



УДК 547.964.4:543.53:546.11*2/*3

ФАРМАКОКИНЕТИКА ПЕПТИДА HLDF-6-AA В ОРГАНИЗМЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

© 2019 г. Ю. А. Золотарев*.,# , А. К. Дадаян* , В. С. Козик* , С. И. Шрам* , В. Н. Азев** ,
А. П. Богачук*** , В. М. Липкин*** , Н. Ф. Мясоедов*

*ФГБУН Институт молекулярной генетики РАН, Россия, 123182, Москва, пл. Курчатова, 2

**ФГБУН Филиал Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
Россия, 142290, Пущино, Московская обл., просп. Науки, 6

***ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
Россия, 117997, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая 16/10

Поступила в редакцию 13.03.2019 г.

После доработки 27.03.2019 г.

Принята к публикации 29.04.2019 г.

Изучена фармакокинетика перспективного противоопухолевого пептида HLDF-6-AA (Ac-ThrGly-GluAsnHisArg-NH₂) с использованием его равномерно меченного тритием производного. Эксперименты проводили на самцах крыс линии Вистар, мышей Balb/c и кроликов Шиншилла. Меченный тритием пептид [³H]HLDF-6-AA с молярной радиоактивностью 50 Ки/ммоль был получен реакцией высокотемпературного твердофазного каталитического изотопного обмена (ВТКИО). При внутривенном болюсном введении пептида HLDF-6-AA крысам и кроликам получены характеристики его фармакокинетического профиля в крови и рассчитаны значения основных фармакокинетических параметров пептида HLDF-6-AA и его активного метаболита HisArg-NH₂. Показано, что показатели времени пребывания в организме и скорости элиминации пептидов HLDF-6-AA и HisArg-NH₂ у крыс и кроликов близки и для крыс составляют около 7 и 21 мин соответственно. Показано, что многократное введение препарата не приводит к изменению его закономерной кумуляции и не вызывает изменения его фармакокинетики в сравнении с однократным введением. В экспериментах на крысах доказана линейность зависимости фармакокинетических параметров от количества вводимого пептида в интервале 2–22 мг/кг. В результате исследования распределения пептида HLDF-6-AA и его метаболита HisArg-NH₂ между кровью и периферическими тканями мышей показано, что максимальная концентрация пептида HLDF-6-AA наблюдается в тканях почек и несколько меньшая – в салынках. Обнаружено, что через 15–20 мин после внутривенного введения HLDF-6-AA мышам, концентрация пептида HisArg-NH₂ начинает превышать концентрацию пептида HLDF-6-AA, что обусловлено его большей устойчивостью к протеолитическому гидролизу. Наибольшая концентрация пептида HisArg-NH₂ наблюдается в тканях почек и печени.

Ключевые слова: HLDF-6 пептид, фармакокинетика, метаболизм, пептиды, меченные тритием

DOI: 10.1134/S0132342319050178

ВВЕДЕНИЕ

К числу важнейших медико-социальных проблем современности относятся онкологические заболевания, являющиеся одной из основных причин смертности и инвалидизации населения в России и зарубежных странах. В настоящее время в мире наблюдается большой рост числа раковых заболеваний. В России, например, число пациентов с впервые диагностируемыми злокачествен-

ными новообразованиями увеличивается ежегодно на 2–3% и составляет на данный момент 550–600 тыс. человек.

Внимание многих исследователей сосредоточено сейчас на препаратах, вызывающих дифференцировку клеток, поскольку патогенез многих злокачественных опухолей связан с отклонениями в нормальной клеточной дифференцировке. Достоинством данного подхода является то, что эти вещества способны вызывать регрессию опухоли через активацию естественного механизма ингибирования роста клеток в результате индукции их дифференцировки. Одним из таких перспективных белков является фактор дифференцировки HLDF (Human Leukemia Differentiation Factor) – гликозилированный белок с молекуляр-

Сокращения: СВ – спилловер-водород; ВТКИО – высокотемпературный твердофазный каталитический изотопный обмен; HLDF – фактор дифференцировки лейкоцитов; HLDF-6-AA – *N*-ацетил *C*-амидпептида ThrGlyGlu-AsnHisArg; HFBA – гептафтормасляная кислота.

Автор для связи (тел.: +7(499)196-02-13; факс: +7(499) 196-02-21; эл. почта: zolya@img.ras.ru).

ной массой 8.2 кДа. Фактор HLDF вызывает дифференцировку исходных клеток HL-60 по гранулоцитарному пути и обнаруживается в организме человека в норме и при патологии [1, 2]. При изучении фактора был идентифицирован шестичленный пептидный фрагмент (HLDF-6), сохраняющий способность полноразмерного фактора индуцировать дифференцировку с сопутствующей остановкой клеточной пролиферации на клетках HL-60 [3].

Одним из специфических осложнений большинства средств противоопухолевой терапии является нейротоксичность. Особенно страдают системы, функционирование которых связано с высокой пролиферативной активностью клеток – костного мозга, иммунной системы, слизистых оболочек, а также центральной нервной системы. В экспериментах на культурах клеток и животных моделях было показано, что пептид HLDF-6 обладает как противоопухолевым, так и нейропротекторным действием [4–7]. В процессе исследования механизма фармакологического действия пептида было показано, что функциональной мишенью специфического фармакологического эффекта пептида HLDF-6 являются NMDA-рецепторы. Хроническое введение *C*-амидной формы пептида HLDF-6 нормализовало плотность NMDA-рецепторов, пониженную в результате патологии [8]. Показано, что специфическая нейропротекторная активность пептида HLDF-6 на модели болезни Альцгеймера связана со стимуляцией нейростероидогенеза, подавлением экспрессии 5-альфа-редуктазы и восстановлением уровней тестостерона, дигидротестостерона и эстрадиола [9].

