

Изучение фармакокинетики нового производного 4,5-дигидроизоксазол-5-карбоксамида на крысах

И. И. Яичков^{1,2}✉, М. К. Корсаков², Н. Н. Вольхин¹, С. С. Петухов^{1,2},
А. Н. Тюшина^{1,2}, В. Е. Зайкова^{1,2}, О. Э. Лазарянц^{1,2}

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО ЯГМУ Минздрава России). 150000, Россия, г. Ярославль, ул. Революционная, д. 5

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ярославский государственный педагогический университет им. К. Д. Ушинского». Центр трансфера фармацевтических технологий им. М. В. Дорогова. 150000, Россия, г. Ярославль, ул. Республиканская, д. 108/1

✉ Контактное лицо: Яичков Илья Игоревич. E-mail: iyaichkov@yspu.org

ORCID: И. И. Яичков – <https://orcid.org/0000-0002-0066-7388>;

М. К. Корсаков – <https://orcid.org/0000-0003-0913-2571>;

Н. Н. Вольхин – <https://orcid.org/0000-0002-4275-9037>;

С. С. Петухов – <https://orcid.org/0009-0007-8435-7689>;

А. Н. Тюшина – <https://orcid.org/0009-0007-8084-5239>;

В. Е. Зайкова – <https://orcid.org/0009-0008-9431-1980>;

О. Э. Лазарянц – <https://orcid.org/0009-0002-1249-3669>.

Статья поступила: 16.07.2024

Статья принята в печать: 12.11.2024

Статья опубликована: 15.11.2024

Резюме

Введение. 3-(2-бутил-5-хлоро-1H-имидазол-4-ил)-N-[4-метокси-3-(трифторметил)фенил]-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоксамида (R004) является новой перспективной молекулой для терапии ревматоидного артрита. Данное соединение находится на стадии доклинического исследования, в ходе которого вместе с эффективностью и безопасностью необходимо изучить его фармакокинетику. При этом необходимо установить основные фармакокинетические параметры лекарственного средства и его метаболитов в плазме крови при однократном введении.

Цель. Оценка линейности фармакокинетики и относительной биодоступности 3-(2-бутил-5-хлоро-1H-имидазол-4-ил)-N-[4-метокси-3-(трифторметил)фенил]-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоксамида после однократного введения субстанции крысам.

Материалы и методы. Субстанцию R004 вводили крысам однократно перорально в дозировках 10 мг/кг, 20 мг/кг и 40 мг/кг и внутривенно в дозировке 10 мг/кг. Исследование проводилось на 24 крысах линии Wistar: по 6 крыс на каждую из доз. Образцы крови отбирались до введения и через 30 мин, 1 ч, 1 ч 30 мин, 2 ч, 3 ч, 4 ч, 6 ч, 8 ч, 10 ч, 12 ч, 24 ч после введения лекарственного средства. Полученная плазма стабилизировалась 250 мМ раствором ацетата аммония для предотвращения гидролиза R004. Подготовку проб плазмы осуществляли путем осаждения белков ацетонитрильным раствором внутренних стандартов. Измерение концентрации R004 и его метаболитов 3-(2-бутил-5-хлоро-1H-имидазол-4-ил)-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоновой кислоты (M1) и 4-метокси-3-(трифторметил)анилина (M2) проводили с помощью ВЭЖХ-МС/МС. При оценке фармакокинетических параметров применялся некомпартментный подход.

Результаты и обсуждение. Разработанная биоаналитическая методика прошла полную валидацию согласно требованиям руководств ЕАЭС по проведению исследований биоэквивалентности и ICH M10. Аналитический диапазон определения в плазме R004 составил 2–2000 нг/мл, M1 и M2 – 1–1000 нг/мл. Зависимость параметров C_{max} и AUC_{0-t} изучаемого соединения и его метаболитов от введенной дозы носила линейный характер. Так, величина коэффициента корреляции C_{max} R004 составил 0,9995, а параметра AUC_{0-t} – 0,9932. Установлено наличие энтерогепатической рециркуляции R004. Величина относительной биодоступности R004 составила 21,26 %.

Заключение. Разработанная методика успешно применена для фармакокинетического исследования. R004 и его метаболиты обладают линейной фармакокинетикой при пероральном введении субстанции.

Ключевые слова: производное 4,5-дигидроизоксазол-5-карбоксамида, ингибитор PAR-2-рецепторов, ВЭЖХ-МС/МС, плазма, фармакокинетика, стабилизация, крысы

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

Вклад авторов. И. И. Яичков проводил разработку и валидацию биоаналитической методики, анализ образцов животных. М. К. Корсаков отвечал за формулирование целей и задач, организационную часть исследования. Н. Н. Вольхин, С. С. Петухов, А. Н. Тюшина, В. Е. Зайкова, О. Э. Лазарянец отвечали за работу с лабораторными животными.

Финансирование. Статья подготовлена в рамках государственного задания Ярославского государственного педагогического университета им. К. Д. Ушинского на 2024 год от Минпросвещения РФ по теме «Разработка нового лекарственного средства для лечения нейродегенеративных заболеваний на основе ингибитора моноаминоксидазы» (номер реестровой записи 720000Ф.99.1.БН62АА12000).

Для цитирования: Яичков И. И., Корсаков М. К., Вольхин Н. Н., Петухов С. С., Тюшина А. Н., Зайкова В. Е., Лазарянец О. Э. Изучение фармакокинетики нового производного 4,5-дигидроизоксазол-5-карбоксамида на крысах. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(4):238–250. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-4-1876>

Pharmacokinetic study of a new 4,5-dihydroisoxazole-5-carboxamide derivative in rats

Ilya I. Yaichkov^{1,2✉}, Mikhail K. Korsakov², Nikita N. Volkhin¹, Sergey S. Petukhov^{1,2},
Alena N. Tyushina^{1,2}, Valeria E. Zaykova^{1,2}, Olga E. Lasaraynz^{1,2}

¹ Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Yaroslavl State Medical University" of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation. 5, Revolutsionnaya str., Yaroslavl, 150000, Russia

² Yaroslavl State Pedagogical University named after K. D. Ushinsky. M. V. Dorogov Pharmaceutical Technology Transfer Center. 108/1, Respublikanskaya str., Yaroslavl, 150000, Russia

✉ **Corresponding author:** Ilya I. Yaichkov. **E-mail:** i.yaichkov@yspu.org

ORCID: Ilya I. Yaichkov – <https://orcid.org/0000-0002-0066-7388>;
Mikhail K. Korsakov – <https://orcid.org/0000-0003-0913-2571>;
Nikita N. Volkhin – <https://orcid.org/0000-0002-4275-9037>;
Sergey S. Petukhov – <https://orcid.org/0009-0007-8435-7689>;
Alena N. Tyushina – <https://orcid.org/0009-0007-8084-5239>;
Valeria E. Zaykova – <https://orcid.org/0009-0008-9431-1980>;
Olga E. Lasaraynz – <https://orcid.org/0009-0002-1249-3669>.

Received: 16.07.2024 **Accepted:** 12.11.2024 **Published:** 15.11.2024

Abstract

Introduction. 3-(2-butyl-5-chloro-1H-imidazole-4-yl)-N-[4-methoxy-3-(trifluoromethyl)phenyl]-4,5-dihydro-1,2-oxazole-5-carboxamide (R004) is a prospective new molecule for the treatment of rheumatoid arthritis. This compound is at the stage of preclinical research, during which its pharmacokinetics must be studied along with efficacy and safety. In this case, it is necessary to establish the main pharmacokinetic parameters of the drug and its metabolites in blood plasma after a single administration.

Aim. Evaluation of linearity of pharmacokinetics and relative bioavailability of 3-(2-butyl-5-chloro-1H-imidazole-4-yl)-N-[4-methoxy-3-(trifluoromethyl)phenyl]-4,5-dihydro-1,2-oxazole-5-carboxamide and its main metabolites in plasma after a single administration of the substance to rats.

