностики, так и с использованием для лечения дорогостоящих медикаментов второго ряда [5].

В связи с этим одной из ключевых задач повышения эффективности борьбы с ТБ является поиск новых ЛП и схем лечения, которые более удобны для пациентов [2].

За последние годы в мире одобрено три новых препарата против ТБ: бедаквилин [6], деламанид [7] и претоманид [8], которые в настоящее время проходят несколько клинических исследований, направленных на лечение лекарственно-устойчивого ТБ, а также на сокращение времени стандартной терапии ТБ [9]. Кроме того, в настоящее время большое количество новых молекул находятся на разных стадиях скрининговой, доклинической и клинической разработки.

По оценкам ведущих мировых экспертов, одним из самых перспективных на сегодняшний день из известных в мире кандидатов в противотуберкулезные ЛП является RBTZ169 (международное непатентованное наименование макозинона [10]), относящийся к новому классу бензотиазинонов, который ингибирует фермент клеточной стенки микобактерий декапренил-b-D-рибозо-1-эпимеразу в наномолярных концентрациях (минимальная ингибирующая концентрация ~0,2 нг/мл) [11–14].

Уникальность мишени макозинона обеспечивает его высокую активность *in vitro* (бактериостатическую и бактерицидную) в отношении не только стандартных форм ТБ, но и в отношении мультирезистентных форм (МЛУ/ШЛУ-штаммы, в том числе самые опасные штаммы МБТ, большинство из которых устойчивы как минимум к 9 основным и резервным ПТП), что показано в специально проведенных исследованиях [15]. Кроме того, при инкубации *in vitro* с RBTZ169 в концентрации 0,037 мкг/мл происходило полное подавление роста всех штаммов, выделенных от ВИЧ-негативных и большинства ВИЧ-инфицированных больных [16].

В проведенных исследованиях *in vivo* по созданию новых форм комбинированных режимов терапии ТБ путем совместного применения макозинона с новейшим зарегистрированным ПТП – бедаквилином и пипразинамидом – показан синергетический эффект антимикобактериальной активности [13–15]; выявлено его синергическое взаимодействие с клофазимидом, деламанидом и сутозолидом [16, 17] и аддитивное – с претоманидом, изониазидом, моксифлоксацином, рифампицином и SQ-109 [17]. Важно отметить, что в этих исследованиях не обнаружены ни антагонизм, ни повышенная токсичность исследуемых комбинаций [16].

Поскольку создание новых режимов терапии с минимизацией количества используемых препаратов и сокращением длительности сроков лечения является наиболее перспективным направлением, макозинон может стать основой для создания новых режимов химиотерапии лекарственно-устойчивых форм ТБ, в том числе и в комбинации с наиболее эффективными на сегодняшний день противотуберкулезными лекарственными средствами [8].

Однако в результате разработки субстанции макозинона и проведения исследований *in vitro* обнаружена прямая корреляция между липофильностью и антибактериальными свойствами различных производных вещества RBTZ169, что характерно для всего класса бензотиазинонов [18–20]. Данный факт стал причиной относительно низких показателей биодоступности, показанной как в доклинических, так и в клинических исследованиях.

Цель работы – сравнительная оценка фармакокинетических свойств лекарственной формы (ЛФ) макозинона капсулы 80 мг и новой ЛФ – диспергируемая таблетка (ДТ) для приготовления раствора для приема внутрь 320 мг.

Материалы и методы

Оценка растворимости субстанции макозинона в биорелевантных средах in vitro

Работа проведена с использованием биорелевантных сред [порошок для приготовления биорелевантных сред FaSSiF/FaSSiF/FaSSGF (Biorelevant.com, Великобритания)].

Исследуемые образцы:

- макозинон, ДТ для приготовления суспензии для приема внутрь 320 мг, производитель ООО «Новая Медика Иннотех», серия 19112018;
- макозинон, капсулы 80 мг, производитель АО «АВВА РУС», серия 01042017/3644.

Тестер растворения RC-6D (с/н 05196), ид. №76, SaintyCo Group, Китай.

