

УДК 615.03

DOI: <https://doi.org/10.17816/RCF203297-308>

Научная статья

## Доклиническое изучение фармакокинетических процессов ADME фенозановой кислоты в системах *in vitro* и *in vivo*

В.М. Косман<sup>1</sup>, М.В. Карлина<sup>1</sup>, К.В. Тютина<sup>1</sup>, В.Г. Макаров<sup>1</sup>, М.Н. Макарова<sup>1</sup>, С.В. Морозов<sup>2</sup>,  
Е.Е. Гущина<sup>2</sup>, Н.В. Журавская<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Научно-производственное объединение «Дом Фармации», Ленинградская обл., Всеволожский р-н, п. Кузьмолово, Россия;

<sup>2</sup> ООО «Пик-Фарма», Москва, Россия

**Актуальность.** Фенозановая кислота — синтетический антиоксидант, действующее вещество оригинального отечественного лекарственного препарата, рекомендуемого для лечения эпилепсии. Для повышения эффективности и безопасности применения фенозановой кислоты необходимо дополнительное изучение ее фармакокинетических свойств.

**Цель** — изучение фармакокинетических параметров действующего вещества препарата Дибуфелон, капсулы 200 мг (ООО «Пик-Фарма», Россия) в системах *in vitro* и *in vivo* на половозрелых крысах при однократном введении в одной дозе.

**Материалы и методы.** В тестах *in vitro* оценены связывание фенозановой кислоты с белками плазмы крови, микросомальная стабильность и проницаемость через монослой клеток Caco-2. На самцах крыс линии Wistar изучены параметры фармакокинетики после однократного внутривенного введения препарата в дозе 80 мг/кг. Анализ проб выполнен методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектированием.

**Результаты.** Выявлена высокая вариабельность степени связывания фенозановой кислоты с белками плазмы крови на 20–65 % в зависимости от концентрации, сравнительно высокая микросомальная стабильность [период полураспада  $1106 \pm 789$  мин, внутренний клиренс  $2,05 \pm 0,86$  мкл/(мин · мг) протеина микросом печени; остаточное содержание после 60 мин инкубации  $87,9 \pm 7,8$  %] и способность проникать через монослой клеток Caco-2. Установлено быстрое поступление вещества в системный кровоток — его максимальную концентрацию в плазме крови наблюдали уже через  $3,6 \pm 1,2$  ч после введения, и медленное выведение из системного кровотока — период полувыведения составил около 19 ч, среднее время удержания — около 29 ч. Фенозановая кислота с разной степенью интенсивности распределялась во все исследованные органы и ткани: почки > печень > головной мозг > сальник > мышцы, и в неизменном виде в незначительном количестве выводилось с мочой и калом — около 0,04 и 5,5 % соответственно.

**Выводы.** В результате исследования установлено, что фенозановая кислота характеризуется быстрым поступлением в системный кровоток и длительным нахождением в нем в неизменном виде, что может быть обусловлено особенностями ее связывания с белками плазмы крови и сравнительно высокой метаболической стабильностью, выявленными при проведении соответствующих тестов *in vitro*. Изучение проницаемости и транспорта фенозановой кислоты показало, что она предположительно может быть отнесена к соединениям со средней проницаемостью и не является субстратом для транспортного белка Р-гликопротеина (P-gp). Исследование тканевой доступности фенозановой кислоты подтвердило ее поступление в периферические ткани, в том числе в головной мозг как в зону реализации противосудорожного эффекта.

**Ключевые слова:** фенозановая кислота; связывание с белками плазмы крови; стабильность; микросомы печени; проницаемость; внутривенное введение; фармакокинетика; крысы; плазма; органы и ткани; экскреты; высокоэффективная жидкостная хроматография с ультрафиолетовым детектированием; ВЭЖХ-УФ.

### Как цитировать:

Косман В.М., Карлина М.В., Тютина К.В., Макаров В.Г., Макарова М.Н., Морозов С.В., Гущина Е.Е., Журавская Н.В. Доклиническое изучение фармакокинетических процессов ADME фенозановой кислоты в системах *in vitro* и *in vivo* // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. 2022. Т. 20. № 3. С. 297–308. DOI: <https://doi.org/10.17816/RCF203297-308>

DOI: <https://doi.org/10.17816/RCF203297-308>

Research Article

## Preclinical study of pharmacokinetic ADME processes of phenosanic acid *in vitro* and *in vivo*

Vera M. Kosman<sup>1</sup>, Marina V. Karlina<sup>1</sup>, Ksenia V. Tyutina<sup>1</sup>, Valery G. Makarov<sup>1</sup>,  
Marina N. Makarova<sup>1</sup>, Sergey V. Morozov<sup>2</sup>, Eugenia E. Gushchina<sup>2</sup>, Natalia V. Zhuravskaya<sup>2</sup>

<sup>1</sup> RMC "Home of Pharmacy", Kuzmolovo, Vsevolozhski municipal district, Leningrad Region, Russia;

<sup>2</sup> LLC "Piq-Pharma", Moscow, Russia

**BACKGROUND:** Phenosanic acid is a synthetic antioxidant, the active ingredient of the original domestic drug recommended for the treatment of epilepsy. To improve the effectiveness and safety of the use of phenosanoic acid, additional study of its pharmacokinetic properties is necessary.

**AIM:** To study the pharmacokinetic parameters of the active ingredient of the drug Dibufelon, capsule 200 mg (LLC "Piq-Pharma", Russia) *in vitro* and *in vivo* systems in rats after single administration in one dose.

**MATERIALS AND METHODS:** Phenosanic acid binding to blood plasma proteins, microsomal stability and permeability through the monolayer of Caco-2 cells were evaluated in *in vitro* tests. The pharmacokinetics parameters were studied after a single intragastric administration in Wistar rats in dose of 80 mg/kg. The samples were analyzed by HPLC-UV.

**RESULTS:** A high variability in the degree of binding of phenosanic acid to blood plasma proteins by 20–65% depending on the concentration was revealed, relatively high microsomal stability (half-life —  $1106 \pm 789$  min, internal clearance —  $2.05 \pm 0.86$   $\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg}$  protein of liver microsome; residual content after 60 min incubation —  $87.9 \pm 7.8\%$ ) and the ability to penetrate through the monolayer of cells Caco-2. The rapid absorption of the substance into the systemic bloodstream was established — its maximum concentration in blood plasma was observed already  $3.6 \pm 1.2$  hours after administration, and its slow removal from the systemic bloodstream — the half-life was about 19 h, the average retention time was about 29 h. Phenosanic acid with different degrees of intensity was distributed to all the examined organs and tissues: kidneys > liver > brain > omentum > muscle, and invariably excreted in a small amount with urine and feces, about 0.04% and 5.5%, respectively.

**CONCLUSIONS:** As a result of the study, it was found that phenosanic acid is characterized by rapid absorption into the systemic bloodstream and a long stay in it invariably, which may be due to the peculiarities of its binding to blood plasma proteins and relatively high metabolic stability, revealed during the corresponding *in vitro* tests. The study of the permeability and transport of phenosanic acid showed that it can presumably be attributed to compounds with medium permeability and is not a substrate for the transport protein P-glycoprotein (P-gp). The study of tissue availability of phenosanic acid confirmed its entry into peripheral tissues, including the brain, which is the area of implementation of the anticonvulsant effect.

**Keywords:** phenosanic acid; plasma protein binding; stability; liver microsomes; permeability; intragastrical application; pharmacokinetics; rats; plasma organ and tissues; excretes; HPLC-UV.