В ходе разработки нового фармацевтического препарата с противоопухолевой и нейропротекторной активностью была исследована фармакокинетика наиболее устойчивого к протеолизу в организме экспериментальных животных ацетил-амидного производного пептида HLDF-6 (Ac-ThrGlyGluAsnHisArg-NH₂, HLDF-6-AA) и его фрагментов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В соответствии с общепринятыми представлениями выбор дозы фармакологического средства осуществляется по данным его фармакодинамики у животных. Млекопитающие с разной массой имеют, по данным фармакодинамики, разную минимальную эффективную дозу. Вместе с тем принимается, что минимальная эффективная доза, отнесенная к площади поверхности тела, у млекопитающих с различной массой одинакова. Масса и площадь поверхности тела связаны между собой нелинейной зависимостью. Это приводит к тому, что минимальная эффективная доза, отнесенная к единице массы животного, снижается по мере увеличения массы животного. Фармакокинетика пептида в крови исследовалась при однократном введении крысам, кроликам и

мышам в дозах, близких к минимальной эффективной дозе для этих животных. Кроликам, крысам, и мышам пептид вводился болюсно в дозах 2.5, 12 и 13 мг/кг соответственно.

Фармакокинетика пептида HLDF-6-AA при внутривенном болюсном введении кроликам. Для анализа фармакокинетики пептида HLDF-6-AA, самцам кроликов ввели 2000 мкКи меченного тритием пептида [³H]HLDF-6-AA в дозе 2.5 мг/кг. Хроматографические фракции, соответствующие пептиду HLDF-6-AA, а также его долгоживущему фрагменту HisArg-NH₂, собирали и анализировали с помощью жидкостного сцинтилляционного счета (рис. 1).

Для хроматографических фракций, соответствующих меченным тритием фрагментам пептидов ThrGlyGluAsnHisArg-NH₂ и GluAsnHisArg-NH₂, не было обнаружено достоверного превышения радиоактивности над фоном элюента. На этом основании был сделан вывод о том, что эти пептидные фрагменты не являются продуктами основного пути протеолитического гидролиза пептида Ac-ThrGlyGluAsnHisArg-NH₂.

По результатам хроматографического анализа (рис. 1) определяли радиоактивную концентрацию пептида HLDF-6-AA и его фрагмента HisArg-NH₂, образующегося под действием пептидаз, и рассчитывали объемную концентрацию пептидов в крови. Фармакокинетические кривые (“концентрация пептида–время”) для расчета фармакокинетических параметров были построены по усредненным значениям концентраций пептидов в крови, полученным из данных для каждой временной точки шести животных. Полученные этим методом фармакокинетические кривые пептидов HLDF-6-AA и HisArg-NH₂ в крови самцов кроликов приведены на рис. 2.

Кинетика HLDF-6-AA и HisArg-NH₂ в крови наилучшим образом формализуется в рамках однокамерной модели и математически описывается уравнениями однокомпонентной экспоненты:

$$C_t = a + C_0 \exp(-\alpha t), \quad C_t = C_0 \exp(-\beta t),$$

соответственно, где C_t – концентрация пептида в момент времени t , C_0 – кажущаяся концентрация пептида в начальный момент времени, C_0 , α и β – гибридные константы интегральных уравнений.

Для полученных фармакокинетических кривых был проведен расчет основных фармакокинетических параметров (C_0 , $T_{1/2}(el)$, Kel , MRT , V_1 , Cl , $AUC(0-\infty)$) пептида HLDF-6-AA в крови кроликов с использованием программ для анализа фармакокинетических данных (табл. 1). Полученные данные указывают на то, что пептид HLDF-6-AA характеризуется быстрым выведением из крови кроликов, обусловленным его быстрой биодеградацией. Установлено, что время полувыведения пептида HLDF-6-AA из крови кролика составляет около 5 мин.

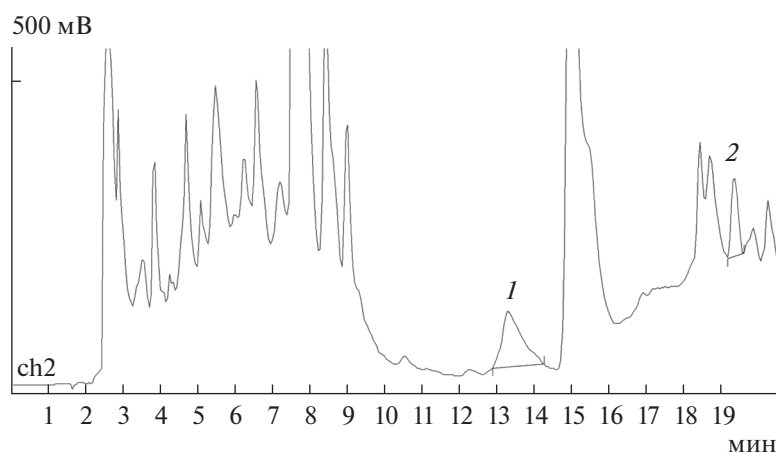


Рис. 1. Хроматографический анализ меченных тритием пептидов, содержащихся в 200 мкл конечного экстракта образца крови кролика после введения животному 2 мКи пептида [^3H]HLDF-6-AA, в дозе 2.5 мг/кг в присутствии 10 мкг HisArg-NH₂ (1) и 10 мкг HLDF-6-AA (2). Колонка Кромасил С18, 5 мкм, 4 × 150 мм, элюция в градиенте концентрации метанола в 0.1% HFBA, скорость элюции 0.8 мл/мин; УФ-детекция 220 нм, 1.0 А (Ch 2).

Фармакокинетика пептида HLDF-6-AA при внутривенном болюсном введении крысам. Для анализа фармакокинетики пептида HLDF-6-AA, самцам крыс ввели 400 мКи меченного тритием пептида HLDF-6-AA в дозе 12 мг/кг. Хроматографические фракции, соответствующие пептиду HLDF-6-AA, а также его пептидному фрагменту HR-NH₂, собирали и анализировали с помощью жидкостного сцинтилляционного счета. Фармакокинетические кривые для расчета фармакокинетических параметров представлены на рис. 3. Исходя из полученных результатов, был проведен расчет фармакокинетических параметров пептида HLDF-6-AA в крови крыс, которые представлены в табл. 2.

