

ФІЗИКО-ХІМІЧНИЙ ІНСТИТУТ ім. О. В. БОГАТСЬКОГО
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ

Презентація роботи на здобуття щорічної премії Президента
України для молодих вчених 2024 року

за темою:

**НЕЙРОХІМІЧНІ, РЕЦЕПТОРНІ ТА БІОТРАНСПОРТНІ МЕХАНІЗМИ
ПРОТИЕПІЛЕПТИЧНОЇ ДІЇ ПРОПОКСАЗЕПАМУ В ЗАГАЛЬНІЙ
СТРАТЕГІЇ РОЗРОБКИ НОВАТОРСЬКОГО ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ**

Автор роботи, що представляється на конкурсі:

ВАЛІВОДЗЬ Ірина Петрівна – кандидат біологічних наук,
молодший науковий співробітник лабораторії молекулярної
фармакології та медицини, відділу біомедицини Фізико-
хімічного інституту ім. О. В. Богатського НАН України

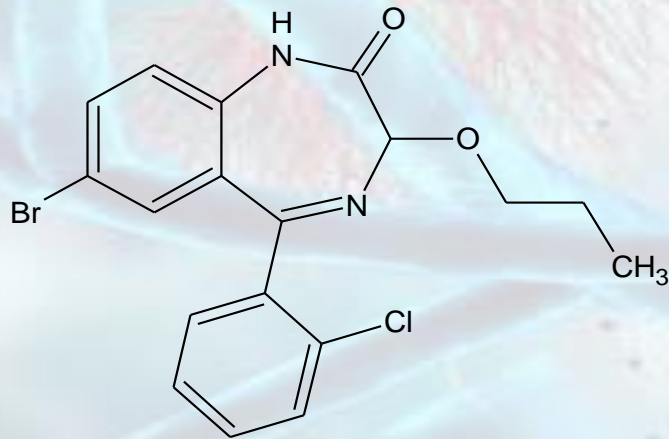
Актуальність роботи

Епілепсія відноситься до хронічних поліетіологічних захворювань головного мозку, що характеризується повторними нападами, які виникають в результаті надмірних нейронних розрядів, що супроводжуються різноманітними клінічними і параклінічними симптомами. Терапія протисудомними препаратами залишається основою лікування хворих на епілепсію, яке передбачає гальмування або значне зменшення кількості нападів.

Сучасним ПЕП притаманна низка побічних ефектів, серед яких особливе місце займають порушення м'язового тону і неврологічного та когнітивного дефіциту. Окрім того, для епілепсії характерним є фармакорезистентність, до предикторів якої відносять високу частоту нападів, симптоматичну етіологію, специфічні синдроми, а також високу варіабельність дії, залежної від особливостей фармакокінетики препаратів. Тому успіх лікування епілепсії знаходиться на шляху пошуку нових протисудомних засобів, які здійснювали б вплив на різні патогенетичні ланки формування всієї різноманітності судомних станів.

Мета роботи полягає у розвитку наукових підходів щодо розробки (конструювання) та впровадження в медичну практику новаторського лікарського засобу з протиепілептичними механізмами дії, який відповідає національним та міжнародним стандартам, та у перше зареєстрований на основі повного комплексу документів щодо його якості, безпеки та ефективності (повної реєстраційної інформації). Підготувати відповідне досьє на препарат, провести реєстрацію в ДЕЦ МОЗ України, отримати дозвіл на клінічні дослідження на добровольцях та провести першу фазу випробувань.

Теоретичне обґрунтування та експериментальна оцінка створення інноваційної сполуки - агоніста ГАМКА - рецептора, що індукує протиепілептичну дію



Константи іонізації:

$$pK_{a1} (1N) = 10.65 \pm 0.7$$

$$pK_{a2} (4N) = 1.2 \pm 0.5$$

Ліпофільність

$$\text{Log } P = 4.31 \pm 0.64$$

Ліпофільність у фізіологічних межах pH

$$\text{Log } D = 4.31 \pm 0.64$$

Розчинність у воді

$$3.4 \cdot 10^{-3} \text{ г/л}$$

Кількість донорів протонів – 1

Кількість акцепторів протонів - 4

У відділі медичної хімії ФХІ ім. О.В. Богатського НАН України під керівництвом академіка НАН України **С.А. Андронаті** було синтезовано низку нових 3-ариліден, 3-алкокси, 3-ацилокси та 3-ариламіно похідних 1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-ону.

Результати тестування синтезованих сполук на судомних моделях у експериментальних тварин дозволили відібрати для подальшого вивчення перспективну сполуку, яка отримала назву **пропоксазепам**. Для сполуки розраховано основні фізико-хімічні параметри, які впливають на протиепілептичні властивості та обумовлюють клітинний транспорт в організмі.

Фармакологічний аналіз нейропротекції пропоксазепамом судом, викликаних пікротоксином, коразолом, стрихніном та бімегридом

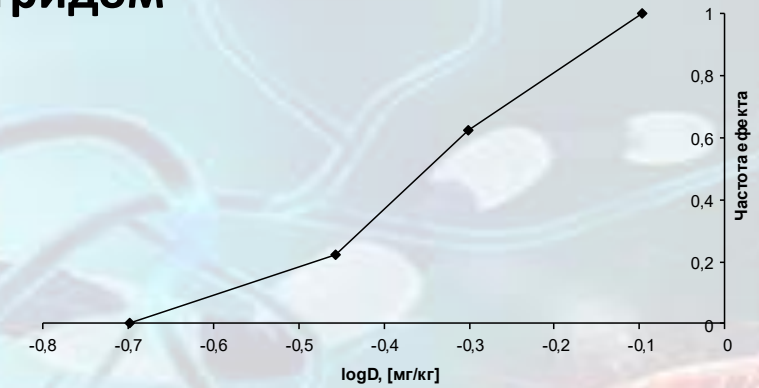
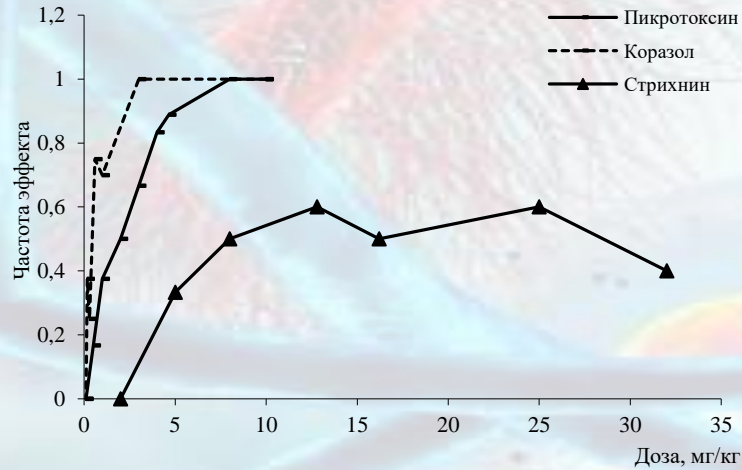


Рис. 2. Залежність величини захисної дії пропоксазепаму від дози (внутрішньоочеревинне введення) при введенні бімегриду (58 мг/кг, підшкірно, через 0,5 год після введення пропоксазепаму).