### To cite this article:

Kosman VM, Karlina MV, Tyutina KV, Makarov VG, Makarova MN, Morozov SV, Gushchina EE, Zhuravskaya NV. Preclinical study of pharmacokinetic ADME processes of phenosanic acid *in vitro* and *in vivo*. *Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy*. 2022;20(3):297–308. DOI: <https://doi.org/10.17816/RCF203297-308>

Received: 19.07.2022

Accepted: 25.08.2022

Published: 30.09.2022

## АКТУАЛЬНОСТЬ

Фармакокинетические процессы, включающие оценку абсорбции, распределения, метаболизма и экскреции препарата (Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion — ADME), направлены на изучение влияния организма на лекарственный препарат. Исследования *in vitro* служат скрининговым механизмом для оценки фармакокинетики лекарственных средств (ЛС), должны предшествовать соответствующим исследованиям *in vivo* у человека<sup>1</sup> и необходимы для формирования полноценного регистрационного досье на ЛС для медицинского применения согласно современным требованиям<sup>2</sup>. Изучение фармакокинетики *in vivo*, характеризующее кинетику всасывания, распределения и элиминации фармакологических средств в организме, является неотъемлемой частью комплекса доклинических исследований ЛС<sup>3</sup>.

Фенозановая кислота (синтетический антиоксидант из класса пространственно-затрудненных фенолов) — действующее вещество зарегистрированного в Российской Федерации оригинального лекарственного препарата Дибуфелон, капсулы 200 мг (ООО «Пик-Фарма», Россия)<sup>4</sup>. Действие препарата связано с торможением процессов перекисного окисления и изменением состава липидов клеточных мембран головного мозга, он оказывает нейротекторное и нейротропное действия, регулирует активность аденилатциклазы и протеинкиназы С, нормализует процессы возбуждения в центральной нервной системе, предупреждает развитие судорожных припадков, тонического разгибания, устраняет эпилептиформную активность, улучшает интеллектуально-мнестические и когнитивные функции у пациентов с эпилепсией, способствует уменьшению неврологического дефицита и улучшению повседневной двигательной активности<sup>5</sup>. О его успешном применении в терапии эпилептических состояний свидетельствуют недавно опубликованные данные [1].

<sup>1</sup> Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. 3. Москва: Полиграф-Плюс, 2014. 344 с; Рекомендации для фармацевтических компаний по изучению биотрансформации и транспортеров новых лекарственных средств: дизайн исследований, анализ данных и внесение информации в инструкцию по применению / сост. Д.А. Сычев, В.Г. Кукуес. Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения и социального развития. Москва. 2009. 32 с.

<sup>2</sup> Guidance for Industry. Drug metabolism/drug interaction studies in the drug development process: studies *in vitro*. — Rockville. U.S. Department of Health and Human Services, FDA, Center for Drug Evaluation and Research, Center For Biologics Evaluation and Research, 1997. 13 p; Guideline on the Investigation of Drug Interactions. EMEA/CPMP/EWP/560/95/Rev. 1. Corr. 2. Committee for Human Medicinal Products (CHMP). 2012. 59 p; Решение Совета ЕЭК № 78 от 03.12.2016 «О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения».

<sup>3</sup> Руководство по экспертизе лекарственных средств... Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств...

<sup>4</sup> Инструкция по медицинскому применению лекарственного препарата Дибуфелон®. URL: [https://grls.rosminzdrav.ru/Grls\\_View\\_v2.aspx?routingGuid=2827f216-7ac0-4619-88d8-307518b692f7&t=](https://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=2827f216-7ac0-4619-88d8-307518b692f7&t=) (дата обращения: 22.03.2022).

<sup>5</sup> То же.

Вместе с тем сведения о доклинических и клинических исследованиях фенозановой кислоты в доступной научной литературе весьма ограничены. Поэтому актуальным является проведение дополнительных исследований этого вещества, позволяющих сделать его применение более обоснованным, безопасным и эффективным.

*Цель исследования* — изучение фармакокинетических параметров фенозановой кислоты, действующего вещества препарата Дибуфелон, капсулы 200 мг (ООО «Пик-Фарма», Россия) в системах *in vitro* и *in vivo* на половозрелых крысах при однократном введении в одной дозе.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили субстанция фенозановой кислоты и лекарственный препарат Дибуфелон, капсулы 200 мг (ООО «Пик-Фарма», Россия).

### Эксперименты *in vitro*

Оценка степени связывания фенозановой кислоты с белками плазмы крови выполнена методом диализа с использованием референтной нормальной пулированной плазмы человека (РНП-плазма, ООО «Фирма «Технология-Стандарт», Россия), диализных ячеек QuixSep Micro dialyzer (Orange Scientific, Бельгия) и полупроницаемой диализной мембраны с порами 7 кДа (Orange Scientific, Бельгия) на трех уровнях концентраций тестируемого соединения (10, 50 и 100 мкг/мл). Диализ проводили при температуре 37 °С, при постоянном перемешивании на магнитной мешалке в течение 24 ч, в качестве акцепторного раствора использовали фосфатный буферный раствор с pH 7,4 ± 0,1. Количество несвязанной фенозановой кислоты определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектированием (ВЭЖХ-УФ).

При изучении микросомальной стабильности тестируемый объект инкубировали с микросомами печени человека (Microsomes from liver, pooled, from human, M0317, Sigma, Германия) в присутствии кофактора никотинадениннуклеотидфосфата (НАДФ) в среде фосфатного буферного раствора с pH 7,4. Количество тестируемого объекта, оставшегося в супернатантах после преципитации белков, определено с помощью ВЭЖХ-УФ. Протестирован один уровень концентрации тестируемого объекта (50 мкг/мл), кофактора НАДФ и микросом печени человека. В серию экспериментов также были включены пробы без добавления исследуемого соединения (бланк-пробы) и пробы без внесения рабочего раствора НАДФ (минус кофактор) для исключения влияния этих факторов на получаемые результаты. Параллельно выполнен тест с контрольным веществом с известной активностью (положительный контроль), в качестве которого использован верапамила гидрохлорид. Количество стабильной фенозановой кислоты и верапамила гидрохлорида определяли методом ВЭЖХ-УФ.

Для оценки проницаемости и транспорта использован монослой клеток линии Caco-2, моделирующий эпителий стенки тонкого кишечника и взаимодействие ЛС с транспортерами. Тест основан на внесении тестируемого объекта в донорный компартмент специального планшета, содержащего монослой клеток в качестве «живой мембраны», с последующей оценкой содержания внесенного соединения в акцепторном компартменте (хроматографически). Были выполнены эксперименты для концентраций действующего вещества — 75, 50, 10 и 1 мкМ, параллельно выполнен тест с контрольными веществами (пропранолола гидрохлоридом и варфарином натрия).

### Эксперимент *in vivo*

Исследование фармакокинетики проводили на 50 самцах крыс линии Wistar (АО «НПО «Дом Фармации», Россия). Эксперименты выполнены согласно методическим руководствам<sup>6</sup> и нормативным документам: правилам лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ 33044-2014); Директиве 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского Союза от 22.09.2010 по охране животных, используемых в научных целях и др., регулирующим проведение доклинических исследований с использованием лабораторных животных, и одобрены на заседании биоэтической комиссии (№ 3.8/21 от 03.03.2021).