Высокоэффективный жидкостной хроматограф Agilent 1260 Infinity II с VWD-детектором, (з/н G7114A/ G7129A), ид. №82, Agilent Technologies, США.

Тест кинетики растворения субстанции макозинона в стандартных (0,01N соляная кислота, ацетатный буферный раствор pH 5,0) и биорелевантных средах (FaSSiF, FeSSiF) выполнялся с использованием валидированного метода ВЭЖХ количественного определения препарата макозинона.

Условия растворения 0,01N HCl:

- аппарат – лопастная мешалка;
- скорость вращения – 150 об/мин;
- время перемешивания – 90 мин;
- объем среды – 1000 мл.

Среды растворения:

- раствор соляной кислоты 0,01N;
- ацетатный буферный раствор pH 5,0;
- биорелевантная среда FeSSiF (pH 6,5);
- биорелевантная среда FaSSiF (pH 5,0).

Изучение проницаемости макозинона в тесте Caco-2 in vitro

Для оценки проницаемости субстанции макозинона через клеточный монослой использована тест-система MultiScreen Caco-2 (Millipore Corp., USA); **рис. 1, см. на цветной вклейке.**

Исследование транспорта со стороны апикальной мембраны к базолатеральной (A-B) и в обратном направлении (B-A) проводилось на 21-дневной культуре Caco-2 при концентрации вещества макозинона 10 мкМ в течение 2 ч. В качестве контрольных соединений использовали ранитидин (низкая проницаемость), пропранолол (высокая проницаемость) и родамин 123 (P-gr-транспорт). Концентрация контрольных веществ составляла 1 мкМ. Целостность клеточного монослоя подтверждали измерением сопротивления. Содержание веществ в лунках до и после эксперимента определяли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС), кроме родамина 123, концентрацию которого оценивали с помощью флуоресцентной спектроскопии. Содержание веществ на уровне 1–10 мкМ входит в общепринятый диапазон концентраций тестируемых веществ в тест-системе Caco-2, выбор концентрации конкретного вещества определяется чувствительностью биоаналитического метода.

Дополнительно к стандартной процедуре исследования проводилась оценка неспецифического связывания макозинона с материалом планшета Millicell 96.

Изучение фармакокинетики на собаках in vivo

Сравнительное фармакокинетическое исследование выполнено на 30 самцах собак породы бигль средней массой

14,6 кг (возраст 7–8 мес), выращенных АО ВНЦ БАВ. Условия содержания животных соответствовали общепринятым стандартам [21–23].

Исследуемые препараты:

- макозинон, таблетки диспергируемые с риской (таблетки для приготовления суспензии для приема внутрь 320 мг (ООО «НоваМедика Иннотех», Россия), серия 18112018);
- макозинон, капсулы 80 мг (АО «АВВА РУС», Россия), серия 01042017/3644.

Дизайн исследования

Исследование проводилось в два этапа.

На I этапе собакам (одна экспериментальная группа) перорально вводили, с применением стандартных приемов для введения жидких и твердых оральных форм, ЛФ макозинона.

До начала введения препаратов собаки лишались корма не менее чем за 8 ч и воды не менее чем за 1 ч. После введения препарата свободный питьевой режим разрешался через 2 ч, кормление – через 10 ч.

На II этапе работы проведено изучение влияния пищи на основные фармакокинетические параметры: AUC_{last} (площадь под фармакокинетической кривой «концентрация лекарственного вещества – время» в интервале времени от 0 до момента отбора последней пробы крови с измеряемой концентрацией), $AUC_{last} T_{max}$ (время достижения максимальной концентрации), C_{max} (максимальная концентрация), K_{el} (конечная константа элиминации), $T_{1/2}$ (период полувыведения).

Для исследования выбрана доза макозинона (PBTZ169) 160 мг на собаку, что соответствовало 2 капсулам PBTZ169 80 мг и 1/2 ДТ 320 мг, предварительно суспендированной в воде. Данная дозировка является безопасной для собак.

Точки отбора крови:

- для капсул – в 15 временных точках: перед введением препарата (0) и через 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 24 ч после введения;
- для ДТ – в 11 временных точках: перед введением (0) и через 0,25 ч, 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 5, 8, 12, 24 ч после введения.

