

Фармакокинетика антагониста брадикинина производного 1,4-бензодиазепин-2-она в эксперименте

А.Е. Алифорова^{1,2}, В.В. Быков^{1,2}, А.В. Быкова², В.С. Мотов², К.Е. Кожуховский²,
В.И. Павловский², В.А. Хазанов², А.И. Венгеровский¹

¹ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Томск, Россия

²ООО «Инновационные фармакологические разработки» (ООО «Ифар»), Томск, Россия

АННОТАЦИЯ

В в е д е н и е . Производное 1,4-бензодиазепин-2-она (шифр – PAV-0056) в диапазоне доз 0.1–10 мг/кг оказывает в эксперименте выраженное анальгетическое действие как антагонист рецепторов брадикинина 1-го типа. Представляется актуальным доклиническое изучение фармакокинетики нового потенциального анальгетика при разных путях введения.

Ц е л ь . Оценить фармакокинетические параметры, биодоступность и трансмембранный транспорт производного 1,4-бензодиазепин-2-она PAV-0056.

М а т е р и а л ы и м е т о д ы . Соединение PAV-0056 в дозах 0.1, 1 и 10 мг/кг вводили в 1% водном растворе поливинилпирролидона в желудок и в вену крысам-самцам (возраст 1.5–3 мес) стока Sprague Dawley массой тела 250–300 г. С помощью метода масс-спектрометрии определяли концентрацию вещества PAV-0056 в плазме крови крыс через дискретные интервалы времени. Изучали фармакокинетические параметры и абсолютную биодоступность PAV-0056. Проницаемость молекул PAV-0056 через клеточный монослой изучали на 21-дневной культуре клеток колоректальной карциномы (Caco-2).

Р е з у л ь т а т ы . Абсолютная биодоступность производного 1,4-бензодиазепин-2-она PAV-0056 при введении в желудок крысам в дозе 0.1 мг/кг составляет 10.1 ± 6.1 %, в дозе 1 мг/кг – 2.2 ± 0.1 %, в дозе 10 мг/кг – 6.4 ± 0.8 %. Системная экспозиция AUC и максимальная концентрация C_{max} в плазме изменяются линейно с увеличением дозы PAV-0056 с 0.1 до 10 мг/кг (коэффициенты линейной детерминации R^2 составляют 0.9767 и 0.9976 соответственно). Соединение PAV-0056 всасывается из тонкого кишечника в течение 1 ч и элиминируется из плазмы в течение 5 ч. После введения в вену соединение PAV-0056 элиминируется в течение 0.5 ч. Анальгетик характеризуется общим клиренсом (CL_r) 83.16 л/кг/ч и не является субстратом гликопротеина Р.

З а к л ю ч е н и е . Липофильное производное 1,4-бензодиазепин-2-она PAV-0056 при введении в желудок всасывается из тонкого кишечника пассивной диффузией с биодоступностью не более 10.1 ± 6.1 %. Линейная фармакокинетика и отсутствие взаимодействия с гликопротеином Р позволяют оценивать соединение PAV-0056 как потенциальный неопиоидный анальгетик с хорошим профилем безопасности.

Ключевые слова: производное 1,4-бензодиазепин-2-она, крысы, фармакокинетические параметры, линейность фармакокинетики, абсолютная биодоступность, трансмембранный транспорт.

Образец цитирования: Алифорова А.Е., Быков В.В., Быкова А.В., Мотов В.С., Кожуховский К.Е., Павловский В.И., Хазанов В.А., Венгеровский А.И. Фармакокинетика антагониста брадикинина производного 1,4-бензодиазепин-2-она в эксперименте // Journal of Siberian Medical Sciences. 2023;7(4):124-137. DOI: 10.31549/2542-1174-2023-7-4-124-137

Поступила в редакцию 21.03.2023
Прошла рецензирование 28.03.2023
Принята к публикации 18.04.2023

Автор, ответственный за переписку
Быков Владимир Валерьевич: ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России. 634050, г. Томск, Московский тракт, 2.
E-mail: vladimir.b.1989@gmail.com

Received 21.03.2023
Revised 28.03.2023
Accepted 18.04.2023

Corresponding author
Vladimir V. Bykov: Siberian State Medical University, 2, Moskovsky trakt, Tomsk, 634050, Russia.
E-mail: vladimir.b.1989@gmail.com

Pharmacokinetics of the bradykinin antagonist derivative 1,4-benzodiazepin-2-one in the experiment

A.E. Aliforenko^{1,2}, V.V. Bykov^{1,2}, A.V. Bykova², V.S. Motov², K.E. Kozhukhovskiy², V.I. Pavlovskiy², V.A. Khazanov², A.I. Vengerovskii¹

¹Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

²Innovative Pharmacological Research LLC (Iphar, LLC), Tomsk, Russia

ABSTRACT

I n t r o d u c t i o n . The 1,4-benzodiazepin-2-one derivative (codenamed PAV-0056), in a wide range of low doses 0.1–10 mg/kg has a pronounced analgesic effect as bradykinin receptor type 1 antagonist. Preclinical study of the pharmacokinetics of a new potential analgesic with different routes of administration in appropriate doses seems to be relevant.

A i m . To evaluate the pharmacokinetic parameters, bioavailability and transmembrane transport of the 1,4-benzodiazepin-2-one derivative PAV-0056.

M a t e r i a l s a n d m e t h o d s . PAV-0056 at doses of 0.1, 1 and 10 mg/kg was administered in a 1% aqueous solution of polyvinylpyrrolidone into the stomach and vein of male Sprague Dawley rats (age 1.5–3 months) weighing 250–300 g. We determined the plasma concentration of PAV-0056 in the blood of rats at discrete time intervals using mass spectrometry. The pharmacokinetic parameters and absolute bioavailability of PAV-0056 were studied. The permeability of PAV-0056 through a cell monolayer was studied on a 21-day cell culture originated from of colorectal carcinoma (Caco-2).

R e s u l t s . The absolute bioavailability of the 1,4-benzodiazepin-2-one derivative PAV-0056 after administration into the stomach of rats at a dose of 0.1 mg/kg is $10.1 \pm 6.1\%$, at a dose of 1 mg/kg – $2.2 \pm 0.1\%$, at a dose of 10 mg/kg – $6.4 \pm 0.8\%$. Systemic exposure AUC and maximum plasma concentration C_{max} change linearly with increasing dose of PAV-0056 from 0.1 to 10 mg/kg (coefficients of determination R^2 are 0.9767 and 0.9976, respectively). PAV-0056 is absorbed from the small intestine within 1 h and eliminated from plasma within 5 h. After intravenous administration, PAV-0056 is eliminated within 0.5 h. The analgesic has a total clearance (Cl_T) of 83.16 l/kg/h and is not a P-glycoprotein substrate.

C o n c l u s i o n . The lipophilic derivative of 1,4-benzodiazepin-2-one, PAV-0056 after administration into the stomach is absorbed from the small intestine by passive diffusion with a bioavailability of no more than $10.1 \pm 6.1\%$. Linear pharmacokinetics and no interaction with P-glycoprotein allow PAV-0056 to be positioned as a non-opioid analgesic with a good safety profile.

Keywords: 1,4-benzodiazepin-2-one derivative, rats, pharmacokinetic parameters, linearity of pharmacokinetics, absolute bioavailability, transmembrane transport.

Citation example: Aliforenko A.E., Bykov V.V., Bykova A.V., Motov V.S., Kozhukhovskiy K.E., Pavlovskiy V.I., Khazanov V.A., Vengerovskii A.I. Pharmacokinetics of the bradykinin antagonist derivative 1,4-benzodiazepin-2-one in the experiment. *Journal of Siberian Medical Sciences*. 2023;7(4):124-137. DOI: 10.31549/2542-1174-2022-7-4-124-137

ВВЕДЕНИЕ

На основе молекулярного дизайна и изучения связи «структура – аффинитет к бензодиазепиновым рецепторам – анальгетическая активность» была спрогнозирована и синтезирована новая молекула – метил-2-(7-нитро-2-оксо-5-фенил-3-пропокси-2,3-дигидро-1H-бензо[e][1,4]дiazепин-1-ил)ацетат (шифр PAV-0056). Согласно результатам молекулярного докинга соединение PAV-0056 является антагонистом брадикининового рецептора 1-го типа (B_1) [1].