Препарат был введен крысам в виде суспензии содержимого капсул в инертном носителе (1 % растворе крахмала) внутривенно однократно в дозе 80 мкг/кг. Доза выбрана в качестве высшей терапевтической дозы (ВТД) для крыс на основании ее пересчета рекомендованной ВТД для человека (800 мг/кг<sup>7</sup>) с учетом межвидовых коэффициентов<sup>8</sup>.

Образцы крови крыс отбирали до введения и через 0,5, 0,75, 1, 2, 4, 6, 8, 10 и 24 ч после введения (по 5 животных на каждую временную точку), в качестве антикоагулянта использовали гепарин. Образцы крови крыс в объеме 2,0 мл отбирали из полостей сердца в процессе эвтаназии животных в CO<sub>2</sub>-камере одновременно с отбором проб тканей (печень, почки, скелетные мышцы тазовой конечности, сальник, головной мозг) и центрифугировали для получения плазмы (15 мин, 3000 об/мин). Полученную плазму, образцы органов и тканей замораживали и хранили при –20 °С. Перед началом количественного определения образцы размораживали.

Для оценки выведения осуществляли отбор двух видов экскретов (моча и кал), на семи временных

интервалах (–2–0, 0–2, 2–4, 4–6, 6–8, 8–10 и 10–24 ч), с помощью метаболических клеток. Полученные образцы кала помещали в грипперы, взвешивали и замораживали. У образцов мочи замеряли объем, после чего замораживали. Перед анализом пробы размораживали.

### Анализ проб

Для определения концентрации фенозановой кислоты были разработаны и валидированы методики анализа действующего вещества препарата в буферной среде, необходимой для выполнения тестов *in vitro*, а также в плазме крови методом ВЭЖХ-УФ. Методика была адаптирована и ревалидирована для анализа тканей и органов крыс (на примере печени). Валидация методик анализа в буферной среде и в биоматериале выполнена согласно рекомендациям<sup>9</sup>.

Подготовка проб биологических жидкостей (плазмы крови, мочи) перед анализом включала депротеинизацию ацетонитрилом в объемном соотношении 1 : 3 с последующей заменой растворителя. Пробы органов и тканей, твердых экскретов (кала) гомогенизировали с помощью измельчителя тканей в присутствии воды очищенной в массо-объемном соотношении 1 : 1, аликвоту полученного гомогената обрабатывали ацетонитрилом в объемном соотношении 1 : 3 для депротеинизации и подвергали процедуре замены растворителя.

Хроматографический анализ выполнен на приборе высокого давления LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония) с диодно-матричным детектором, колонкой Luna C<sub>18</sub>(2) 4,6 × 150 мм (размер частиц сорбента 5 мкм) (Phenomenex, США) и предколонкой 3 мм, заполненной тем же сорбентом (Phenomenex, США) в изократическом режиме элюирования смесью 0,03 % раствора трифторуксусной кислоты и ацетонитрила в соотношении 60 : 40, скорость подачи элюента 1 мл/мин, дозируемый объем проб 20 мкл, длина волны детектирования 210 нм. Регистрация и обработка хроматограмм выполнена с помощью программного обеспечения LabSolutions LCSolution Version 1.25 (Shimadzu, Япония).

<sup>9</sup> ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» // Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Москва: МЗ РФ. 2018. Т. 1–4. 7019 с.; Руководство по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств. Утв. Решением коллегии стран ЕЭК от 17.07.2018 № 113. 2018. 26 с.; Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств. Москва: Министерство здравоохранения и социального развития РФ. 2007. 49 с.; ICH, Q2A, Harmonized tripartite guideline, text on validation of analytical procedures. IFPMA – Geneva, March 1994. P. 1–5; ICH, Q2B, Harmonized tripartite guideline, validation of analytical procedure: methodology, IFPMA. In: Proceedings of the International Conference on Harmonization. Geneva, 1996. P. 1–8; Guidance for Industry: Bioanalytical method for validation. Rockville, MD, U.S. Department of Health and Human Services, FDA, Center for Drug Evaluation and Research, Center for veterinary medicine. 2018. 41 p.; Guideline on bioanalytical method validation. EMEA/CHMP/EWP192217/2009, London, Committee for medicinal products for human use (CHMP). 2011. 22 p.

<sup>6</sup> Руководство по экспертизе лекарственных средств...; Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств...

<sup>7</sup> Инструкция по медицинскому применению лекарственного препарата Дибуфелон...

<sup>8</sup> Guidance for industry. Estimating the maximum safe starting dose for initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers. US Department of health and human services. FDA. CDER. 2005. 27 p.

### Обработка результатов

По результатам оценки степени связывания с белками плазмы крови рассчитаны количества связанной и свободной фракций анализируемого соединения. По результатам теста микросомальной стабильности рассчитаны период полураспада ( $T_{1/2}$ ), клиренс (Clint), оставшееся количество аналита (% от начального). По результатам оценки клеточной проницаемости рассчитаны коэффициент проницаемости  $P_{app}$  (apparent permeability) в апикально-базолатеральном (А-В) и базолатерально-апикальном (В-А) направлениях.

Параметры фармакокинетики рассчитаны внемоделным методом статистических моментов [4] с использованием приложения PKSolver для Microsoft Office Excel.

Для всех данных применена описательная статистика: рассчитаны средние арифметические значения ( $\bar{X}$ ), соответствующие им стандартные отклонения (SD), стандартные ошибки среднего значения ( $S\bar{x}$ ). Для выявления статистически значимых различий между параметрами был использован однофакторный дисперсионный анализ ANOVA для более чем двух выборок, или  $t$ -тест для средних значений (для двух выборок), сравнение проводили при 95 % доверительном интервале параметрическими или непараметрическими методами в зависимости от нормальности распределения данных. Статистический анализ выполнен с помощью лицензированного программного обеспечения (GraphPad Prism 9, GraphPad Software, США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Разработка и валидация методик анализа

Фенозановая кислота — фенозан-кислота, *b*-(4-гидрокси-3,5-дитретбутилфенил) пропионовая кислота

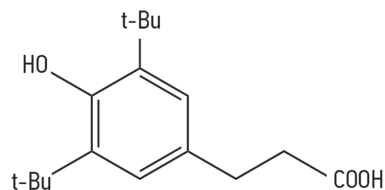


Рис. 1. Структурная формула фенозановой кислоты

(рис. 1) — это синтетический антиоксидант из класса пространственно-затрудненных фенолов.

Согласно литературным данным, метод ВЭЖХ с использованием обращенно-фазовых сорбентов, УФ-детектирования и подвижных фаз, состоящих из ацетонитрила и различных буферных растворов, применим для количественного определения фенозановой кислоты в различных объектах, в том числе в биологических пробах [5, 6]. По результатам предварительных экспериментов были подобраны оптимальные условия хроматографического анализа и процедура подготовки проб биоматериала, которые согласуются с охарактеризованными ранее наиболее часто встречающимися вариантами — элюент на основе 0,03 % раствора трифторуксусной кислоты и ацетонитрила, изократический режим анализа и осадительная пробоподготовка с использованием ацетонитрила с последующей заменой растворителя [7].

Валидация методик анализа фенозановой кислоты выполнена согласно общепринятым рекомендациям: в буферной среде с использованием в качестве растворителя буферного раствора с pH  $7,4 \pm 0,1$ , в биоматериале с использованием модельных смесей плазмы крови крыс и гомогенатов печени крыс с добавками анализируемого соединения. Основные результаты валидационных испытаний представлены в табл. 1 и 2.