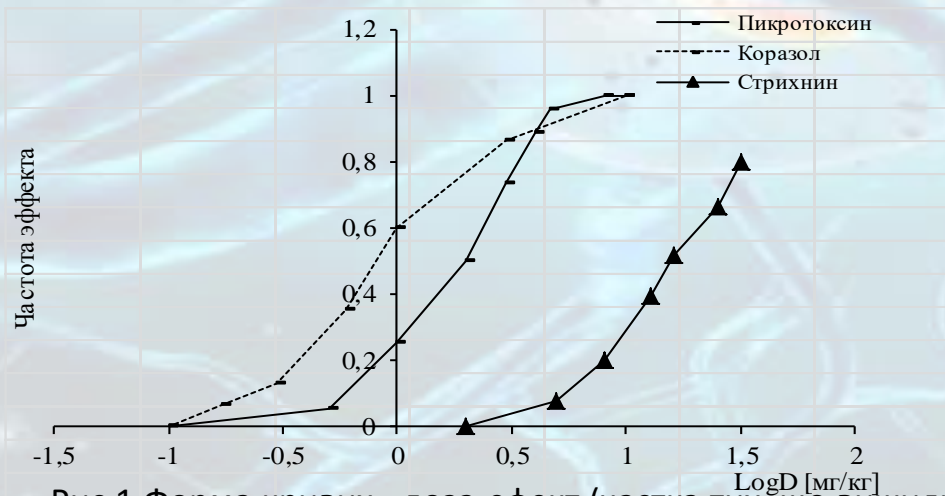


Рис.1 Форма кривих «доза-ефект (частка тих, що вижили тварин)» первинних експериментальних даних (а) і скоригованих за методом Барренса в полулогарифмічних координатах (б) (s_1 , s_2 і s_3 - величини нахилу кривих, які визначено в області ЕД50).

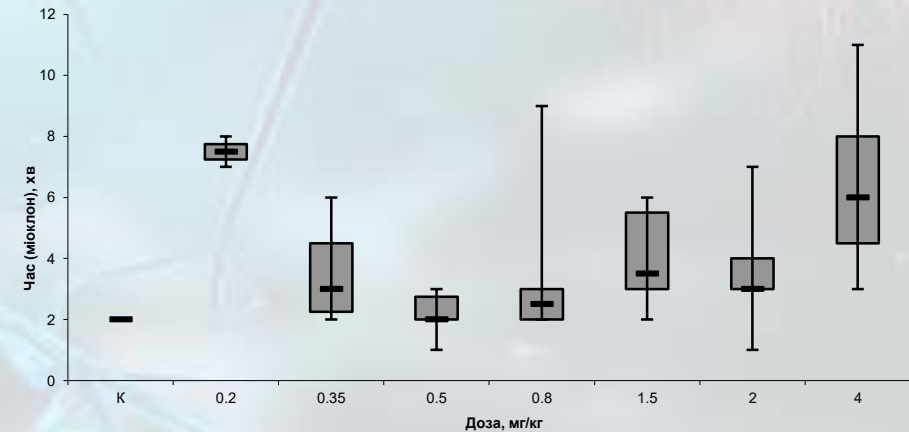


Рис. 3. Зміна латентного часу розвитку міоклонічних судом при введенні бімегриду (58 мг/кг, підшкірно) на тлі попереднього введення різних доз пропоксазепаму (0,5 год, в/о).

Фармакологічний аналіз нейропротекції пропоксазепамом судом, викликаних пікротоксином, коразолом, стрихніном та бімегридом (продовження)

На моделі бемеглід-індукованих судом пропоксазепам продемонстрував високу активність за величиною захисної дії, збільшуючи час життя тварин та зменшуючи прояв тонічних судом. Антагонізм між пропоксазепамом та бімегридом в умовах *in vivo* з високою ймовірністю відбувається через різні місця зв'язування, що проявляється у відсутності дозозалежності між часом тривалості життя тварин та введеною дозою пропоксазепаму.

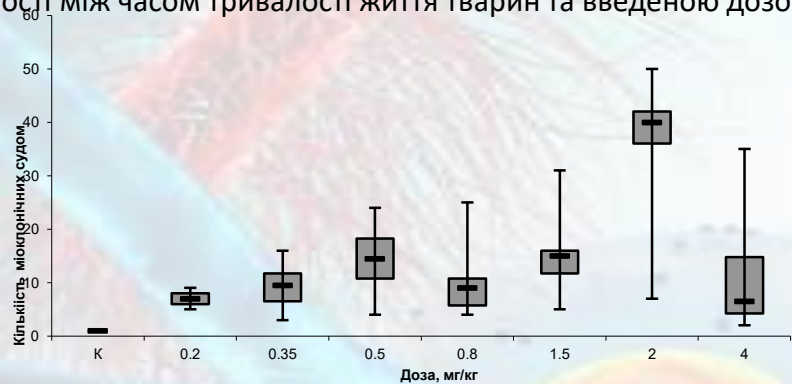


Рис. 4 Зміна кількості міоклонічних судом при введенні бемегліду (58 мг/кг, підшкірно) на тлі попереднього введення різних доз пропоксазепаму (0,5 год, в/о).

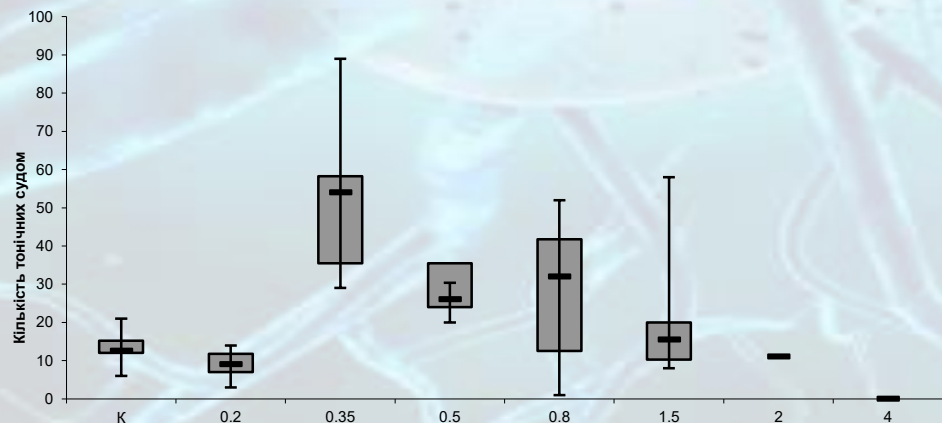


Рис. 5 Зміна кількості тонічних судом при введенні бемегліду (58 мг/кг, підшкірно) на тлі попереднього введення різних доз пропоксазепаму (0,5 год, в/о).

