

ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ФОСФОЛИПИДНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ФЛУДАРАБИНА

И.А. Цибульская, Т.И. Кулак, Т.Н. Буравская, Е.Н. Калиниченко, М.Б. Голубева,
Б.Б. Кузьмицкий

Институт биоорганической химии НАН Беларуси
220141 Минск, ул. акад. В.Купревича, 5/2

ilonaolenikova@tut.by

В настоящее время флударабина фосфат (9-β-D-арабинофуранозил-2-фтораденин-5'-монофосфат, F-ara-AMP) широко используется в медицине в качестве противолейкемического средства для лечения хронического В-клеточного лимфолейкоза, неходжкинской лимфомы низкой степени злокачественности [1]. F-ara-AMP является хорошо растворимым в воде производным флударабина (9-β-D-арабинофуранозил-2-фтораденина, F-ara-A); в крови F-ara-AMP быстро дефосфорилируется до свободного нуклеозида, который проникает в клетку и постадийно фосфорилируется клеточными киназами до активного 5'-трифосфата, являющегося активным метаболитом [2].

Известно, что одним из недостатков антилейкемической и противовирусной терапии является быстрый метаболизм лекарственных препаратов *in vivo*, что приводит к короткому времени циркуляции в крови и снижению биодоступности при пероральном приеме. Ранее в клинической практике флударабина фосфат использовали в виде внутривенной инфузии, однако в последние годы, благодаря разработке таблеточной формы препарата, стало возможным его пероральное применение. Биодоступность таблетированного флударабина фосфата у человека исследовали в плазме крови пациентов с хроническим В-клеточным лимфолейкозом и неходжкинскими лимфомами. Проведенное исследование показало, что биодоступность F-ara-A при приеме *per os* F-ara-AMP составляет 55% и не зависит от дозы препарата [2].

В ряде работ показано, что липидные производные нуклеозидов характеризуются улучшенной биодоступностью. Так, например, липидный аддукт дидезоксицитидина (ddC) (диолеоилфосфатидил-ddC), введенный внутрибрюшинно мышам, вызывал 40-кратное увеличение уровня препарата в печени по сравнению со свободным ddC, без значительного увеличения токсичности [3].

Нами синтезированы фосфолипидные производные ряда выпускаемых в нашей стране противоопухолевых препаратов нуклеозидной природы (клофарабина, лейкокладина, флударабина [4]), которые, как предполагается, могут представлять интерес в качестве пролекарственных форм данных соединений, в том числе для перорального применения [5]. **Целью данной работы** являлось изучение фармакокинетических свойств полученных нами конъюгатов F-ara-A с 1,2- и 1,3-диацилглицерофосфатами (соединений 12MF, 12PF и 13MF, 13PF, соответственно; М – миристоильные, Р – пальмитоильные производные).

Методы исследования. Эксперименты на биомоделях были выполнены в соответствии с принципами защиты лабораторных животных. Крысы Вистар весом 200 ± 10 г получены из питомника Института биоорганической химии НАН Беларуси. Перед экспериментом животные не получали корм в течение 16 ч. В фармакокинетическом исследовании сравнивали введенные внутривенно F-ara-AMP и его пролекарства (12MF, 12PF, 13MF, 13PF). F-ara-AMP (30 мг/кг) и его конъюгаты (12MF и 13MF – 72 мг/кг, 12PF и 13PF – 77 мг/кг, дозы эквивалентны 30 мг/кг F-ara-AMP) вводили крысам в виде суспензии в 2% растворе гуммиарабика. В каждой исследуемой группе было по 7 животных. Каждый эксперимент проводили в трех повторях. Образцы крови (1 мл) отбирали из яремной вены животных после анестезии диэтиловым эфиром и декапитации. Отбор проб осуществляли через интервалы времени 0,5, 1, 2, 3, 4, 7 и 24 ч после введения препаратов в гепаринизированные пробирки и незамедлительно центрифугировали при 6500 г и

комнатной температуре, после чего снимали сыворотку с осадка и замораживали при - 8°C для последующего анализа с помощью ВЭЖХ. Для осаждения белков к каждой пробе сыворотки объемом 100 мкл добавляли 50 мкл 50% водного метанола и 250 мкл ацетонитрила, полученную смесь центрифугировали в течение 10 мин при 6500 g, затем извлекали супернатант и анализировали его методом ВЭЖХ. Калибровочные образцы готовили таким же способом. Содержание F-ara-A в образцах анализировали методом ВЭЖХ с использованием хроматографической системы Waters (USA). Разделение проб проводили на колонке C18 Nucleodur EC (250x4.6 мм) при температуре 40°C; в качестве жидкой фазы использовали изократическую смесь метанол : 0.01M KН₂РO₄, 20:80 (скорость потока 0.7 мл/мин).

Результаты. Полученные фармакокинетические параметры представлены в таблице 1. Значения концентраций F-ara-A (нг/мл) есть среднее значение $\pm$ стандартное отклонение (n = 3). Анализ и статистическую оценку фармакокинетических данных проводили с использованием внемоделного метода интегральных моментов. Величину площади под кривой концентрация – время (AUC₀₋₂₄) определяли интегрированием с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 5 (кривые концентрация – время строили с использованием средних значений концентраций и стандартного отклонения). Для C_{max} и C_{min} также рассчитывали стандартное отклонение. Показатель T_{1/2}, характеризующий период полу-элиминации действующего вещества из кровеносного русла, находили из фармакокинетических кривых. Относительную биодоступность (F) оценивали сравнением AUC₀₋₂₄ для тестируемого конъюгата и флударабина фосфата.