Таблица 1. Основные валидационные параметры методики определения фенозановой кислоты в буферных средах

Параметр	Предъявляемые требования <sup>10</sup>	Результат
Специфичность	Способность однозначно оценивать анализируемое вещество в присутствии других компонентов, которые могут находиться в образце	Подтверждена
Аналитическая область и линейность	Способность показать, что аналитические сигналы пропорциональны концентрации анализируемого вещества в образце в пределах аналитической области методики	Подтверждена. Аналитическая область (0,05–100 мкг/мл). Получено уравнение линейности: $Y = 53946X + 5989,9$ ( $r = 0,99$ ), где $Y$ — площадь пика аналита, усл. ед., $X$ — концентрация аналита, мкг/мл
Правильность	Систематическая погрешность ( $ \delta , \%$ ) $\leq 15 \%$	Соответствует. 4,62–12,02 %
Прецизионность	Повторяемость (сходимость) ( $\max \Delta_{AS}$ ) $\leq 15 \%$ . Внутрилабораторная (промежуточная) прецизионность ( $\max \Delta_{AS}$ ) $\leq 15 \%$	Соответствует. 0,08–10,49 %. Соответствует. 5,86–14,45 %
Стабильность раствора аналита, %	85–115	Соответствует. 99,9 % для концентрации 1000 мкг/мл

<sup>10</sup> ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик»...; Руководство по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств...; Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств...; Guidance for Industry: Bioanalytical method for validation...; Guideline on bioanalytical method validation. EMEA/CHMP/EWP/192217/2009...

**Таблица 2.** Основные валидационные параметры методик определения фенозановой кислоты в плазме крови и гомогенате печени крыс

Параметр, уровень концентраций	Критерий приемлемости <sup>11</sup>	Результат	
		плазма крови	гомогенат печени
Калибровочный диапазон	Коэффициент корреляции линейной регрессии ( $r > 0,9$ )	0,05–50 мкг/мл, $r = 0,9899–0,9993$	0,15–50 мкг/г, $r = 0,9918–0,9986$
Точность в одном цикле / между циклами, %			
ВПКО	<15	4,95–12,76//8,40	3,91–14,59//9,54
средний КК	<15	2,45–13,16//6,85	6,16–13,37//9,23
низкий КК	<15	6,70–14,85//9,81	3,29–12,35//8,89
НПКО	<20	7,56–16,21//10,89	5,42–15,68//10,71
Прецизионность в одном цикле / между циклами, %			
ВПКО	<15	6,75–13,36//12,65	1,46–8,66//8,07
средний КК	<15	2,59–8,23//9,24	8,70–14,77//11,45
низкий КК	<15	6,82–9,06//9,80	3,69–9,25//8,56
НПКО	<20	7,84–13,00//12,66	6,77–11,75//10,71

*Примечание.* ВПКО — верхний предел количественного определения, средний КК и низкий КК — контроль качества, НПКО — нижний предел количественного определения; для плазмы крови крыс — 50, 25, 0,15 и 0,05 мкг/мл соответственно, для печени крыс — 50, 25, 0,5 и 0,15 мкг/г соответственно.

Методика анализа фенозановой кислоты в буферных средах валидирована по параметрам: специфичность, аналитическая область и линейность, правильность, прецизионность на уровне повторяемости (сходимости) и промежуточной (внутрилабораторной) прецизионности. Методика количественного определения фенозановой кислоты в плазме крови крыс методом ВЭЖХ-УФ валидирована в диапазоне концентраций от 0,05 до 50,6 мкг/мл по показателям: селективность, нижний предел количественного определения (НПКО), калибровочный диапазон, точность и прецизионность, стабильность анализа, разбавление проб. Методика адаптирована для анализа фенозановой кислоты в органах и тканях (на примере печени) в диапазоне концентраций 0,15–50 мкг/г и валидирована по тем же показателям. По всем валидационным параметрам были получены удовлетворительные результаты, что свидетельствовало о возможности дальнейшего использования разработанных методик для изучения фармакокинетики исследуемого препарата.

### Исследования *in vitro*

В рамках проведения исследований были выполнены три наиболее важных теста по изучению ADME действующего вещества препарата *in vitro*: определение степени связывания с белками плазмы крови; оценка стабильности в микросомальной фракции печени и проницаемости и транспорта через монослой клеток.

Уровень связывания препарата с белками плазмы имеет важное фармакокинетическое и фармакодинамическое значение, поскольку несвязанная часть препарата, которая свободно диффундирует через биологические

мембраны, достигает места расположения рецептора, после чего вызывает фармакологический эффект и наиболее быстро элиминируется. Метод равновесного диализа, широко используемый для изучения степени связывания веществ с белками плазмы крови, основан на диффузии свободной фракции низкомолекулярного соединения через полупроницаемую мембрану, задерживающую молекулы белка и связанного с ним лиганда [8, 9]. Среднее значение содержания свободной фракции фенозановой кислоты варьировало в диапазоне от 35 до 78 % (табл. 3); различия статистически достоверны ( $p < 0,05$ , однофакторный дисперсионный анализ с последующим межгрупповым сравнением с применением критерия Тьюки). Установлено, что уровень концентраций фенозановой кислоты, по крайней мере в изученном диапазоне (10–100 мкг/мл), может оказывать влияние на степень ее связывания с белками плазмы крови человека. Снижение степени связывания с увеличением концентрации фенозановой кислоты может быть обусловлено насыщением центров (сайтов) связывания. Сравнительно высокое содержание несвязанной с белками фракции может обеспечивать интенсивное проникновение в ткани и органы.

Оценка стабильности в микросомальной фракции печени является первостепенным тестом панели ADME, поскольку микросомы печени — субклеточная фракция, содержащая основные метаболические ферменты, такие как цитохромы P450, монооксигеназы, трансферазы. Использование пулированного коммерчески доступного биоматериала человека предпочтительнее, чем использование аналогичных тест-систем животного

<sup>11</sup> ICH, Q2A, Harmonized tripartite guideline, text on validation of analytical procedures, IFPMA...; ICH, Q2B, Harmonized tripartite guideline, validation of analytical procedure: methodology, IFPMA...; Guidance for Industry: Bioanalytical method for validation...; Guideline on bioanalytical method validation. EMEA/CHMP/EWP/192217/2009...

**Таблица 3.** Результаты оценки степени связывания фенозановой кислоты с белками плазмы крови человека

Концентрация действующего вещества в плазме крови	Количество свободной фракции фенозановой кислоты в акцепторной среде, % ( $n = 4$ , $\bar{X} \pm SD$ )	Степень связывания, %
100, мкг/мл	77,83 ± 1,99	≈22
50, мкг/мл	58,12 ± 8,08	≈42
10, мкг/мл	34,73 ± 3,88	≈65

**Таблица 4.** Результаты оценки клеточной проницаемости в Caco-2 модели фенозановой кислоты

Концентрация	Коэффициент проницаемости, $P_{app} \cdot 10^{-5}$ , см/с ( $n = 6$ , $\bar{X} \pm SD$ )
В апикально-базолатеральном направлении	
75 мкМ (30 мкг/мл)	0,83 ± 0,12
50 мкМ (20 мкг/мл)	0,87 ± 0,04
10 мкМ (4 мкг/мл)	0,67 ± 0,10
В базолатерально-апикальном направлении	
75 мкМ (30 мкг/мл)	1,63 ± 0,09
50 мкМ (20 мкг/мл)	1,38 ± 0,15
10 мкМ (4 мкг/мл)	0,82 ± 0,12

Примечание.  $P_{app}$  — коэффициент проницаемости.