Метод количественного определения макозинона

Количественное определение макозинона, основания, в пробах проводили валидированным методом ВЭЖХ-МС/МС детектированием аналита и внутреннего стандарта (PBTZ169-d11) в режиме мониторинга заданных реакций (MRM).

Статистическая обработка данных фармакокинетического анализа

Запись, обработка хроматограмм, построение калибровочных зависимостей и расчет точности и прецизионности анализа осуществлялись с помощью программного обеспечения Analyst 1.6.2 (AB Sciex).

Для значений концентраций исследуемого препарата в каждой временной точке рассчитывали:

- арифметическое среднее (Mean);
- стандартное отклонение (SD);
- стандартную ошибку среднего (SE);
- коэффициент вариации (CV).

Фармакокинетический анализ выполняли некомпартментным методом с помощью программного пакета WinNonlin Professional 6.3 (Pharsight Corporation, USA).

Для всех фармакокинетических параметров проводили описательный статистический анализ с помощью программ WinNonlin Professional 6.3 (Pharsight Corporation).

Сравнение биодоступности исследуемых формуляций PBTZ169 при введении натощак и после кормления проведено по лог-преобразованным параметрам C_{max} и AUC_{last} с помощью непарного t-критерия Стьюдента при 90% доверительной вероятности. Расчет показателей ФК и статистический анализ выполнены с помощью программ WinNonlin Professional 6.3 (Pharsight Corporation) и Prism 5 (GraphPad Software, Inc.).

Оценка скорости всасывания и биодоступности ДТ макозинона проведена относительно ЛФ капсулы по параметрам C_{max} , T_{max} , AUC_{last} и AUC_{inf} , а также осуществлялось сравнение фармакокинетических параметров ДТ, применяемых до и после еды между собой. Статистическое сравнение выполнялось с помощью программы Prism 5 (GraphPad Software, Inc.) с применением критериев для множественных сравнений. Поскольку исследования проводили на одних и тех же собаках, применяли тесты для повторных измерений. Сравнение C_{max} и AUC осуществляли при их лог-преобразовании с помощью дисперсионного однофакторного анализа (ANOVA) с применением теста Тьюки.

Результаты

Оценка растворимости в биореlevantных средах

При оценке растворения субстанции макозинон в среде ацетатного буферного раствора pH 5,0 показано, что высвобождение составило для навески 10 мг – 66,1%, для навески 25 мг – 35,6%, для навески 50 мг – 18,5%, т.е. в среднем предел растворения составил от 6 до 9 мг/л.

В среде FaSSiF (натощак) высвобождение составило для навески 10 мг – 25,5%, для навески 25 мг – 13,3%, для навески 50 мг – 6,9%. При этом в среде FeSSiF (после еды) высвобождение составило для навески 50 мг – 58,4%, для навески 75 мг – 22,4%, для навески 100 мг – 17,6%. Таким образом, предел растворения субстанции макозинон для среды FaSSiF (натощак) составил от 2,5 до 4 мг/л, а для среды FeSSiF (после еды) – от 16,8 до 29 мг/л.

Изучение проницаемости препарата макозинон в тесте Caco-2 in vitro

При исследовании проницаемости субстанции макозинон в тест-системе Caco-2 использованы условия для снижения неспецифического связывания – в присутствии только 1% бычьего сывороточного альбумина в акцепторных лунках, а также при совместном применении преинкубации с тестируемым веществом в донорных лунках и 1% бычьего сывороточного альбумина в акцепторных лунках. В обоих случаях значение массового баланса являлось приемлемым (выше 70%). Среднее значение проницаемости по двум экспериментам составило $2,5 \times 10^{-6}$ см/с в прямом направлении и $1,5 \times 10^{-6}$ см/с – в обратном, что соответствует низкой проницаемости.

Асимметрия транспорта при исследовании проницаемости в направлениях А-В и В-А отсутствует (индекс асимметрии менее 2), таким образом, макозинон не является субстратом для активных транспортеров.