Materials and methods. Substance R004 was administered to rats once orally at dosages of 10 mg/kg, 20 mg/kg and 40 mg/kg and intraperitoneally at a dosage of 10 mg/kg. The study was carried out using 24 Wistar rats: 6 rats were used for each of the dosage. Blood samples were collected before administration and 30 min, 1 h, 1 h, 30 min, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h, 12 h, 24 h after administration of the drug. The obtained plasma was stabilized with a 250 mM ammonium acetate solution to prevent hydrolysis of R004. Plasma samples were prepared by means proteins precipitation by acetonitrile solution of internal standards. Measurement of the concentration of R004 and its metabolites 3-(2-butyl-5-chloro-1H-imidazole-4-yl)-4,5-dihydro-1,2-oxazole-5-carboxylic acid (M1) and 4-methoxy-3-(trifluoromethyl)aniline (M2) was performed using HPLC-MS/MS. A non-compartment approach was applied for evaluation pharmacokinetic parameters.

Results and discussion. The developed bioanalytical method has been fully validated in accordance with the requirements of the EAEU guideline for conducting bioequivalence study and ICH M10 guideline. The analytical range of determination in plasma of R004 was 2–2000 ng/ml, M1 and M2 – 1–1000 ng/ml. The dependence of the parameters C_{max} and AUC_{0-t} of the studied compound and its metabolites on the administered dose was linear. Thus, the value of the correlation coefficient of C_{max} R004 was 0.9995, and value of the correlation coefficient of AUC_{0-t} was 0.9991. The presence of enterohepatic recirculation R004 has been determined. The relative bioavailability of R004 was 21.26 %.

Conclusion. The developed method was successfully applied for the pharmacokinetic research. R004 and its metabolites have linear pharmacokinetics in case of oral administration.

Keywords: 4,5-dihydroisoxazol-5-carboxamide derivative, PAR-2 receptor inhibitor, HPLC-MS/MS, plasma, pharmacokinetics, stabilization, rats

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Ilya I. Yaichkov carried out the development and validation of bioanalytical methods, analysis of animal samples. Mikhail K. Korsakov carried out formulation of aims and objectives, the organizational part of the study. Nikita N. Volkhin, Sergey S. Petukhov, Alena N. Tyushina, Valeria E. Zaykova, Olga E. Lasaraynz carried out the experiment on laboratory animals.

Funding. The article was prepared within the framework of the State assignment of the Yaroslavl State Pedagogical University named after K.D. Ushinsky for 2024 from the Ministry of Education of the Russian Federation on the topic "Development of a new drug for the treatment of neurodegenerative diseases based on a monoamine oxidase inhibitor" (registry entry number 720000Ф.99.1.БН62АА12000).

For citation: Yaichkov I. I., Korsakov M. K., Volkhin N. N., Petukhov S. S., Tyushina A. N., Zaykova V. E., Lasaraynz O. E. Pharmacokinetic study of a new 4,5-dihydroisoxazole-5-carboxamide derivative in rats. *Drug development & registration*. 2024;13(4):238–250. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-4-1876>

ВВЕДЕНИЕ

Ревматоидный артрит (РА) является достаточно распространенным заболеванием, от которого страдает до 1,0 % населения. Риск развития РА увеличивается с возрастом [1]. Одной из перспективных мишеней для лечения РА является ингибирование PAR-2-рецепторов, локализованных на мембранах клеток иммунной системы. Для данных целей наряду с моноклональными антителами применяются низкомолекулярные соединения [2, 3]. 3-(2-бутил-5-хлоро-1Н-имидазол-4-ил)-N-[4-метокси-3-(трифторметил)фенил]-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоксамид (R004) (рисунок 1) является новым селективным ингибитором PAR-2-рецепторов. Данный препарат проявлял свою фармакологическую активность на модели отека, вызванного формальдегидом. Так, по своему противовоспалительному эффекту R004 превзошел диклофенак натрия [4].

В ходе изучения биотрансформации установлено, что R004 метаболизируется путем гидролиза с образованием 3-(2-бутил-5-хлоро-1Н-имидазол-4-ил)-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоновой кислоты (M1); 4-метокси-3-(трифторметил)анилина (M2) (см. рисунок 1) [5]. Других фармакокинетических исследований данной молекулы ранее не проводилось. На следующем этапе необходимо оценить основные фармакокинетические параметры R004 и его метаболитов в плазме крови после однократного введения, проверить гипотезу их линейности [6]. Наиболее часто для этих целей используют крыс [7–9].

Биоаналитическая методика, использованная для скрининга метаболитов R004, слишком длительна и не предназначена для количественного определения [5]. Поэтому требуется разработка новой, более быстрой и точной методики. В рамках доклиническо-

го исследования требуется оценка фармакокинетических параметров лекарственного средства как минимум на двух видах животных [6], один из которых не относится к грызунам. Как правило, для этих целей используются кролики [10, 11]. Поэтому новая биоаналитическая методика будет разработана для плазмы обоих видов животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оборудование и реактивы

Количественное определение R004 и его метаболитов проводилось с помощью ВЭЖХ-МС/МС-системы, оснащенной жидкостным хроматографом 1260 Infinity (Agilent Technologies, Германия) и масс-спектрометрическим детектором AB SCIEX QTRAP5500 (AB Sciex Pte. Ltd., Сингапур), с программным обеспечением Analyst 1.6.2 (AB Sciex, США) для управления прибором и MultiQuant 3.0.5 (AB Sciex, США) для интегрирования хроматограмм и количественных расчетов.

Субстанции 3-(2-бутил-5-хлоро-1Н-имидазол-4-ил)-N-[4-метокси-3-(трифторметил)фенил]-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоксамид (99,2 %), 3-(2-бутил-5-хлоро-1Н-имидазол-4-ил)-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоновой кислоты (99,3 %), а также 3-(2-бутил-5-хлоро-1Н-имидазол-4-ил)-N-[3,4-диметилфенил]-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоксамид (R002) (98,5 % – внутренний стандарт) произведены в Центре трансфера фармацевтических технологий им. М. В. Дорогова ЯГПУ им. К. Д. Ушинского. Образцы 4-метокси-3-(трифторметил)анилина (99,0 %, Alfa Aesar, США) и 4-хлоранилина (4CA) (≥ 98 % (внутренний стандарт), ALPHA CHEMICA, Индия) получены из коммерческих источников.