Соединение PAV-0056 оказывает в эксперименте выраженное анальгетическое действие: препятствует развитию болевых реакций в ответ

INTRODUCTION

Based on molecular design and studying the “structure–affinity for benzodiazepine receptors – analgesic activity” relationship, a new molecule, methyl-2-(7-nitro-2-oxo-5-phenyl-3-propoxy-2,3-dihydro-1H-benzo[e][1,4]diazepin-1-yl)acetate (codenamed PAV-0056) was predicted and synthesized. According to the results of molecular docking, the PAV-0056 compound is bradykinin type 1 receptor (B_1) antagonist [1].

The compound PAV-0056 has a significant analgesic effect in the experiment: it prevents the development of pain in response to intraperitoneal injection of acetic acid solution, subplantar administra-

на внутрибрюшинную инъекцию раствора уксусной кислоты, субплантарное введение брадикинина и формалина [2]. В дозах 0.1–1 мг/кг это вещество не уступает по выраженности анальгетического эффекта диклофенаку натрия и трамadolu в эффективных дозах 10 и 20 мг/кг соответственно [2]. Производное 1,4-бензодиазепин-2-она PAV-0056 тормозит экссудацию при экспериментальном воспалении, вызванном брадикинином, не повреждает слизистую оболочку желудка в дозах до 50 мг/кг (500 терапевтических доз). Для соединения PAV-0056 не характерны эффекты производных 1,4-бензодиазепина – анксиолитический, седативный, снотворный и центральный миорелаксирующий, отсутствует аддиктивный потенциал [3].

Изучение фармакокинетики новых фармакологически активных веществ в эксперименте является обязательным этапом при разработке оригинальных лекарственных средств. Эти экспериментальные данные необходимы для прогнозирования пути введения и дозы лекарственного средства, разработки оптимальной лекарственной формы, обеспечивающей необходимую биодоступность и фармакологическую активность [4, 5].

Представляется актуальным изучение фармакокинетики нового производного 1,4-бензодиазепин-2-она (PAV-0056) у крыс при разных путях введения.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценить фармакокинетические параметры, биодоступность и трансмембранный транспорт производного 1,4-бензодиазепин-2-она PAV-0056.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Соединение PAV-0056 предоставлено для исследования компанией-правообладателем. Для мышей и крыс эффективная доза (ED_{50}) соединения PAV-0056 в зависимости от модели боли составляет 0.01–1 мг/кг, полумлетальная доза (LD_{50}) – более 2000 мг/кг.

Эксперименты проводили на 160 свободных от патогенной флоры крысах-самцах стока Sprague Dawley массой тела 250–300 г (возраст 1.5–3 мес). Крыс содержали в барьерном виварии в пластиковых клетках (по 5 особей) при температуре 20–26 °C, относительной влажности воздуха 30–70 %, воздухообмене 15 объемов/ч и регулируемом световом режиме (12:12 ч). Исследование одобрено локальными этическими комитетами, проведено в соответствии с положениями Европейской конвенции по защите лабо-

tion of bradykinin and formalin [2]. At doses of 0.1–1 mg/kg, this substance is not inferior in the severity of the analgesic effect to diclofenac sodium and tramadol at effective doses of 10 and 20 mg/kg, respectively [2]. The 1,4-benzodiazepin-2-one derivative, PAV-0056 inhibits exudation in bradykinin-induced inflammation and does not damage the gastric mucosa at doses up to 50 mg/kg (500 curative doses). The PAV-0056 compound is not characterized by the effects of 1,4-benzodiazepine derivatives – anxiolytic, sedative, hypnotic and myorelaxant; there is no addictive potential [3].

Experimental studying the pharmacokinetics of new pharmacological active substances is a mandatory stage in the development of original drug. These experimental data are necessary to predict the route of administration and dose of a drug, and develop the appropriate dosage form that provides the necessary bioavailability and pharmacological activity [4, 5].

It seems relevant to study the pharmacokinetics of a new 1,4-benzodiazepin-2-one derivative (PAV-0056) in rats using different routes of administration.

AIM OF THE RESEARCH

To evaluate the pharmacokinetic parameters, bioavailability and transmembrane transport of the 1,4-benzodiazepin-2-one derivative, PAV-0056.

MATERIALS AND METHODS

The PAV-0056 compound was provided for research by the copyright holder. For mice and rats, the effective dose (ED_{50}) of the PAV-0056 compound depending on the pain model is 0.01–1 mg/kg, the 50% lethal dose (LD_{50}) is more than 2000 mg/kg.

Experiments were carried out on 160 pathogen-free male Sprague Dawley rats weighing 250–300 g (age 1.5–3 months). The rats were kept in a vivarium in plastic cages (5 animals each) at 20–26 °C, relative air humidity of 30–70%, air exchange of 15 volumes/h and controlled light conditions (12:12 h). The study was approved by Local Ethical Committees and conducted in accordance with the provisions of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986) in compliance with the principles and rules of Good Laboratory Practice. To exclude the influence of food on pharmacokinetics, animals fasted for 16 h before the start of the experiment.

The 1,4-benzodiazepin-2-one derivative (PAV-0056) was administered once into the stomach of rats at doses of 0.1, 1 and 10 mg/kg in 0.5 ml of a 1% aqueous solution of polyvinylpyrrolidone (Ashland

раторных животных (Страсбург, 1986) с соблюдением принципов и правил надлежащей лабораторной практики. Для исключения влияния пищи на фармакокинетику животные голодали в течение 16 ч до начала эксперимента.

Производное 1,4-бензодиазепин-2-она (PAV-0056) вводили однократно крысам в желудок в дозах 0.1, 1 и 10 мг/кг в 0.5 мл 1% водного раствора поливинилпирролидона (Ashland Inc., США). Дозы вещества PAV-0056 выбраны на основании результатов ранее проведенных исследований анальгетической активности (диапазон эффективных доз 0.1–1 мг/кг) и токсичности (максимальная переносимая доза при многократном введении 10 мг/кг). Соединение PAV-0056 вводили крысам внутривенно в дозе 0.004 мг/кг в 0.3 мл 1% водного раствора поливинилпирролидона. Ограничения в дозе вводимого в вену вещества связаны с его низкой растворимостью и предельно допустимым объемом жидкости для инъекций.

Для забора крови крыс помещали на 3 мин в камеру, постепенно заполняемую диоксидом углерода, фиксировали потерю рефлексов, брали кровь из полости сердца и выводили из эксперимента цервикальной дислокацией. При введении соединения PAV-0056 в желудок пробы крови брали до начала эксперимента и через 15, 30, 60, 120, 240, 480, 960 и 1440 мин после введения вещества, при внутривенном введении – до инъекции и через 5, 15, 30, 60, 120, 240, 480 и 1440 мин после введения. Временные точки выбраны на основании предыдущих пилотных исследований фармакокинетики соединения PAV-0056. В каждой временной точке забор крови производился у 5 крыс.

Образцы крови собирали в пробирки с гепарином натрия (50 ЕД/мл). Плазму получали центрифугированием при 1500 g в течение 15 мин, помещали в пробирки Eppendorf, немедленно замораживали в жидком азоте и хранили при температуре –70 °C до проведения анализа.

Для определения концентрации производного 1,4-бензодиазепин-2-она PAV-0056 в плазме использовали масс-спектрометр QTRAP 4500 (AB Sciex, США) в комплексе с жидкостным хроматографом Infinity 1260 (Agilent Technologies, Inc., США). Хроматографическое разделение проводили на аналитической колонке размером 75×2 мм, заполненной сорбентом ProntoSil-120-5-C18 AQ с диаметром частиц 5 мкм (ООО ИХ «ЭкоНова», Россия) в режиме изократического элюирования. Для жидкостно-жидкостной экстракции биологические образцы перемешивали

Inc., USA). Doses of PAV-0056 were selected based on the results of previous studies of analgesic activity (effective dose range 0.1–1 mg/kg) and toxicity (maximum tolerated dose with multiple dose of 10 mg/kg). The compound PAV-0056 was administered intravenously to rats at a dose of 0.004 mg/kg in 0.3 ml of a 1% aqueous solution of polyvinylpyrrolidone. Limitations in the dose for intravenous administration are associated with its low solubility and the maximal permissible volume of liquid for injection.

To take blood samples, rats were placed for 3 min in a chamber gradually filled with carbon dioxide; loop of reflexes was recorded; blood was taken from the heart cavity, and the animals were euthanized by cervical dislocation. When PAV-0056 was administered into the stomach, blood samples were taken before the start of the experiment and 15, 30, 60, 120, 240, 480, 960 and 1440 min after administration of the substance; intravenously – before administration and 5, 15, 30, 60, 120, 240, 480 and 1440 min after administration. The time points were selected based on previous pilot studies of the pharmacokinetics of PAV-0056. At each time point, blood was taken from 5 rats.