Значения проницаемости для контрольных соединений составили: для пропранолола характерна высокая проницаемость ($P_{app} = 36,3 \times 10^{-6}$ см/с), для ранитидина – низкая проницаемость ($P_{app} = 0,6 \times 10^{-6}$ см/с). Родамин 123 в прямом направлении А-В имеет низкую проницаемость ($0,6 \times 10^{-6}$ см/с) с индексом асимметрии 6,4, который снижается до 1,3 в присутствии ингибитора P-gp циклоспорина А. Таким образом,

Основные фармакокинетические параметры макозинона ДТ 160 мг, вводимой в виде суспензии после дозирования натошак (I этап исследования) и на фоне приема пищи (II этап исследования), а также капсул 80 мг в дозе 160 мг при введении их натошак в исследованиях *in vivo* у собак

Группы	Средние значения оцениваемого параметра, М±SD					
	AUC _{inf} , нг×ч/мл	C _{max} , нг/мл	T _{1/2} , ч	K _{el}	MRT _{last} , ч	T _{max} , ч
Капсулы (натошак)	88,8±41,1	24,7±2,4	1,46±0,5	0,5±0,26	3,5±0,8	1,8±0,3
ДТ (натошак)	255±105	58,2±17,8	6,4±2,1	0,12±0,04	6,5±1,1	1,2±1,0
ДТ (после еды)	398±146	146±111	3,2±1,1	0,216±0,08	3,60,4±0,4	0,82±1,5

полученные результаты для контрольных соединений являются адекватными и демонстрируют пригодность данной тест-системы Сасо-2.

Очевидно, что проницаемость макозинона обусловлена пассивной диффузией через клеточные мембраны.

Изучение ФК на собаках

На рис. 2, см. на цветной вклейке, представлены усредненные значения фармакокинетических кривых препарата макозинон, ДТ для приготовления суспензии для приема внутрь в дозе 160 мг, после введения как на фоне приема пищи, так и натошак. На рис. 2 также изображена фармакокинетическая кривая для ЛФ капсулы 80 мг при введении их в той же дозе.

Произведен расчет фармакокинетических параметров для каждой ЛФ, усредненные значения которых также приведены в таблице.

Обсуждение

В ходе ранее проведенных клинических и доклинических исследований были установлены некоторые особенности ФК макозинона [24].

Так, в ходе пилотного клинического исследования IIa фазы у пациентов с впервые выявленным ТБ органов дыхания с бактериовыделением и сохраненной чувствительностью к изониазиду и рифампицину изучена ФК макозинона при ежедневном приеме лекарственной формы капсула 80 мг в дозах 160, 320 и 640 мг/сут в течение 14 дней в режиме монотерапии и при однократном приеме [12]. Установлено статистически значимое увеличение ФК параметра AUC₀₋₂₄ на фоне многократного дозирования по сравнению с однократным приемом: в 2,9 раза в группе терапии РВТЗ169 (320 мг) и 2,1 раза в группе терапии РВТЗ169 (640 мг).

Также установлено статистически значимое повышение параметра C_{max} на фоне многократного дозирования по сравнению с однократным приемом: в 3,4 раза для группы терапии РВТЗ169 (320 мг). Таким образом, результаты клинического исследования показали, что для достижения терапевтического эффекта требуется увеличивать либо дозу препарата, либо биодоступность самой субстанции макозинон [12].

Низкая биодоступность может быть связана со степенью проницаемости макозинона. Результаты исследования *in vitro* с использованием клеток кишечной аденокарциномы Сасо-2 по оценке проницаемости позволяют отнести препарат макозинон к веществам с низкой проницаемостью. Также следует отметить, что макозинон не является субстратом для активных транспортеров, а его проницаемость обусловлена только пассивной диффузией.