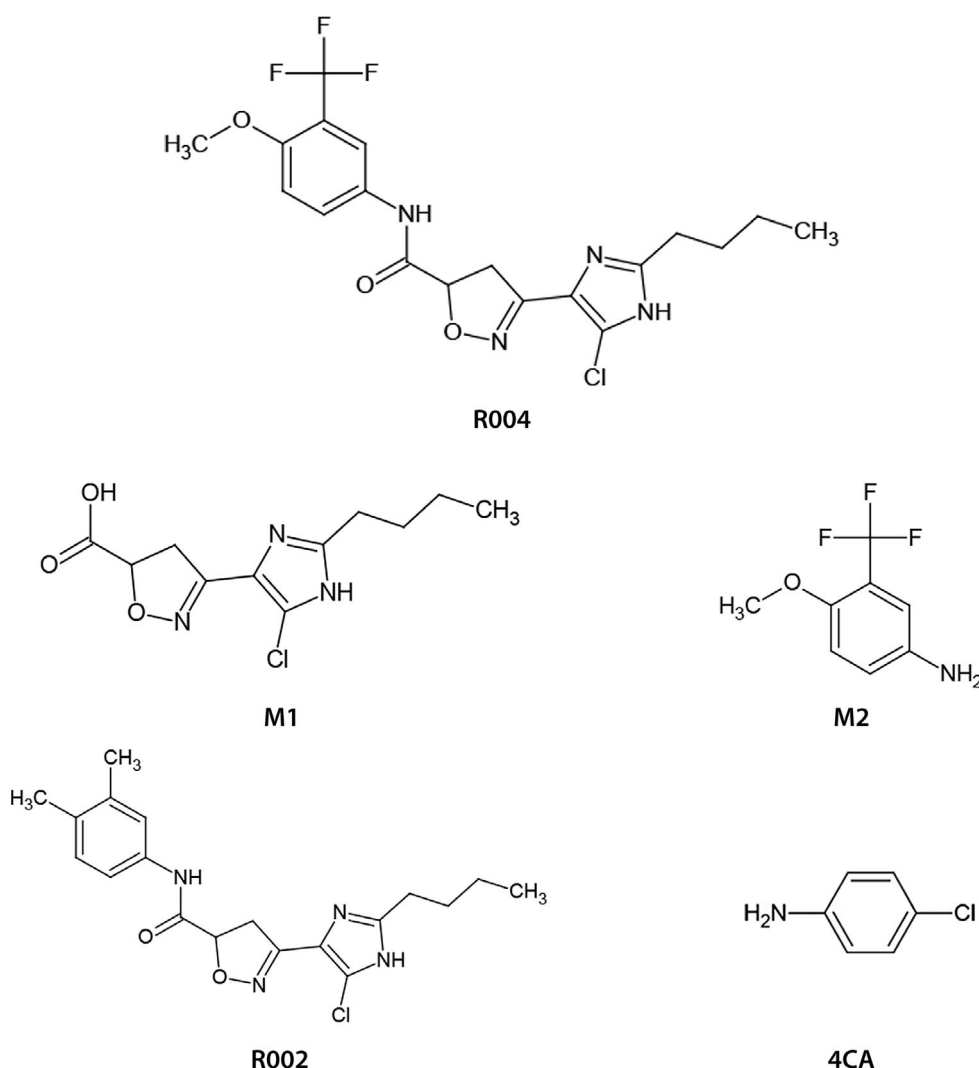


Рисунок 1. Структурные формулы 3-(2-бутил-5-хлоро-1H-имидазол-4-ил)-N-[4-метокси-3-(трифторметил)фенил]-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоксамида (R004), его основных метаболитов 3-(2-бутил-5-хлоро-1H-имидазол-4-ил)-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоновой кислоты (M1), 4-метокси-3-(трифторметил)анилина и внутренних стандартов R002 и 4-хлоранилина (4CA)

Figure 1. The structure of 3-(2-butyl-5-chloro-1H-imidazole-4-yl)-N-[4-methoxy-3-(trifluoromethyl)phenyl]-4,5-dihydro-1,2-oxazole-5-carboxamide, its metabolites 3-(2-butyl-5-chloro-1H-imidazole-4-yl)-4,5-dihydro-1,2-oxazole-5-carboxylic acid (M1), 4-methoxy-3-(trifluoromethyl)aniline (M2) and internal standards R002 and 4-chloroaniline (4CA)

Для приготовления подвижной фазы и подготовки проб использовались следующие реактивы:

- ✓ ацетонитрил, класс «Optima™ LC/MS-Grade» (для ВЭЖХ-МС, Fisher Chemicals, Бельгия) – элюент В;
- ✓ ацетонитрил (о.с.ч., ООО ТД «ХИММЕД», Россия) – для подготовки проб;
- ✓ муравьиная кислота, класс «eluent additive for LC-MS» (для ВЭЖХ-МС, Scharlab, Китай);
- ✓ ацетат аммония (класс «для ВЭЖХ», High Purity Laboratory Chemicals Pvt. Ltd., Индия);
- ✓ уксусная кислота ледяная (х.ч., АО «База № 1 Химреактивов», Россия);
- ✓ диметилсульфоксид (х.ч., АО «ЭКОС-1», Россия).

Подготовка проб плазмы

Содержание R004, M1 и M2 в основных растворах в ДМСО составляло 1000 мкг/мл. Приготовление калибровочных образцов (K1–K8), образцов контроля качества нижнего (LQC), среднего (MQC) и верхнего (HQC) уровней концентраций и образцов для теста разведения (Dil) осуществлялось путем добавления комбинированного рабочего раствора аналитов с концентрацией, которая в 20 раз превышает концентрацию в соответствующем образце (таблица 1), к холостому образцу плазмы в объемном соотношении 1:19 (раб. раствор:плазма). Далее образец не-

медленно стабилизировали путем добавления 250 мМ раствора ацетата аммония (pH = 4,0) из расчета 20 мкл раствора на 100 мкл K₃ЭДТА-плазмы.

Таблица 1. Концентрации 3-(2-бутил-5-хлоро-1H-имидазол-4-ил)-N-[4-метокси-3-(трифторметил)фенил]-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоксамиды и его метаболитов в калибровочных образцах и образцах контроля качества

Table 1. Concentrations of 3-(2-butyl-5-chloro-1H-imidazole-4-yl)-N-[4-methoxy-3-(trifluoromethyl)phenyl]-4,5-dihydro-1,2-oxazole-5-carboxamide and its metabolites in calibration and QC samples

Аналит Analyte	Концентрация, нг/мл Concentration, ng/ml							
	Калибровочные образцы Calibration samples							
	K1 (LLOQ)	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K8
R004	2	10	50	200	500	1000	1500	2000
M1	1	5	25	100	250	500	750	1000
M2	1	5	25	100	250	500	750	1000
	Образцы контроля качества Quality control samples							
	LQC	MQC		HQC		Dil		
R004	6	750		1750		3500		
M1	3	375		875		1750		
M2	3	375		875		1750		

Для подготовки проб к 25 мкл стабилизированной плазмы добавлялось 100 мкл ацетонитрильного раствора внутренних стандартов R002 и 4CA с концентрациями обоих соединений 40 нг/мл. Затем смесь перемешивали на шейкере и центрифугировали 5 мин при 10 тыс. об/мин. Надосадочная жидкость переносилась в микровставки и вводилась в ВЭЖХ-МС/МС-систему в объеме 7 мкл.

Параметры хроматографического разделения и масс-спектрометрического детектирования

Хроматографическое разделение проводилось на хроматографической колонке Zorbax Eclipse Plus C18 (150 × 3,0 мм, 3,5 мкм) с предколонкой Zorbax Eclipse Plus C18 (12,5 × 2,1 мм, 5,0 мкм) при скорости потока 0,5 мл/мин и температуре 40 °C в градиентном режиме (таблица 2).

Масс-спектрометрическое детектирование осуществлялось в MRM-режиме (таблица 3) в следующих условиях:

- ✓ электрораспылительная ионизация;
- ✓ полярность – положительная;
- ✓ напряжение электроспрея – 5500 В;
- ✓ температура источника ионов – 650 °C.

Таблица 2. Условия градиентного элюирования

Table 2. Gradient elution conditions

Время, мин Time, min	A, %	B, %
0,00	60	40
0,50	60	40
3,00	10	90
8,50	10	90
8,60	60	40
12,50	60	40

Примечание. 0,2%-й водный р-р муравьиной кислоты – А; ацетонитрил – В.

Note. 0,2 % aqueous formic acid solution – A; acetonitrile – B.

Таблица 3. Параметры масс-спектрометрического детектирования определяемых веществ

Table 3. Parameters of mass spectrometric detection of studied compounds

Вещества Compounds		SRM-переход SRM-transition		Тип SRM-перехода Type of SRM-transition
		Q1	Q3	
Аналиты Analytes	R004	445	425	Количественный Quantitative
		445	200	Контрольный Control
	M1	272	200	Количественный Quantitative
		272	144	Контрольный Control
	M2	192	108	Количественный Quantitative
		192	123	Контрольный Control
Внутренние стандарты Internal standards	R002	375	226	ВС для R004 IS for R004
	4CA	128	93	ВС для M1 IS for M1
		128	75	ВС для M2 IS for M2

Примечание. Количественные SRM-переходы использовались для количественных расчетов; контрольные SRM-переходы использовались для подтверждения корректности идентификации.