Blood samples were collected in test tubes containing heparin sodium (50 U/ml). Plasma was obtained by centrifugation at 1500 g for 15 min, placed in Eppendorf tubes, immediately frozen in liquid nitrogen and stored at –70°C.

To determine the concentration of the 1,4-benzodiazepin-2-one derivative, PAV-0056 in plasma, a QTRAP 4500 mass spectrometer (AB Sciex, USA) was used in combination with an Agilent 1260 Infinity chromatograph (Agilent Technologies, Inc., USA). Chromatographic separation was performed using a 75×2 mm column filled with a ProntoSil-120-5-C18 AQ sorbent with a particle diameter of 5 µm (Institute of Chromatography EcoNova, LLC, Russia) in the isocratic elution mode. For liquid-liquid extraction, biological samples were mixed with 0.01 ml of 20% ortho-phosphoric acid solution and 1.5 ml of diethyl ester using a Vortex V-3 laboratory shaker (Elmi Ltd, Latvia). The aqueous organic phase of the sample was precipitated in an SL 16 centrifuge (Thermo Scientific Inc., Germany). The organic solvent was evaporated in a RVC 2-18 CDplus vacuum concentrator (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Germany).

Chromatographic analysis was performed under the following conditions: mobile phase – 0.1% solution of formic acid in acetonitrile (0.25 ml of 98% formic acid solution was diluted to a total volume

с 0.01 мл 20% раствора ортофосфорной кислоты и с 1.5 мл диэтилового эфира на лабораторном шейкере Vortex V-3 (Elmi Ltd, Латвия). Водно-органическую фазу образца осаждали в центрифуге SL 16 (Thermo Scientific Inc., Германия). Органический растворитель упаривали в ротационном вакуумном концентраторе RVC 2-18 CDplus (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Германия).

Хроматографический анализ проводили при следующих условиях: подвижная фаза – 0.1% раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (0.25 мл 98% раствора муравьиной кислоты доводили ацетонитрилом до общего объема 250 мл); скорость потока элюента – 0.4 мл/мин; объем вводимой пробы – 5 мкл; скорость ввода пробы – 200 мкл/мин; время анализа – 2 мин; среднее время удерживания соединения PAV-0056 составляло 0.60 ± 0.06 мин; тип ионизации – турбоэлектроспрей при атмосферном давлении (+); детектирование – режим множественных молекулярных реакций (MRM); анализируемые переходы – m/z 412.0 $\rightarrow$ 324.0; энергия соударения – 31 эВ; температура источника ионов – 350 °C; напряжение источника ионов – 5400 В. Методика количественного определения вещества PAV-0056 в плазме крыс была впервые разработана и валидирована перед исследованием согласно требованиям EMA и FDA [6, 7].

Хроматографические данные обрабатывали с помощью программного обеспечения MultiQuant 3.0 (AB Sciex, США). Концентрации PAV-0056 рассчитывали методом абсолютной калибровки по площади пика PAV-0056 ($y = kx + b$). На основании полученных значений концентраций были построены усредненные фармакокинетические профили.

Расчетный коэффициент распределения н-октанол/вода $\log P$ для PAV-0056 вычисляли с помощью программы ChemDraw Ultra v.12.0.2.1076 (PerkinElmer Inc., США).

Проницаемость соединения PAV-0056 через клеточный монослой изучали на 21-дневной культуре клеток колоректальной аденокарциномы (Caco-2) с помощью тест-системы MultiScreen (Millipore Corp., США). Культуру клеток получали из Российской коллекции клеточных культур позвоночных Института цитологии РАН (г. Санкт-Петербург). Соединение PAV-0056 добавляли в концентрации 1 мкМ и в течение 2 ч изучали его транспорт в прямом (А–В, от апикальной к базолатеральной мембране, свободная диффузия) и обратном направлении (В–А, от базолатеральной к апикальной мембране, сво-

of 250 ml with acetonitrile); eluent flow rate – 0.4 ml/min; sample volume – 5 μ l; sample adding rate – 200 μ l/min; analysis time – 2 min; the average retention time of PAV-0056 – 0.60 ± 0.06 min; type of ionization – turbo electrospray at atmospheric pressure (+); detection – multiple molecular reaction mode (MRM); study transitions – m/z 412.0 $\rightarrow$ 324.0; collision energy – 31 eV; ion source temperature – 350 °C; ion source voltage – 5400 V. The PAV-0056 quantification method in rat plasma was first developed and validated before the study according to the requirements of the EMA and FDA [6, 7].

Chromatographic data were processed using MultiQuant 3.0 software (AB Sciex, USA). PAV-0056 concentrations were calculated using the absolute calibration method based on the peak area of PAV-0056 ($y = kx + b$). Based on concentration values we obtained, averaged pharmacokinetic profiles were plotted.

The n-octanol/water partition coefficient, $\log P$ for PAV-0056 was calculated using ChemDraw Ultra v.12.0.2.1076 (PerkinElmer Inc., USA).

The permeability of the PAV-0056 compound through a cell monolayer was studied on a 21-day cell culture originated from colorectal adenocarcinoma (Caco-2) using a MultiScreen plate (Millipore Corp., USA). The cell culture was obtained from the Russian collection of vertebrate cell cultures of the Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences (St. Petersburg). PAV-0056 was added at a concentration of 1 μ M, and its transport in the onward direction (A–B, from apical to basolateral membrane, free diffusion) and reverse direction (B–A, from basolateral to apical membrane, free diffusion and active transport with the participation of P-glycoprotein) was studied for 2 h [8]. PAV-0056 is a lipophilic aromatic compound, molecular weight of 411.4 Da, the molecule contains H-bonds and a positively charged atom of nitrogen at physiological pH values. Substances with these characteristics are substrates of P-glycoprotein [9]. In this regard, it was relevant to study whether the PAV-0056 compound is a substrate of this transporter.

As control compounds, we used a substance with low intestinal permeability – ranitidine, a compound with high permeability – propranolol and a P-glycoprotein substrate – rhodamine 123 (all by Sigma-Aldrich, USA). The effect of P-glycoprotein on the transmembrane molecular transport of PAV-0056 was assessed after adding the inhibitor of this transporter, cyclosporine A, to the medium of incubation [9].

бодная диффузия и активный транспорт с участием гликопротеина Р [8]. PAV-0056 является липофильным ароматическим соединением с молекулярной массой 411.4 Да, в молекуле присутствуют водородные связи и положительно заряженный атом азота при физиологических значениях pH. Вещества с такими характеристиками являются субстратами гликопротеина Р [9]. В связи с этим было актуальным изучить, является ли соединение PAV-0056 субстратом данного транспортера.

В качестве контрольных соединений использовали вещество с низкой кишечной проницаемостью – ранитидин, соединение с высокой проницаемостью – пропранолол и субстрат гликопротеина Р – родамин 123 (все – Sigma-Aldrich, США). Влияние гликопротеина Р на трансмембранный транспорт молекул PAV-0056 оценивали после добавления в среду инкубации ингибитора этого транспортера циклоспорина А [9].

Коэффициент кажущейся проницаемости (P_{app} , см/с) вычисляли по следующей формуле [10]:

$$P_{app} = \left(\frac{V_A}{\text{Area} \cdot \text{Time}} \right) \cdot \left(\frac{C_A(t)}{C_D(0)} \right),$$

где V_A – объем (мл) в акцепторной лунке, равный 0.25 для транспорта в прямом направлении А–В и 0.09 для транспорта в обратном направлении В–А;

Area – площадь поверхности, составляющая 0.11 см² для 96-луночного планшета;

Time – время транспорта (7200 с);

$C_A(t)$ – площадь под хроматографическим пиком аналита, нормированная на сигнал внутреннего стандарта толбутамида (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 100 нг/мл в акцепторной лунке после эксперимента;

$C_D(0)$ – площадь под хроматографическим пиком аналита, нормированная на сигнал внутреннего стандарта толбутамида в концентрации 100 нг/мл в донорной лунке.

Индекс асимметрии транспорта определяли как частное от деления коэффициента кажущейся проницаемости в обратном В–А и прямом А–В направлениях.

Фармакокинетические показатели рассчитывали с помощью программы Microsoft Excel (Microsoft, США). Данные, подчиняющиеся нормальному закону распределения, представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения ($M \pm SD$), не подчиняющиеся – в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (Q1; Q3).