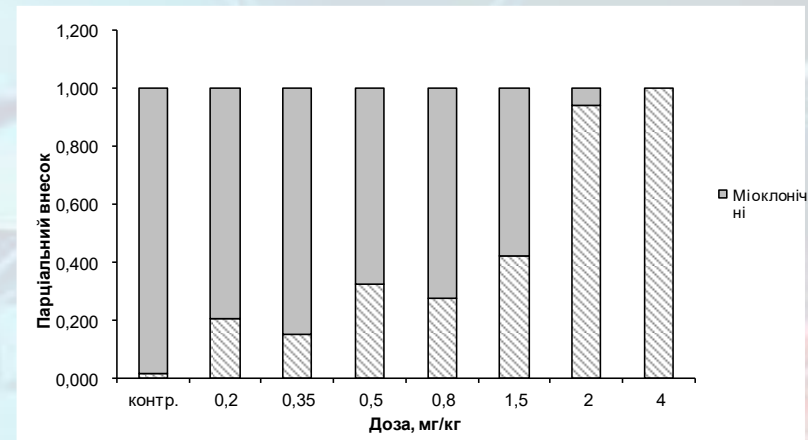


Рис. 6 Парціальний внесок у загальну структуру судомного нападу, викликаного бемеглідом (58 мг/кг, підшкірно, миші) на тлі попереднього введення пропоксазепаму різних дозах (0,5 год, в/о).

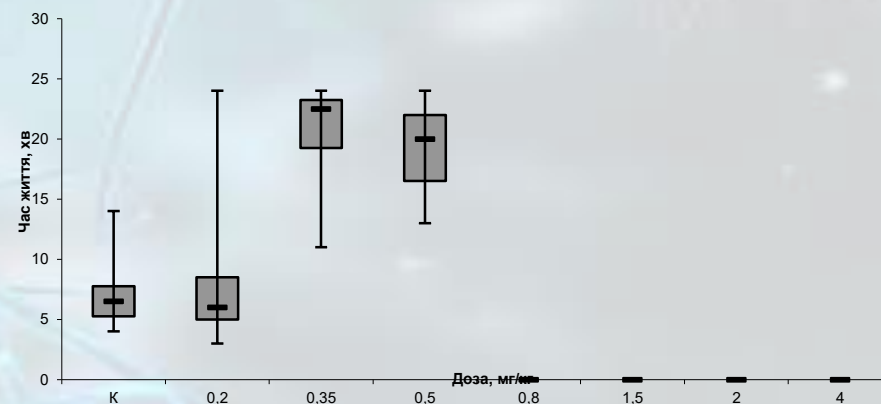


Рис. 7 Зміна загального часу життя тварин при введенні бемегліду (58 мг/кг, підшкірно) на тлі попереднього введення різних доз пропоксазепаму (0,5 год, в/о).

Епілептогенез судом в процесі розвитку коразол-індукованого кіндлінгу у мишей в нормі та на тлі введення пропоксазепаму

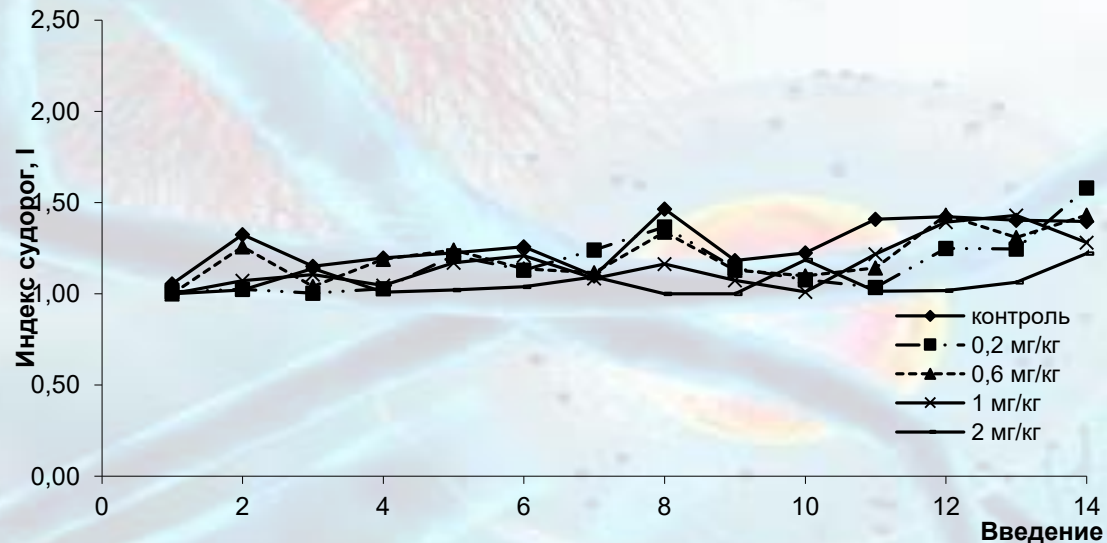


Рис.8. Зміна величини індексу судом контрольної та експериментальної (пропоксазепам в дозах 0,2-2,0 мг/кг) груп тварин в процесі розвитку кіндлінгу.

Введення низьких доз (0,2-0,6 мг/кг) пропоксазепаму протягом періоду формування кіндлінгу не має значного протисудомного ефекту, хоча й гальмує прояв судом третього та четвертого ступеню важкості. Високі дози пропоксазепаму (1,0-2,0 мг/кг) гальмують розвиток судом високого ступеню важкості; при введенні високих доз (2,0 мг/кг) практично не спостерігається прояву приступів навіть другого ступеню важкості. За результатами дисперсійного аналізу внесок фактору дози пропоксазепаму на моделі кіндлінг-епілепсії складає від 11,8 % до 51,9 % для доз 0,2-2,0 мг/кг).

Представлені дані свідчать також про відсутність зниження відповіді на пропоксазепам у дозах 0,2-2,0 мг/кг при повторному або тривалому застосуванні в процесі кіндлінгу, що свідчить про відсутність експериментальної фармакодинамічної резистентності антиепілептичної дії речовини.

Антиепілептоформна активність пропоксазепаму на моделі максимального електрошоку у мишей

Таблиця 1

Протисудомна дія (захисний ефект) пропоксазепаму та його вплив на частоту прояву окремих судомних нападів у мишей в тесті МЕШ.