При этом, выявленная в тесте кинетики растворения выраженная зависимость между значением показателя рН и

степенью растворения позволяет предположить, что субстанция макозинон может растворяться главным образом в желудке, а всасывание происходит в верхних отделах кишечника. При этом показано, что в биорелевантной среде FaSSiF (моделирование состояния «после еды») субстанция макозинон имеет высокие показатели растворимости, тогда как в среде FeSSiF (натошак) практически не растворяется. Эти данные полностью согласуются с результатами, полученными в ходе клинического исследования IIb фазы [12], которое имело дизайн открытого проспективного несравнительного исследования безопасности, переносимости, ФК и влияния пищи препарата РВТЗ169 в капсулах 80 мг после однократного, двукратного (2 раза в день) или многократного применения в возрастающих дозах.

По результатам анализа относительной биодоступности и относительной степени всасывания установлено, что после приема пищи наблюдается существенное статистически значимое увеличение основных ФК параметров препарата макозинон при применении в дозе 640 мг: параметра AUC_{0-∞} – в 3,45 раза, параметра AUC_{0-t} (f') – в 3,50 раза и параметра C_{max} – в 2,29 раза; 90% доверительные интервалы для отношения (после еды/натошак) средних геометрических значений параметров относительной биодоступности [f=AUC_{0-∞}(T)/AUC_{0-∞}(R); f'=AUC_{0-t}(T)/AUC_{0-t}(R)] и относительной степени всасывания [f''=C_{max}(T)/C_{max}(R)] составили 293,99–403,80% для f, 300,94–407,52% для f' и 179,29–292,56% для f'' и находятся вне установленных пределов 80,00–125,00%, что также подтверждает вывод о наличии влияния пищи на фармакокинетические показатели препарата макозинон.

Продемонстрировано, что препарат всасывался и выводился из организма значительно медленнее при применении после приема пищи в сравнении с применением препарата натошак [12].

При этом следует отметить, что повышение дозы макозинона, с одной стороны, не приводит к значимому повышению биодоступности, что связано с так называемым узким окном абсорбции, а с другой – возникает проблема удобства приема для пациентов. Таким образом, на основании результатов как клинических, так и доклинических исследований сделан вывод о необходимости создания удобной для приема пациентами ЛФ с улучшенными фармакокинетическими параметрами – ДТ для приготовления суспензии для приема внутрь.

ДТ макозинона разработана в соответствии с современными правилами надлежущей производственной практики и требованиями к фармацевтической разработке [25]. В ходе сравнительных фармакокинетических исследований на собаках двух ЛФ макозинона (капсулы и ДТ) показано, что для ДТ характерно более быстрое достижение пиковой концентрации действующего вещества в плазме крови. Для капсул макозинона медиана T_{max} составила 1,8 ч (ранг 1,5–2 ч), тогда как для ДТ – 1 ч (ранг 0,3–3 ч).

Средние значения C_{\max} макозинона при введении ДТ выше по сравнению с C_{\max} капсул (см. таблицу). Следует отметить, что у ДТ межсубъектная вариабельность по C_{\max} составила более 30%, что значительно выше, чем у капсул (10%). Тем не менее отличия по C_{\max} от капсул для всех таблеток являлись статистически значимыми ($p < 0,05$).

Общая экспозиция в плазме макозинона (AUC) при введении ДТ также выше, чем при введении капсул, – в 2,4 раза.

Сравнительная биодоступность капсул и суспензии ДТ в условиях натощак AUC_{last} составляет 17% и 67% относительно AUC_{last} суспензии.

Таким образом, более высокие средние значения C_{\max} и AUC макозинона в экспериментах на собаках при дозировании ДТ показывают, что данная ЛФ обеспечивает более высокую степень всасывания и биодоступность субстанции, чем ЛФ капсулы при одинаковых дозах действующего вещества.

Следует отметить, что существенным фактором, влияющим на ФК параметры, является режим приема препарата (после еды или натощак). В проведенных ранее клинических исследованиях Ib фазы [12] после приема пищи наблюдается существенное статистически значимое увеличение основных ФК параметров препарата макозином, что согласуется с данными по растворению субстанции макозином в биорелевантных средах и указывает на существование так называемого узкого окна абсорбции для макозинона. В исследованиях на собаках также показано, после еды C_{\max} макозинона была в 1,8 раза, а AUC_{last} – в 1,3 раза больше, чем при дозировании натощак. Из-за высокой вариабельности статистическая значимость отличий ФК параметров натощак и после еды не достигнута ($p > 0,1$), однако тенденция к увеличению биодоступности макозинона на фоне пищи прослеживается.