Установлено, что среднее время пребывания пептида HLDF-6-AA в крови крысы составляет около 7 мин, а для продукта его деградации — пептида HisArg-NH₂, этот параметр составляет около 21 мин. У кролика значения времени выведения обоих пептидов из крови близки показателям, найденным для крысы. Можно отметить, что HisArg-NH₂ характеризуется меньшей скоростью элиминации из крови, чем введенный пептид.

То есть в случае пептида HLDF-6-AA проявлялось явное отклонение от классической экспоненты. Экспонента описывает изменение, имеющее первый порядок по концентрации субстрата. Через 30 и 60 мин наблюдалось положительное отклонение концентрации от линейной зависимости логарифма концентрации пептида HLDF-6-AA от времени, что свидетельствует о наличии некоторого небольшого медленно выводящегося из крови пула пептида. Можно предположить, что это пул пептида, задерживался в клеточных элементах крови, в которых HLDF-6-AA (в отличие от HisArg-NH₂) накапливался и, по всей веро-

ятности, деградировал заметно медленнее, чем в плазме.

Обнаружено, что зависимость соотношения пептидов HisArg-NH₂ и HLDF-6-AA от времени в крови кролей и крыс хорошо совпадают и математически аппроксимируются уравнением гиперболы (рис. 4). Наблюдаемый характер зависимости указывает на то, что в крови кролей и крыс фрагмент HisArg-NH₂ образуется непосредственно из исходного пептида. При этом полученные результаты еще раз подтверждают сделанный вы-

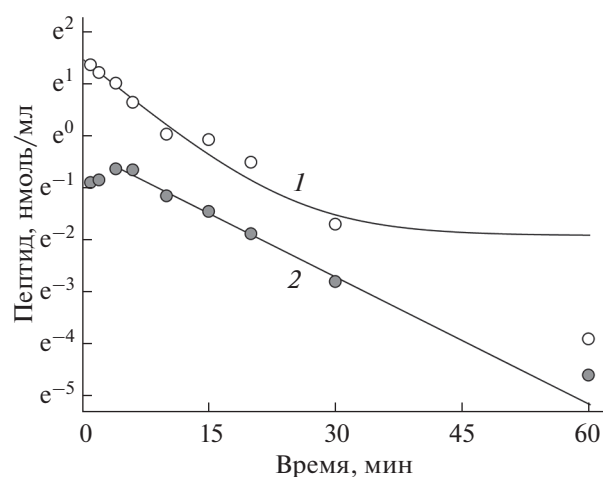


Рис. 2. Изменение во времени концентрации пептидов HLDF-6-AA (1) и HisArg-NH₂ (2) в крови кроликов после внутривенного болюсного введения в дозе 2.5 мг/кг. Данные представлены в полулогарифмических координатах. Точками обозначены экспериментальные данные, сплошной линией — расчетные значения, полученные в результате наилучшего приближения к экспериментальным данным с помощью нелинейной регрессии.

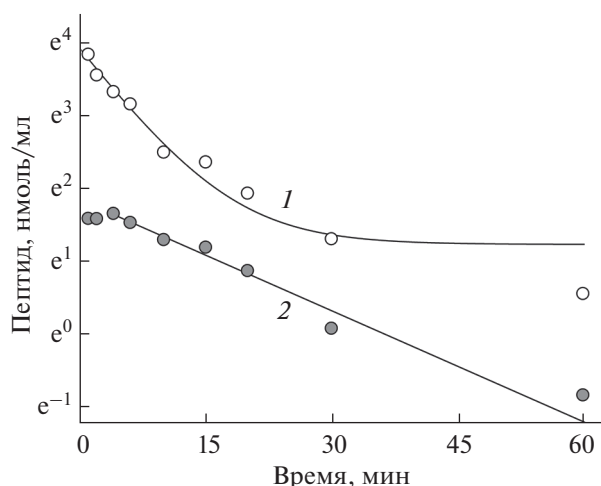


Рис. 3. Изменение концентрации пептидов HLDF-6-AA (1) и HisArg-NH₂ (2) в крови крыс после внутривенного болюсного введения в дозе 12 мг/кг. Данные представлены в полулогарифмических координатах. Точками обозначены экспериментальные данные, сплошной линией — расчетные значения, полученные в результате наилучшего приближения к экспериментальным данным с помощью нелинейной регрессии.

ше вывод о близких скоростях элиминации HLDF-6-AA и HisArg-NH₂ из организма кролика и крысы, что во многом определяется близкими активностями пептидаз, участвующими в метаболизме HLDF-6-AA и HisArg-NH₂ в тканях этих животных.

Проверка гипотезы линейности фармакокинетических параметров. В соответствии с рекомендациями по проведению доклинических исследований, была проверена гипотеза линейности дозовой зависимости фармакокинетики пептидного препарата HLDF-6-AA в крови самцов крыс Вистар при внутривенном болюсном введении [10]. Проверка этой гипотезы является важнейшим элементом фармакокинетического анализа, т.к. позволяет оценить предсказуемость изменений концентрации (C) в ответ на изменение дозы (D) фармакологического средства. Гипотеза принимается, если значения параметров фармакокинетики не зависят от дозы. Как правило, гипотеза линейности проверяется применительно к фармакокинетическим профилям фармакологического средства в крови.

С этой целью определяли концентрацию пептида HLDF-6-AA в крови крыс после введения меченого пептида в дозах 2, 12 и 22 мг/кг. Для анализа фармакокинетики пептида HLDF-6-AA, самцам крыс ввели 400 мкКи пептида [³H]HLDF-6-AA в 400 мкл физиологического раствора, содержащего соответствующую дозу пептида HLDF-6-AA. Хроматографические фракции, соответствующие пептиду HLDF-6-AA и его пептидному фрагменту HisArg-NH₂, собирали по

данным УФ-детекции и анализировали с помощью жидкостного сцинтилляционного счета. По результатам этого анализа определяли дозовую зависимость фармакокинетических параметров пептида HLDF-6-AA и его пептидного фрагмента HisArg-NH₂ в крови крысы.

