

УДК 577.113.3 + 615.281.9

# 5'-Фосфонаты AZT: достижения и перспективы в лечении и профилактике ВИЧ-инфекции

А. Л. Хандажинская\*, Е. А. Широкова

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32

\*E-mail: khandazhinskaya@bk.ru

Поступила в редакцию 18.02.2013

**РЕФЕРАТ** AZT (Зидовудин, Ретровир), несмотря на его многочисленные недостатки, остается одним из ключевых препаратов, используемых для профилактики и терапии ВИЧ-инфекции как в виде монотерапии, так и в составе ВААРТ. Стратегия поиска новых эффективных и безопасных соединений, направленная на создание латентных форм (депо-форм) на основе AZT, принесла первые положительные результаты. Так, натриевая соль 5'-Н-фосфоната AZT (Никавир, фосфазид) показала клинические преимущества перед AZT, прежде всего значительно меньшую токсичность и лучшую переносимость. Никавир может эффективно использоваться для профилактики передачи ВИЧ от матери ребенку, а также в качестве альтернативного препарата при непереносимости Зидовудина. Доклинические испытания еще одного фосфоната, 5'-аминокарбонилфосфоната AZT, показали, что при его приеме происходит высвобождение AZT, причем фармакокинетические параметры AZT указывают на пролонгированность фармакологического действия. Анализ совокупности доклинических токсикологических и фармакологических данных позволил рекомендовать 5'-аминокарбонилфосфонат AZT для клинических исследований.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** терапия ВИЧ, депо-формы, 5'-фосфонаты AZT, Никавир, доклинические исследования.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ОТ-ВИЧ – обратная транскриптаза вируса иммунодефицита человека; AZT – 3'-азидо-3'-дезокситимидин; ЗТС – (-)-β-L-2',3'-дидезокси-3'-тиацитидин; L-FTC – (-)-β-L-2',3'-дидезокси-3'-тиа-5-фторцитидин; ВААРТ – высокоактивная антиретровирусная терапия; LD<sub>50</sub> – средняя летальная доза; AUC – площадь под кривой зависимости концентрации препарата в крови от времени; MRT – время удержания субстанции в тест-ткани; CL – общий клиренс; V<sub>ss</sub> – стационарный объем распределения; F – биодоступность.

## ВВЕДЕНИЕ

В последней четверти прошлого столетия СПИД стал одной из главных угроз здоровью человека. Многолетние усилия ученых привели к созданию множества веществ с анти-ВИЧ-активностью, которые можно разделить на несколько групп: 1) нуклеозидные и нуклеотидные ингибиторы обратной транскриптазы ВИЧ (ОТ-ВИЧ); 2) ингибиторы протеазы; 3) ингибиторы интегразы и 4) ингибиторы связывания и проникновения вируса в клетку. Самую многочисленную группу анти-ВИЧ-препаратов, применяемых в медицинской практике, представляют нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы (НИОТ), наиболее известные из которых – 3'-азидо-3'-дезокситимидин (AZT, Зидовудин, Ретровир), (-)-β-L-2',3'-дидезокси-3'-тиацитидин (ЗТС, Ламивудин), (-)-β-L-2',3'-дидезокси-3'-тиа-5-фторцитидин (L-FTC, Эмрицитабин), 2',3'-дидезоксиинозин (ddI, Диданозин) и др. [1]. Механизм действия этих ингибиторов включает внутриклеточное трифосфорилиро-

вание с последующим специфическим блокированием синтеза вирусной ДНК, катализируемого ОТ-ВИЧ. Однако все НИОТ имеют серьезные недостатки. Фармакокинетические свойства и низкая эффективность внутриклеточных превращений (например, только 0.3% AZT преобразуется в клетках в соответствующий трифосфат) обуславливают использование высоких доз препаратов, что, в свою очередь, приводит к росту токсичности. Кроме того, вследствие высокой изменчивости вируса происходит быстрое развитие вирусной резистентности [2, 3], что также снижает эффективность терапии.

Клинические последствия токсичности AZT включают многочисленные гематологические эффекты, подавление функционирования клеток костного мозга, заболевания печени, миопатии и др. [4, 5]. Из-за митохондриальной токсичности AZT больные СПИДом страдают от гиперлактатемии и липодистрофии [6, 7]. Быстрое выведение AZT требует ежедневного трехразового приема препарата. После

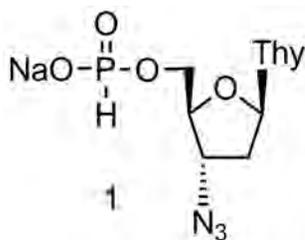
длительного курса AZT становится неэффективным из-за развития у вируса резистентности к нему [8, 9]. Тем не менее, несмотря на все побочные эффекты, AZT остается наиболее широко применяемым препаратом.

Используемые в настоящее время схемы комплексной лекарственной терапии (высокоактивная антиретровирусная терапия, ВААРТ) позволяют контролировать репликацию ВИЧ в большей степени, чем индивидуальные препараты, но и для них нужны новые эффективные и нетоксичные компоненты.

Один из способов увеличения эффективности антивирусного препарата состоит в синтезе депо-формы (латентной формы), т.е. такого производного, которое, подвергаясь химическим или ферментативным превращениям в организме, высвобождает активное соединение [10]. Создание депо-форм – это хороший способ снижения токсичности НИОТ за счет как улучшения фармакокинетических параметров, так и уменьшения сродства к митохондриальным белкам-транспортерам. Такой подход использовали во многих лабораториях мира при поиске новых анти-ВИЧ-агентов. Примерами успешного применения депо-форм НИОТ в практической медицине являются Виреад (Viread®, тенофовир дизопроксилфумарат) и Никавир (Nikavir®, натриевая соль 5'-Н-фосфоната AZT, фосфазад) [11, 12].