Note. Quantitative SRM-transitions were used for quantitative calculations; control SRM transitions were used to confirm the correctness of identification.

В качестве внутреннего стандарта для определения R004 использовался близкий по структуре кандидат R002. Для расчетов концентрации метаболитов применялся 4CA: более интенсивный MRM-переход 128 → 93 m/z – для M1; менее интенсивный MRM-переход 128 → 75 m/z – для M2.

Валидация биоаналитической методики

Валидация разработанной методики была выполнена согласно требованиям Решения Совета ЕЭК от 3 ноября 2016 г. № 85¹ и руководства ICH M10² по следующим показателям: селективности; калибровочной кривой; правильности и прецизионности внутри аналитического цикла (по 2 серии на образцах биоматериала крысы и кролика) и между аналитическими циклами; эффекту разведения образца (2-кратное разведение); эффекту матрицы [расчет относительного стандартного отклонения (RSD) нормализованного фактора матрицы (NMF)]; эффекту переноса анализируемых веществ и внутренних стандартов из предыдущей пробы; воспроизводимости при повторном вводе аналитической серии. Селективность и матричные эффекты оценивались отдельно на плазме крысы и на плазме кролика. В процессе валидации были изучены следующие виды стабильности: краткосрочная стабильность (STS) (стабилизированная плазма); долгосрочная стабильность (LTS) (стабилизированная плазма); стабильность после 3 циклов заморозки/разморозки (FTS) (стабилизированная плазма); стабильность приготовленных проб в автодозаторе (ASS); стабильность в цельной крови. Исследование LTS также проводилось на плазме обоих видов животных.

Дизайн фармакокинетического исследования

Субстанцию R004 в виде суспензии (1%-й твин-80 в 0,9%-м растворе натрия хлорида) лекарственного средства вводили перорально (п/о) с помощью зонда в дозировках 10 мг/кг, 20 мг/кг и 40 мг/кг, а также внутривенно (в/в) в дозировке 10 мг/кг. Испытание с каждой дозировкой выполнялось на отдельной группе крыс линии Wistar (питомник ООО «СМК Стелар»), включающей в себя 6 особей (по 3 самца и 3 самки). Масса животных в группах ($M \pm SEM$) составляла 256 ± 2 г (10 мг/кг – п/о), 249 ± 2 г (20 мг/кг – п/о), 249 ± 3 г (40 мг/кг – п/о), 269 ± 3 г (10 мг/кг – в/в). Для предотвращения влияния пищи на абсорбцию R004 исследование проводилось на голодный желудок: крыс не кормили за 12 ч до введения и не поили за 2 ч до введения субстанции. Доступ к корму и воде был возобновлен спустя 4 ч после начала эксперимента.

¹ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза». Доступно по: https://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_207405/ Ссылка активна на 16.07.2024.

² ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-m10-bioanalytical-method-validation-step-5_en.pdf. Accessed: 16.07.2024.

Отбор проб крови в объеме 0,2 мл (антикоагулянт: К₃ЭДТА) осуществляли через предварительно установленный в правую яремную вену катетер. Использовались следующие временные точки: 0 ч (до введения), 30 мин, 1 ч, 1 ч 30 мин, 2 ч, 3 ч, 4 ч, 6 ч, 8 ч, 10 ч, 12 ч, 24 ч после введения. Кровь немедленно центрифугировали 5 мин при 2500 об/мин и температуре 4 °С. К полученной плазме добавляли 250 мМ раствор ацетата аммония (pH = 4,0) в объемном соотношении 1:5 (стабилизатор:плазма). Образцы хранились в морозильной камере при температуре не выше –70 °С.

Статистические расчеты

Для R004, а также его метаболитов были рассчитаны следующие фармакокинетические параметры в плазме крови крысы: максимальная концентрация аналита в плазме (C_{max}); время достижения максимальной концентрации аналита в плазме (T_{max}); площадь под фармакокинетической кривой от момента введения ЛС до времени последнего отбора крови (AUC_{0-t}); площадь под фармакокинетической кривой от момента введения ЛС до бесконечности ($AUC_{0-\infty}$); период полувыведения аналита ($T_{1/2}$); среднее время удержания аналита в крови (среднее резидентное время, MRT); клиренс (Cl/F); объем распределения (Vd/F).

Для расчета фармакокинетических параметров использовался пакет R, ver. 3.3.2 (модуль Bear, ver. 2.7.7), для расчета элементов описательной статистики (среднее значение (M), стандартное отклонение (SD), относительное стандартное отклонение (RSD), стандартная ошибка среднего (SEM), медиана (Med), минимальное (Min) и максимальное (Max) значение); для проверки гипотезы линейности C_{max} и AUC_{0-t} использовалось ПО Statsoft Statistica 10.0.1011.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На начальном этапе исследования была разработана и валидирована ВЭЖХ-МС/МС-методика. Для предотвращения гидролиза R004 после отбора к 75 мкл К₃ЭДТА-плазмы добавлялось 15 мкл 250 мМ раствора ацетата аммония (pH = 4,0) в объемном соотношении 1:5, как и при изучении биотрансформации [5]. Требуемой чувствительности удалось достичь с помощью осаждения белков плазмы ацетонитрильным раствором внутренних стандартов.

Площадь хроматографических пиков R004 в холостых образцах крысы не превышала 5,93 % от площади хроматографических пиков в образцах LLOQ, в холостых образцах кролика – 3,95 % площади хроматографических пиков в образцах LLOQ. В области времени удерживания M1, M2, а также внутренних стандартов R002 и 4CA аналитический сигнал отсутствовал в интактной плазме обоих видов животных (рисунок 2) Также в рамках оценки селективно-