Для проверки гипотезы линейности был проведен анализ дозозависимых (по определению) фармакокинетических параметров: AUC(0-∞) и C₀ от дозы. Расчеты показывают, что все вышеперечисленные фармакокинетические параметры прямо пропорционально зависели от использованной дозы пептида (рис. 5). В то же время значения ряда время-зависимых (MRT, Kel, T_{1/2}(el)) и объем-зависимых (Cl, V_l) параметров, полученные для разных доз пептида, существенно не различались (данные не приводятся). Это указывает на то, что только дозо-зависимые фармакокинетические параметры демонстрировали четкую линейную зависимость при изменении дозы пептида в диапазоне от 2 до 22 мг/кг. Вывод о линейности фармакокинетики HLDF-6-AA в крови крыс при внутривенном болюсном введении был сделан на основании найденных линейных зависимостей фармакокинетических параметров AUC(0-∞) и C₀ от дозы (рис. 5).

Фармакокинетическое исследование при многократном введении пептида HLDF-6-AA необходимо сопоставить с данными его фармакокинетики, полученными после однократного введения. Целью сравнения результатов фармакокинетических исследований при многократном и однократном введении является выявление возможных нарушений в закономерной кумуляции фармакологического средства. При многократном введении достаточно использовать один уровень дозы, установленной при фармакологических исследованиях [10]. Для анализа влияния длительного хронического введения пептида HLDF-6-AA на его фармакокинетическое поведение было проведено сравнительное исследование на двух группах крыс. Крысам лечебной группы в течение 28 дней внутрибрюшинно вводили 400 мкл физиологического раствора, содержащего пептид HLDF-6-AA в дозе 12 мг/кг, в контрольной группе, в том же объеме, вводился физиологический раствор. По истечении 28-дневного срока, животным этих двух групп внутривенно ввели 400 мкКи меченого тритием пептида [³H]HLDF-6-AA в дозе 12 мг/кг. Через определенные промежутки времени кровь отбирали и готовили пептидный экстракт для хроматографического анализа по приведенной методике.

Было установлено, что профили зависимостей концентрации пептида от времени для животных, подвергнутых хроническому и однократному введению пептида, статистически не отличаются друг от друга. Хроническое введение пептида HLDF-6-AA самцам крыс не приводит к изменениям его метаболизма и выведения из организма,

Таблица 1. Расчетные значения фармакокинетических параметров HLDF-6-AA и HisArg-NH₂ в крови кролика (однократное внутривенное болюсное введение HLDF-6-AA в дозе 2.5 мг/кг)

Параметр*	HLDF-6-AA	HisArg-NH ₂
<i>D</i> , нмоль	6870	—
мкг	5180	—
<i>C</i> ₀ , нмоль/мл	4.31	—
мкг/мл	3.25	—
<i>T</i> _{1/2(el)} , мин	5.11	8.30
<i>K</i> _{el} , мин ⁻¹	0.136	0.084
MRT мин	7.37	11.97
Cl, л/мин	0.210	—
<i>V</i> ₁ , л	1.549	—
AUC(0-∞), (нмоль/мл)мин	31.7	8.30
(мкг/мл)мин	23.9	2.58
<i>r</i> ²	0.9890	0.9858

* Пояснение параметров см. экспериментальную часть.

что указывает на отсутствие кумулятивных и “истощающих” эффектов хронического введения пептида на фармакокинетику. Таким образом, многократное введение препарата не приводит к изменению его закономерной кумуляции и не вызывает изменения фармакокинетики пептида HLDF-6-AA в сравнении с однократным введением. Пептид HLDF-6-AA при многократном внутривенном болюсном введении крысам не вызывает токсических эффектов, является безопасным и может быть рекомендован для проведения дальнейших исследований.

Таблица 2. Расчетные значения фармакокинетических параметров для HLDF-6-AA и HisArg-NH₂ в крови крысы (однократное внутривенное болюсное введение HLDF-6-AA в дозе 12 мг/кг)

Параметр	HLDF-6-AA	HR-NH ₂
<i>D</i> , нмоль	3340	—
мкг	2520	—
<i>C</i> ₀ , нмоль/мл	49.3	—
мкг/мл	37.2	—
<i>T</i> _{1/2(el)} , мин	4.57	14.79
<i>K</i> _{el} , мин ⁻¹	0.152	0.047
MRT мин	6.59	21.35
Cl, л/мин	8.31 × 10 ⁻³	—
<i>V</i> ₁ , л	54.7 × 10 ⁻³	—
AUC(0-∞), (нмоль/мл)мин	325	124.7
(мкг/мл)мин	245	38.7
<i>r</i> ²	0.9831	0.9863

Обозначения см. в экспериментальной части и табл. 1.

Фармакокинетика пептида HLDF-6-AA при внутрибрюшинном болюсном введении мышам. В этом комплексном исследовании фармакокинетики наряду с крысами и кроликами были использованы линейные мыши Balb/c. Был проведен анализ фармакокинетики пептида HLDF-6-AA и его дипептидного фрагмента HisArg-NH₂ крови и некоторых органах мыши при внутрибрюшинном введении пептида. Полученные результаты приведены в табл. 3.