Разработка новой ЛФ, таблетка для приготовления суспензии для приема внутрь, позволила улучшить основные ФК-показатели, такие как экспозиция, биодоступность, и полностью решила проблему удобства приема препарата. Однако использование данной ЛФ, скорее всего, потребует ежедневного двукратного приема в день препарата с целью обеспечения эффективной антимикобактериальной активности и уменьшения риска развития резистентности. Также необходимо снизить амплитудные колебания содержания препарата в плазме крови с целью снижения возможных нежелательных явлений.

Очевидно, что выявленные особенности физико-химических свойств субстанции макозином следует учитывать при разработке ЛФ. Известно, что для субстанций II и IV классов по биофармацевтической классификационной системе – БКС (макозином относится к IV классу) характерны особенности ФК, такие как разобщение зон растворения и всасывания, наличие абсорбционного окна, высокий пресистемный метаболизм и высокая фармакокинетическая вариабельность, которые создают дополнительные трудности на этапе обеспечения требуемого уровня биодоступности и могут быть определены как биофармацевтически значимые [26–28].

Данные фармакокинетических исследований ЛФ с немедленным высвобождением на крупных животных (собаки породы бигль) подтверждают результаты тестов кинетики растворения и проницаемости, а также гипотезу об узком окне абсорбции. Фармакокинетические параметры T_{\max} (0,5–1 ч) и константа элиминации ($K_{\text{el}} - 0,8$) свидетельствует о

том, что после введения препарата максимальная абсорбция наблюдается в течение первых 30 минут и соответствует верхним отделам тонкого кишечника [22]. Известно, что частицы лекарства, как и пищи, измельчаясь в желудке (до 1–2 мм), поступают в тонкий кишечник, где и идет, особенно в верхней его трети, основной процесс всасывания большинства препаратов. Этому способствует чрезвычайно развитая площадь поверхности – система ворсинок, а также клеточных микроворсинок на апикальной (внутрикишечной) стороне кишечных клеток (энтероцитов).

Результаты исследований о влиянии приема пищи свидетельствуют о повышении в этих условиях биодоступности форм немедленного высвобождения препарата макозином. Считается [23], что положительное влияние на показатели биодоступности (C_{\max} , экспозиция) обеспечивается за счет задержки и растворения ЛП в желудке и последующей солюбилизации пищеварительными соками. Учитывая класс субстанции макозином по классификации БКС, одним из перспективных направлений решения задачи дальнейшего повышения биодоступности нового перспективного препарата Макозином является создание принципиально новой ЛФ с модифицированным высвобождением, учитывающей узкое окно абсорбции.

Заключение

Конечной целью усилий по разработке лекарств от ТБ является разработка нового более эффективного режима, который может заменить существующую комбинированную терапию. Одним из наиболее перспективных ингибиторов декапренил-b-D-рибозо-1-эпимеразы считается макозином. Его профили безопасности и переносимости, ФК и эффективность по параметру ранней бактерицидной активности оценены в ходе экспериментальных, доклинических и трех клинических исследований, проведенных компанией ООО «Ниармедик Плюс» в России (NCT04150224, NCT03334734, NCT03036163) [11, 12]. Безопасность и высокая переносимость препарата также подтверждены в рамках исследований безопасности, переносимости и ФК макозинона у здоровых добровольцев, проводимых некоммерческим фондом «Инновационные лекарства для туберкулеза» (фонд iM4TB) с поддержкой фонда Билла и Мелинды Гейтс [28, 29].