The apparent permeability coefficient (P_{app} , cm/s) was calculated using the following formula [10]:

$$P_{app} = \left(\frac{V_A}{\text{Area} \cdot \text{Time}} \right) \cdot \left(\frac{C_A(t)}{C_D(0)} \right),$$

where V_A – volume (ml) in the acceptor well, equal to 0.25 for transport in the A–B and 0.09 for transport in the B–A directions;

Area – surface area of 0.11 cm² for a 96-well plate;

Time – transport time (7200 s);

$C_A(t)$ – area under the chromatographic peak of the analyte, normalized to the signal of the reference value of tolbutamide (Sigma-Aldrich, USA) at a concentration of 100 ng/ml in the acceptor well after the experiment;

$C_D(0)$ – area under the chromatographic peak of the analyte normalized to the signal of the internal standard tolbutamide at a concentration of 100 ng/ml in the donor well.

The transport asymmetry index was determined as the quotient of the apparent permeability coefficient in the B–A and A–B directions.

Pharmacokinetic parameters were calculated using Microsoft Excel (Microsoft, USA). Normally distributed data are presented as the mean and standard deviation ($M \pm SD$), non-normally distributed ones – as the median (Me) and interquartile range (Q1; Q3). Differences between samples were assessed in the first case using the Student *t*-test, and in the second case using the Mann-Whitney *U*-test [11]. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$. The magnitude of the linear relationship (correlation) between two normally distributed variables was assessed using the coefficient of linear determination (R^2).

RESULTS AND DISCUSSION

After a single administration into the stomach of rats of the 1,4-benzodiazepin-2-one derivative, PAV-0056 at doses of 0.1, 1 and 10 mg/kg, its plasma concentration reached a maximum (T_{max}) after 0.8–1.3 h and amounted to 1.4, 13 and 305 ng/ml, respectively (Fig. 1). This is consistent with the data on the pharmacodynamics of the substance obtained during previous studies. The PAV-0056 compound has a significant anti-inflammatory effect on the bradykinin-induced edema model 1.5 hours after administration and exhibits a maximum analgesic effect in the formalin test 15–45 min after administration [2]. The lower limit of quantification of the analytical method for PAV-0056 in rat plasma was 0.1 ng/ml. The analgesic effect of the PAV-0056 compound occurs at a plasma concentration of 1 ng/ml.

Различия между выборками оценивали в первом случае по t -критерию Стьюдента, а во втором – по U -критерию Манна – Уитни [11]. Статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$. Величина линейной связи (корреляция) между двумя переменными, распределение которых подчинялось нормальному закону распределения, оценивали с помощью коэффициента линейной детерминации (R^2).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

После однократного введения крысам в желудок производного 1,4-бензодиазепин-2-она PAV-0056 в дозах 0.1, 1 и 10 мг/кг его концентрация в плазме достигала максимума (T_{max}) через 0.8–1.3 ч и составляла 1.4, 13 и 305 нг/мл соответственно (рис. 1). Это согласуется с данными о фармакодинамике изучаемого вещества, полученными в ранее проведенных исследованиях. Соединение PAV-0056 обладает выраженным противовоспалительным действием на модели брадикининового отека через 1.5 ч после введения и проявляет максимальный анальгетический эффект в формалиновом тесте спустя

Systemic exposure (AUC – area under the concentration-time curve) of the PAV-0056 compound in administration at a dose of 0.1 mg/kg into the stomach was 2.0 (0.6; 50.9), at a dose of 1 mg/kg – 64.6 ± 23.1 , at a dose of 10 mg/kg – 1764 ± 641.3 ng $\times$ h/ml (Table 1). The maximal plasma concentration C_{max} and systemic exposure, AUC increased linearly when the dose of PAV-0056 was increased to 100 curative doses. The coefficients of linear determination R^2 are close to 1 and amount to 0.9976 and 0.9767, respectively [12], which indicates the predictability of changes in concentration in response to an increase in studied dose range (Fig. 2 and 3). This is consistent with the dose dependence previously revealed of the analgesic effect of PAV-0056 in the formalin test [2].

In Fig. 4 shows the averaged pharmacokinetic profile of PAV-0056 in the plasma of rat after a single intravenous administration at a dose of 0.004 mg/kg.

The calculated initial plasma concentration of the PAV-0056 compound in rat after a single intravenous administration at a dose of 0.004 mg/kg was

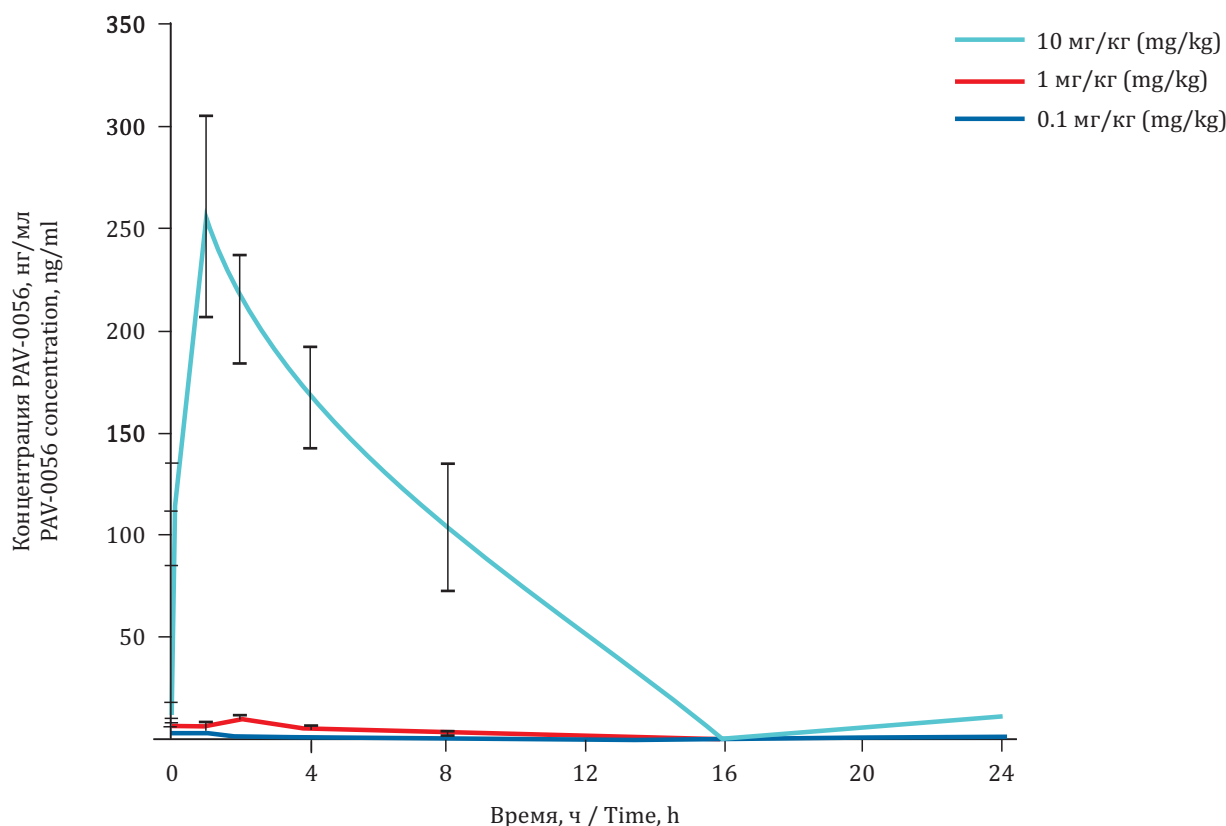


Рис. 1. Усредненные фармакокинетические профили производного 1,4-бензодиазепин-2-она PAV-0056 в плазме крови крыс после однократного введения в желудок в дозах 0.1, 1 и 10 мг/кг ($n = 5$)

Fig. 1. Averaged pharmacokinetic profiles of the 1,4-benzodiazepin-2-one derivative, PAV-0056 in the blood plasma of rats after a single administration into the stomach at doses of 0.1, 1 and 10 mg/kg ($n = 5$)

Таблица 1. Фармакокинетические показатели производного 1,4-бензодиазепин-2-она PAV-0056 после однократного введения в желудок крысам в дозах 0.1, 1 и 10 мг/кг**Table 1.** Pharmacokinetic parameters of the 1,4-benzodiazepin-2-one derivative, PAV-0056 after a single administration into the stomach of rats at doses of 0.1, 1 and 10 mg/kg