происхождения<sup>12</sup>, поэтому микросомы печени человека выбраны в качестве тест-системы для оценки микросомальной стабильности. В качестве контрольного вещества часто используют верапамила гидрохлорид<sup>13</sup> [10–12]. Результаты теста с контрольным веществом верапамила гидрохлоридом позволили подтвердить адекватность постановки теста оценки микросомальной стабильности и его пригодность для дальнейшей оценки действующего вещества препарата Дибуфелон.

Результаты оценки микросомальной стабильности действующего вещества препарата Дибуфелон представлены на рис. 2. Анализ бланк-проб (без внесения фенозановой кислоты) не выявил наличия анализа в реакционных смесях. При изучении микросомальной стабильности фенозановой кислоты в пробах без внесения кофактора НАДФ обнаружено 75,6 ± 16,6 % начального его содержания; в экспериментальных пробах (с внесением кофактора, который может интенсифицировать процесс разрушения анализируемого соединения рядом ферментов микросом печени, отвечающих за I фазу метаболизма) уровень анализа снижался до 87,9 ± 7,8 % исходного; различия статистически незначимы ( $p > 0,05$ ,  $t$ -тест для средних значений). Полученные данные свидетельствовали о сравнительно высокой микросомальной стабильности фенозановой кислоты и отсутствии влияния кофактора НАДФ на его стабильность *in vitro*.

На основании полученных результатов рассчитаны фармакокинетические параметры фенозановой кислоты

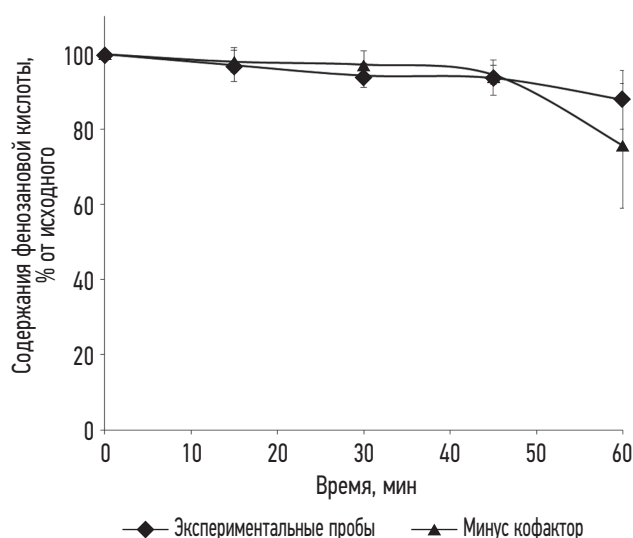
<sup>12</sup> Решение Совета ЕЭК №78 от 03.12.16 «О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения».

<sup>13</sup> Microsomal stability assay [электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.cypotex.com/admepk/in-vitro-metabolism/microsomal-stability/>. Дата обращения: 03.2022.

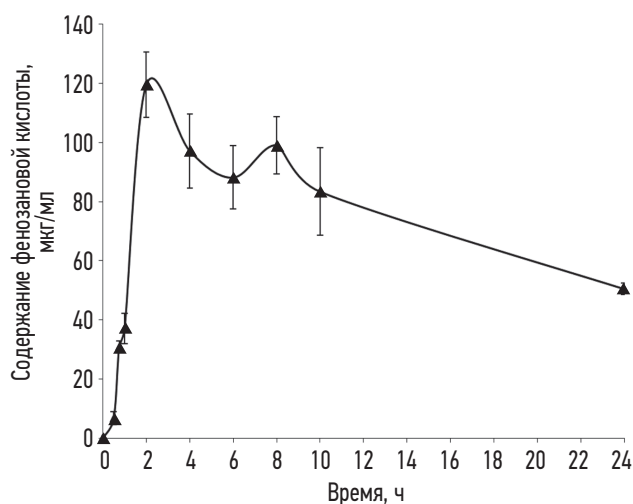
*in vitro*: период полураспада составил 1106 ± 789 мин, внутренний клиренс — 2,05 ± 0,86 мкл/(мин · мг) протеина микросом печени; остаточное содержание анализа после 60 мин инкубации — 87,9 ± 7,8 %. Таким образом, установлена сравнительно высокая микросомальная стабильность фенозановой кислоты.

Для оценки проницаемости и транспорта используют монослой клеток линии Caco-2, моделирующий эпителий стенки тонкого кишечника [13–15]. По итогам предварительных экспериментов по оценке цитотоксичности был определен рабочий диапазон концентраций тестируемого объекта, приемлемый для выполнения основного теста по оценке проницаемости фенозановой кислоты, при котором фенозановая кислота не оказывала повреждающего действия на клетки в концентрациях 0,04–30 мкг/мл. При выполнении теста с концентрацией тестируемого соединения 0,04 мкг/мл анализ в пробах не обнаружили, поэтому основная часть экспериментов была выполнена для концентраций фенозановой кислоты 4–30 мкг/мл (табл. 4).

В результате серии экспериментов установлена способность фенозановой кислоты проникать через монослой клеток Caco-2 — средние значения коэффициента проницаемости фенозановой кислоты в апикально-базолатеральном направлении в концентрациях 4–30 мкг/мл составили (0,67–0,87) · 10<sup>-5</sup> см/с, в базолатерально-апикальном направлении — (0,82–1,63) · 10<sup>-5</sup> см/с. Эти результаты близки к данным, полученным нами для варфарина (около 0,85 · 10<sup>-5</sup> см/с в апикально-базолатеральном направлении и около 1,41 · 10<sup>-5</sup> см/с для концентраций 10–100 мкМ), который в литературе относят к соединениям с высокой проницаемостью [16]. По мнению некоторых авторов, для соединений с высокой проницаемостью



**Рис. 2.** Динамика изменения содержания фенозановой кислоты в ходе теста микросомальной стабильности ( $n = 4$ ,  $\bar{X} \pm S\bar{X}$ , где  $\bar{X}$  — среднее арифметическое значение,  $S\bar{X}$  — стандартное отклонение среднего значения)



**Рис. 3.** Кривая «концентрация – время» фенозановой кислоты в плазме крови крыс после однократного внутрижелудочного введения препарата Дибуфелон в дозе 80 мг/кг в линейных координатах ( $n = 5$ ,  $\bar{X} \pm S\bar{X}$ , где  $\bar{X}$  — среднее арифметическое значение,  $S\bar{X}$  — стандартное отклонение среднего значения)

**Таблица 5.** Показатели фармакокинетики фенозановой кислоты ( $\bar{X} \pm SD$ )

$C_{\max}$ , МКГ/МЛ	$T_{\max}$ , ч	AUC <sub>0-24</sub> , ч · МКГ/МЛ	MRT, ч	$T_{1/2}$ , ч	Примечания
135,7 ± 10,3	3,6 ± 2,6	1800,9 ± 312,2	28,6 ± 8,9	18,8 ± 6,5	Собственные экспериментальные данные, однократное внутрижелудочное введение крысам препарата Дибуфелон в дозе 80 мг/кг, $n = 5$
1,65 ± 0,14	2,33 ± 0,34	25,4 ± 3,7	13,6 ± 2,4	8,87 ± 1,73	По данным [5], введение кроликам таблеток по 0,1 г (производитель не указан) в дозе 100 мг/кг, $n = 5$
0,178 ± 0,029	3,9 ± 0,5	1,235 ± 0,239	8,6 ± 0,8	5,3 ± 0,8	По данным [6], однократное введение добровольцам 800 мг в виде капсул (фенозан-кислота), $n = 12$

*Примечание.*  $C_{\max}$  — максимальная концентрация,  $T_{\max}$  — время достижения максимальной концентрации, AUC — площадь под кривой «концентрация – время», MRT — среднее время удерживания,  $T_{1/2}$  — период полувыведения.