Показник	Захисний ефект (кількість тварин, що вижили)	Стани судомного нападу (ЕД ₅₀ (ЕД ₈₂ ÷ЕД ₁₈))		
		Тонічні судоми/тонічна екстензія	Клонічні судоми	Рефрактерний період
Медіанна ефективна доза, D, мг/кг	0,57 ± 0,23	0,92(0,021÷39,9)	1,53(0,28÷8,5)	0,56(0,001÷237)
мкмоль/кг	1,39 ± 0,56	2,25(0,05÷97,9)	3,7(0,7÷20,9)	1,29(0,003÷581)
Нахил кривої «доза-ефект», s	0,51	-21,2	-2,3	-4,2

Під впливом МЕШ у тварин контрольної групи виникають тонічні напади, що мають високі летальні наслідки. При введенні пропоксазепаму навіть у дозі 0,2 мг/кг структура викликаного епілептичного нападу представлена й клонічним компонентом (до 15%), а подальше підвищення дози не тільки збільшує парціальний внесок цього стану, але й підвищує прояв рефрактерного часу, асоційованого з захисним ефектом.

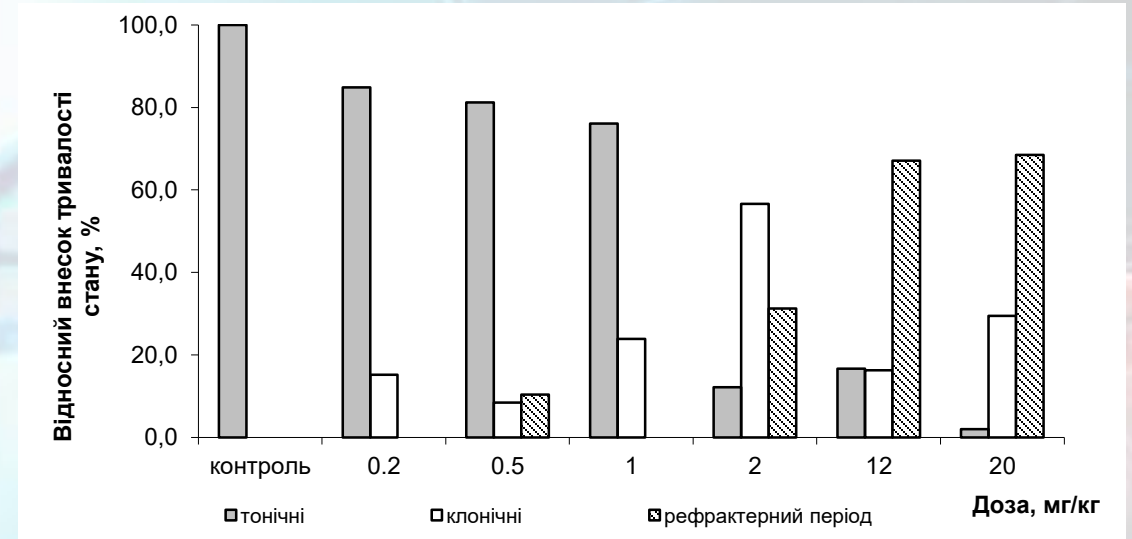


Рис.9 Розподіл окремих компонентів судомного нападу (тонічні судоми, клонічні судоми, рефрактерний період) на тлі попереднього введення мишам пропоксазепаму за 30 хв до МЕШ.

Гальмування пропоксазепамом судом в умовах дефіциту ГАМК, викликаного дією тіосемікарбазидом

Частота ефекту

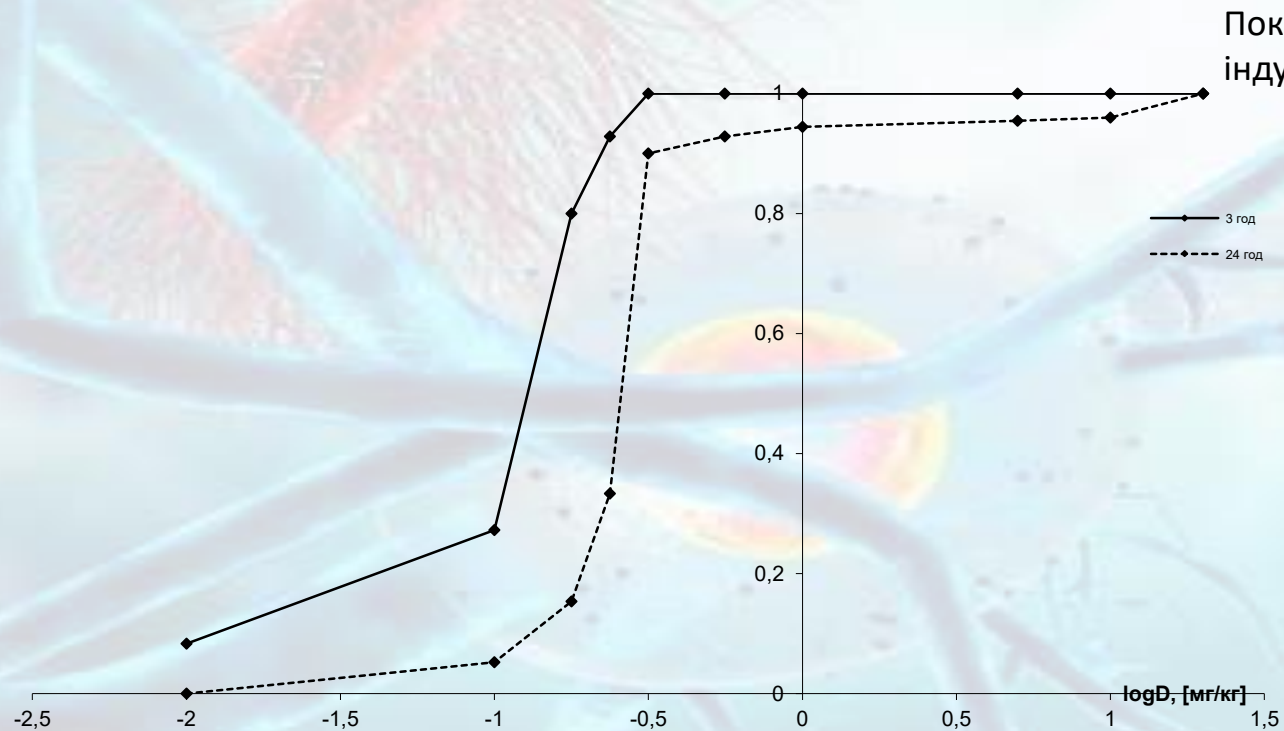


Рис. 10. Залежність «доза-ефект» пропоксазепаму на моделі тіосемікарбазид-індукованих судом (час спостереження 3 -24 години).