### НИКАВИР (ФОСФАЗИД) – ПЕРВЫЙ УСПЕХ В СОЗДАНИИ ДЕПО-ФОРМ AZT

Никавир был лицензирован в Российской Федерации в 1999 году как препарат для лечения больных СПИДом и профилактики ВИЧ-инфекции [13–15]. Никавир получен в результате многолетних исследований по синтезу и изучению противовирусных агентов, проводимых под руководством А.А. Краевского в Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН [16, 17]:



5'-Н-Фосфонат AZT синтезировали в 1989 году и проверили на клеточных культурах, инфицированных ВИЧ-1 [16], однако результаты тестов, проведенных в разных лабораториях, значительно отличались. Сначала сообщалось, что в культуре клеток МТ-4 фосфазад **1** показал умеренную анти-ВИЧ-активность и более низкую токсичность, чем AZT

[18, 19], при этом его индекс селективности был выше, чем у AZT. Позже, однако, фосфазад проверили на трех различных клеточных линиях (МТ-4, СЕМ-SS и СЕМ-Х 174) и обнаружили, что его активность была примерно на порядок меньше, чем у AZT [20]. В другой публикации [21] сообщалось, что в клеточных культурах С8 и JM анти-ВИЧ-активность соединения **1** была в 10–20 раз ниже, чем у AZT. Напротив, согласно [22], индексы селективности Н-фосфоната **1** были в 1.5 и 15 раз выше соответственно, чем у AZT (использовали штаммы ПИВ и НХВ2 ВИЧ в мононуклеарных клетках крови). Несмотря на эти противоречивые и несколько спорные данные, изучение фосфазида было продолжено, что позволило выявить его преимущества перед AZT в опытах на лабораторных животных [23].

Фармакокинетические исследования фосфазида показали его основное отличие от AZT: фармакокинетический профиль AZT после перорального приема фосфазида был существенно более плавным, чем при приеме самого AZT ( $C_{max}$  и  $t_{max}$  ~ 0.13 мг/л и 2–2.5 ч соответственно против 1.2 мг/л и 0.5–0.8 ч у AZT). Меньшая пиковая концентрация AZT, наблюдаемая после приема фосфазида, не снижала противовирусную эффективность, но могла способствовать снижению токсичности. Это отличие проявилось в клинической практике, где наблюдали устойчивый положительный терапевтический эффект (снижение вирусной нагрузки, восстановление иммунитета и уменьшение опасности развития сопутствующих заболеваний). Фосфазад хорошо переносится взрослыми и детьми. В ходе лечения фосфазидом не было выявлено побочных эффектов, обычно наблюдавшихся при приеме AZT, таких, как рвота, тошнота, головная боль, диарея, миалгия, анемия, тромбоцитопения и нейтроцитопения [17].

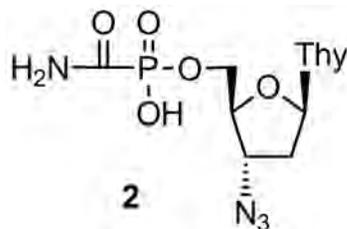
Существенная терапевтическая эффективность и безопасность фосфазида отмечена у ВИЧ-инфицированных пациентов, получающих ВААРТ. Хорошо показали себя различные сочетания Никавира: с Диданозином и Невирапином [24], с Диданозином и Ритонавиром/Саквинавиром [25], с Ламивудином и Эфавиренцем или ингибитором протеазы (Атазанавиром или Лопинавиром/Ритонавиром) [26] и др. Перечисленные схемы ВААРТ оказались более эффективными при сопутствующих заболеваниях – анемиях, хронических гепатитах В и С [27], циррозе печени и туберкулезе [28], чем схемы, включающие Ретровир или Комбивир. Безопасность Никавира при туберкулезе и заболеваниях печени вирусной этиологии является его существенным преимуществом, потому что большинство пациентов, зараженных ВИЧ, страдают от данных оппортунистических инфекций [27, 28].

Другое клиническое применение фосфазида – химиопрофилактика передачи ВИЧ от инфицированных женщин их детям во время беременности, родового и послеродового периодов. Фосфазид не влияет на течение беременности у ВИЧ-инфицированных женщин, на зрелость и жизнеспособность плодов. AZT из фосфазида эффективно проникает через плаценту, в результате чего в пуповине и крови матери поддерживаются его одинаковые концентрации. Использование Никавира во время беременности в сочетании с Ретровиром или Невирапином в родах и послеродовом периоде эффективно предотвращает вертикальную передачу ВИЧ [29, 30]. В некоторых случаях Ретровир был заменен на Никавир из-за низкого уровня гемоглобина в крови беременных женщин. Во всех случаях препарат хорошо переносился, а гематологические показатели восстанавливались.

Таким образом, низкая токсичность и хорошая переносимость фосфазида делают его привлекательным компонентом различных вариантов ВААРТ. Он может эффективно использоваться для профилактики передачи ВИЧ от матери ребенку, в терапии ВИЧ-инфекции, особенно при сопутствующем хроническом вирусном гепатите, а также для предотвращения заражения медперсонала. Неслучайно, в последней редакции Протоколов лечения больных ВИЧ-инфекцией [31] фосфазид рекомендован в качестве одного из компонентов предпочтительных схем антиретровирусной терапии первого ряда.