характерны значения  $P_{\text{app}}$  (в апикально-базолатеральном направлении) выше  $1 \cdot 10^{-5}$  см/с, а для соединений с низкой проницаемостью — менее  $1 \cdot 10^{-6}$  см/с [17]. Соответственно этой градации фенозановая кислота предположительно может быть отнесена к соединениям со средней проницаемостью. Соотношение коэффициентов проницаемости в апикально-базолатеральном и базолатерально-апикальном направлениях позволяет предположить, что исследуемое соединение не служит субстратом для транспортного белка Р-гликопротеина (Р-gp).

### Исследования *in vivo*

Полученная фармакокинетическая кривая в линейных координатах приведена на рис. 3. Фенозановая кислота была обнаружена в пробах уже на первой временной точке (30 мин) после введения тестируемого препарата. Далее ее концентрация повышалась, достигая максимума в интервале 2–8 ч. К 24 ч после введения концентрация фенозановой кислоты составила около 42 %

от максимального уровня, что свидетельствовало о медленном выведении действующего вещества тестируемого препарата из системного кровотока крыс.

Фармакокинетические профили фармакологического средства в крови при его внутрижелудочном введении охарактеризованы такими параметрами, как максимальная концентрация ( $C_{\max}$ ), площадь под кривой «концентрация – время» (AUC), среднее время удерживания (MRT), период полувыведения ( $T_{1/2}$ ), время достижения максимальной концентрации ( $T_{\max}$ )<sup>14</sup> (табл. 5). Параметры фармакокинетики рассчитаны внемоделльным методом — методом статистических моментов [4, 18].

После внутрижелудочного введения тестируемого препарата крысам фенозановая кислота достаточно быстро всасывается из желудочно-кишечного тракта и определяется в плазме крови на протяжении 24 ч.

<sup>14</sup> Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств...



**Таблица 6.** Основные показатели проникновения фенозановой кислоты в органы и ткани крыс после однократного внутривенного введения исследуемого препарата в дозе 80 мг/кг ( $\bar{X} \pm SD$ ,  $n = 5$ )

Орган	AUC <sub>0-24</sub> , мкг · ч/г	MRT <sub>T</sub> , ч	T <sub>1/2T</sub> , ч
Печень	1084,7 ± 185,3	25,8 ± 12,4	18,2 ± 9,2
Почки	1370,1 ± 177,8	45,5 ± 36,5	30,6 ± 25,6
Головной мозг	548,9 ± 65,5	24,5 ± 14,8	16,0 ± 10,1
Мышцы	217,8 ± 35,9	51,6 ± 43,3	34,7 ± 29,7
Сальник	376,2 ± 108,8	30,2 ± 18,4	20,1 ± 12,5

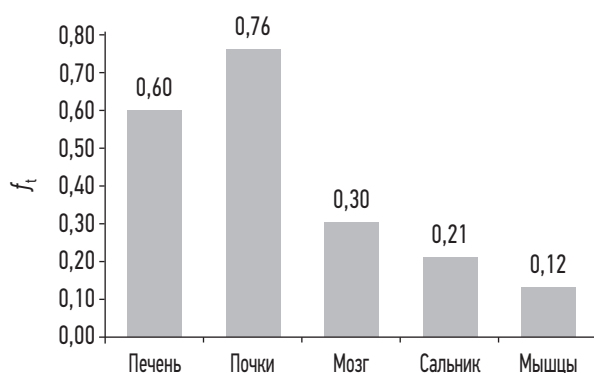
Примечание. AUC — площадь под кривой «концентрация – время», MRT — среднее время удерживания, T<sub>1/2</sub> — период полувыведения.

Период полувыведения составил около 19 ч, MRT — около 29 ч, что указывает на длительное нахождение исследуемого вещества в системном кровотоке животных. Среднее значение C<sub>max</sub> в плазме крови составило около 136 мкг/мл, среднее значение T<sub>max</sub> 3,6 ч. Длительное нахождение неизменного действующего вещества в системном кровотоке может быть обусловлено особенностями его связывания с белками плазмы крови и сравнительно высокой метаболической стабильностью, выявленными при проведении соответствующих тестов *in vitro*.

Дополнительно в табл. 5 приведены имеющиеся в литературе сведения о фармакокинетических параметрах фенозановой кислоты. Можно отметить кардинально отличающиеся уровни «концентрационных» параметров C<sub>max</sub> и AUC<sub>0-24</sub>, что может быть обусловлено особенностями изученных объектов (например, свойствами фармацевтической субстанции, лекарственных форм), использованных тест-систем (например, особенностями пищеварения кроликов), различиями изученных доз и др. Однозначно объяснить их на основании имеющейся информации затруднительно. Более схожие значения для «временных» параметров T<sub>max</sub>, MRT и T<sub>1/2</sub> свидетельствуют о сравнительно долгом присутствии исследуемого вещества в системном кровотоке у разных биологических видов, подтверждаемом в независимых исследованиях, и, возможно, обусловлены высокой степенью связывания фенозановой кислоты с белками плазмы крови.

Важный этап при проведении фармакокинетических исследований — изучение тканевой доступности ЛС. Основным результатом процессов распределения является транспорт ЛС в зону действия, где оно взаимодействует со структурами, определяющими эффект препарата.

Интенсивность проникновения фармакологического средства в периферические ткани должна быть охарактеризована тканевой доступностью (f<sub>t</sub>), определяемой как отношение значения AUC в ткани (AUC<sub>t</sub>) к соответствующей величине AUC в плазме, а также значением периода полувыведения и среднего времени удерживания (T<sub>1/2T</sub> и MRT<sub>T</sub>)<sup>15</sup>. Основные параметры, характеризующие степень проникновения фенозановой кислоты в основные



**Рис. 4.** Тканевая доступность (f<sub>t</sub>) фенозановой кислоты после однократного внутривенного введения исследуемого препарата в дозе 80 мг/кг

органы и ткани, приведены в табл. 6, суммарный график тканевой доступности представлен на рис. 4.

После введения исследуемого препарата действующее вещество распределялось в сильно васкуляризованные органы, отвечающие за выведение — печень и почки — проникало через гематоэнцефалический барьер и поступало в головной мозг (возможная мишень, учитывая фармакотерапевтическую группу препарата), а также поступало в умеренно васкуляризованный (мышцы) и слабо васкуляризованный (сальник) орган. Наиболее интенсивное распределение отмечено в ткани печени и почек, наименьшее — в ткани сальников и мышц. Существенное поступление исследуемого вещества в ткани сальников, превышающее его поступление в сравнительно более васкуляризованный орган (мышцы), предположительно может быть связано с липофильными свойствами фенозановой кислоты, обеспечивающими также ее значимое поступление в ткани мозга.

Фенозановая кислота в неизменном виде в незначительных количествах была обнаружена во всех исследованных образцах мочи и в большинстве исследованных образцов кала. Суммарно из организма крыс за 24 ч эксперимента с мочой было выведено менее 0,04 % введенного количества фенозановой кислоты, с калом — около 5,5 %. Низкое выведение действующего вещества с мочой и калом в неизменном виде в течение 24 ч после введения исследуемого препарата может быть связано с его интенсивным распределением в различные органы и ткани и присутствием в большинстве из них в значительном количестве в течение всего срока эксперимента.