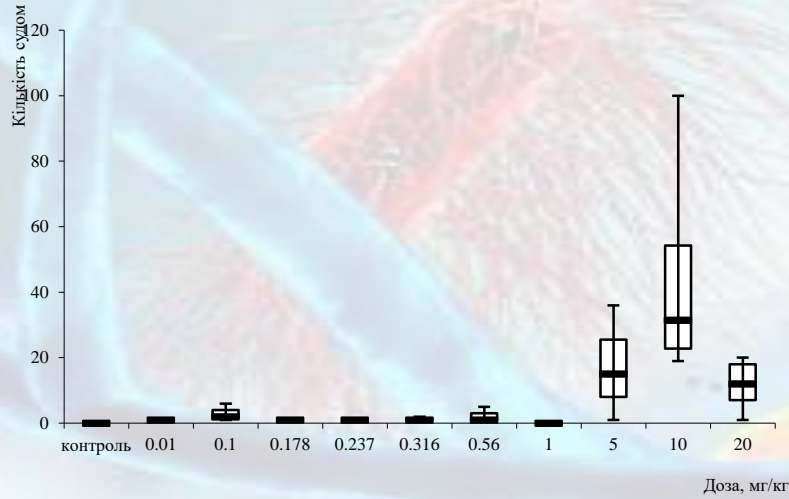
Приймаючи до уваги той факт, що середня ефективна доза пропоксазепаму (ED_{50}) статистично не відрізняється на протязі спостереження 3 та 24 години, можна зробити висновок, що протективний ефект сполуки протягом тривалого часу є меншим, ніж у гострому періоді розвитку судомного стану за умов ГАМК-дефіциту.

Показники захисної дії пропоксазепаму на моделі тіосемікарбазид-індукованих судом

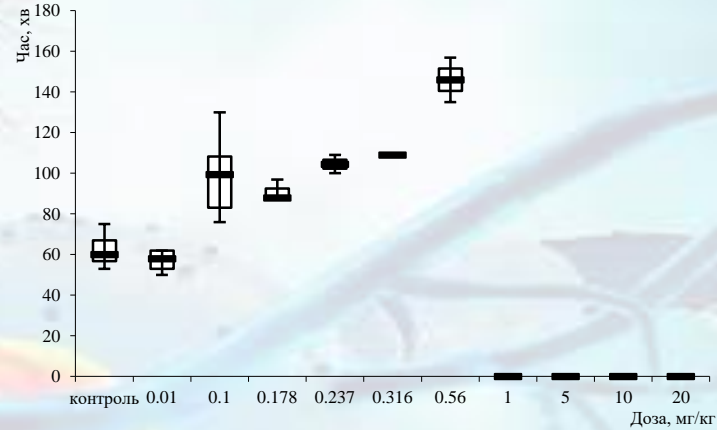
Таблиця 2

Доза, мг/кг	LogD	ефект	3 год		24 год		
			Середня ефективна доза, ED_{50} , мг/кг (ммоль/кг)	Нахил кривої «доза-ефект», s	Середня ефективна доза, ED_{50} , мг/кг (ммоль/кг)	Нахил кривої «доза-ефект», s	
0,01	-2	0,08	0,18 ± 0,09 мг/кг	0,60	0	0,28 ± 0,18 мг/кг	0,15
0,1	-1	0,27			0,05		
0,178	-0,75	0,8			0,15		
0,237	-0,63	0,93			0,33		
0,316	-0,50	1,0			0,90		
0,56	-0,25	1,0			0,93		
1	0	1,0			0,94		
5	0,70	1,0			0,95		
10	1	1,0			0,96		
20	1,30	1,0			1		

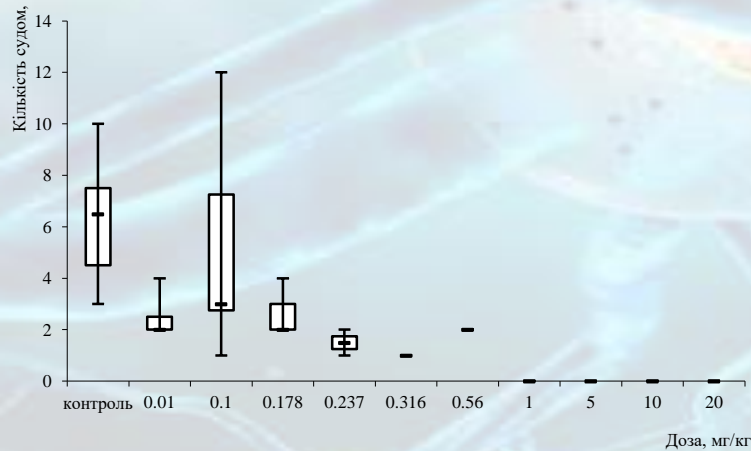
Гальмування пропоксазепамом судом в умовах дефіциту ГАМК, викликаного дією тіосемікарбазидом (продовження)



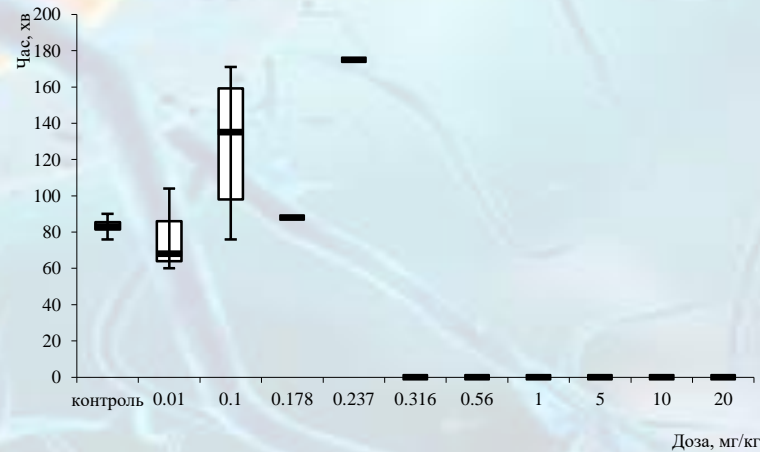
А



Б



В



Г

Отримані результати свідчать про те, що перші прояви судомної активності у тварин починають проявлятися вже на першій хвилині після введення тіосемікарбазиду (контрольна група), тоді як введення пропоксазепаму (0,01 мг/кг) підвищує цей час до ~ 70 хв. На тлі введення пропоксазепаму (0,1 мг/кг) спостерігалось підвищення тривалості життя тварин до 128 ± 16 хв, а в дозах, понад 0,3 мг/кг, тварини переживали період в три години спостереження. В експериментальних групах відмічається скорочення часу виникнення міоклонічних судом разом із підвищенням їх кількості поряд із зменшенням виникнення кількості тонічних судом, що відображує підвищення ефективності гальмівних процесів у ЦНС. Середня ефективна доза захисної дії пропоксазепаму на моделі тіосемікарбазид-індукованих судом складає $0,18 \pm 0,10$ мг/кг із кутом нахилу кривої «доза-ефект» 0,6, що відповідає швидкому розвитку захисного ефекту та антагоністичній взаємодії на рецепторному рівні.

Рис. 11. Показники зміни кількості міоклонічних судом (А), латентного часу до прояву тонічних судом (Б), кількості тонічних судом (В) та часу життя мишей (Г) після введення тіосемікарбазиду на тлі введення пропоксазепаму у різних дозах (перший-третій квартал, медіана (мінімальне÷максимальне значення))

Вплив пропоксазепаму на судоми, викликані 4-амінопіридином, модулятором потенціал-залежних калієвих каналів

Таблиця 3.