### 5'-АМИНОКАРБОНИЛФОСФОНАТЫ КАК НАПРАВЛЕНИЕ ДЛЯ ПОИСКА НОВЫХ ДЕПО-ФОРМ AZT

В продолжение работы по созданию фосфонатных депо-форм AZT были изучены соединения различного типа [32–37], но самой перспективной оказалась группа 5'-аминокарбонилфосфонатов AZT, замещенных по NH-фрагменту различными функциональными группами ( $C_6H_{13}$ ,  $HOCH_2CH_2$ ,  $H_2NCH_2CH_2$ ,  $Me_2NCH_2CH_2$ ,  $Me_3N^+CH_2CH_2$ , Me, H,  $C_4H_9$ ,  $PhCH_2CH_2$ ) [38–40]:



Противовирусные эксперименты в клетках МТ-4, зараженных ВИЧ, показали, что 5'-аминокарбонилфосфонаты AZT ингибировали вирусную репликацию на порядок менее эффективно, чем AZT. В то же

время их токсичность, за исключением метиламидного производного, была значительно ниже, чем у AZT. Все синтезированные фосфонаты оказались устойчивыми в биологических жидкостях (сыворотка крови человека, цельная кровь собаки). Предварительная оценка фармакокинетических параметров после перорального приема собаками 5'-аминокарбонилфосфонатов AZT показала, что все соединения могли метаболизироваться до AZT. Характер кривых зависимости концентрации высвобожденного AZT в плазме крови от времени был сходным у всех изученных амидов. Пиковые концентрации  $C_{max}$  AZT для фосфонатов, несущих по NH-фрагменту остатки  $C_6H_{13}$ ,  $C_4H_9$ ,  $PhCH_2CH_2$ , а также незамещенного амида **2** составляли 2.0, 0.8, 0.9 и 3.7 мг/л соответственно. Таким образом, в пределах этой группы 5'-аминокарбонилфосфонат AZT **2** был самым эффективным донором AZT. Это соединение изучено более подробно.

### 5'-АМИНОКАРБОНИЛФОСФОНАТ AZT

#### Эксперименты в клеточных культурах

Изучение противовирусной активности 5'-аминокарбонилфосфоната AZT **2** на культуре лимфобластоидных клеток человека МТ-4 показало, что его противовирусная активность примерно на порядок уступает активности AZT и в 3–4.5 раза ниже, чем у фосфазида. Однако его токсичность снижалась в еще большей степени (в 34–50 и 12.5–15 раз соответственно), благодаря чему фосфонат **2** обладал более высоким химиотерапевтическим индексом, чем AZT и фосфазид [38–40].

Эффективность проникновения в клетки фосфоната **2** была в 10–100 раз ниже, чем AZT, и приблизительно в 6 раз ниже, чем у фосфазида [23, 39]. Это позволяет предположить, что понижение анти-ВИЧ-активности и токсичности в культуре клеток МТ-4 по сравнению с показателями для AZT и фосфазида отражает уменьшение эффективности проникновения в клетки, т.е. существует прямая зависимость между проникновением фосфоната **2**, фосфазида и AZT в культивируемые клетки и противовирусными свойствами этих соединений. Необходимо отметить, что обе депо-формы достаточно стабильны при испытании в культуре клеток, в то время как в организме они эффективно превращаются в AZT [39].

#### Исследование стабильности

Стабильность фосфоната **2** в 100% сыворотке крови человека оказалась сопоставимой со стабильностью фосфазида: время полужизни ( $t_{1/2}$ ) обоих соединений превышает 6 ч [39]. В то же время в цельной крови собаки при 37°C фосфонат **2** был существенно более устойчивым, чем фосфазид ( $t_{1/2} > 24$  ч против 3 ч).

**ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ПРИ ОДНОКРАТНОМ ВВЕДЕНИИ [41]**

**Беспородные собаки (средний вес 22 ± 3.4 кг)**

В результате фармакокинетического изучения препарата **2** (капсулы № 2; 250, 500 и 1000 мг или 10, 20 и 40 мг/кг) установлено, что большая его часть метаболизируется до фармакологически активного AZT. Фармакокинетические параметры высвобожденного AZT после однократного перорального приема собаками фосфоната **2** приведены в *табл. 1*.

Сравнение фосфоната **2** с AZT и фосфазидом (*табл. 2*) показало, что пиковая концентрация AZT при приеме фосфоната **2** в плазме была ниже, тогда как накопление AZT и время выведения были более длительными. Фармакокинетические параметры AZT, образующегося из фосфоната **2**, были близки к параметрам фосфазиды ( $C_{max}$  в 2.5 раза меньше, AUC в 2 раза меньше, но  $t_{max}$  и другие параметры больше). Максимальная концентрация AZT после пе-

рорального приема фосфоната **2** достигалась через 4 ч, что в 2 раза больше, чем при приеме AZT, и на 1 ч больше, чем у фосфазиды (*табл. 2*).

Заслуживает внимания, что значения  $t_{1/2}$  и  $t_{max}$  AZT у собак увеличивались в следующем порядке: AZT < фосфазид < 5'-аминокарбонилфосфонат AZT, что позволяет рассматривать 5'-аминокарбонилфосфонат AZT **2** как депо-форму AZT пролонгированного действия.

В плазме крови собак после внутривенного введения субстанции фосфоната **2** в дозе 50 мг (2–5 мг/кг веса тела) AZT не был зафиксирован. Фармакокинетические параметры исходного **2** составляли:  $AUC_t = 2.19$  мг·ч/л,  $t_{1/2} = 0.35$  ч, MRT = 0.74 ч, CL = 16.8 л/ч,  $V_{ss} = 12.4$  л.

Биодоступность 5'-аминокарбонилфосфоната **2** после перорального приема в использованных дозах составляла 4.7%, а биодоступность AZT после перорального приема 2–8%, что в 2 раза меньше, чем у фосфазиды. Биодоступность AZT при пероральном

**Таблица 1.** Фармакокинетические параметры 5'-аминокарбонилфосфоната **2** и его основного метаболита AZT после однократного перорального приема собаками капсул 5'-аминокарбонилфосфоната **2** в дозах 10, 20 и 40 мг/кг массы тела