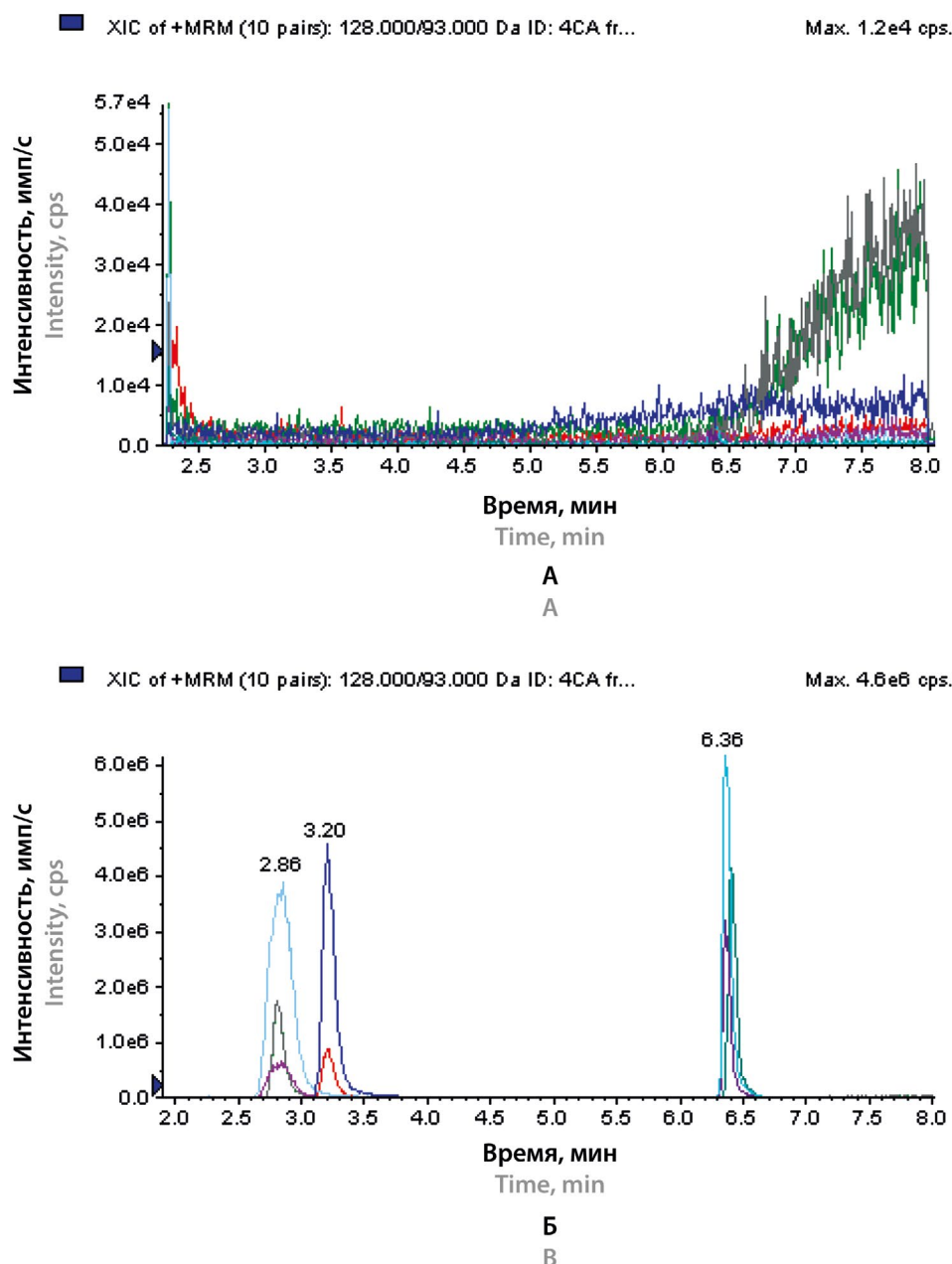


Рисунок 2. Пример хроматограммы холостого образца плазмы (А) и хроматограммы калибровочного образца К4 (В).

Примечание. R004 – $t_R = 6,36$ мин; M1 – $t_R = 2,86$ мин; M2 – $t_R = 2,86$ мин; R002 – $t_R = 6,41$ мин; 4CA – $t_R = 3,20$ мин

Figure 2. Example of chromatogram of a blank plasma sample (A) and chromatogram of a K4 calibration sample (B).

Note. R004 – $t_R = 6.36$ min; M1 – $t_R = 2.86$ min; M2 – $t_R = 2.86$ min; R002 – $t_R = 6.41$ min; 4CA – $t_R = 3.20$ min

сти изучалась возможность повторного образования R004 из M1 и M2 после отбора. Для этого 3 образца стабилизированной плазмы крысы и 3 образца плазмы кролика с концентрациями M1 и M2 на уровне НQC выдерживали 24 ч при комнатной температуре. Площадь хроматографического пика R004 в испытуемых образцах составляла 0,00–4,95 % от площади хроматографических пиков в образцах LLOQ, что не превышало максимально допустимые 20 %. Калибро-

вочные зависимости носили линейный характер в диапазоне 2–2000 нг/мл для R004 и в диапазоне 1–1000 нг/мл для M1 и M2. Угловые коэффициенты градуировочных кривых, построенных на плазме крысы и кролика, имеют близкие значения (таблица 4).

Оценка матричных эффектов проводилась также на образцах обоих видов животных. Величина RSD нормализованного фактора матрицы (NMF) была менее 15 % для каждого аналита, что соответствовало

Таблица 4. Результаты оценки линейности методики

Table 4. The results of evaluation of linearity of the method

Аналит Analyte	Аналитический диапазон, нг/мл Analytical range, ng/ml	Весовой коэффициент Weighting	Угловые коэффициенты калибровочных кривых (мин. – макс.) Slopes of calibration curves (min. – max.)		Свободные коэффициенты калибровочных кривых (мин. – макс.) Intercepts of calibration curves (min. – max.)	
			Крыса (n = 7) Rat (n = 7)	Кролик (n = 3) Rabbit (n = 3)	Крыса (n = 7) Rat (n = 7)	Кролик (n = 3) Rabbit (n = 3)
R004	2–2000	1/x ²	0,00174–0,00200	0,00182–0,00193	0,00069–0,00187	0,00051–0,00190
M1	1–1000	1/x	0,00375–0,00431	0,00380–0,00415	0,00051–0,00152	0,00071–0,00122
M2	1–1000	1/x	0,00322–0,00375	0,00354–0,00381	0,00082–0,00210	0,00112–0,00196

установленным требованиям^{1,2} (таблица 5). Расхождение абсолютных значений NMF между пробами крыс и кроликов для R004, M1 и M2 также не превышало 15 % (таблица 5).

Таблица 5. Оценка эффекта матрицы методики определения 5-(2-бутил-5-хлоро-1Н-имидазол-4-ил)-N-[4-метокси-3-(трифторметил)фенил]-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоксамида и его метаболитов в плазме

Table 5. Evaluation of matrix effect of the method of determination of 5-(2-butyl-5-chloro-1H-imidazole-4-yl)-N-[4-methoxy-3-(trifluoromethyl)phenyl]-4,5-dihydro-1,2-oxazole-5-carboxamide and its metabolites in plasma

Аналит Analyte	Концентрация Concentration	Плазма крысы Rat plasma		Плазма кролика Rabbit plasma	
		NMF	RSD (NMF), %	NMF	RSD (NMF), %
R004	LQC	1,034	2,81	1,019	3,93
	HQC	0,994	3,43	1,008	2,87
M1	LQC	0,845	2,24	0,887	10,98
	HQC	0,830	5,31	0,878	4,66
M2	LQC	1,003	6,14	0,972	8,30
	HQC	0,978	2,95	0,987	4,32

Величина среднего значения относительной погрешности (δ) на уровнях концентрации LQC, MQC, HQC при определении R004 варьировала в диапазоне 0,44–11,35 %, при определении M1 – в диапазоне –2,23–10,41 %, при определении M2 – в диапа-

зоне –0,76–8,33 %. Данные результаты входили в допустимый интервал ± 15 %. Значение δ на уровне нижнего предела количественного определения для R004 не превышало 12,61 %, для M1 – 8,40 %, для M2 – 15,60 % (таблица 6). Это укладывалось в установленный предел ± 20 %^{3,4}. Величина RSD рассчитанных концентраций на уровнях LQC, MQC, HQC для R004 составила 1,20–5,95 %, для M1 – 2,70–6,84 %, для M2 – 1,98–10,03 %. Для образцов LLOQ значение RSD при определении R004 находилось в диапазоне 4,78–12,61 %, при определении M1 – в диапазоне 3,89–15,90 %, при определении M2 – в диапазоне 3,43–9,55 % (таблица 6). Таким образом, результаты оценки внутрисерийной прецизионности соответствовали установленным требованиям^{5,6}. Отсутствие различий при испытаниях селективности, эффекта матрицы, градуировочной кривой (схожесть типа регрессии и величины угловых коэффициентов калибровочных зависимостей) позволило объединить данные 4 аналитических серий, проведенных на плазме крыс и на плазме кроликов, для подтверждения межсерийной правильности и прецизионности (см. таблицу 6). При двукратном разведении образцов стабилизированной плазмы среднее значение относительной погрешности определения

³ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза». Доступно по: https://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_207405/ Ссылка активна на 16.07.2024.

⁴ ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-m10-bioanalytical-method-validation-step-5_en.pdf. Accessed: 16.07.2024.

⁵ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза». Доступно по: https://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_207405/ Ссылка активна на 16.07.2024.

⁶ ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-m10-bioanalytical-method-validation-step-5_en.pdf. Accessed: 16.07.2024.