Из приведенных в этой таблице данных можно видеть, что максимальная концентрация пептида HLDF-6-AA в крови наблюдается через 6 мин после внутрибрюшинного введения. Можно также видеть, что максимальное накопление пептида HLDF-6-AA наблюдается в тканях почек и несколько меньшая – в сальниках. Найдено, что через 15–20 мин после введения, концентрация пептида HisArg-NH₂ начинает превышать концентрацию исходного пептида HLDF-6-AA, что отражает большую устойчивость фрагментарного пептида к протеолитическому гидролизу. Наибольшая концентрация пептида HisArg-NH₂ наблюдается в тканях почек и печени. Показано, что пептид HLDF-6-AA способен преодолевать гематоэнцефалический барьер. Его динамически изменяющаяся концентрация в мозге примерно в 20–30 раз меньше концентрации пептида HLDF-6-AA в крови на этот момент.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Экспериментальные животные

Для исследований использовали 30 здоровых половозрелых крыс-самцов линии Вистар возрастом 8 недель, весом 200 ± 20 г; 36 самцов мышей линии Balb/c возрастом 6–7 недель, весом

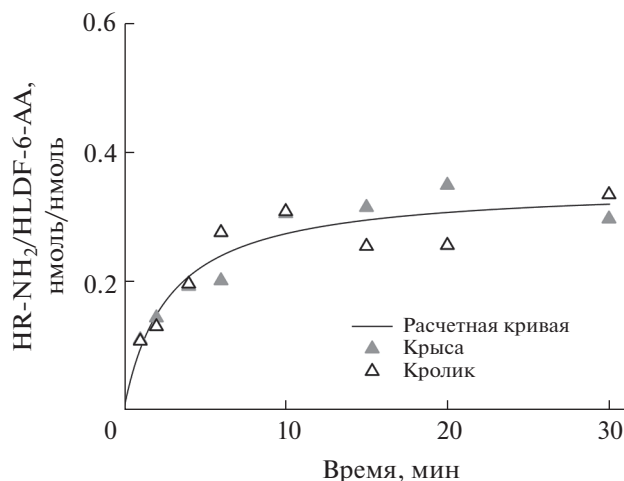


Рис. 4. Отношение концентраций HLDF-6-AA и продукта его протеолитического гидролиза – дипептида HisArg-NH₂ в крови крыс и кроликов после внутривенного болюсного введения в дозе 12 и 2.5 мг/кг соответственно.

20 ± 1 г; и 5 самцов кроликов породы Шиншилла возрастом 12 недель, весом 2000 ± 200 г. Содержание животных соответствовало действующим санитарным правилам по обустройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник. Стандартная лабораторная диета соответствовала действующим нормам. Крысы и мыши содержались по 4 в клетке в условиях свободного доступа к воде и корму при температуре 21°C и постоянном световом дне 14 ч (включение света в 8 ч утра). Факторы внешней среды (температура, влажность, освещенность, состав подстилки) соответствовали требованиям по содержанию лабораторных животных. Исследование выполнялось согласно “Правилам лабораторной практики в Российской Федерации” [11], а также рекомендациям, изложенным в “Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств” [10], и в соответствии с международными требованиями по правилам GLP FDA и GLP OECD на лабораторных животных (экспериментальных биомоделях) SPF-статуса (свободные от патогенной флоры). Лабораторные животные SPF-статуса производились в Питомнике лабораторных животных ФИБХ РАН, который имеет международную аккредитацию AAALAC. Система управления качеством производства лабораторных животных в Питомнике сертифицирована на соответствие международным требованиям ИСО 9001:2008. Все процедуры в исследовании выполнялись согласно утвержденным Комиссией по гуманному обращению с животными протоколам.

Твердофазный синтез пептида HLDF-6-AA и его фрагментов ThrGlyGluAsnHisArg-NH₂, GluAsnHisArg-NH₂ и HisArg-NH₂ был осуществлен с использованием Boc/Bzl-методологии и схемы непол-

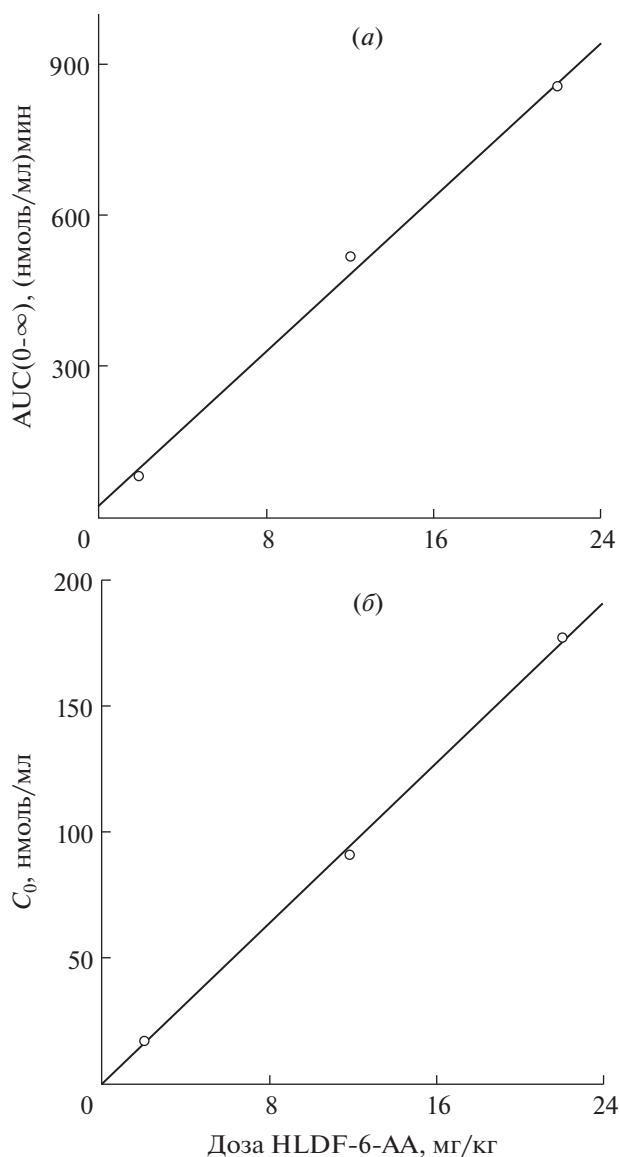


Рис. 5. Зависимость величины AUC(0-∞) (а) и C₀ (б) от дозы пептида HLDF-6-AA при внутривенном болюсном введении крысам.

ного блокирования боковых функций аминокислот [12].