Показатель Indicator	Доза PAV-0056, мг/кг / Dose of PAV-0056, mg/kg		
	0.1	1	10
Максимальная концентрация в плазме (C_{max}), нг/мл Maximal plasma concentration (C_{max}), ng/ml	1.4 (1.3; 14.9)*	13.0 ± 4.7*	304.9 ± 62.6
Время достижения максимальной концентрации (T_{max}), ч Time to reach the maximal concentration (T_{max}), h	0.8 (0.4; 1.3)	1.3 ± 0.7	1.3 ± 0.8
Площадь под кривой «концентрация – время» (AUC_{0-t}), нг × ч/мл Area under the concentration-time curve (AUC_{0-t}), ng × h/ml	2.0 (0.6; 50.9)*	64.6 ± 23.1*	1764.0 ± 641.3
Период полуэлиминации ($T_{1/2}$), ч Half-life ($T_{1/2}$), h	13.0 ± 6.1	3.5 ± 1.6**	4.9 ± 3.0**
Скорость всасывания C_{max}/AUC_{0-t} , ч Absorption rate C_{max}/AUC_{0-t} , h	0.67 (0.56; 1.11)	0.21 ± 0.08**	0.18 ± 0.06**

* Статистически значимые отличия от показателей при введении вещества PAV-0056 в дозе 10 мг/кг ($p < 0.05$).Statistically significant differences compared to the indicators in administration of PAV-0056 at a dose of 10 mg/kg ($p < 0.05$).** Статистически значимые отличия от показателей при введении вещества PAV-0056 в дозе 0.1 мг/кг ($p < 0.05$).Statistically significant differences compared to the indicators in administration of PAV-0056 at a dose of 0.1 mg/kg ($p < 0.05$).

15–45 мин после введения [2]. Нижний предел количественного определения аналитической методики для вещества PAV-0056 в плазме крыс составлял 0.1 нг/мл. Анальгетический эффект соединения PAV-0056 начинает проявляться уже при концентрации в плазме 1 нг/мл.

Системная экспозиция (AUC – площадь под кривой «концентрация – время») соединения PAV-0056 при введении в дозе 0.1 мг/кг крысам в желудок составляла 2.0 (0.6; 50.9), в дозе 1 мг/кг – 64.6 ± 23.1, в дозе 10 мг/кг – 1764 ± 641.3 нг × ч/мл (табл. 1). Максимальная концентрация C_{max} в плазме и системная экспозиция AUC при увеличении дозы вещества PAV-0056 до 100 терапевтических доз возрастали линейно. Коэффициенты линейной детерминации R^2 близки к 1 и составляют 0.9976 и 0.9767 соответственно [12], что указывает на предсказуемость изменения концентрации в ответ на увеличение дозы в исследованном диапазоне (рис. 2 и 3). Это согласуется с установленной ранее дозозависимостью анальгетического эффекта соединения PAV-0056 в формалиновом тесте [2].

Расчетная начальная концентрация соединения PAV-0056 в плазме крыс после однократного внутривенного введения в дозе 0.004 мг/кг составляла 66.4 (59.6; 70.7) нг/мл, показатель AUC был равен 13.8 (12.4; 17.1) нг × ч/мл, период полуэлиминации – 0.5 ± 0.4 ч (табл. 2).

На рис. 4 представлен усредненный фармакокинетический профиль вещества PAV-0056 в плазме крыс после однократного внутривенного введения в дозе 0.004 мг/кг.

66.4 (59.6; 70.7) нг/мл, AUC was 13.8 (12.4; 17.1) нг × ч/мл, half-life – 0.5 ± 0.4 h (Table 2).

The molecule of PAV-0056 is a weak base; its structure does not contain radicals with acidic properties; at pH > 7, the substance is predominantly in a non-ionized state. The gastric emptying time in rats does not exceed 20 min [13], therefore, the rapid achievement of the maximal concentration (within 1 h) is due to simple diffusion of non-ionized molecules of PAV-0056 in the proximal small intestine.

The penetration rate of a substance through the small intestine epithelium depends on its lipophilicity. According to our data, compound PAV-0056 dissolves well in non-polar solvents. The n-octanol/water partition coefficient, log P is 3.51, which characterizes the PAV-0056 compound as lipophilic [14].

In an experiment with the Caco-2 cell culture, the rate of PAV-0056 transport in the A–B direction without cyclosporine A is comparable to that of the value of lipophilic propranolol (log P = 3.03 [15]) and significantly exceeds the value of the less lipophilic ranitidine (log P = 0.3 [16]) ($p < 0.05$). For the P-glycoprotein substrate, rhodamine 123, the asymmetry index is >2 (actual value is 29.2) without cyclosporine A and <2 (actual value is 1.29) after the addition of cyclosporine A (Table 3). For the PAV-0056 compound, the transport asymmetry index is 1.85. Consequently, the PAV-0056 substance does not undergo active transport from a cell and is not a substrate of P-glycoprotein [8].

Data obtained for Caco-2 cells suggest that the combined use of the analgesic, PAV-0056 with

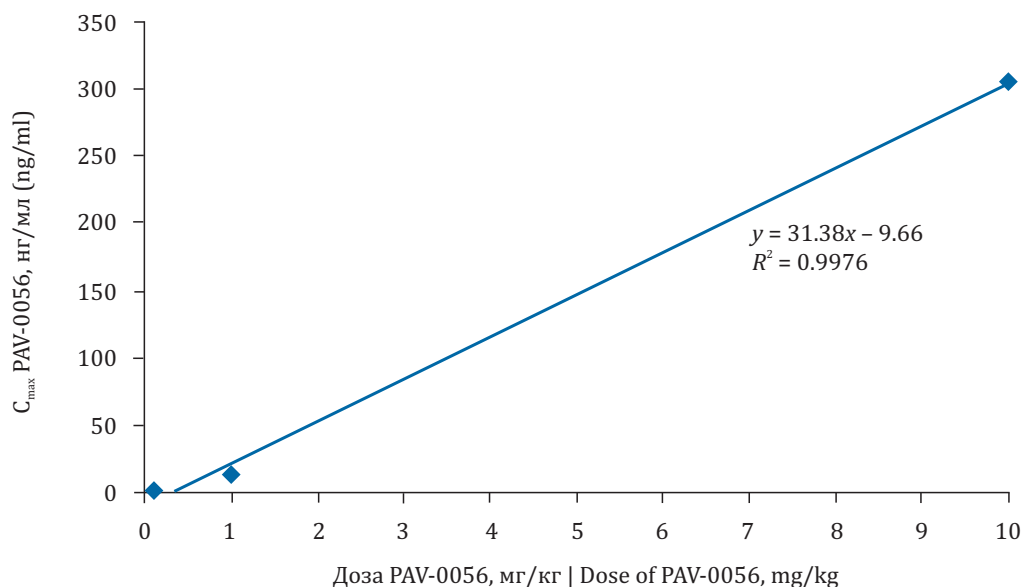


Рис. 2. Зависимость $C_{\max}$ от дозы производного 1,4-бензодиазепин-2-она PAV-0056 в плазме крови крыс после однократного введения в желудок в дозах 0.1, 1 и 10 мг/кг ($n = 5$)

Fig. 2. Dependence of $C_{\max}$ on the dose of the 1,4-benzodiazepin-2-one derivative, PAV-0056 in the blood plasma of rats after a single administration into the stomach at doses of 0.1, 1 and 10 mg/kg ($n = 5$)

Молекула PAV-0056 является слабым основанием, в ее структуре отсутствуют радикалы с кислотными свойствами, вещество при $pH > 7$ находится преимущественно в неионизированном состоянии. Время эвакуации содержимого желудка у крыс не превышает 20 мин [13], поэтому быстрое достижение максимальной концентрации (в течение 1 ч) обусловлено простой диффузией неионизированных молекул PAV-0056 в проксимальном отделе тонкого кишечника.

P-glycoprotein inducers and inhibitors will not affect its plasma concentration and pharmacological effect. This is especially important for the treatment of pain in cancer patients taking anticancer drugs, most of which are P-glycoprotein inhibitors [9, 17]. Increased activity of P-glycoprotein in cancer should not reduce the analgesic activity of PAV-0056.