В ходе проведенных исследований установлены особенности ФК препарата макозином, которые имеют критическое значение для разработки эффективной ЛФ [11, 12]. Предполагается, что после введения препарата максимальная абсорбция наблюдается в течение первых 30 минут и происходит главным образом в верхних отделах тонкого кишечника. При этом положительное влияние пищи на параметры биодоступности связаны с задержкой субстанции в желудке и лучшим растворением ЛП в желудке и последующей солюбилизацией пищеварительными соками. Учитывая класс препарата макозином по БКС, одним из перспективных направлений решения повышения биодоступности, а следовательно, и эффективности препаратов макозинона является создание ЛФ с модифицированным высвобождением, учитывающих узкое окно абсорбции.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. S. WHO: Geneva, Global TB Report 2019, 2019.
2. Tiberi S, et al. Tuberculosis: progress and advances in development of new drugs, treatment regimens, and host-directed therapies. *Lancet Infect Dis*. 2018;18:e183-e198. doi: 10.1016/S1473-3099(18)30110-5
3. World Health Organization, Anti-tuberculosis Drug Resistance in the World: Third Global Report/the WHO/IUATLD Global Project on Anti-tuberculosis Drug Resistance Surveillance. 2004.
4. World Health Organization. The end TB strategy: global strategy and targets for tuberculosis prevention, care and control after 2015. 2015. https://www.who.int/tb/post2015_TBstrategy.pdf?ua=1
5. Общероссийская общественная организация «Российское общество фтизиатров». Клинические рекомендации «Туберкулез у взрослых». 2020 [All-Russian public organization "Russian Society of Phthisiologists". Clinical guidelines "Tuberculosis in adults." 2020 (In Russ.)].
6. Andries K, et al. A Diarylquinoline drug active on the ATP synthase of Mycobacterium tuberculosis. *Science*. 2005 Jan 14;307(5707):223-7. doi: 10.1126/science.1106753
7. Matsumoto M, et al. OPC-67683, a nitro-dihydro-imidazooxazole derivative with promising action against tuberculosis in vitro and in mice. *PLoS Med*. 2006;3(11):e466. doi: 10.1371/journal.pmed.0030466
8. Stover CK, et al. A small-molecule nitroimidazopyran drug candidate for the treatment of tuberculosis. *Nature*. 2000;405(6789):962-6. doi: 10.1038/35016103
9. Clinical Pipeline. Working Group for New TB Drugs. <https://www.newtbdugs.org/pipeline/clinical>
10. WHO. WHO Drug Information. 2018;32(3). https://www.who.int/medicines/publications/druginformation/issues/DrugInformation2018_Vo132-3/en/
11. Makarov V, Mikušová K. Development of macozinone for TB treatment: An update. *Appl Sci*. 2020;10(7):2269. doi: 10.3390/app10072269
12. Марьяндышев А.О., Хохлов А.Л., Смердин С.В. и др. Основные результаты клинических исследований эффективности, безопасности и фармакокинетики перспективного противотуберкулезного препарата макозинон (PBTZ169). *Терапевтический архив*. 2020;92(3):61-72 [Mariandyshov AO, Khokhlov AL, Smerdin SV, et al. The main results of clinical trials of the efficacy, safety and pharmacokinetics of the perspective anti-tuberculosis drug makozinone (PBTZ169). *Terapevticheskiy arkhiv*. 2020;92(3):61-72 (In Russ.)]. doi: 10.26442/00403660.2020.03.000621
13. Makarov V, et al. Benzothiazinones kill Mycobacterium tuberculosis by blocking arabinan synthesis. *Science*. 2009;324(5928):801-4. doi: 10.1126/science.1171583
14. Zumla AI, et al. Review New antituberculosis drugs, regimens, and adjunct therapies: needs, advances, and future prospects. *Lancet Infect Dis*. 2014;14:327. www.thelancet.com/infection
15. Pasca MR, et al. Clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis in four European hospitals are uniformly susceptible to benzothiazinones. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(4):1616-8. doi: 10.1128/AAC.01676-09