Меченный тритием пептид [³H]HLDF-6-AA для фармакокинетических исследований получали с использованием реакции ВТКИО с газообразным тритием при температуре 170°C в твердой смеси, образованной немеченым пептидом, нанесенным на карбонат кальция, и высокодисперсным катализатором 5% палладий-на-карбонате кальция. В исследовании фармакокинетики был использован меченый пептид [³H]HLDF-6-AA с молярной радиоактивностью 50 Ки/ммоль, содержащий фрагмент [³H]HisArg-NH₂ с молярной радиоактивностью 29 Ки/ммоль [12].

Таблица 3. Изменение концентрации пептидов HLDF-6-AA и HisArg-NH₂ в тканях мышей Balb/c через 2–20 мин после внутрибрюшинного введения пептида HLDF-6-AA в дозе 13 мг/кг

Время, мин	Кровь	Мозг	Почки	Печень	Сердце	Сальник
HLDF-6-AA, нмоль/мл						
2	2.8 ± 0.5	0.09 ± 0.03	10.7 ± 1.9	4.3 ± 0.8	1.4 ± 0.4	3.6 ± 0.5
4	6.9 ± 0.8	0.16 ± 0.04	8.8 ± 1.2	3.7 ± 0.7	5.5 ± 0.6	7.9 ± 1.5
6	12.3 ± 1.8	0.21 ± 0.05	10.5 ± 1.6	4.1 ± 0.9	5.8 ± 0.7	9.3 ± 1.6
10	6.8 ± 0.8	0.31 ± 0.07	9.4 ± 1.2	3.1 ± 0.6	3.6 ± 0.5	5.2 ± 0.7
15	3.4 ± 0.4	0.16 ± 0.03	5.2 ± 0.7	2.8 ± 0.5	1.5 ± 0.3	4.9 ± 0.6
20	1.4 ± 0.3	0.05 ± 0.02	3.7 ± 0.5	1.1 ± 0.3	1.3 ± 0.4	2.4 ± 0.5
HisArg-NH ₂ , нмоль/мл						
2	0.9 ± 0.2	0.05 ± 0.02	3.6 ± 0.9	1.2 ± 0.4	0.7 ± 0.2	4.1 ± 0.6
4	3.3 ± 0.6	0.09 ± 0.03	7.9 ± 1.3	4.6 ± 0.9	2.4 ± 0.3	1.6 ± 0.4
6	6.0 ± 0.9	0.11 ± 0.03	12.4 ± 1.9	6.9 ± 1.6	3.6 ± 0.5	1.7 ± 0.4
10	5.2 ± 0.6	0.17 ± 0.04	8.9 ± 1.1	4.7 ± 0.8	4.8 ± 0.6	3.7 ± 0.5
15	3.5 ± 0.5	0.06 ± 0.02	8.2 ± 0.9	2.1 ± 0.5	1.6 ± 0.3	0.8 ± 0.2
20	1.5 ± 0.3	0.06 ± 0.02	5.8 ± 0.8	2.1 ± 0.5	1.3 ± 0.4	0.42 ± 0.1

Примечание: Значения концентраций пептидов представлены в виде среднее ± ошибка среднего ($\bar{x} \pm S\bar{x}$). Мышам вводилось по 260 мкг HLDF-6-AA, включая 50 мкКи [³H]HLDF-6-AA; средняя масса мышей – 0.020 кг.

Введение животным пептидов и отбор крови.

В экспериментах на кроликах введение пептида и отбор крови осуществляли через большие ушные вены. Кроликов фиксировали в ящике с отверстием для головы. В правое ухо, через большую ушную вену, инсулиновым шприцом вводили 0.8 мл раствора гепарина (5000 МЕ/мл; ФГУП “Московский эндокринный завод”) и через 5 мин в большую ушную вену левого уха устанавливали внутривенный катетер Flexicath G22, через который в дальнейшем осуществляли отбор крови. Пептид [³H]HLDF-6-AA (2 мКи, в дозе 2.5 мг/кг) вводили инсулиновым шприцом в правую ушную вену и через фиксированные промежутки времени (2, 4, 6, 10, 15, 20 и 30 мин) через катетер отбирали примерно по 1 мл венозной крови. Кровь собирали во взвешенные пластиковые пробирки и замораживали жидким азотом.

В экспериментах на крысах введение пептида (внутривенный способ введения) и отбор крови осуществляли через яремные вены. Крыс анестезировали хлоралгидратом (300 мг/кг), и через 5–10 мин с вентральной стороны в области, прилегающей к грудным конечностям и шее, удаляли шерсть и делали два продольных разреза кожи (справа и слева) длиной около 3 см, и препарировали яремные вены. В левую яремную вену устанавливали внутривенный катетер Flexicath G24 и вводили через него 80 мкл гепарина. Затем в правую яремную вену устанавливали катетер Flexicath G22 для отбора крови. Раствор пептида [³H]HLDF-6-AA (400 мкКи) в дозах, 2, 12 и 22 мг/кг, в объеме 200 мкл физиологического раствора вводили в левую яремную вену в течение 10–15 с. После чего, по истечении определенного времени (2, 4, 6, 10, 15, 20 и 30 мин), из правой

яремной вены отбирали примерно по 0.5 мл венозной крови. Забор крови осуществляли, как описано выше, с использованием внутривенного катетера. Кровь собирали во взвешенные пластиковые пробирки и замораживали жидким азотом.

В экспериментах на мышах введение меченого пептида [³H]HLDF-6-AA (25 мкКи) осуществляли внутрибрюшинно в дозе 13 мг/кг. Животных декапитировали по окончании определенного протокола времени, кровь и исследуемые ткани собирали во взвешенные пластиковые пробирки и замораживали жидким азотом.