Judging by the high total clearance (Cl_T) value of 83.16 l/kg/h (a volume of plasma released from

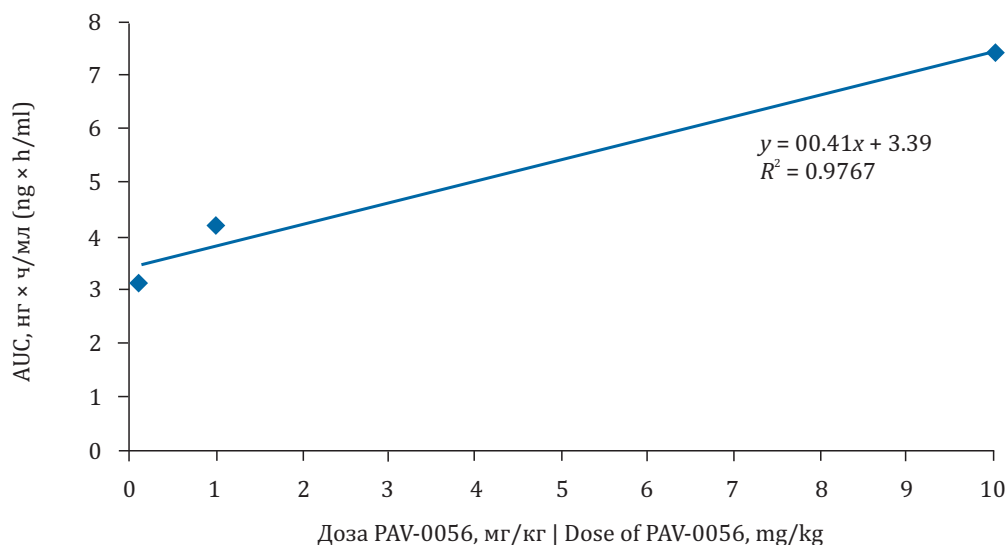


Рис. 3. Зависимость AUC от дозы производного 1,4-бензодиазепин-2-она PAV-0056 после однократного введения в желудок в дозах 0.1, 1 и 10 мг/кг ($n = 5$)

Fig. 3. Dependence of AUC on the dose of the 1,4-benzodiazepin-2-one derivative, PAV-0056 after a single administration into the stomach at doses of 0.1, 1 and 10 mg/kg ($n = 5$)

Таблица 2. Фармакокинетические показатели производного 1,4-бензодиазепин-2-она PAV-0056 после однократного внутривенного введения крысам в дозе 0.004 мг/кг**Table 2.** Pharmacokinetic parameters of the 1,4-benzodiazepin-2-one derivative, PAV-0056 after a single intravenous administration to rats at a dose of 0.004 mg/kg

Показатель / Indicator	Данные / Data
Начальная концентрация в плазме (C_0), нг/мл Initial plasma concentration (C_0), ng/ml	66.4 (59.6; 70.7)
Площадь под кривой «концентрация – время» (AUC_{0-t}), нг × ч/мл Area under the concentration-time curve (AUC_{0-t}), ng × h/ml	13.8 (12.4; 17.1)
Площадь под кривой «концентрация-время» ($AUC_{0-\infty}$), нг × ч/мл Area under the concentration-time curve ($AUC_{0-\infty}$), ng × h/ml	13.1 (11.2; 14.6)
Период полуэлиминации ($T_{1/2}$), ч / Half-life ($T_{1/2}$), h	0.5 ± 0.4

Скорость проникновения вещества через эпителий тонкого кишечника зависит от его липофильности. По нашим данным соединение PAV-0056 хорошо растворяется в неполярных растворителях. Расчетный коэффициент распределения н-октанол/вода $\log P$ равен 3.51, что характеризует соединение PAV-0056 как липофильное [14].

В эксперименте с культурой клеток Сасо-2 скорость транспорта соединения PAV-0056 в направлении А–В без циклоспорина А сопоставима с показателем липофильного пропранолола ($\log P = 3.03$ [15]) и значительно превосходит показатель менее липофильного ранитидина ($\log P = 0.3$ [16]) ($p < 0.05$). Для субстрата гликопротеина Р родамина 123 индекс асимметрии составляет >2 (фактическое значение 29.2) в отсутствии циклоспорина А и <2 (фактическое значение 1.29) после добавления циклоспорина А

the substance every hour that significantly exceeds the volume of plasma in rats), PAV-0056, if administered intragastrically, is rapidly eliminated from the plasma, which is likely associated with the activity of plasma esterases (there is an ester bond in the structure of the PAV-0056 molecule) or the distribution of the analgesic into tissues and organs.

The apparent volume of distribution (V_d) of the PAV-0056 compound of 60 l/kg significantly exceeds the volume of body fluids of a rat. This also indicates possible plasma esterase-induced metabolism or extravascular distribution of PAV-0056.

The absorption rate of PAV-0056 decreased as the intragastrically administered dose increased from 0.1 to 10 mg/kg. This limitation is caused by a decrease in the completeness of dissolution of the substance administered in large quantities (the sub-

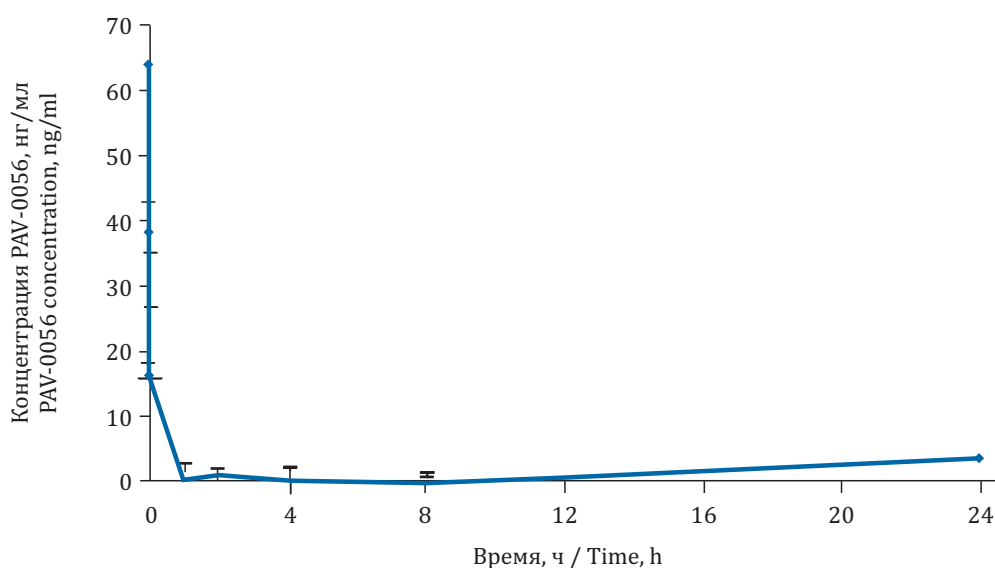
**Рис. 4.** Усредненный фармакокинетический профиль производного 1,4-бензодиазепин-2-она PAV-0056 в плазме крови крыс после однократного внутривенного введения в дозе 0.004 мг/кг ($n = 5$)**Fig. 4.** Averaged pharmacokinetic profile of the 1,4-benzodiazepin-2-one derivative, PAV-0056 in the blood plasma of rats after a single intravenous administration at a dose of 0.004 mg/kg ($n = 5$)

Таблица 3. Проницаемость и асимметрия транспорта веществ на модели Caco-2
Table 3. Permeability and asymmetry of transport of the substance on the Caco-2 model

Вещество Substance	P_{app} А-В, $\times 10^{-6}$ см/с (cm/s)	P_{app} В-А, $\times 10^{-6}$ см/с (cm/s)	Индекс асимметрии транспорта Transport asymmetry index	Проницаемость Permeability
PAV-0056	$20.5 \pm 0.52^*$	37.9 ± 8.30	1.85	Высокая / High
PAV-0056 + циклоспорин А PAV-0056 + cyclosporine A	29.9 ± 0.86	27.5 ± 1.27	0.92	Высокая / High
Родамин 123 Rhodamine 123	0.31 ± 0.01	8.94 ± 0.46	29.2	Низкая / Low
Родамин 123 + циклоспорин А Rhodamine 123 + cyclosporine A	0.32 ± 0.01	0.41 ± 0.01	1.29	Низкая / Low
Ранитидин / Ranitidine	0.71 ± 0.05	–	–	Низкая / Low
Пропранолол / Propranolol	16.7 ± 0.98	–	–	Высокая / High

Примечания: P_{app} – коэффициент кажущейся проницаемости для транспорта в прямом (А-В) и обратном (В-А) направлениях.

* Статистически значимые отличия по сравнению с показателем ранитидина ($p < 0.05$).

Note: P_{app} – coefficient of apparent permeability for transport in the A-B and B-A directions.

* Statistically significant differences compared to ranitidine ($p < 0.05$).