16. Черноусова Л.Н., Андреевская С.Н., Смирнова Т.Г. и др. Активность in vitro лекарственного кандидата PBTZ169, гидрохлорид, в отношении клинических штаммов Mycobacterium tuberculosis с широкой лекарственной устойчивостью. *Туберкулез и болезни легких*. 2016;94(9):73-9 [Chernousova LN, Andreevskaya SN, Smirnova TG, et al. In vitro action of the drug candidate of pbtz169, hydrochloride action in respect of clinical strains of Mycobacterium tuberculosis with extensive drug resistance. *Tuberculosis and Lung Diseases*. 2016;94(9):73-9 (In Russ.)]. doi: 10.21292/2075-1230-2016-94-9-73-79
17. Makarov V, et al. Towards a new combination therapy for tuberculosis with next generation benzothiazinones. *EMBO Mol Med*. 2014;6(3):372-83. doi: 10.1002/emmm.201303575
18. Pio A, Chaulet P. Tuberculosis Handbook. 1998.
19. Zignol M, et al. Population-based resistance of Mycobacterium tuberculosis isolates to pyrazinamide and fluoroquinolones: results from a multicountry surveillance project. *Lancet Infect Dis*. 2016;16(10):1185-92. doi: 10.1016/S1473-3099(16)30190-6
20. Avalos E, et al. Frequency and geographic distribution of gyrA and gyrB mutations associated with fluoroquinolone resistance in clinical Mycobacterium tuberculosis isolates: A systematic review. *PLoS One*. 2015;10(3). doi: 10.1371/journal.pone.0120470
21. Nih, Od, Oer, Olaw, Guide Laboratory Animals for the Care and use of Eighth Edition Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals Institute for Laboratory Animal Research Division on Earth and Life Studies. 2011.
22. ФГУП ВНИЦСМВ, ГОСТ 33044-2014. Принципы надлежащей лабораторной практики. 2015 [FSUE "VNITsSMV" GOST 33044-2014. Principles of Good Laboratory Practice (In Russ.)]
23. СП 2.2.1.3218-14. Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев). 2014 [SP 2.2.1.3218-14. Sanitary and Epidemiological Requirements for the Design, Equipment and Maintenance of Experimental Biological Clinics (Vivariums). 2014 (In Russ.)].
24. ЕМА/CHMP/ICH, Committee for Human Medicinal Products ICH guideline Q8 (R2) on pharmaceutical development. 2017; p. 24.
25. Демина Н.Б. Биофармацевтическая классификационная система как инструмент разработки дизайна и технологии лекарственной формы. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017;2:56-60 [Demina N.B. Biofarmatsevticheskaia klassifikatsionnaia Sistema kak instrument razrabotki dizaina i tekhnologii lekarstvennoi formy. *Razrabotka i registratsiia lekarstvennykh sredstv*. 2017;2:56-60 (In Russ.)].
26. Головенко Н.Я., Борисюк И.Ю. Биофармацевтическая классификационная система – экспериментальная модель прогнозирования биодоступности лекарственных средств. *Биомедицинская химия*. 2008;54(4):392-407 [Golovenko NJa, Borisiuk IYu. Biofarmatsevticheskaia klassifikatsionnaia sistema – eksperimental'naia model' prognozirovaniia biodostupnosti lekarstvennykh sredstv. *Biomeditsinskaiia khimii*. 2008;54(4):392-407 (In Russ.)].
27. Сеткина С.Б., Хишова О.М. Алгоритм биофармацевтической оценки на этапе фармацевтической разработки лекарственных средств. Достижения фундаментальной, клинической медицины и фармации. Материалы 72-й научной сессии сотрудников университета. Витебский гос. мед. ун-т. 2017; с. 307-10 [Setkina SB, Khishova OM. Algoritm biofarmatsevticheskoi otsenki na etape farmatsevticheskoi razrabotki lekarstvennykh sredstv. Dostizheniia fundamental'noi, klinicheskoi meditsiny i farmatsii. Materialy 72-i nauchnoi sessii sotrudnikov universiteta. Vitebskii gos. med. un-t. 2017; p. 307-10 (In Russ.)].
28. Study to Evaluate the Safety, Tolerability, Pharmacokinetics and Ex-vivo Antitubercular Activity of PBTZ169 Formulation – Full Text View – ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03423030>
29. Study to Evaluate the Safety, Tolerability and Pharmacokinetics of PBTZ169 in Multiple Dosing – Full Text View – ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03776500>

Поступила 03.11.2020