¹ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза». Доступно по: https://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_207405/ Ссылка активна на 16.07.2024.

² ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-m10-bioanalytical-method-validation-step-5_en.pdf. Accessed: 16.07.2024.

Таблица 6. Результаты оценки правильности и прецизионности методики определения 3-(2-бутил-5-хлоро-1H-имидазол-4-ил)-N-[4-метокси-3-(трифторметил)фенил]-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоксамид и его метаболитов в плазме

Table 6. The results of evaluation of accuracy and precision of the method of determination of 3-(2-butyl-5-chloro-1H-imidazole-4-yl)-N-[4-methoxy-3-(trifluoromethyl)phenyl]-4,5-dihydro-1,2-oxazole-5-carboxamide and its metabolites in plasma

Испытание Test		Концентрация Concentration	R004		M1		M2	
			δ, %	RSD, %	δ, %	RSD, %	δ, %	RSD, %
Внутрисерийная правильность и прецизионность Intraday accuracy and precision	Серия 1 (n = 6) Batch 1 (n = 6)	LLOQ	4,37	9,08	-3,12	12,89	7,45	6,46
		LQC	10,37	1,20	1,58	6,84	8,33	4,07
		MQC	8,25	5,51	6,36	6,16	6,69	4,85
		HQC	11,35	1,52	10,41	2,70	7,72	1,98
	Серия 2 (n = 6) Batch 2 (n = 6)	LLOQ	0,63	12,61	-3,80	15,90	15,60	3,43
		LQC	5,06	3,59	0,21	6,77	6,47	4,40
		MQC	3,90	5,51	4,30	5,78	5,81	6,49
		HQC	8,72	3,47	9,66	3,08	5,67	2,49
	Серия 3 (n = 6) Batch 3 (n = 6)	LLOQ	13,16	4,78	8,40	3,89	-1,80	9,55
		LQC	9,11	4,20	9,18	3,77	6,43	7,01
		MQC	0,44	3,37	2,38	3,22	0,76	4,21
		HQC	3,07	4,29	8,19	5,19	4,56	2,38
	Серия 4 (n = 6) Batch 4 (n = 6)	LLOQ	4,03	7,42	-0,60	12,03	-1,55	9,43
		LQC	3,71	5,09	5,08	2,71	5,52	10,03
		MQC	0,44	5,95	-2,23	3,40	2,42	3,59
		HQC	5,93	2,06	2,07	5,29	5,24	2,92
Межсерийная правильность и прецизионность (n = 24) Interday accuracy and precision (n = 24)		LLOQ	5,55	9,29	0,22	11,99	4,93	9,81
		LQC	7,06	4,38	4,01	5,97	6,69	6,39
		MQC	3,26	5,80	2,70	5,55	3,92	5,19
		HQC	7,18	4,86	7,58	4,99	5,80	2,56
Воспроизводимость при повторном вводе серии (48 ч) (n = 6) Reinjection reproducibility (48 h) (n = 6)		LLOQ	2,38	9,68	8,90	5,05	5,27	5,29
		LQC	5,58	6,63	8,47	5,61	5,67	5,66
		MQC	-5,63	3,77	-2,78	3,48	1,78	2,46
		HQC	-2,41	3,91	4,99	6,06	5,40	3,65

Примечание. Серии 1 и 2 выполнены на плазме крысы, серии 3 и 4 выполнены на плазме кролика; в рамках серий 2 и 4 выполнялось изучение селективности методики.

Note. Series 1 and 2 were performed on rat plasma, series 3 and 4 were performed on rabbit plasma; selectivity of the method was studied within series 2 and 4.

R004 составило 3,82 %, M1 – 4,08 %, M2 – 8,65 %, что отвечает критериям приемлемости^{1,2}. Величина RSD при этом не превышала 6,43 %. Перенос R004 из предыдущей пробы не превышал 13,83 % от площади хроматографического пика в пробах LLOQ, а перенос близкого по структуре R002 (BC) – 0,18 %. Попадания M1, M2 и 4CA в последующий образец не наблюдалось.

¹ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза». Доступно по: https://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_207405/ Ссылка активна на 16.07.2024.

² ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-m10-bioanalytical-method-validation-step-5_en.pdf. Accessed: 16.07.2024.

Испытания STS, FTS и ASS проводили на стабилизированной плазме крыс ввиду положительных результатов при подборе антикоагулянта и раствора стабилизатора [5] с целью оптимизации объема валидационных испытаний. R004 и его метаболиты остаются стабильными в течение 24 ч хранения при комнатной температуре, 3 циклов заморозки и разморозки, 48 ч хранения готовых проб в автосемплере, а также 30 мин хранения образцов цельной крови на ледяной бане (таблица 7). Изучение LTS осуществляли на плазме крыс и кроликов. Межвидовые различия в активности ферментных систем не влияли на стабильность аналитов (таблица 7). Воспроизводимость результатов при повторном вводе аналитической серии спустя 48 ч также сохраняется (см. таблицу 6).

После успешной валидации биоаналитической методики проводился анализ проб плазмы крыс. Всего было проанализировано 288 образцов.

Таблица 7. Изучение стабильности 5-(2-бутил-5-хлоро-1Н-имидазол-4-ил)-N-[4-метокси-3-(трифторметил)фенил]-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоксамида и его метаболитов в плазме

Table 7. Stability study of 5-(2-butyl-5-chloro-1H-imidazole-4-yl)-N-[4-methoxy-3-(trifluoromethyl)phenyl]-4,5-dihydro-1,2-oxazole-5-carboxamide and its metabolites in plasma

Испытание Test		% отклонения от номинального значения % of deviation from nominal value					
		R004		M1		M2	
		LQC (n = 6)	HQC (n = 6)	LQC (n = 6)	HQC (n = 6)	LQC (n = 6)	HQC (n = 6)
Краткосрочная стабильность при комнатной температуре (24 ч) Short-term stability at room temperature (24 h)		8,29	4,12	5,06	3,43	3,56	0,51
Стабильность после 3 циклов заморозки (12 ч) и разморозки (4 ч) Stability after 3 cycles of freeze (12 h) and thaw (4h)		3,45	4,14	6,81	2,83	-0,68	0,67
Стабильность в автосемплере (48 ч при +4 °C) Autosampler stability (48 h at +4 °C)		7,12	3,24	4,44	4,80	-0,21	3,23
Долгосрочная стабильность в морозильной камере (не выше -70 °C, 30 дней) Long-term stability at freezer (no higher than -70 °C, 30 days)	Плазма крысы Rat plasma	12,03	-1,26	5,56	0,05	3,77	10,17
	Плазма кролика Rabbit plasma	5,31	2,08	2,16	-1,53	0,21	1,33
Стабильность в цельной крови (30 мин) Stability in whole blood (30 min)		5,54	1,24	0,57	0,22	-0,09	3,20

На фармакокинетических профилях R004 после перорального введения наблюдается два пика нарастания концентрации: через 0,5–1 ч после введения и около 4 часов (рисунок 3). При этом у части животных C_{max} достигается в начальных точках, а у другой части – в точке 4 ч. Это обуславливает высокие величины RSD времени достижения максимальной концентрации после приема дозы 10 и 20 мг/кг. После приема самой высокой дозы 40 мг/кг T_{max} R004 у всех животных составляет 0,5 ч (таблица 8). На фармакокинетической кривой изучаемого соединения после внутрибрюшинной инъекции также отмечается прирост его концентрации в точках 4–6 ч (рисунок 3). Это свидетельствует о наличии энтеро-гепатической рециркуляции действующего вещества. Зависимость параметра C_{max} и AUC_{0-t} от введенной дозы носила линейный характер: величина коэффициентов корреляции 0,9995 и 0,9932 соответственно (рисунок 4). Относительная биодоступность субстанции R004 составила 21,26 %.