Показники захисної дії пропоксазепаму на тлі попереднього введення 4-АП (10,3 мг/кг, п-ш)

Доза, мг/кг	logD,	Частота ефекта	Пробит	Показники лінійної регресії пробит-аналізу	
20	1,30	0,13	3,85	Кут нахилу, k	4,69
28	1,45	0,23	4,26	Відрізок, b	-2,37
40	1,60	0,55	5,11		
60	1,78	0,85	6,02		
80	1,90	0,94	6,56		
			logD ₅₀	1,57	
			logD ₁₆	1,36	
			logD ₈₄	1,78	
Средня ефективна доза D ₅₀			37,3 ± 7,9 мг/кг		
Нахил кривої «доза-ефект», s			1,15		

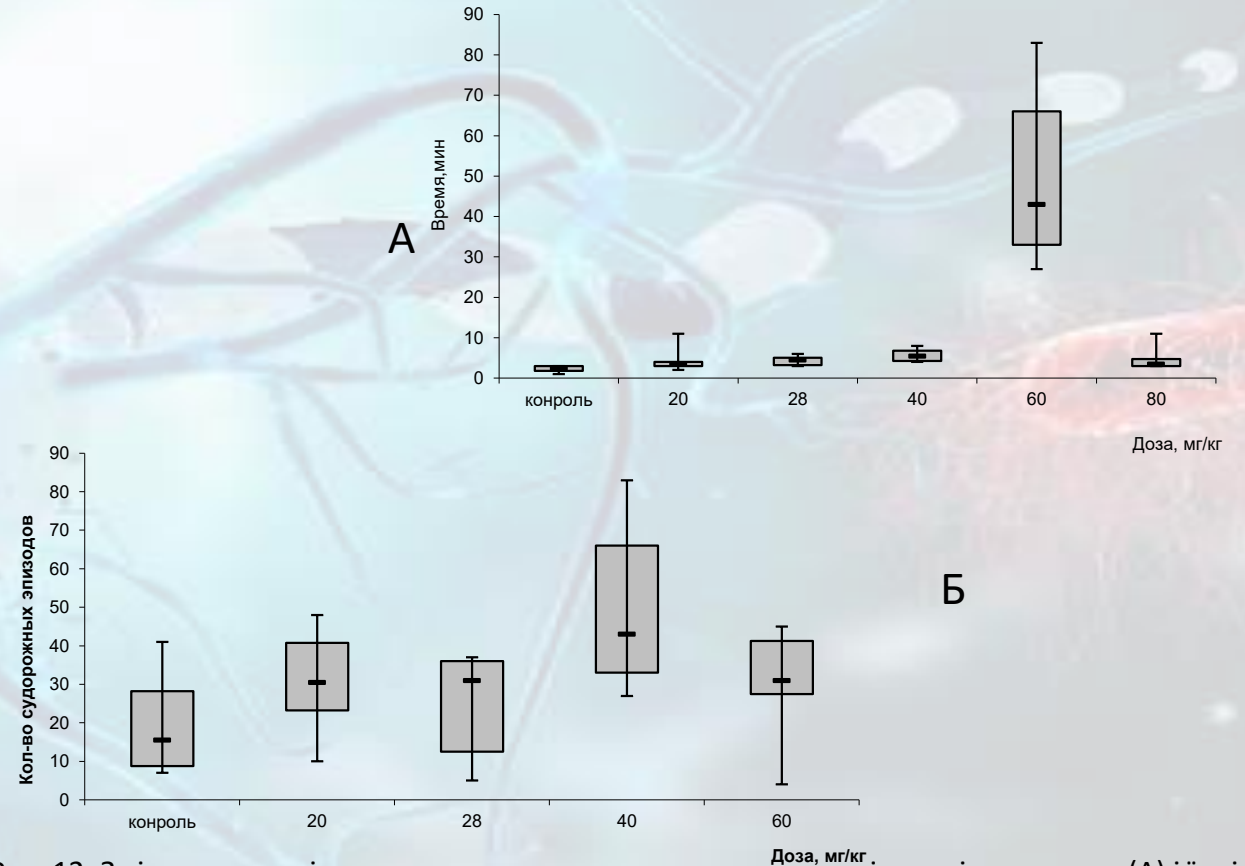


Рис. 12. Зміна показників латентного часу до початку розвитку міоклонічних судом (А) і їх кількості (Б) у мишей після введення 4-АП (10,3 мг / кг) на фоні попереднього введення пропоксазепаму в різних дозах (перший-третій квартиль, медіана (мінімальне ÷максимальное значення))

Для справжнього антагоністу ГАМКА-Р пікротоксину ця величина складає $1,67 \pm 0,09$ мг / кг. На підставі величини захисної дії в даному тесті можна зробити висновок, що пропоксазепам не проявляє прямої та вираженої дії на калієві канали, які блокуються 4-АП.

Аналіз механізму дії пропоксазепаму та флумазенілу (селективного конкурентного антагоністу ГАМКА-R) на моделі судом, викликаних пікротоксином

Таблиця 4
Середні ефективні дози сполук (в/о) по антагонізму з пікротоксином (6,5 мг/кг, підшкірно).

Сполука	Середня ефективна доза, ED_{50} , $M \pm m$, мг/кг	«Крутизна» кривої (s)
Пропоксазепам	$0,37 \pm 0,07$ ($0,9 \pm 0,2$ μ моль/кг)	0,64
Флумазеніл	$5,24 \pm 2,38$ ($0,017 \pm 0,008$ μ моль/кг)	2,2
Флумазеніл+пропоксазепам (0,5 мг/кг, 95 % захисного ефекту)	$2,25 \pm 0,38$ ($0,007 \pm 0,001$ μ моль/кг)	1,7