Таблица 1. Фармакокинетические параметры F-ara-A в сыворотке крови крыс Вистар после внутривенного введения F-ara-AMP (30 мг/кг) и конъюгатов 12MF, 13MF (72 мг/кг), 12PF, 13PF (77 мг/кг)

Параметры	F-ara-AMP	12MF	12PF	13MF	13PF
C _{max} (нг/мл)	3776 $\pm$ 167	1921 $\pm$ 151	1346 $\pm$ 79	1162 $\pm$ 124	612 $\pm$ 48
T _{max} (ч)	0.95	2.9	2.7	3.5	3.3
AUC ₀₋₂₄ (нг·ч/мл)	17009	16935	12149	9209	5834
T _{1/2} (ч)	2.2	10.4	6.5	5.4	5.4
C _{ss} (нг/мл)	710	706	465	384	243
C _{min} (нг/мл)	13 $\pm$ 9	199 $\pm$ 31	193 $\pm$ 29	95 $\pm$ 67	170 $\pm$ 49
F, %		99.6	71.4	54.0	34.3

Из полученных данных следует, что при внутривенном введении фосфолипидных производных флударабина максимальная концентрация F-ara-A в сыворотке крови животных ниже той, которая наблюдается при введении свободного F-ara-AMP. При введении F-ara-AMP величина C_{max} F-ара-А была в 2 - 6 раза больше, чем в случае фосфолипидных конъюгатов. Однако исследуемые производные флударабина характеризовались меньшей скоростью абсорбции F-ара-А и увеличенным в 2.8 - 3.7 раза временем достижения максимальной концентрации T_{max}. Так, уровень F-ара-А в сыворотке крови крыс после внутривенного введения препаратов 12MF и 12PF возрастал до максимальной отметки в 1921 $\pm$ 151 нг/мл за 2.9 ч и 1346 $\pm$ 79 нг/мл за 2.7 ч, соответственно, и медленно уменьшался в течение 24 ч; при этом время полу-элиминации составляло 10.4 и 6.5 ч, соответственно. Максимальный уровень F-ара-А в сыворотке крови животных после внутривенного введения конъюгатов 13MF и 13PF был ниже - 1162 $\pm$ 124 нг/мл за 3.5 ч и 612 $\pm$ 48 нг/мл за 3.3 ч, соответственно. В отличие от фосфолипидных производных флударабина, при введении F-ара-AMP наблюдались более быстрый рост и затем более быстрое падение концентрации флударабина (C_{max} 3776 $\pm$ 167 нг/мл снижалась в два раза за 1.25 ч).

Площадь под фармакокинетической кривой (AUC_{0-24}) и средняя стационарная концентрация (C_{ss}) для конъюгата 12MF (16935 нг·ч/мл, 706 нг/мл, соответственно) практически равнялись таковым для F-ara-AMP (17009 нг·ч/мл, 710 нг/мл, соответственно).

Период полувыведения $T_{1/2}$ флударабина, выделившегося из конъюгатов, составлял от 5.4 до 10.4 ч, то есть был значительно длиннее, чем в случае немодифицированного нуклеотида (2.2 ч). Относительная биодоступность исследованных конъюгатов составила 34.3 - 99.6%.

Заключение. Установлено, что полученные нами диацилглицерофосфатные производные флударабина, не увеличивая концентрацию F-ara-A в сыворотке крови, обеспечивают длительное высвобождение нуклеозида. Анализ фармакокинетических характеристик исследованных соединений позволяет заключить, что фосфолипидный конъюгат флударабина 12MF обладает свойствами потенциального перорального пролекарства флударабина.

Литература

1. Keating M, Estey E, O'Brien S, Kantarjian H, Robertson L, Plunkett W: Clinical Experience with Fludarabine in Leukaemia. *Drugs* 1994, 47(6): 39-49.
2. Foran JM, Oscier D, Orchard J, Johnson SA, Tighe M, Cullen MH, de Takats PG, Kraus C, Klein M, Lister TA: Pharmacokinetic Study of Single Doses of Oral Fludarabine Phosphate in Patients With "Low-Grade" Non-Hodgkin's Lymphoma and B-Cell Chronic. Lymphocytic Leukemia. *Journal of Clinical Oncology* 1999, 17(5): 1574-1574.
3. Hostetler KY, Korba BE, Sridhar CN, Gardner MF: Antiviral activity of phosphatidyl-dideoxycytidine in hepatitis B-infected cells and enhanced hepatic uptake in mice. *Antiviral Research* 1994, 24(1): 59-67.
4. Калиниченко Е.Н.: Инновационные технологии получения фармацевтических субстанций и лекарственных средств для терапии онкогематологических заболеваний. *Инновационные технологии в медицине* 2014, 1 (2): 99- 107.
5. Tsybul'skaya I., Kulak T., Baranovsky A., Golubeva M., Kuzmitsky B., Kalinichenko E: Synthesis and in vitro cytostatic activity of 1,2- and 1,3-diacylglycerophosphates of clofarabine. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2013, 21 (17): 5414–5419.

PHARMACOKINETIC PROPERTIES OF PHOSPHOLIPID FLUDARABINE DERIVATIVES

I.A. Tsybul'skaya, T.I. Kulak, T.N. Buravskaya, E.N. Kalinichenko, M.B. Golubeva,
B.B. Kuzmitsky

The aim of this study was to investigate the pharmacokinetic properties of F-ara-A conjugates with isomeric 1,2- and 1,3-diacylglycerophosphates (12MF, 12PF and 13MF, 13PF, correspondingly; M – dimyristoyl, P – dipalmitoyl derivatives). It was found that intragastric administration of phospholipid F-ara-A derivatives to Wistar rats led to prolonged serum circulation of deliberated nucleoside. The investigated compounds exhibited moderate to high oral bioavailability. The most prominent results were obtained for compound 12MF.