Рисунок 3. Усредненные фармакокинетические кривые (со стандартной ошибкой среднего) 5-(2-бутил-5-хлоро-1Н-имидазол-4-ил)-N-[4-метокси-3-(трифторметил)фенил]-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоксамида и его метаболитов в плазме крови крысы

Figure 3. Averaged pharmacokinetic curves (with standard error of mean) of 5-(2-butyl-5-chloro-1H-imidazole-4-yl)-N-[4-methoxy-3-(trifluoromethyl)phenyl]-4,5-dihydro-1,2-oxazole-5-carboxamide and its metabolites in rat blood plasma

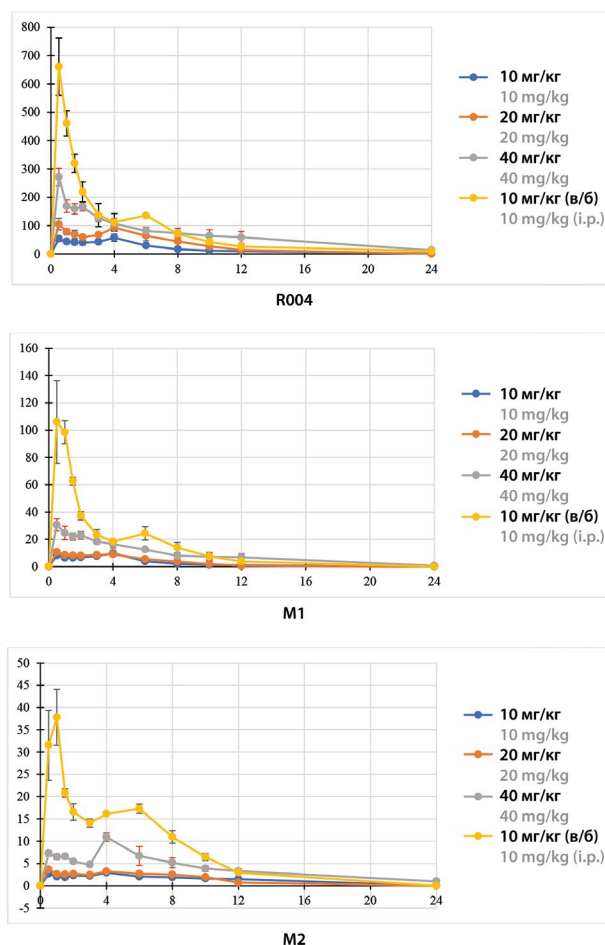


Таблица 8. Значения фармакокинетических параметров 5-(2-бутил-5-хлоро-1Н-имидазол-4-ил)-N-[4-метокси-3-(трифторметил)фенил]-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоксамида и его метаболитов
Table 8. Values of pharmacokinetic parameters 5-(2-butyl-5-chloro-1H-imidazole-4-yl)-N-[4-methoxy-3-(trifluoromethyl)phenyl]-4,5-dihydro-1,2-oxazole-5-carboxamide and its metabolites

Вещество Substance		R004 (n = 6)				M1 (n = 6)				M2 (n = 6)			
Дозировка, мг/кг Dosage, mg/kg		10	20	40	10 (в/б) 10 (i/p)	10	20	40	10 (в/б) 10 (i/p)	10	20	40	10 (в/б) 10 (i/p)
C _{max} , нг/мл C _{max} , ng/ml	M ± SEM	68,6 ± 10,67	130,13 ± 17,79	271,26 ± 31,14	697,49 ± 93,65	11,02 ± 1,34	12,46 ± 1,28	32,76 ± 4,86	135,97 ± 18,57	3,30 ± 0,47	4,03 ± 0,43	11,30 ± 1,14	45,85 ± 5,93
	RSD	38,11	33,48	28,12	30,02	29,84	25,20	36,33	33,45	35,13	26,27	24,60	31,67
	Med (Min–Max)	4,0 (0,5–4,0)	1,0 (0,5–6,0)	0,5 (0,5–0,5)	0,5 (0,5–1,5)	2,8 (0,5–4,0)	1,0 (0,5–4,0)	0,5 (0,5–1,5)	0,8 (0,5–1,0)	4,0 (0,5–4,0)	1,3 (0,5–4,0)	4,0 (0,5–6,0)	1,0 (0,5–1,0)
C _{max} , ч C _{max} , h	RSD	48,56	106,92	0,00	55,90	73,34	93,95	55,78	36,51	63,79	89,48	47,52	30,98
	M ± SEM	391,5 ± 34,4	644,9 ± 59,5	1514,1 ± 266,9	1871,4 ± 139,7	52,2 ± 4,0	62,1 ± 4,5	184,9 ± 34,0	301,2 ± 31,8	23,4 ± 2,1	27,9 ± 2,7	87,2 ± 17,1	165,6 ± 8,7
	RSD	21,54	22,62	43,18	18,29	18,70	17,91	44,99	25,87	22,26	23,78	48,17	12,92
AUC _{0–t} , нг · ч/мл AUC _{0–t} , ng · h/ml	M ± SEM	415,2 ± 36,2	707,6 ± 66,6	1755,8 ± 342,0	1988,9 ± 147,6	58,0 ± 4,0	69,8 ± 3,5	201,5 ± 36,4	317,0 ± 35,2	41,2 ± 3,8	38,2 ± 2,6	136,9 ± 23,0	175,3 ± 8,7
	RSD	21,33	23,07	47,71	18,18	16,84	12,23	44,19	27,23	22,69	16,56	41,05	12,21
	M ± SEM	5,1 ± 1,0	2,8 ± 0,6	6,8 ± 1,3	6,8 ± 1,4	3,8 ± 0,7	3,1 ± 0,8	4,2 ± 0,6	2,4 ± 0,1	8,3 ± 1,3	5,1 ± 0,6	14,4 ± 2,7	2,2 ± 0,2
T _{1/2} , ч T _{1/2} , h	RSD	49,66	48,63	47,95	51,74	48,08	62,55	33,80	13,85	37,65	29,23	45,94	25,29
	M ± SEM	6,2 ± 0,5	4,8 ± 0,2	6,5 ± 1,0	4,9 ± 0,4	4,2 ± 0,1	4,2 ± 0,3	5,3 ± 1,0	3,4 ± 0,2	5,5 ± 0,2	5,3 ± 0,2	7,2 ± 0,9	4,5 ± 0,2
	RSD	19,62	11,79	37,91	18,82	7,88	17,39	45,34	14,68	8,32	6,90	31,44	8,84
Cl/F, мл/ч Cl/F, ml/h	M ± SEM	251 ± 24	147 ± 13	70 ± 14	51 ± 4	1770 ± 135	1450 ± 73	597 ± 117	334 ± 33	2553 ± 277	2690 ± 205	836 ± 133	578 ± 29
	RSD	23,70	21,79	49,80	18,49	18,71	12,25	48,12	24,24	26,57	18,70	38,92	12,20
	M ± SEM	1756 ± 288	587 ± 119	614 ± 120	502 ± 98	9622 ± 2003	6502 ± 1740	3229 ± 469	1124 ± 111	28738 ± 2511	19599 ± 2719	15763 ± 2354	1830 ± 213
	RSD	40,12	49,72	47,79	47,75	50,98	65,55	35,57	24,13	21,40	33,98	36,57	28,52

Примечание. В/б – внутривенное введение.
Note. I/p – intraperitoneal injection.