Доза <b>2</b> , мг	Тестируемое вещество	Фармакокинетические параметры					
		$C_{max}$ , мг/л	$t_{max}$ , ч	$AUC_t$ , мг·ч/л	$t_{1/2}$ , ч	MRT, ч	$C_{max}/AUC$ , 1/ч
10	<b>2</b>	0.31 ± 0.09	1.5 ± 0.25	0.47 ± 0.15	0.62 ± 0.1	2.43 ± 0.04	0.662 ± 0.066
	AZT	0.36 ± 0.24	4.7 ± 1.0	2.87 ± 1.56	4.57 ± 1.46	8.90 ± 5.34	0.119 ± 0.033
20	<b>2</b>	0.51 ± 0.18	1.6 ± 0.2	0.98 ± 0.44	0.81 ± 0.2	2.65 ± 0.16	0.561 ± 0.122
	AZT	0.69 ± 0.49	5.0 ± 1.7	6.0 ± 3.3	9.7 ± 4.3	12.0 ± 2.6	0.107 ± 0.023
40	<b>2</b>	0.51 ± 0.26	1.75 ± 0.27	1.25 ± 0.86	0.59 ± 0.2	2.87 ± 0.49	0.478 ± 0.117
	AZT	0.98 ± 0.56	6.0 ± 1.3	10.4 ± 6.1	7.0 ± 2.5	12.2 ± 1.4	0.100 ± 0.016

*Примечание.* Здесь и в *табл. 2* и *3*:  $AUC_t$  – площадь под кривой «концентрация–время»; MRT – время удержания субстанции в тест-ткани;  $t_{max}$  – время достижения максимальной концентрации;  $C_{max}$  – максимальная концентрация субстанции;  $t_{1/2}$  – период полувыведения.

**Таблица 2.** Сравнение фармакокинетических параметров AZT после однократного перорального приема собаками 5'-аминокарбонилфосфоната AZT **2**, фосфазиды **1** или AZT в дозах, эквивалентных 20 мг AZT/кг массы тела

Соединение	$C_{max}$ , мг/л	$t_{max}$ , ч	$AUC_t$ , мг·ч/л	$t_{1/2}$ , ч	MRT, ч	CL, л/ч
<b>2</b>	0.74 ± 0.03	5	9.2 ± 0.2	9.6 ± 0.2	13.9 ± 0.2	27 ± 2.6
<b>1</b>	1.89 ± 0.07	4	16.6 ± 0.3	7.2 ± 0.3	10.4 ± 0.5	15 ± 0.7
AZT	9.77 ± 0.3	2.5	58.8 ± 1.1	5.2 ± 0.5	7.5 ± 0.4	4.2 ± 0.3

приеме самого AZT была в 6 раз выше, чем в случае фосфоната **2**. Однако высокое значение AUC при приеме AZT связано с избыточной пиковой концентрацией в плазме, которая очень быстро понижается. Это вызывает токсичность и быстрое появление штаммов вируса, устойчивых к воздействию препарата. Напротив, при приеме фосфоната **2** перепад между максимальной и минимальной концентрацией AZT в крови существенно менее выражен, что может способствовать снижению токсичности и замедлению возникновения резистентности.

**Кролики породы шиншилла (средний вес 3 ± 0.4 кг) [41]**

Изучение фармакокинетики фосфоната **2**, водный раствор которого вводили в желудок кроликов, также подтвердило, что он является депо-формой AZT. AZT не найден в периферической крови кроликов (как и собак), которым фосфонат **2** вводили внутривенно, – единственным обнаруженным продуктом был исходный фосфонат **2** [17]. Это подтверждает гипотезу о том, что AZT образуется во время абсорбции исходного соединения [17].

Сравнение фармакокинетических параметров AZT и фосфоната **2** после однократного перорального приема кроликами фосфоната **2** в дозах 7, 70 и 200 мг/кг веса показало, что AZT присутствовал в крови во всех случаях. При этом характер кривых «концентрация–время» и соотношения AZT и исходного **2** практически не менялись при изменении дозы [39].

Результаты сравнения фармакокинетических свойств AZT после перорального приема кроликами однократной дозы AZT, фосфазида **1** или фосфоната **2** приведены в табл. 3. Следует отметить, что форма кривой зависимости концентрации AZT, высвобожденного из фосфоната **2**, была существенно более гладкой, величины  $C_{max}$  AZT, высвобожденного из фосфазида **1** или фосфоната **2**, отличались только в 2 раза, а величины AUC обоих фосфонатов были довольно близкими.

**Крысы линии Вистар и мыши линии BALB/c**

При пероральном введении крысам (масса тела 200 ± 7 г) фосфоната **2** в дозе 20 мг/кг исходный фосфонат **2** в плазме крови не определялся. Доступным для определения был только его метаболит – AZT, имеющий следующие фармакокинетические параметры:  $AUC_{0-t} = 2.27$  мг·ч/л,  $MRT = 6.54$  ч,  $t_{max} = 4$  ч,  $C_{max} = 0.4$  мг/л,  $t_{1/2} = 2.45$  ч и  $C_{max}/AUC_t = 0.176$  ч<sup>-1</sup>.

При внутрибрюшинном введении крысам (масса тела 250 ± 10 г) фосфоната **2** в дозе 20 мг/кг, наоборот, в плазме определялся главным образом сам фосфонат **2** и следовые количества его метаболита AZT. Фармакокинетические параметры фосфоната **2** составляли:  $AUC_{0-t} = 8.02$  мг·ч/л,  $MRT = 0.82$  ч,  $CL = 0.45$  л/ч,  $t_{1/2} = 0.42$  ч и  $V_{ss} = 0.37$  л. Заслуживает внимания тот факт, что после внутрибрюшинного введения мышам фосфоната **2** в дозе 6 г/кг веса в крови выявлен не только исходный фосфонат **2**, но и 3.5% AZT.

Таким образом, 5'-аминокарбонилфосфонат AZT **2** высвобождает AZT после введения различными способами (перорально, внутрижелудочно или внутрибрюшинно) экспериментальным животным (мыши, крысы, кролики и собаки) в широком диапазоне доз (7–6000 мг/кг веса) [17]. Фармакокинетические параметры фосфоната **2** и высвобождаемого из него AZT различаются в плазме крови разных видов животных. Эти различия могут быть связаны с особенностями метаболизма у различных животных и/или способами введения препарата.