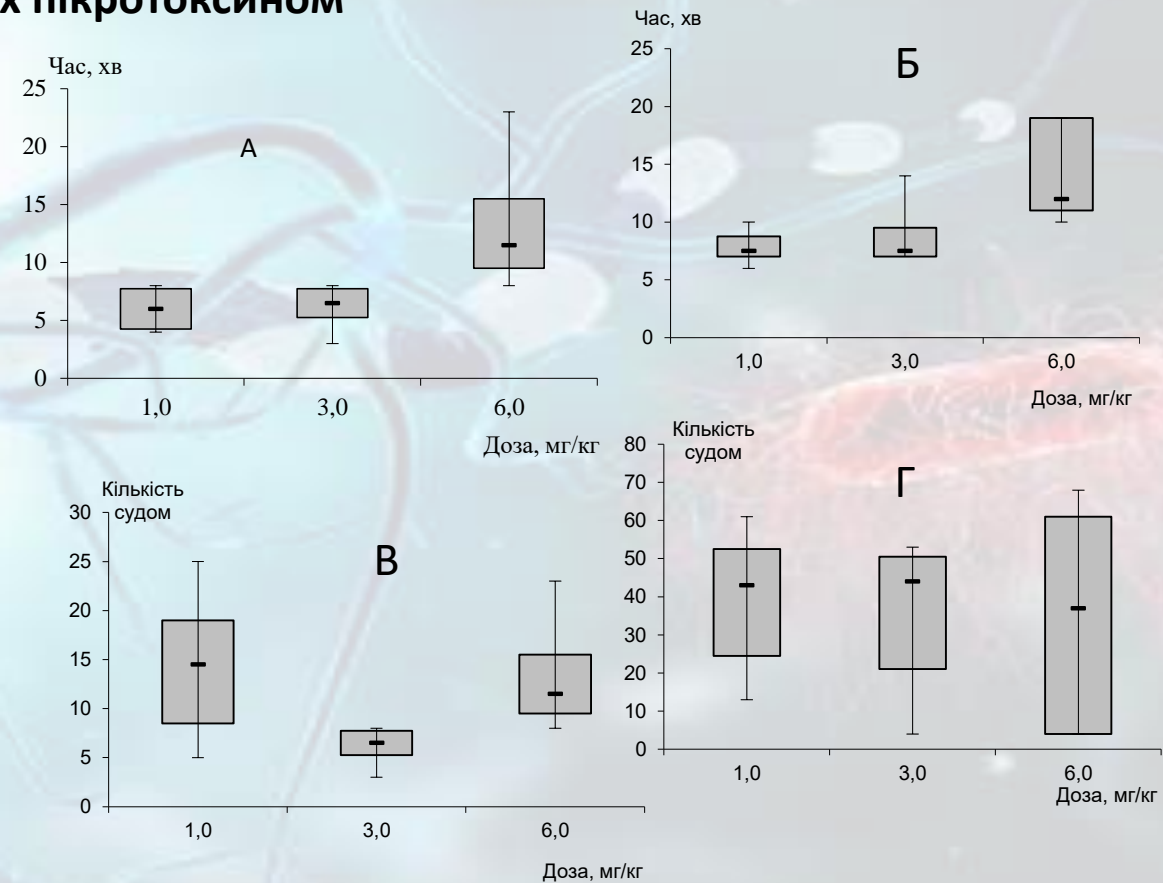


Рис. 13 Зміна латентного часу розвитку міоклонічних (А) та тонічних (Б) судом та їх кількості (В, Г) при введенні пікротоксину (6,5 мг/кг, підшкірно) на тлі попереднього введення флумазенілу у різних дозах (внутрішньоочеревинно).

Аналіз механізму дії пропоксазепаму та флумазенілу (селективного конкурентного антагоністу ГАМКА-Р) на моделі судом, викликаних пікротоксином (продовження)

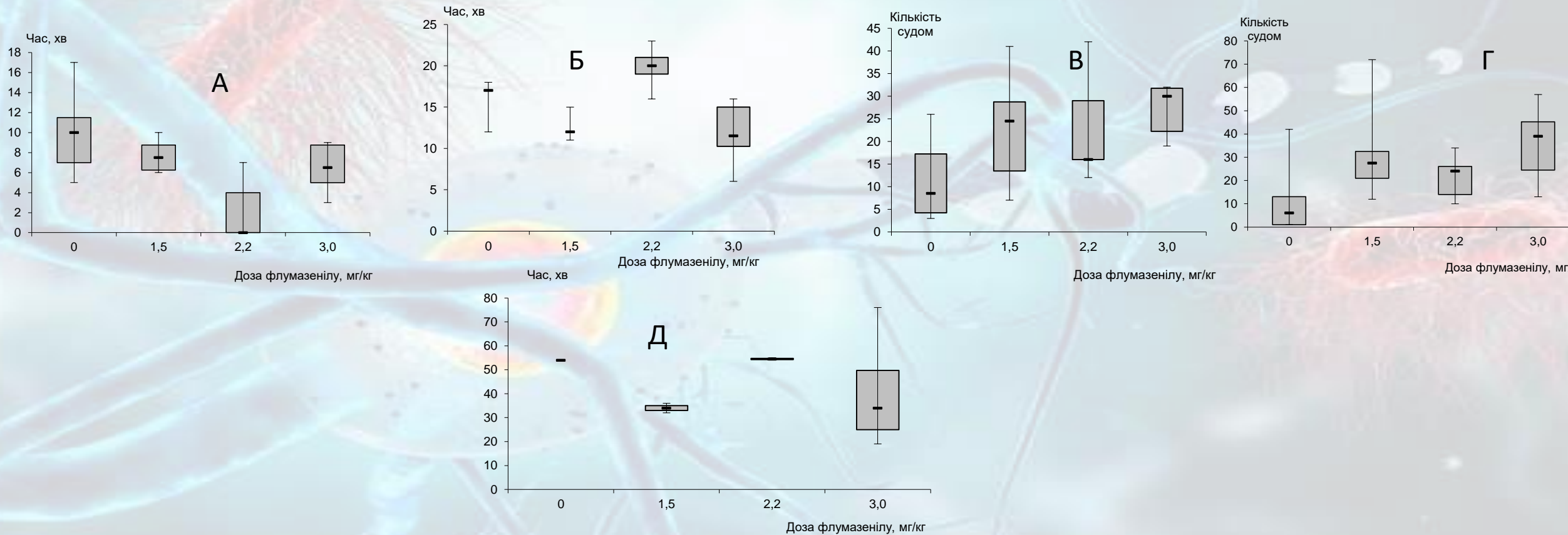


Рис. 14 Зміна латентного часу розвитку міоклонічних (А) та тонічних (Б) судом, їх кількості (В, Г) та загального часу життя експериментальних тварин (Д) на тлі попереднього введення пропоксазепаму (0,5 мг/кг) та флумазенілу у різних дозах (внутрішньоочеревинно).