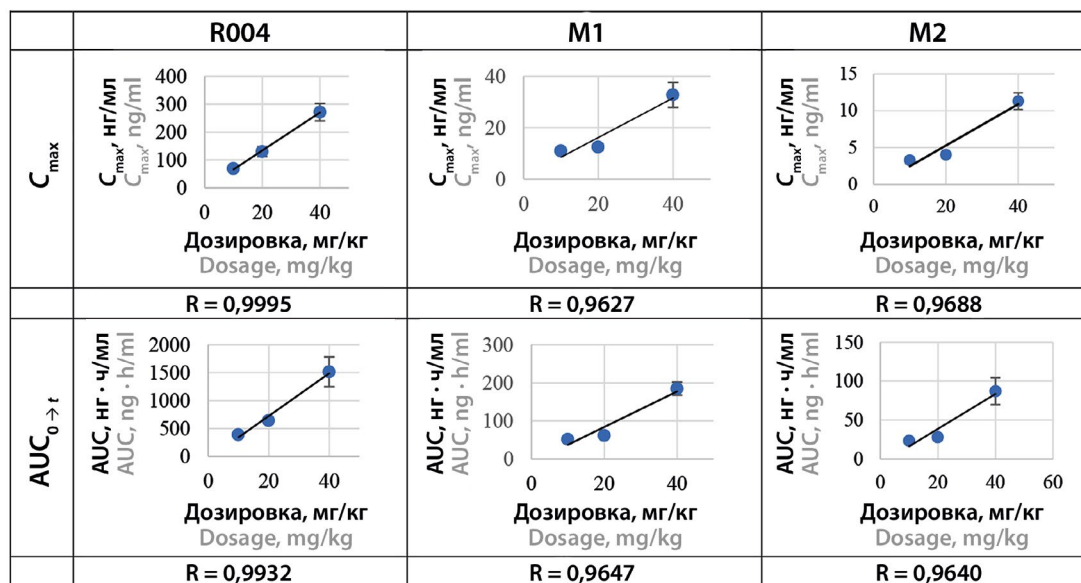


Рисунок 4. Результаты оценки линейности зависимости параметров C_{max} и $AUC_{0 \rightarrow t}$ от введенной дозы для 5-(2-бутил-5-хлоро-1H-имидазол-4-ил)-N-[4-метокси-3-(трифторметил)фенил]-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоксамида и его метаболитов (со стандартной ошибкой среднего)

Figure 4. Results of evaluation of the linearity of dependence of C_{max} and $AUC_{0 \rightarrow t}$ parameters on the administered dose for 5-(2-butyl-5-chloro-1H-imidazole-4-yl)-N-[4-methoxy-3-(trifluoromethyl)phenyl]-4,5-dihydro-1,2-oxazole-5-carboxamide and its metabolites (with standard error of mean)

Для основных метаболитов M1 и M2 также характерно наличие двух периодов нарастания концентрации, как и для действующего вещества. После введения дозы 40 мг/кг T_{max} M1 смещена к начальным точкам фармакокинетической кривой, как и у R004, а T_{max} M2 достигается в районе $3,75 \pm 0,73$ ч. Величина параметров C_{max} и $AUC_{0 \rightarrow t}$ M1 и M2 изменяется линейно при увеличении дозы (см. рисунок 4).

Таким образом, 5-(2-бутил-5-хлоро-1H-имидазол-4-ил)-N-[4-метокси-3-(трифторметил)фенил]-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоксамида и его метаболиты обладают линейной фармакокинетикой. Это позволяет использовать один уровень дозы R004 в эксперименте с многократным введением субстанции, а также хронической токсичности. Наличие энтерогепатической рециркуляции указывает на высокую липофильность изучаемого соединения и позволяет спрогнозировать высокие концентрации данного соединения в органах и тканях при исследовании распределения, а также в желчи и фекалиях при исследовании экскреции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанная биоаналитическая методика определения R004 и его метаболитов в плазме была валидирована согласно требованиям руководств ЕАЭС по проведению исследований биоэквивалентности и ICH M10. Предпринятые меры по стабилизации

позволили предотвратить гидролиз R004 после пробоотбора и обеспечили достоверность полученных данных. R004, а также его метаболиты обладают линейной фармакокинетикой в диапазоне доз от 10 мг/кг до 40 мг/кг. Так, коэффициенты корреляции параметров C_{max} и $AUC_{0 \rightarrow t}$ данных соединений превышают 0,9. Относительная биодоступность субстанции изучаемого лекарственного средства при внутрижелудочном введении по сравнению с внутривенной инъекцией составила 21,26 %. В дальнейшем планируется изучение фармакокинетики готовой лекарственной формы R004 на кроликах с использованием разработанной методики.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Scherer H. U., Häupl T., Burmester G. R. The etiology of rheumatoid arthritis. *Journal of Autoimmunity*. 2020;110:102400. DOI: 10.1016/j.jaut.2019.102400.
2. Romanycheva A. A., Korsakov M. K., Fedorov V. N., Shetnev A. A., Arshinov A. V. Prospects for innovative drugs for the treatment of rheumatoid arthritis. *Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry*. 2023;(12):55–63. (In Russ.) DOI: 10.29296/25877313-2023-12-07.
3. Kalogera S., He Y., Bay-Jensen A.-C., Gantzel T., Sun S., Manon-Jensen T., Karsdal M. A., Thudium C. S. The activation fragment of PAR2 is elevated in serum from patients with rheumatoid arthritis and reduced in response to anti-IL6R treatment. *Scientific Reports*. 2021;11(1):24285. DOI: 10.1038/s41598-021-03346-0.

4. Korsakov M. K., Fedorov V. N., Smirnov N. A., Shetnev A. A., Leonova O. V., Volkhin N. N., Andreyev A. I. Screening of anti-inflammatory activity of 4,5-dihydroisoxazol-5-carboxamide (PAR-2 inhibitors) based on formaldehyde oedema model among white lab rats. *Research Results in Pharmacology*. 2023;9(4):105–111. DOI: 10.18413/rrpharmacology.9.10061.
5. Khokhlov A. L., Yaichkov I. I., Alexeev M. A., Korsakov M. K., Shetnev A. A., Ivanovsky S. A., Volkhin N. N., Petukhov S. S., Vasilyeva E. A. Identification and synthesis of metabolites of the new 4,5-dihydroisoxazol-5-carboxamide derivate. *Research Results in Pharmacology*. 2024;10(2):83–95. DOI: 10.18413/rrpharmacology.10.482.
6. Mironov A. N., editor. Guidelines for conducting preclinical studies of drugs. Part one. Moscow: Grif i K; 2012. 944 p. (In Russ.)
7. Hu W., Zhong Z.-Y., Gao Y.-T., Ren X.-F., Liu H.-Y., Tang X.-J. Establishment of LC-MS/MS Method for Determination of GMDTC in Rat Plasma and Its Application in Pre-clinical Pharmacokinetics. *Molecules*. 2023;28(3):1191. DOI: 10.3390/molecules28031191.
8. Sun P., Xiao H., Qiu J., Cao Y., Kong J., Zhang S., Cao X. Plasma Protein Binding Rate and Pharmacokinetics of Lekethromycin in Rats. *Antibiotics*. 2022;11(9):1241. DOI: 10.3390/antibiotics11091241.
9. Yang Z., Sun Q., Wang S., Tang B., Yuan C., Wu Y., Dai J., Yang C., Wang L., Zhou Q., Wang J., Weng Q. Pharmacokinetics, tissue distribution, and plasma protein binding rate of curcumol in rats using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Frontiers in Pharmacology*. 2022;13:1036732. DOI: 10.3389/fphar.2022.1036732.
10. Xiong J., Xu Y., He S., Zhang Y., Wang Z., Wang S., Jiang H. Pharmacokinetics and bioavailability of tildipirosin in rabbits following single-dose intravenous and intramuscular administration. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 2020;43(5):448–453. DOI: 10.1111/jvp.12882.
11. Wilson S. E., Carpenter J. W., Gardhouse S., KuKanich B. Pharmacokinetics of mavacoxib in New Zealand White rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *American Journal of Veterinary Research*. 2023;84(5). DOI: 10.2460/ajvr.22.11.0196.