Линейность фармакокинетики фосфоната **2** по его основному метаболиту AZT позволяет приблизительно рассчитать дозу для человека по результатам, полученным на животных. Так, при однократном пероральном приеме 600 мг фосфоната **2** можно ожидать, что концентрация AZT в плазме крови человека составит 100–115 нг/мл при достаточно пологой фармакокинетической кривой, что существенно превосходит минимальную концентрацию AZT при регулярном (трижды в день по 200 мг) пероральном приеме Зидовудина [42].

**Таблица 3.** Сравнение фармакокинетических параметров AZT после однократного перорального приема кроликами 5'-аминокарбонилфосфоната AZT **2**, фосфазида **1** или AZT в дозах, эквивалентных 200 мг AZT/кг массы тела

Соединение	$C_{max}$ , мг/л	$t_{max}$ , ч	$AUC_t$ , мг·ч/л	$t_{1/2}$ , ч	MRT, ч	CL/F, л/ч
<b>2</b>	3.75 ± 0.01	3.5	25.12 ± 1.08	3.66 ± 0.74	4.72 ± 0.08	44.22 ± 1.95
<b>1</b>	7.38 ± 3.08	2.0	22.99 ± 10.17	1.42 ± 0.12	3.02 ± 0.12	54.95 ± 22.85
AZT	39.64 ± 4.24	1.0	88.5 ± 25.5	2.13 ± 0.71	2.10 ± 0.30	9.40 ± 2.70

### ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ПРИ МНОГОКРАТНОМ ВВЕДЕНИИ 5'-АМИНОКАРБОНИЛФОСФОНАТА AZT [41]

Результаты многократного приема 5'-аминокарбонилфосфоната AZT также выглядят многообещающими.

Эксперименты на кроликах показали, что после курсового перорального введения (раствор – 1 г в 4–5 мл воды, прием через 6 и 18 ч в течение 5 дней) фосфоната 2 AZT постепенно накапливается в крови (рисунк). Кроме того, после последней дозы (96 ч после начала эксперимента) AZT детектировался в крови через 66 ч (162 ч от начала эксперимента) [17].

Собакам (средний вес  $10.2 \pm 1$  кг) препарат 2 вводили перорально (600 мг натошак в течение 7 дней с интервалом 24 ч). AZT определялся в плазме на протяжении всего интервала между приемами фосфоната 2. Одинаковые значения  $C_0$  ( $0.17 \pm 0.07$  мг/л) и  $C_{\min}$  ( $0.17 \pm 0.07$  мг/л) на 7-й день курсового введения препарата говорят о достижении равновесного состояния. Значение квазистационарной концентрации составило 0.96 мг/л. Флуктуация уровней AZT в плазме в равновесной стадии ( $2.82 \pm 0.26$ ) была вполне приемлемой.

На 7-й день курсового перорального введения капсул фосфоната 2 отмечалось накопление AZT в организме собак, что выражалось в увеличении значений AUC (в 1.3 раза по сравнению с первым днем приема) и  $C_{\min}$  (в 1.7 раза по сравнению с первым днем), а также в удлинении  $t_{\max}$  (с 2.7 до 4 ч) и возрастании  $C_{\max}$  (с 2.45 до 2.75 мг/л плазмы крови).

### РАСПРЕДЕЛЕНИЕ В ТКАНЯХ [41]

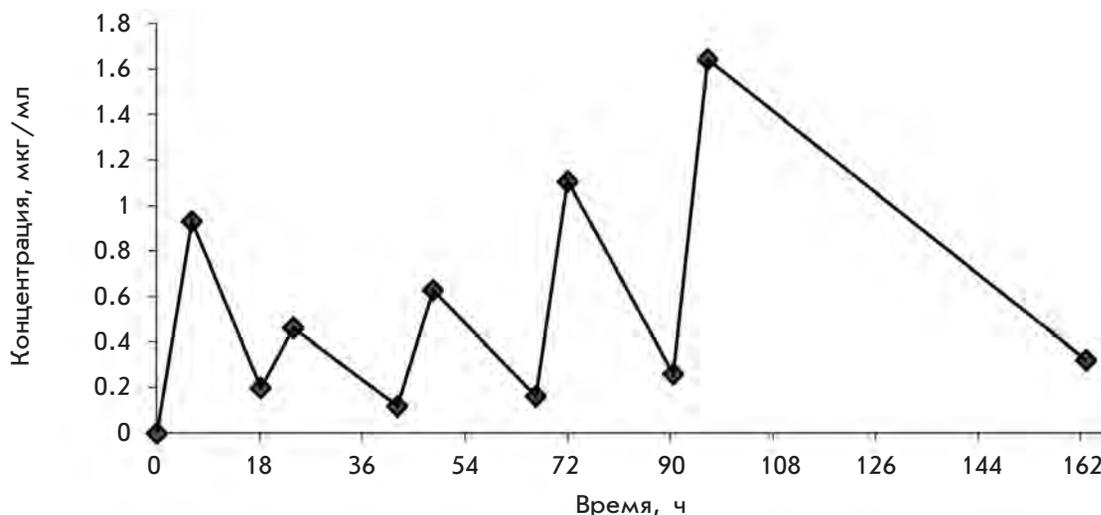
Важный этап фармакокинетических исследований – изучение тканевой доступности новых лекарственных

средств. В результате процессов распределения лекарственное средство транспортируется в зону действия, где оно взаимодействует со структурами, определяющими эффект препарата. Определение величины тканевой доступности позволяет количественно оценить интенсивность проникновения действующего вещества в периферические ткани и орган-мишень.