(табл. 3). Для соединения PAV-0056 индекс асимметрии транспорта составляет 1.85. Следовательно, вещество PAV-0056 не подвергается активному транспорту из клетки и не является субстратом гликопротеина Р [8].

Полученные на клетках Caco-2 данные позволяют предположить, что совместное применение анальгетика PAV-0056 с индукторами и ингибиторами гликопротеина Р не окажет влияния на его концентрацию в плазме и фармакологический эффект. Это особенно важно для терапии болевого синдрома у пациентов с онкологическими заболеваниями, принимающих противоопухолевые лекарственные средства, большинство из которых являются ингибиторами гликопротеина Р [9, 17]. Повышенная активность гликопротеина Р при онкологических заболеваниях не должна уменьшать анальгетическую активность PAV-0056.

Судя по высокому значению общего клиренса (CL_T), равного 83.16 л/кг/ч (от вещества каждый час освобождается объем плазмы, значительно превышающий объем плазмы крысы), соединение PAV-0056 при введении в желудок быстро элиминируется из плазмы, что, вероятно, связано с действием эстераз плазмы (в структуре молекулы PAV-0056 есть сложноэфирная связь) или распределением анальгетика в ткани и органы.

Очевидный объем распределения (V_d) соединения PAV-0056 60 л/кг значительно превосходит объем жидких сред организма крысы. Это также указывает на возможный метаболизм под

stance is virtually water insoluble, the approximate volume of solvent required to dissolve 1 g of the substance is more than 10 000 ml).

The absolute bioavailability of the 1,4-benzodiazepin-2-one derivative, PAV-0056 when administered intragastrically at a dose of 0.1 mg/kg is $10.1 \pm 6.1\%$, at a dose of 1 mg/kg – $2.2 \pm 0.1\%$, at a dose of 10 mg/kg – $6.4 \pm 0.8\%$. Low bioavailability may be a consequence of low gastrointestinal absorption of molecules of PAV-0056, presystemic elimination in intestinal or liver cells, and metabolism by plasma esterases [18].

CONCLUSION

The lipophilic derivative of 1,4-benzodiazepin-2-one, PAV-0056 administered into the stomach is absorbed from the small intestine by passive diffusion with a bioavailability of no more than $10.1 \pm 6.1\%$. A wide therapeutic range, absence of psychotropic effects, linear pharmacokinetics at doses up to 100 curative doses and no interaction with P-glycoprotein allow the 1,4-benzodiazepin-2-one derivative, PAV-0056 to be positioned as a potential non-opioid analgesic with a good safety profile.

Financing. The study was carried out with financial support.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

действием эстераз плазмы или на распределение PAV-0056 во внесосудистом пространстве.

Скорость всасывания вещества PAV-0056 снижалась при увеличении вводимой в желудок дозы с 0.1 до 10 мг/кг. Такое ограничение вызвано уменьшением полноты растворения вещества, введенного в больших количествах (субстанция практически нерастворима в воде, примерный объем растворителя, необходимый для растворения 1 г субстанции, – более 10 000 мл).

Абсолютная биодоступность производного 1,4-бензодиазепин-2-она PAV-0056 при введении в желудок в дозе 0.1 мг/кг составляет $10.1 \pm 6.1 \%$, в дозе 1 мг/кг – $2.2 \pm 0.1 \%$, в дозе 10 мг/кг – $6.4 \pm 0.8 \%$. Низкая биодоступность может являться следствием низкого всасывания молекул PAV-0056 в желудочно-кишечном тракте, пресистемной элиминации в клетках кишечника или печени, а также метаболизма эстеразами плазмы [18].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pavlovsky V.I., Tsymbalyuk O.V., Martynyuk V.S. et al. Analgesic effects of 3-substituted derivatives of 1,4-benzodiazepines and their possible mechanisms // *Neurophysiol.* 2013;45:427-432.
2. Алифоре́нко А.Е., Быков В.В., Мотов В.С. и др. Анальгетическая активность антагониста рецепторов брадикинина – производного 1,4-бензодиазепин-2-она // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2022;21(2S):69-70. (XXIX Российский национальный конгресс «Человек и лекарство»: сб. тезисов). DOI: 10.15829/1728-8800-2022-S2.
3. Алифоре́нко А.Е., Быков В.В., Мотов В.С. и др. Аддитивный потенциал нового анальгетика – антагониста рецепторов брадикинина // Современная лекарственная токсикология: фундаментальные и прикладные аспекты: материалы III Всерос. науч. конф. Томск, 2022. С. 6–7.
4. Колыванов Г.Б., Литвин А.А., Шевченко Р.В. и др. Фармакокинетические закономерности в проявлении действия психотропных лекарственных средств // Фармакокинетика и фармакодинамика. 2020;4:3-8. DOI: 10.37489/2587-7836-2020-4-3-8.
5. Иванникова Е.В., Жердев В.П., Бойко С.С. и др. Исследование фармакокинетики и биодоступности в создании новых оригинальных лекарственных средств пептидной структуры и их оптимальных лекарственных форм // Фармакокинетика и фармакодинамика. 2013;2:1-17.
6. European Medicines Agency. Guideline on Bioanalytical Method Validation. London, 21 Jul 2011. URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf (дата обращения: 10.01.2023).
7. Bioanalytical Method Validation: Guidance for Industry. 2018. URL: <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf> (дата обращения: 10.01.2023).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Липофильное производное 1,4-бензодиазепин-2-она PAV-0056 при введении в желудок всасывается из тонкого кишечника пассивной диффузией с биодоступностью не более $10.1 \pm 6.1 \%$. Широкий терапевтический диапазон, отсутствие психотропных эффектов, линейная фармакокинетика в дозах вплоть до 100 терапевтических доз и отсутствие взаимодействия с гликопротеином Р позволяют позиционировать производное 1,4-бензодиазепин-2-она PAV-0056 как потенциальный неопиоидный анальгетик с хорошим профилем безопасности.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

REFERENCES

1. Pavlovsky V.I., Tsymbalyuk O.V., Martynyuk V.S. et al. Analgesic effects of 3-substituted derivatives of 1,4-benzodiazepines and their possible mechanisms. *Neurophysiol.* 2013;45:427-432.
2. Aliforenko A.E., Bykov V.V., Motov V.S. et al. Analgesic activity of the bradykinin receptor antagonist – a derivative of 1,4-benzodiazepin-2-one. *Cardiovascular Therapy and Prevention.* 2022;21(2S):69-70. (XXIX Russian National Congress “Man and Medicine”: collection of abstracts). DOI: 10.15829/1728-8800-2022-S2. (In Russ.)
3. Aliforenko A.E., Bykov V.V., Motov V.S. et al. (2022). Addictive potential of a new analgesic – a bradykinin receptor antagonist. In *Modern Medicinal Toxicology: Fundamental and Applied Aspects: proceedings of the III All-Russian Scientific Conference.* Tomsk, P. 6–7. (In Russ.)
4. Kolyvanov G.B., Litvin A.A., Shevchenko R.V. et al. Pharmacokinetic relationships in psychotropic drugs effects. *Farmakokinetika and Farmakodynamika.* 2020;4:3-8. DOI: 10.37489/2587-7836-2020-4-3-8. (In Russ.)
5. Ivannikova E.V., Zherdev V.P., Boyko S.S. et al. Study the pharmacokinetics and bioavailability in the creation of new original drugs peptide structures and their optimum dosage forms. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics.* 2013;2:1-17. (In Russ.)
6. European Medicines Agency. Guideline on Bioanalytical Method Validation. London, 21 Jul 2011. URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf (accessed 10.01.2023).
7. Bioanalytical Method Validation: Guidance for Industry. 2018. URL: <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf> (accessed 10.01.2023).
8. Jarc T., Novak M., Hevir N. et al. Demonstrating suitability of the Caco-2 cell model for BCS-based biowaiver