<sup>15</sup> Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств...

Полученные результаты согласуются с опубликованными ранее данными — на основании высоких значений объемов распределения предполагалось интенсивное внутриклеточное распределение и поступление препарата в органы и ткани [5, 6]. Исследование было направлено на анализ неизменного соединения и позволило обнаружить его во всех видах отобранного биоматериала на большинстве временных точек. В целом, сопоставление собственных и литературных данных подтверждает существенную вариабельность фармакокинетических параметров в зависимости от различных факторов.

## ВЫВОДЫ

Разработаны и валидированы методики анализа фенозановой кислоты в буферных средах (в диапазоне концентраций 0,05–100 мкг/мл), плазме крови крыс (в диапазоне концентраций от 0,05 до 50,6 мкг/мл), органах и тканях (на примере печени, в диапазоне концентраций 0,15–50 мкг/г).

В результате проведенного исследования установлено, что фенозановая кислота характеризуется быстрым поступлением в системный кровоток и длительным нахождением в нем в неизменном виде, последнее может быть обусловлено особенностями ее связывания с белками плазмы крови и сравнительно высокой метаболической стабильностью, выявленными при проведении соответствующих тестов *in vitro*. Изучение проницаемости и транспорта фенозановой кислоты показало, что она предположительно может быть отнесена к соединениям со средней проницаемостью и не является субстратом для транспортного белка Р-гликопротеина (Р-gp). Исследование тканевой доступности фенозановой кислоты

подтвердило ее поступление в периферические ткани, в том числе в головной мозг как зону реализации противосудорожного эффекта.

## ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

**Вклад авторов.** Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией. Вклад каждого автора: В.М. Косман, М.В. Карлина, К.В. Тютинина, С.В. Морозов, Е.Е. Гушина, Н.В. Журавская — написание статьи, анализ данных; В.Г. Макаров, М.Н. Макарова — рецензирование статьи, разработка общей концепции.

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Источник финансирования.** Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

## ADDITIONAL INFORMATION

**Authors contribution.** Thereby, all authors made a substantial contribution to the conception of the study, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the article, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the study. The contribution of each author: V.M. Kosman, M.V. Karlina, K.V. Tyutina, S.V. Morozov, E.E. Gushchina, N.V. Zhuravskaya — writing and pilot data analyses; V.G. Makarov, M.N. Makarova — paper reconceptualization and general concept discussion.

**Competing interests.** The authors declare that they have no competing interests.

**Funding source.** This study was not supported by any external sources of funding.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бурд С.Г., Лебедева А.В., Пантина Н.В., и др. Клинические результаты и перспективы применения фенозановой кислоты у взрослых пациентов с фокальной эпилепсией // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2021. Т. 121, № 10. С. 52–59. DOI: 10.17116/jnevro202112110152
2. Altman D.G., Bland J.M. How to randomize // BMJ. 1999. Vol. 319, No. 7211. P. 703–704. DOI: 10.1136/bmj.319.7211.703
3. Bland J.M. An Introduction to Medical Statistics. 3<sup>rd</sup> edition. New York: Oxford University Press, 2000. 422 p.
4. Zhang Y., Huo M., Zhou J., Xie S. PKSolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel // Comput Methods Programs Biomed. 2010. Vol. 99, No. 3. P. 306–314. DOI: 10.1016/j.cmpb.2010.01.007
5. Прокопов А.А., Шукиль Л.В., Берлянд А.С. Изучение биодоступности фенозановой кислоты в различных лекарственных формах // Химико-фармацевтический журнал. 2006. Т. 40, № 1. С. 3–5. DOI: 10.30906/0023-1134-2006-40-1-3-5
6. Кондратенко С.Н., Стародубцев А.К., Белякова Г.А. ВЭЖХ-определение и фармакокинетика нового оригинального препарата Дибуфелон® // Химико-фармацевтический журнал. 2009. Т. 43, № 11. С. 54–56. DOI: 10.30906/0023-1134-2009-43-11-54-56
7. Косман В.М., Карлина М.В., Макарова М.Н. Опыт разработки биоаналитических методик методом ВЭЖХ с УФ-детектированием // Фармация. 2020. Т. 69, № 3. С. 23–35. DOI: 10.29296/25419218-2020-03-04
8. Луик А.И., Лукьянчук В.Д. Сывороточный альбумин и биотранспорт ядов. Москва: Медицина, 1984. 224 с.
9. Абаимов Д.А., Сариев Е.К., Носкова Т.Ю., и др. Современные технологии в терапевтическом лекарственном мониторинге // Эпилепсия и пароксизмальные состояния. 2013. Т. 5, № 2. С. 31–41.
10. Mondal S.K., Mazumber U.K., Mondal N.B., Banerjee S. Optimisation of rat liver microsomal stability assay using HPLC // J Biological Sci. 2008. Vol. 8. P. 1110–1114. DOI: 10.3923/jbs.2008.1110.1114

11. Obach R.S. Prediction of human clearance of twenty-nine drugs from hepatic microsomal intrinsic clearance data: an examination of *in vitro* half-life approach and nonspecific binding to microsomes // *Drug Metab Dispos.* 1999. Vol. 27, No. 11. P. 1350–1359.

12. Riley R.J., McGinnity D.F., Austin R.P. A Unified model for predicting human hepatic, metabolic clearance from *in vitro* intrinsic clearance data in hepatocytes and microsomes // *Drug Metab Dispos.* 2005. Vol. 33, N. 9. P. 1304–1311. DOI: 10.1124/dmd.105.004259

13. Bohets H., Annaert P., Mannens G., et al. Strategies for absorption screening in drug discovery and development // *Curr Top Med Chem.* 2001. Vol. 1. P. 367–383. DOI: 10.2174/1568026013394886

14. Huebert N.D., Dasgupta M., Chen Y. Using *in vitro* human tissues to predict pharmacokinetic properties // *Curr Opin Drug Discov Devel.* 2004. Vol. 7. P. 69–74.

15. Lennernas H., Palm K., Fagerholm U., Artursson P. Comparison between active and passive drug transport in human intestinal epithelial (Caco-2) cells *in vitro* and human jejunum *in vivo* // *International Journal of Pharmaceutics.* 1996. Vol. 127. P. 103–107. DOI: 10.1016/0378-5173(95)04204-0

16. Arena A., Phillips J., Blanchard M. MultiScreen Caco-2 Assay System. Drug transport assays in a 96-well system: reproducibility and correlation to human absorption. 2003. Режим доступа: <https://www.sigmaldrich.cn/CN/zh/technical-documents/technical-article/research-and-disease-areas/pharmacology-and-drug-discovery-research/multiscreen-caco-2-assay-system> Дата обращения: 29.03.2022.

17. Marugan J.J., Xiao J., Zheng W., et al. ML223: A small molecule probe with *in vivo* activity against acute myeloid leukemia subtype M4Eo. In: Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program [Internet]. 2010. Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK133444/table/ml223.t4/>. Дата обращения: 29.03.2022

18. Жердев В.П., Колыванов Г.Б., Литвин А.А. и др. Гармонизация проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов: вопросы и их возможное решение // *Экспериментальная и клиническая фармакология.* 2003. Т. 66, № 2. С. 60–64. DOI: 10.30906/0869-2092-2003-66-2-60-64

## REFERENCES

1. Burd SG, Lebedeva AV, Pantina NV, et al. Clinical results and prospects for the use of phenosanic acid in patients with focal epilepsy. *Zhurnal Nevrologii i Psikiatrii imeni SS. Korsakova.* 2021;121(10):52–59. (In Russ.) DOI: 10.17116/jnevro202112110152

2. Altman DG, Bland JM. How to randomize. *BMJ.* 1999;319(7211):703–704. DOI: 10.1136/bmj.319.7211.703

3. Bland JM. An Introduction to Medical Statistics. 3<sup>rd</sup> edition. New York: Oxford University Press; 2000. 422 p.