Распределение AZT, метаболита фосфоната 2, изучали в органах и тканях, отличавшихся степенью кровоснабжения, в органах, обеспечивающих выведение, и в органе – зоне потенциального действия. Были исследованы хорошо васкуляризированные (печень, почки, селезенка, легкие), умеренно васкуляризированные (скелетные мышцы) и слабо васкуляризированные ткани (брыжейка). AZT обнаружили во всех этих органах и тканях, причем его распределение по органам характеризовалось значительной гетерогенностью. Предел количественного определения составлял 10 нг/мл. После однократного перорального введения фосфоната 2 в дозе 100 мг/кг тела AZT определялся в плазме крови и органах крыс в течение 12 ч. При этом тканевая доступность AZT в сильно васкуляризированных органах (печень, селезенка, легкие, почки) была значительно выше, чем в скелетной мускулатуре и брыжейке.

Снижение концентрации AZT в основном носило монофазный характер. Полупериод выведения после перорального введения составил 3.9 ч (плазма крови).

После однократного перорального введения фосфоната 2 в дозе 200 мг/кг исходное соединение не определялось в суточной моче и кале, что может быть обусловлено интенсивной биотрансформацией препарата на фазе всасывания. Обнаружен только



Высвобождение AZT после многократного приема фосфоната 2 кроликами [17]

основной метаболит AZT, который выводится в незначительных количествах (4.11 и 0.04% соответственно от введенной дозы препарата).

### ТОКСИЧНОСТЬ [41]

Результаты исследования токсичности на мышах подтвердили предположение о том, что медленное накопление в крови и более медленное выведение AZT, высвобожденного из фосфоната **2**, по сравнению с AZT, введенным непосредственно и высвобожденным при введении фосфазида, может привести к уменьшению токсичности. Действительно, фосфонат **2** является малотоксичным препаратом, что подтверждается результатами опытов по определению острой токсичности (мыши линии BALB/c и крысы Вистар) и хронических экспериментов (крысы Вистар, беспородные собаки). Однократное введение препарата мышам и крысам в испытанных токсических дозах (2000–50000 мг/кг) сопровождалось кратковременным возбуждением животных, сменявшимся угнетенным состоянием, вялостью и адинамией. Средняя летальная доза (LD<sub>50</sub>) фосфоната **2** при внутрибрюшинном введении мышам составила ≥ 5 г/кг по сравнению с 1.5 и 2.3 г/кг для AZT и фосфазида соответственно. LD<sub>50</sub> при однократном введении в желудок крысам превысила 40 г/кг.

Токсичность фосфоната **2** изучали в условиях хронического эксперимента на крысах, которым ежедневно в течение 3 мес. внутрижелудочно вводили этот препарат в дозе 133 и 266 мг/кг. Испытанные дозы препарата превышали высшую суточную терапевтическую дозу для человека в 10 и 20 раз (13.3 мг/кг веса). Оказалось, что соединение **2** в испытанных дозах хорошо переносится животными и не влияет на функциональное состояние основных органов и систем организма (по данным биохимических тестов), а также на гематологические показатели. Отсутствие токсических повреждений внутренних органов и местного раздражающего действия подтверждено при патоморфологическом исследовании, проведенном после окончания эксперимента.

Токсичность лекарственной формы фосфоната **2** (капсулы для приема внутрь по 200 мг) оценивали на собаках, которым в течение 4 нед. ежедневно внутрижелудочно вводили препарат в дозе 166 мг/кг (12.5-кратная высшая терапевтическая доза, рекомендованная для человека). Установлено, что данная лекарственная форма хорошо переносится животными и по данным биохимических тестов не влияет на функциональное состояние внутренних органов, а также на их гематологические показатели. Отсутствие токсических повреждений внутренних органов и местного раздражающего действия фосфоната **2** в виде капсул при длительном введении в желудок

собакам подтверждено результатами патоморфологических исследований.

Для оценки мутагенных свойств фосфоната **2** изучили его способность вызывать генные мутации в индикаторных штаммах *Salmonella typhimurium* в тесте Эймса, вызывать хромосомные aberrации в клетках костного мозга гибридных мышей F1(CBAxС57Bl6) и влиять на количество доминантных летальных мутаций в зародышевых клетках мышей. Показано, что фосфонат **2** в концентрации до 1 мг на чашку не вызывает статистически значимого увеличения числа ревертантов в тесте Эймса. В дозах, более чем в 50 раз превосходящих высшую терапевтическую дозу, рекомендованную для человека, фосфонат **2** не показал мутагенности в тестах *in vivo*: он не вызывал увеличения числа хромосомных aberrаций в клетках костного мозга мышей и не влиял на количество доминантных летальных мутаций в зародышевых клетках мышей.

При ежедневном внутрижелудочном введении соединения **2** в дозе 133 мг/кг (10-кратная высшая терапевтическая доза, рекомендованная для человека) крысам Вистар (самцам в течение 10 нед., самкам – в течение 2 нед.) не установлено влияния препарата на репродуктивную функцию животных.

При ежедневном введении в желудок беременным крысам с 1 по 19 день гестации в дозе 133 мг/кг фосфонат **2** не влиял на увеличение массы тела беременных крыс, продолжительность беременности, количество желтых тел, мест имплантации, массу тела эмбрионов, их кранио-каудальный размер, показатели пред- и постимплантационной гибели плодов, а также постнатальное развитие крысят. Прием соединения **2** не вызывал каких-либо уродств или пороков развития эмбрионов, иными словами, оно не обладает эмбриотоксическим и тератогенным действием.

Аллергизирующие свойства фосфоната **2** были изучены на морских свинках. Установлено, что при 5-кратном внутрижелудочном введении препарата в сенсibiliзирующих дозах, 133 и 266 мг/кг, и внутрижелудочном введении разрешающей дозы препарата 266 мг/кг на 14 и 21 день после сенсibiliзации фосфонат **2** не вызывает анафилактического шока. Препарат в испытанных дозах и схемах сенсibiliзации не проявляет аллергизирующего действия в реакции гиперчувствительности типа III у морских свинок. Кроме того, показано, что фосфонат **2** не влияет на реакцию подколенного лимфоузла у мышей.