Подготовка проб тканей и анализ фармакокинетики пептида [³H]HLDF-6-AA. При приготовлении тканей для ВЭЖХ анализа, замороженные и взвешенные образцы проб тканей в пластиковых пробирках подвергались лиофильной сушке в течение 2 сут. Лиофильно высушенные образцы тканей прогревали при 65°C в течение 30 мин, после чего измельчали и проводили экстракцию 90% водным ацетонитрилом, содержащим 1% TFA [13]. В водно-ацетонитрильный раствор, использованный для экстракции, добавляли по 10 мкг синтезированных пептидов Ac-ThrGly-GluAsnHisArg-NH₂, ThrGlyGluAsnHisArg-NH₂, GluAsnHisArg-NH₂ и HisArg-NH₂, предназначенных для идентификации фракций при хроматографии.

Количественный анализ пептидов проводили с помощью ВЭЖХ на колонке Kromasil C18, 8 × 150 мм в градиенте концентрации метанола (0–40%), присутствии 0.08% TFA и 0.02% HFBA (гептафтормасляная кислота). Фракции, содержащие пептиды Ac-ThrGlyGluAsnHisArg-NH₂, ThrGlyGluAsnHisArg-NH₂, GluAsnHisArg-NH₂ и

HisArg-NH₂, собирали и в них проводили определение радиоактивности с помощью жидкостного сцинтилляционного счета. Расчет фармакокинетических параметров производили с использованием внемоделльного подхода. Для этого применяли специальную некоммерческую программу для анализа фармакокинетических данных Borgia 1.03 (НПП “Наука Плюс”), а также программу SigmaPlot 11.0 (Systat Software, USA). Фармакокинетические кривые (“концентрация пептида–время”) для расчета фармакокинетических параметров были построены по усредненным значениям концентраций пептидов HLDF-6-AA и HisArg-NH₂ в крови, полученным из данных для 6 животных. Экспериментальные данные аппроксимировали экспоненциальной зависимостью и рассчитывали оптимальные параметры уравнения (макроконстанты) методом наименьших квадратов. С использованием полученных значений параметров уравнения экспоненты рассчитывали основные фармакокинетические параметры:

AUC(0-∞) – площадь под фармакокинетической кривой “концентрация–время”;

Cl – общий клиренс; отражающий объем тест-ткани, освобождающийся от фармакологического средства в единицу времени, определяется отношением дозы к площади под кривой “концентрация–время” (AUC, в пределах от нуля до бесконечности): $Cl_T = D/AUC$

C₀ – расчетное значение концентрации вещества в крови в начальный момент времени, определяется на участке моноэкспоненциальной зависимости фармакокинетической кривой;

T_{1/2}(el) – время полувыведения вещества из крови, это период времени, в течение которого концентрация фармакологического средства снижается вдвое. Величина T_{1/2} может быть рассчитана по формуле: $T_{1/2} = 0.693/\lambda$, где λ – показатель экспоненты, характеризующий скорость снижения концентрации препарата на конечном (моноэкспоненциальном) участке фармакокинетической кривой;

K_{el} – константа скорости выведения вещества из крови;

MRT – среднее время пребывания фармакологического соединения в крови. Величина MRT может быть рассчитана по формуле: $MRT = AUMC/AUC$, где AUMC – площадь под кривой “произведение времени на концентрацию фармакологического средства (t × C)”;

V₁ – кажущийся объем распределения вещества в центральной камере;

r² – коэффициент детерминации.

Все полученные количественные данные были подвергнуты статистическому анализу. В таблицах все количественные показатели приведены в виде среднее ± стандартное отклонение.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С целью создания высокоактивного и низко-токсичного пептидного препарата с противоопухолевой и нейропротекторной активностью выполнено исследование фармакокинетики в организме экспериментальных животных пептида HLDF-6-AA на самцах ряда лабораторных животных: крыс линии Вистар, мышей Balb/c и кроликов породы Шиншилла. Определена зависимость концентрации пептида HLDF-6-AA и его основного метаболита HisArg-NH₂ в крови и в различных органах лабораторных животных от времени после введения пептида. Рассчитаны значения основных фармакокинетических параметров пептида HLDF-6-AA в крови кролика и крысы при однократном внутривенном болюсном введении. Продемонстрирована линейная зависимость дозозависимых фармакокинетических показателей от количества внутривенно введенного крысам пептида HLDF-6-AA. На мышах изучен метаболизм и распределение пептида HLDF-6-AA и его основного долгоживущего метаболита HisArg-NH₂ между кровью и периферическими тканями при внутрибрюшинном введении.

БЛАГОДАРНОСТИ.

Работа поддержана Программой фундаментальных исследований Президиума РАН “Структурно-функциональное исследование эндогенных пептидов – основа создания новых фармакологически важных препаратов” № госрегистрации 01201353020.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований.

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kostanyan I.A., Astapova M.V., Starovoytova E.V., Dranitsyna S.M., Lipkin V.M. // FEBS Letters. 1994. V. 356 (2–3). P. 327–329.
2. Соснина А.В., Морозов Д.В., Вараксин Н.А., Вонаршенко А.В., Байдакова Л.К., Аутиенилюс А.И., Липкин В.М. // ДАН. 2014. Т. 454 (5). С. 603–605.
3. Костянян И.А., Астапова М.В., Наволоцкая Е.В., Лепихова Т.Н., Драницина С.М., Телегин Г.Б., Родионов И.Л., Байдакова Л.К., Золотарев Ю.А., Молотковская И.М., Липкин В.М. // Биоорган. химия. 2000. Т. 26 (7). С. 505–511. [Kostanyan I.A., Astapova M.V.,