8. Jarc T., Novak M., Hevir N. et al. Demonstrating suitability of the Caco-2 cell model for BCS-based biowaiver according to the recent FDA and ICH harmonised guidelines // *J. Pharm. Pharmacol.* 2019;71(8):1231-1242. DOI: 10.1111/jphp.13111.
9. Якушева Е.Н., Черных И.В., Бирюкова А.С. Характеристика гликопротеина-Р как белка транспортера лекарственных веществ // *Российский медико-биологический вестник им. акад. И.П. Павлова.* 2011;19(3):142-148. DOI: 10.17816/PAVLOVJ20113142-148.
10. Le Ferrec E., Chesne C., Artusson P. et al. In vitro models of the intestinal barrier. The report and recommendations of ECVAM Workshop 46 // *Altern. Lab. Anim.* 2001;29(6):649-668. DOI: 10.1177/026119290102900604.
11. Mishra P., Pandey C.M., Singh U. et al. Selection of appropriate statistical methods for data analysis // *Ann. Card. Anaesth.* 2019;22(3):297-301. DOI: 10.4103/aca.ACA_248_18.
12. Сергиенко В.И., Бондарева И.Б. Математическая статистика в клинических исследованиях: учеб. пособие. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. 304 с.
13. Chmelař V., Grossman V., Hais I.M., Demi F. Gastric retention and its changes in mice and rats during the first six days following X-irradiation // *Radiat. Res.* 1969;37(3):627-635. DOI: 10.2307/3572700.
14. Tshepelevitsh S., Kadam S.A., Darnell A. et al. LogP determination for highly lipophilic hydrogen-bonding anion receptor molecules // *Anal. Chim. Acta.* 2020;1132:123-133. DOI: 10.1016/j.aca.2020.07.024.
15. Calatayud-Pascual M.A., Sebastian-Morelló M., Balaguer-Fernández C. et al. Influence of chemical enhancers and iontophoresis on the in vitro transdermal permeation of propranolol: evaluation by dermatopharmacokinetics // *Pharmaceutics.* 2018.10(4):265. DOI: 10.3390/pharmaceutics10040265.
16. Djabri A., Guy R.H., Delgado-Charro M.B. Transdermal iontophoresis of ranitidine: an opportunity in paediatric drug therapy // *Int. J. Pharm.* 2012;435(1):27-32. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2012.03.006.
17. Вдовин А.С., Максимчик П.В., Куликов А.В. и др. Ингибирование Р-гликопротеина стимулирует клеточную гибель в условиях, моделирующих гипоксию // *Доклады Академии наук.* 2017;472(3):345-349. DOI: 10.7868/So869565217030264.
18. Венгеровский А.И. Фармакология: учебник. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2020. 848 с.
- according to the recent FDA and ICH harmonised guidelines. *J. Pharm. Pharmacol.* 2019;71(8):1231-1242. DOI: 10.1111/jphp.13111.
9. Yakusheva E.N., Chernykh I.V., Birukova A.S. Characteristic of P-glycoprotein as a drug peptide transporter. *I.P. Pavlov Russian Medical Biological Herald.* 2011;19(3):142-148. DOI: 10.17816/PAVLOVJ20113142-148. (In Russ.)
10. Le Ferrec E., Chesne C., Artusson P. et al. In vitro models of the intestinal barrier. The report and recommendations of ECVAM Workshop 46. *Altern. Lab. Anim.* 2001;29(6):649-668. DOI: 10.1177/026119290102900604.
11. Mishra P., Pandey C.M., Singh U. et al. Selection of appropriate statistical methods for data analysis. *Ann. Card. Anaesth.* 2019;22(3):297-301. DOI: 10.4103/aca.ACA_248_18.
12. Sergienko V.I., Bondareva I.B. (2006). *Mathematical Statistics in Clinical Research: Textbook.* M.: GEOTAR-Media. 304 p. (In Russ.)
13. Chmelař V., Grossman V., Hais I.M., Demi F. Gastric retention and its changes in mice and rats during the first six days following X-irradiation. *Radiat. Res.* 1969;37(3):627-635. DOI: 10.2307/3572700.
14. Tshepelevitsh S., Kadam S.A., Darnell A. et al. LogP determination for highly lipophilic hydrogen-bonding anion receptor molecules. *Anal. Chim. Acta.* 2020;1132:123-133. DOI: 10.1016/j.aca.2020.07.024.
15. Calatayud-Pascual M.A., Sebastian-Morelló M., Balaguer-Fernández C. et al. Influence of chemical enhancers and iontophoresis on the in vitro transdermal permeation of propranolol: evaluation by dermatopharmacokinetics. *Pharmaceutics.* 2018.10(4):265. DOI: 10.3390/pharmaceutics10040265.
16. Djabri A., Guy R.H., Delgado-Charro M.B. Transdermal iontophoresis of ranitidine: an opportunity in paediatric drug therapy. *Int. J. Pharm.* 2012;435(1):27-32. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2012.03.006.
17. Vdovin A.S., Maximchik P.V., Kulikov A.V. et al. Inhibition of P-glycoprotein stimulates cell death under hypoxia-mimicking conditions. *Doklady Biochemistry and Biophysics.* 2017;472:327-30. DOI: 10.1134/S1607672917010100.
18. Vengerovskii A.I. (2020). *Pharmacology: Textbook.* M.: GEOTAR-Media. 848 p. (In Russ.)

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Алифорова Анастасия Евгеньевна – младший научный сотрудник ООО «Инновационные фармакологические разработки» (ООО «Ифар»), Томск, Россия; аспирант кафедры фармакологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Томск, Россия. ORCID: 0000-0003-1656-8429.

Быков Владимир Валерьевич – канд. мед. наук, начальник отдела фармакологических исследований ООО «Инновационные фармакологические разработки» (ООО «Ифар»), Томск, Россия; старший преподаватель кафедры фармакологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицин-

ABOUT THE AUTHORS

Anastasia E. Aliforenko – Junior Researcher, Innovative Pharmacological Research, LLC (Iphar, LLC), Tomsk, Russia; Post-graduate Student, Department of Pharmacology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russia. ORCID: 0000-0003-1656-8429.

Vladimir V. Bykov – Cand. Sci. (Med.), Head, Pharmacological Research Department, Innovative Pharmacological Research, LLC (Iphar, LLC), Tomsk, Russia; Senior Lecturer, Department of Pharmacology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russia. ORCID: 0000-0002-5145-2184.

Arina V. Bykova – Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Innovative Pharmacological Research, LLC (Iphar, LLC), Tomsk, Russia. ORCID: 0000-0002-8495-8560.

ский университет» Минздрава России, Томск, Россия. ORCID: 0000-0002-5145-2184.

Быкова Арина Владимировна – канд. биол. наук, старший научный сотрудник ООО «Инновационные фармакологические разработки» (ООО «Ифар»), Томск, Россия. ORCID: 0000-0002-8495-8560.

Мотов Валерий Сергеевич – канд. биол. наук, научный сотрудник ООО «Инновационные фармакологические разработки» (ООО «Ифар»), Томск, Россия. ORCID: 0000-0002-0197-7521.

Кожуховский Кирилл Евгеньевич – руководитель группы хромато-масс-спектрометрии лаборатории аналитической химии отдела фармацевтических разработок ООО «Инновационные фармакологические разработки» (ООО «Ифар»), Томск, Россия. ORCID: 0009-0007-1716-3825.

Павловский Виктор Иванович – д-р хим. наук, ведущий научный сотрудник отдела фармацевтических разработок ООО «Инновационные фармакологические разработки» (ООО «Ифар»), Томск, Россия. ORCID: 0000-0002-4583-6245.

Хазанов Вениамин Абрамович – д-р мед. наук, профессор, генеральный директор ООО «Инновационные фармакологические разработки» (ООО «Ифар»), Томск, Россия. ORCID: 0000-0002-8833-785X.

Венгеровский Александр Исаакович – д-р мед. наук, профессор, заслуженный работник высшей школы РФ, и.о. заведующего кафедрой фармакологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Томск, Россия. ORCID: 0000-0001-5094-3742.

Valeriy S. Motov – Cand. Sci. (Biol.), Researcher, Innovative Pharmacological Developments, LLC (Iphar LLC), Tomsk, Russia. ORCID: 0000-0002-0197-7521.

Kirill E. Kozhukhovskiy – Head, Chromatography-mass Spectrometry Group, Laboratory of Analytical Chemistry, Pharmaceutical Development Department, Innovative Pharmacological Research, LLC (Iphar, LLC), Tomsk, Russia. ORCID: 0009-0007-1716-3825.

Victor I. Pavlovskiy – Dr. Sci. (Chem.), Leading Researcher, Pharmaceutical Development Department, Innovative Pharmacological Research, LLC (Iphar, LLC), Tomsk, Russia. ORCID: 0000-0002-4583-6245.

Veniamin A. Khazanov – Dr. Sci. (Med.), Professor, Director General, Innovative Pharmacological Research, LLC (Iphar, LLC), Tomsk, Russia. ORCID: 0000-0002-8833-785X.

Aleksandr I. Vengerovskii – Dr. Sci. (Med.), Professor, Honored Worker of Higher Education of the Russian Federation, acting Head, Department of Pharmacology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russia. ORCID: 0000-0001-5094-3742.