В дозах 166 и 332 мг/кг (12.5- и 25-кратные высшие терапевтические дозы, рекомендованные для человека) фосфонат **2** не влияет на число ядросодержащих клеток в селезенке, а также на реакцию гиперчувствительности замедленного типа у мышей. В наи-

большей из испытанных доз (332 мг/кг) фосфонат **2** несколько снижает первичный иммунный ответ у мышей F1(CВАхС57В16).

Таким образом, доказано, что 5'-аминокарбонилфосфонат AZT **2** значительно менее токсичен, чем утвержденные лекарственные препараты Ретровир и Никавир, не обладает мутагенными и алергизирующими свойствами, а также иммунотоксичностью, эмбриотоксичностью и тератогенностью, и не влияет на репродуктивную функцию животных.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Усилия многочисленных исследователей привели к тому, что были синтезированы более 100 новых потенциальных депо-форм, основанных на 5'-фосфонатной модификации AZT, и проверена их анти-ВИЧ-активность. Никавир® является первым 5'-фосфонатом AZT, который стал использоваться в качестве анти-ВИЧ-препарата. В настоящее время закончены доклинические испытания еще одного фосфоната, 5'-аминокарбонилфосфоната AZT, и получены обнадеживающие результаты. Фармакокинетические исследования, проведенные на животных, показали, что при приеме внутрь фосфонат **2** в значительной степени превращается в AZT, причем

фармакокинетические параметры AZT указывают на пролонгацию его фармакологического действия.

Анализ совокупности доклинических токсикологических и фармакологических данных позволяет рекомендовать фосфонат **2** для клинических исследований. Фармакокинетические свойства этого соединения, по-видимому, позволяют использовать созданный на его основе препарат раз в сутки, в отличие от Зидовудина, который применяется 2–3 раза в сутки. Из-за меньшей токсичности фосфонат **2** может применяться не только для профилактики вертикальной передачи ВИЧ, но также у детей и ВИЧ-инфицированных пациентов с нарушенной функцией печени.

Таким образом, 5'-аминокарбонилфосфонат AZT **2** имеет превосходный потенциал как альтернатива AZT и заслуживает дальнейшего исследования. ●

*Авторы благодарны М.К. Кухановой и С.Н. Кочеткову за полезные дискуссии и помощь в работе.*

*Работа поддержана РФФИ (грант № 12-04-00581) и Программой Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- De Clercq E. // Biochim. Biophys. Acta. 2002. V. 1587. P. 258–275.
- Groschel B., Cinatl J.H., Cinatl J., Jr. // Intervirology. 1997. V. 40. P. 400–407.
- Antonelli G., Turriziani O., Verri A., Narcisco P., Ferri F., D'Offizi G., Dianzani F. // AIDS Res. Hum. Retrovir. 1996. V. 12. P. 223–228.
- Chariot P., Drogou I., De Lacroix-Szmania I., Eliezer-Vanerot M.C., Chazaud B., Lombès A., Schaeffer A., Zafrani E.S. // J. Hepatol. 1999. V. 30. P. 156–160.
- Gelmon K., Montaner J.S.G., Fanning M., Smith J.R.M., Falutz J., Tsoukas C., Gill J., Wells G., O'Shaughnessy M., Wainberg M., Ruedy J. // AIDS. 1989. V. 3. № 9. P. 555–561.
- Pan-Zhou X.-R., Cui L., Zhou X.-J., Sommadossi J.-P., Darley-Usmar V.M. // Antimicrob. Agents Chemother. 2000. V. 44. P. 496–503.
- Chiao S.K., Romero D.L., Johnson D.E. // Curr. Opin. Drug Discov. Devel. 2009. V. 12. № 1. P. 53–60.
- Kellam P., Boucher C.A., Larder B.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992. V. 89. P. 1934–1938.
- Ren J., Esnouf R.M., Hopkins A.L., Jones E.Y., Kirby I., Keeling J., Ross C.K., Larder B.A., Stuart D.I., Stammers D.K. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. P. 9518–9523.
- Stanczak A., Ferra A. // Pharmacol. Rept. 2006. V. 58. № 5. P. 599–613.
- Beaumont K., Webster R., Gardner I., Dack K. // Curr. Drug Metab. 2003. V. 4. № 6. P. 461–485.
- Calogeropoulou T., Detsi A., Lekkas E., Koufaki M. // Curr. Top. Med. Chem. 2003. V. 3. № 13. P. 1467–1495.
- Khorlin A.A., Tarusova N.B., Dyatkina N.B., Kraevsky A.A., Bibilashvili R.Sh., Galegov G.A., Korneeva M.N., Nosik D.N., Maiorova S.N., Shobukhov V.M., Zhdanov V.V. 5'-Phosphonates of 2',3'-dideoxynucleosides. RF1548182, 1992; US5043437, 1991; EP0354246, 1994; Japan 0354246 B1, 1995; Korean 106957, 1996.
- Yurin O., Kravtchenko A., Serebrovskaya L., Golochvastova E., Burova N., Voronin E., Pokrovsky V. The phase 1 of the clinical trial of 'Phosphazid', the new reverse transcriptase inhibitor. 4th Intern. Congress on drug therapy in HIV-infection. Glasgow, UK, 1998. V. 12. № 4. P. 240.
- Юрин О.Г., Краевский А.А., Афонина Л.Ю., Балаганин В.А., Бурова Н.В., Воронин Е.Е., Колесник А.Н., Молодов И.Б., Мошкочич Г.Ф., Покровский В.В. // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2001. № 1. С. 43–45.
- Тарусова Н.Б., Хорлин А.А., Краевский А.А. Корнилаева М.Н., Носик Д.Н., Круглов Н.Б., Галегов Г.А., Бибилашвили Р.Ш. // Молекуляр. биология. 1989. Т. 23. № 6. С. 1716–1724.
- Khandazhinskaya A., Matyugina E., Shirokova E. // Expert Opin. Drug Metab. Toxicol. 2010. V. 6. № 6. P. 1–14.
- Krayevsky A.A., Tarusova N.B., Zhu Q.Y., Vidal P., Chou T.C., Baron P., Polsky B., Jiang X.J., Matulic-Adamic J., Rosenberg I., Watanabe K.A. // Nucleosides & Nucleotides. 1992. V. 11. № 2–4. P. 177–196.
- Tarusova N.B., Kukhanova M.K., Krayevsky A.A., Karamov E.V., Lukashov V.V., Kornyalayeva G.V., Rodina M.A., Galegov G.A. // Nucleosides & Nucleotides. 1991. V. 10. № 1–3. P. 351–354.
- Gosselin G., Perigaud C., Lefebvre I., Pompou A., Aubertin A.M., Kern A., Azabo T., Stawinski J., Imbach J.L. // Antiviral. Res. 1993. V. 22. № 2–3. P. 143–153.
- McGuigan C., Bellevergue P., Jones B.C.N.M., Mahmood N., Hay A.J., Petrik J., Karpas A. // Antivir. Chem.