4. Zhang Y, Huo M, Zhou J, Xie S. PKSolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel. *Comput Methods Programs Biomed.* 2010;99(3):306–314. DOI: 10.1016/j.cmpb.2010.01.007

5. Prokopov AA, SHukil' LV, Berlyand AS. Studying the bioavailability of fenozan acid in various medicinal forms. *Khimiko farmatsevticheskii zhurnal.* 2006;40(1):3–5. (In Russ.) DOI: 10.30906/0023-1134-2006-40-1-3-5

6. Kondratenko SN, Starodubcev AK, Belyakova GA. VEZHKh-opredelenie i farmakokinetika novogo original'nogo preparata Dibufelon®. *Khimiko farmatsevticheskii zhurnal.* 2009;43(11):54–56. (In Russ.) DOI: 10.30906/0023-1134-2009-43-11-54-56

7. Kosman VM, Karlina MV, Makarova MN. Experience in development of bioanalytical methods by HPLC with UV detection. *Pharmacy.* 2020;69(3):23–35. (In Russ.) DOI: 10.29296/25419218-2020-03-04

8. Luik AI, Luk'yanchuk VD. Syvorotochnyi al'bumin i biotransport yadov. Moscow: Meditsina; 1984. 224 p.

9. Abaimov DA, Sariev AK, Noskova TYu, et al. Modern technologies in therapeutic drug monitoring (review). *Epilepsy and paroxysmal conditions.* 2013;5(2):31–41. (In Russ.)

10. Mondal SK, Mazumber UK, Mondal NB, Banerjee S. Optimisation of rat liver microsomal stability assay using HPLC. *J Biological Sci.* 2008;8:1110–1114. DOI: 10.3923/jbs.2008.1110.1114

11. Obach RS. Prediction of human clearance of twenty-nine drugs from hepatic microsomal intrinsic clearance data: an examination of

*in vitro* half-life approach and nonspecific binding to microsomes. *Drug Metab Dispos.* 1999;27(11):1350–1359.

12. Riley RJ, McGinnity DF, Austin RP. A Unified model for predicting human hepatic, metabolic clearance from *in vitro* intrinsic clearance data in hepatocytes and microsomes. *Drug Metab Dispos.* 2005;33(9):1304–1311. DOI: 10.1124/dmd.105.004259

13. Bohets H, Annaert P, Mannens G, et al. Strategies for absorption screening in drug discovery and development. *Curr Top Med Chem.* 2001;1:367–383. DOI: 10.2174/1568026013394886

14. Huebert ND, Dasgupta M, Chen Y. Using *in vitro* human tissues to predict pharmacokinetic properties. *Curr Opin Drug Discov Devel.* 2004;7:69–74.

15. Lennernas H, Palm K, Fagerholm U, Artursson. Comparison between active and passive drug transport in human intestinal epithelial (Caco-2) cells *in vitro* and human jejunum *in vivo*. *International Journal of Pharmaceutics.* 1996;127:103–107. DOI: 10.1016/0378-5173(95)04204-0

16. Arena A, Phillips J, Blanchard M. MultiScreen Caco-2 Assay System. Drug transport assays in a 96-well system: reproducibility and correlation to human absorption. 2003. Available from: <https://www.sigmaldrich.cn/CN/zh/technical-documents/technical-article/research-and-disease-areas/pharmacology-and-drug-discovery-research/multiscreen-caco-2-assay-system>

17. Marugan J.J., Xiao J., Zheng W., et al. ML223: A small molecule probe with *in vivo* activity against acute myeloid leukemia subtype M4Eo. In: Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program [Internet]. 2010. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK133444/table/ml223.t4/>. Cited: 29 March 2022

18. Zherdev VP, Kolyvanov GB, Litvin AA, et al. Garmonizatsiya provedeniya issledovaniy bioekivalentnosti lekarstvennykh preparatov: voprosy i ih vozmozhnoe reshenie. *Ekspperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya.* 2003;66(2):60–64. (In Russ.) DOI: 10.30906/0869-2092-2003-66-2-60-64

## ОБ АВТОРАХ

**Вера Михайловна Косман**, канд. фарм. наук, руководитель химико-аналитической лабораторией; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9690-1935>; e-mail: kosman.vm@doclinika.ru

**\*Марина Валерьевна Карлина**, канд. биол. наук, руководитель отдела технологии, кинетики и анализа лекарственных средств; адрес: Россия, 188663, Ленинградская обл., Всеволожский р-н, п. Кузьмолловский, ул. Заводская, д. 3/245; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6292-8934>, e-mail: karlina.mv@doclinika.ru

**Ксения Владимировна Тютиня**, мл. научн. сотр. лаборатории иммуноферментного анализа; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6037-204X>; e-mail: tyutina.kv@doclinika.ru

**Валерий Геннадиевич Макаров**, д-р мед. наук, профессор, научный руководитель; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2447-7888>; e-mail: makarov.vg@doclinika.ru

**Марина Николаевна Макарова**, д-р мед. наук, директор; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3176-6386>; e-mail: makarova.mn@doclinika.ru

**Сергей Викторович Морозов**, канд. мед. наук, директор по развитию; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8514-792X>; e-mail: morozov\_s@pikfarma.ru

**Евгения Евгеньевна Гущина**, специалист по медицинской информации; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5138-5519>; e-mail: guschina\_e@pikfarma.ru

**Наталья Викторовна Журавская**, руководитель медицинского отдела; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9586-4298>; e-mail: zhuravskaya@pikfarma.ru

\* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

## AUTHORS' INFO

**Vera M. Kosman**, Cand. Sci. (Med.), Head of Analytical laboratory; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9690-1935>; e-mail: kosman.vm@doclinika.ru

**\*Marina V. Karlina**, Cand. Sci. (Med.), Head of Department of technology, kinetics and analysis of drugs; address: 3/245, Zavodskaya st., Kuzmolovsky village, Vsevolozhsky district, Leningrad Region, 188663, Russia; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6292-8934>, e-mail: karlina.mv@doclinika.ru

**Ksenia V. Tyutina**, Junior Research Associate of Laboratory of immune-enzyme analysis; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6037-204X>; e-mail: tyutina.kv@doclinika.ru

**Valery G. Makarov**, Dr. Sci. (Med.), Professor, Scientific Supervisor; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2447-7888>; e-mail: makarov.vg@doclinika.ru

**Marina N. Makarova**, Dr. Sci. (Med.), Director; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3176-6386>; e-mail: makarova.mn@doclinika.ru

**Sergey V. Morozov**, Cand. Sci. (Med.), Development Director; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8514-792X>; e-mail: morozov\_s@pikfarma.ru

**Eugenia E. Gushchina**, Medical Information Specialist; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5138-5519>; e-mail: guschina\_e@pikfarma.ru

**Natalia V. Zhuravskaya**, Head of Medical Department; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9586-4298>; e-mail: zhuravskaya@pikfarma.ru