- Navolotskaya E.V., Lepikhova T.N., Dranitsyna S.M., Telegin G.B., Rodionov I.L., Baidakova L.K., Zolotarev Yu.A., Molotkovskaya I.M., Lipkin V.M.* // *R. J. Bioorg. Chem.* 2000. V. 26. P. 505–511.]
4. *Батенева А.В., Бабенко О.А., Даниленко Е.Д., Порываев В.Д., Карпышев Н.Н., Гончарова Е.П., Костанян И.А., Масычева В.И.* // *Эксп. клин. фармакол.* 2010. Т. 73 (2) С. 21. [*Bateneva A.V., Babenko O.A., Danilenko E.D., Poryvaev V.D., Karpyshev N.N., Goncharova E.P., Kostanyan I.A., Masycheva V.I.* // *Eksp. Klin. Farmakol.* V. 73. № 2. P. 18–21.]
 5. *Костанян И.А., Сторожева З.И., Семенова Н.А., Липкин В.М.* // *Доклады академии наук.* 2009. Т. 428 (4). С. 418–422. [*Kostanyan I.A., Storozheva Z.I., Semenova N.A., Lipkin V.M.* // *Doklady Biol. Sci.* 2009. V. 428. P. 418–422.]
 6. *Sewell R.D., Gruden M.A., Pache D.M., Storozheva Z.I., Kostanyan I.A., Proshin A.T., Yurasov V.V., Sherstnev V.V.* // *J. Psychopharmacol.* 2005. V. 19. P. 602–608.
 7. *Bogachouk A.P., Storozheva Z.I., Solovjeva O.A., Sherstnev V.V., Zolotarev Yu.A., Azev V.N., Rodionov I.L., Surina E.A., Lipkin V.M.* // *J. Psychopharmacol.* 2016. V. 30. 78–92.
 8. *Zolotarev Yu.A., Kovalev G.I., Kost N.V., Voevodina M.E., Sokolov O.Y., Dadayan A.K., Kondrakhin E.A., Vasileva E.V., Bogachuk A.P., Azev V.N., Lipkin V.M., Myasoedov N.F.* // *J. Psychopharmacol.* 2016. V. 30. (9). P. 922–935.
 9. *Rzhevsky D.I., Zhokhov S.S., Babichenko I.I. Goleva A.V., Goncharenko E.N., Baizhumanov A.A., Murashev A.N., Lipkin V.M., Kostanyan I.A.* // HLDF-6 peptide affects behavioural reactions and organism functions dependent on androgen hormones in normal and castrated male mice // *Regul. Pept.* 2005. V. 127. P. 111–121.
 10. *Миронов А.Н. Бунятян Н.Д., Васильев А.Н.* Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / Под ред. Миронова А.Н. Часть первая. М.: Гриф и К., 2012. С. 944. [*Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv* / Ed by Mironov A.N. Moscow: Grif i K., 2012. (In Russ.).]
 11. Национальный стандарт Российской Федерации, ГОСТ Р 53434. 2009. [Natsional'nyi standart Rossiiskoi federatsii, GOST R 53434. 2009. (In Russ.).]
 12. *Золотарев Ю.А., Дадаян А.К., Козик В.С., Шрам С.И., Нагаев И.Ю., Азев В.Н., Богачук А.П., Липкин В.М., Мясоедов Н.Ф.* // *Биоорганическая химия.* (2019, готовится к печати).
 13. *Золотарев Ю.А., Дадаян А.К., Кост Н.В., Воеводина М.Э., Соколов О.Ю., Козик В.С., Шрам С.И., Азев В.Н., Боcharов Э.В., Богачук А.П., Липкин В.М., Мясоедов Н.Ф.* // *Биоорганическая химия.* 2015. Т. 41. С. 644–656. [*Zolotarev Yu.A., Dadayan A.K., Kost N.V., Voevodina M.E., Sokolov O.Y., Kozik V.S., Shram S.I., Bocharov E.V., Bogachuk A.P., Azev V.N., Lipkin V.M., Myasoedov N.F.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2015. V. 41. P. 578–589.]

The Pharmacokinetics of Peptide Hldf-6-AA in the Organism of Experimental Animals

Yu. A. Zolotarev*^{*,#}, A. K. Dadayan*, V. S. Kozik*, S. I. Shram*, V. N. Azev^{**}, A. P. Bogachouk***^{***}, V. M. Lipkin***^{***}, and N. F. Myasoedov***

[#]Phone: +7 (499) 196-02-13; fax: +7 (499) 196-02-21; e-mail: zolya@img.ras.ru

*Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, pl. Akademika Kurchatova 2, Moscow, 123182 Russia

**Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Pushchino Branch, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, Russia

***Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

The pharmacokinetics of the acetyl amide form (Ac-ThrGlyGluAsnHisArg-NH₂) of the promising antitumor peptide HLDF-6-AA was conducted with the use of its tritium labeled derivative and both its single and multiple intravenous administration to male Wistar rats, Balb/c mice and Chinchilla rabbits. Pharmacokinetics analysis of the peptide and its fragments was carried out with the use of the tritium labeled peptide [³H]HLDF-6-AA, its molar radioactivity being 50 Ci/mmol. The peptide was produced using the high temperature solid state catalytic isotope exchange (HSCIE). Pharmacokinetic characteristics of the pharmacokinetic profile in the blood were obtained and the values of main pharmacokinetic parameters of the HLDF-6-AA peptide and its active metabolite HisArg-NH₂ were calculated for intravenous HLDF-6-AA administration to male rats and rabbits. It was established that the parameter of an average time of the peptide HLDF-6-AA stay in the blood of rats after intravenous administration of the peptide is about 7 min, and of its HisArg-NH₂ metabolite about 21 min. Multiple administration of the preparation was shown to result in no modification of its single administration, nor to its pharmacokinetics changes as compared with a single administration. Dose dependence linearity of the HLDF-6-AA peptide in the blood of rats was assessed. As the result of the distribution analysis of peptide HLDF-6-AA and its HisArg-NH₂ metabolite in the blood and peripheral tissues of mice, the maximum HLDF-6-AA concentration was shown to be observed in kidney tissues. A bit smaller concentration of this peptide was observed in the Omentum. It was revealed that, with time, the concentration of HisArg-NH₂ starts to exceed the HLDF-6-AA concentration, which reflects its larger resistance to proteolytic hydrolysis. The largest concentration of the HisArg-NH₂ peptide is observed in kidney and liver tissues.

Keywords: the HLDF-6 peptide, pharmacokinetics, metabolism, tritium labeled peptides