- Chemother. 1994. V. 5. P. 271–277.
22. Machado J., Salomon H., Olivera M., Tsoukas C., Kravetsky A., Wainberg M. // *Nucleosides & Nucleotides*. 1999. V. 18. № 4–5. P. 901–906.
23. Skoblov Yu., Karpenko I., Shirokova E., Popov K., Andronova V., Galegov G., Kukhanova M. // *Antiviral Res.* 2004. V. 63. № 2. P. 107–113.
24. Кравченко А.В., Саламов Г.Г., Богословская Е.Г., Сергиенко О.Г., Покровский В.В. // *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2001. № 4. С. 32–35.
25. Кравченко А.В., Ситдыкова Ю.Р., Серебровская Л.В., Богословская Е.В., Иванова Л.А., Покровский В.В. // *Инфекционные болезни*. 2003. Т. 1. № 1. С. 14–19.
26. Кравченко А.В., Канестри В.Г., Ганкина Н.Ю. // *Инфекционные болезни*. 2011. Т. 9. № 4. С. 64–69.
27. Ганкина Н.Ю., Кравченко А.В., Куимова У.А., Канестри В.Г. // *Инфекционные болезни*. 2010. Т. 8. № 1. С. 14–18.
28. Пантелеев А.М., Голиусова М.Ю., Кабанов В.И. // *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессия*. 2010. № 2. С. 75–79.
29. Иванова Э.С., Шмагель Н.Г., Воробьева Н.Н. // *Вопр. вирусологии*. 2010. Т. 55. № 2. С. 31–34.
30. Ivanova E.S., Shmagel N.G., Vorobyova N.N. // *Nikavir in Chemoprevention Regimens of Vertical HIV Transmission* / Ed. Fyson Hanania Kasenga, Publ.: InTech, DOI: 10.5772/24428.
31. Покровский В.В., Юрин О.Г., Кравченко А.В., Беляева В.В., Канестри В.Г., Афонина Л.Ю., Ермак Т.Н., Буравцова Е.В., Шахгильдян В.И., Козырина Н.В., Нарсия Р.С. и др. // *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. Приложение*. 2012. № 6. С. 1–28.
32. Khandazhinskaya A.L., Shirokova E.A., Karpenko I.L., Zakirova N.F., Tarussova N.B., Kravetsky A.A. // *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*. 2000. V. 19. № 10–12. P. 1795–1804.
33. Pokrovsky A.G., Pronyaeva T.R., Fedyuk N.V., Khandazhinskaya A.L., Shirokova E.A., Tarussova N.B., Karpenko I.L., Kravetsky A.A. // *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*. 2001. V. 20. № 4–7. P. 767–769.
34. Khandazhinskaya A.L., Shirokova E.A., Jasko M.V., Yanvarev D.V., Ivanov A.V., Pronyaeva T.R., Fedyuk N.V., Pokrovsky A.G., Kukhanova M.K. // *Collection Symp. Ser.* 2002. V. 5. P. 93–98.
35. Shirokova E.A., Jasko M.V., Khandazhinskaya A.L., Yanvarev D.V., Skoblov Y.S., Pronyaeva T.R., Fedyuk N.V., Pokrovsky A.G., Kukhanova M.K. // *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*. 2003. V. 22. № 5–8. P. 981–985.
36. Shirokova E.A., Jasko M.V., Khandazhinskaya A.L., Ivanov A.V., Yanvarev D.V., Skoblov Yu.S., Mitkevich V.A., Bocharov E.V., Pronyaeva T.R., Fedyuk N.V., et al. // *J. Med. Chem.* 2004. V. 47. № 14. P. 3606–3614.
37. Куханова М.К. // *Молекуляр. биология*. 2012. Т. 46. № 6. С. 860–873.
38. Shirokova E.A., Khandazhinskaya A.L., Jasko M.V., Kukhanova M.K., Shipitsyn A.V., Pokrovsky A.G. Modified 5'-phosphonate azidothymidine – potential anti-viral preparations. US Pat. 7,999,099. EP1829885A1.
39. Khandazhinskaya A.L., Yanvarev D.V., Jasko M.V., Shipitsyn A.V., Khalizev V.A., Shram S.I., Skoblov Y.S., Shirokova E.A., Kukhanova M.K. // *Drug Metab. Dispos.* 2009. V. 37. № 3. P. 494–501.
40. Kukhanova M.K., Jasko M.V., Yanvarev D., Karpenko I., Shipitsyn A.V., Khandazhinskaya A.L. // *Nucleic Acids Symp. Ser. (Oxf.)*. 2008. V. 52. P. 597–598.
41. Результаты доклинических испытаний представлены ЗАО «Производственно-коммерческая ассоциация АЗТ». Досье на регистрацию лекарственного препарата 6НР. Вх. № 421549 от 23.12.2011.
42. Cato A. 3rd, Qian J., Hsu A., Levy B., Leonard J., Gran-neman R. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998. V. 42. № 7. P. 1788–1793.