Здатність флумазенілу усувати антиконвульсантну дію пропоксазепаму припускає, що зазначений механізм реалізується за допомогою ГАМК-ергічної нейротрансмісії та активацією бенздіазепінового сайту ГАМКА-Р. Ці результати узгоджуються з нашими попередніми дослідженнями

Характеристика зв'язування пропоксазепаму із рецепторами на основі проведеного докінгу

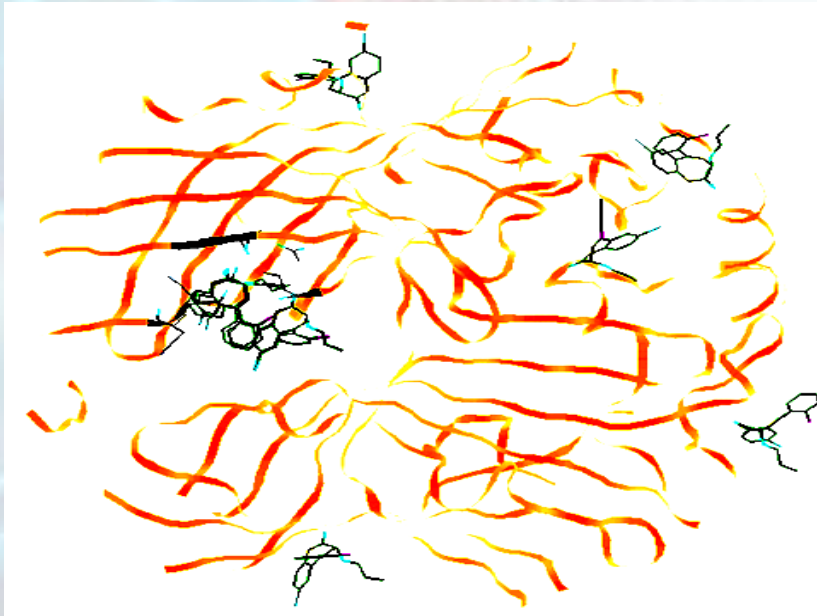


Рис 15. Схематична локалізація переважних місць зв'язування конформерів пропоксазепаму

Методом молекулярного докінгу показано, що на частині ГАМКА-Р існує декілька місць зв'язування пропоксазепаму з енергією утворення комплексів від -78,64 до -85,29 ккал / моль. Найбільший внесок у формуванні зв'язку комплексу здійснюють залишки полярних амінокислот (серин, аспарагін, метионін та аргінін), що створюють полярний підцентр зв'язування). Для окремих конформерів значний внесок мають ароматичні амінокислоти, переважно фенілаланін (Phe-31 та Ala-135 - гідрофобний підцентр зв'язування).

При візуалізації результатів докінгу помітно, що при взаємодії із залишками фенілаланіну конформери пропоксазепаму групуються таким чином, що основний вплив здійснюється через атом бромю. Навпаки, в більш полярному підцентрі у зв'язуванні беруть участь не тільки залишки фенілаланіну (через атом бромю), але і більш полярні амінокислоти (аспарагін та аргінін).

Місце пропоксазепаму серед антиепілептичних лікарських засобів, визначених в експериментах на моделях хімічних та електричних судом

Представлені результати свідчать про високу захисну активність пропоксазепаму на підставі даних кривих «доза-ефект»: пікротоксин $1,67 \pm 0,09$, коразол $0,9 \pm 0,04$, стрихнін $14,24 \pm 0,47$, МЕШ $0,57 \pm 0,23$, тіосемікарбазид $0,18 \pm 0,09$, 4-амінопіридин $37,3 \pm 7,9$ мг/кг та моделі коразолового кіндлінгу. Зміна часу настання судом та їх перерозподіл в перебігу епілептичного синдрому робить пропоксазепам перспективною в лікуванні епілепсії.

В той же час, при співставленні експериментальних даних відносно «золотого стандарту» скрінінгу препаратів на моделях судом, викликаних коразолом та МЕШ помітно, що по показникам ED_{50} пропоксазепам переважає вольпроат: пропоксазепам ($0,92 \pm 0,38 / 0,57 \pm 0,23$ мг/кг), вольпроат (271,7/148,6).

Таблиця 5

Показники безпечності пропоксазепаму, визначених на різних моделях судом у мишей

Тест ефекту (захисна дія)	ТІ	ФНБ	ТШ	ТІnt
Коразол	5556	4379	5000	0,33
Пікротоксин	2994	2243	4999	0,75
Тіосемікарбазид	27778	1908	5000	2,6
МЕШ	10000	851, 0	5000	5,7
Стрихнін	351	294, 2	4988	3,8
4-Амінопіридин	134	43,1	4988	93

Терапевтичний індекс (ТІ)

Фактор надійної безпеки (ФНБ)

Терапевтична широта (або терапевтичне «вікно», ТШ)

Показник терапевтичного інтервалу (ТІnt)

Місце пропоксазепаму серед антиепілептичних лікарських засобів, визначених в експериментах на моделях хімічних та електричних судом (продовження)

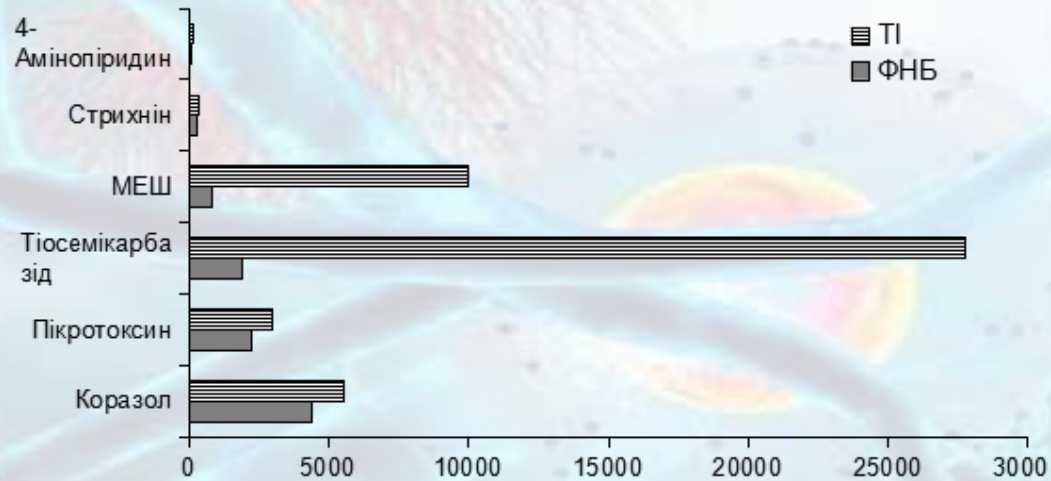


Рис. 15 Порівняльна характеристика пропоксазепаму по показникам ТІ (терапевтичного індексу) та фактору надійної безпеки (ФНБ)

Високі показники ТІ за тестами антагонізму з тіосемікарбазідом та МЕШ (табл. 10.2) також демонструють високу безпечність використання пропоксазепаму при патологіях ГАМК-дефіциту та первинно-генералізованих судомах (епілептичний статус) і парціальних пароксизмах в умовах використання моделі МЕШ. Втім, при навіть незмінній терапевтичній широті (ТШ) – фактор надійної безпеки є значно зменшеним, тобто 1908 та 851 відповідно (рис. 10.1). Більш того, у порівнянні з тестом по антагонізму з коразолом по даним показникам не спостерігається значного розвитку ефекту із збільшенням дози (терапевтичний інтервал для тесту антагонізму з коразолом складає 0,33, тоді як для тіосемікарбазиду та МЕШ – 2,6 та 5,7 відповідно).

Клітинний транспорт (експериментальна фармакокінетика) пропоксазепаму

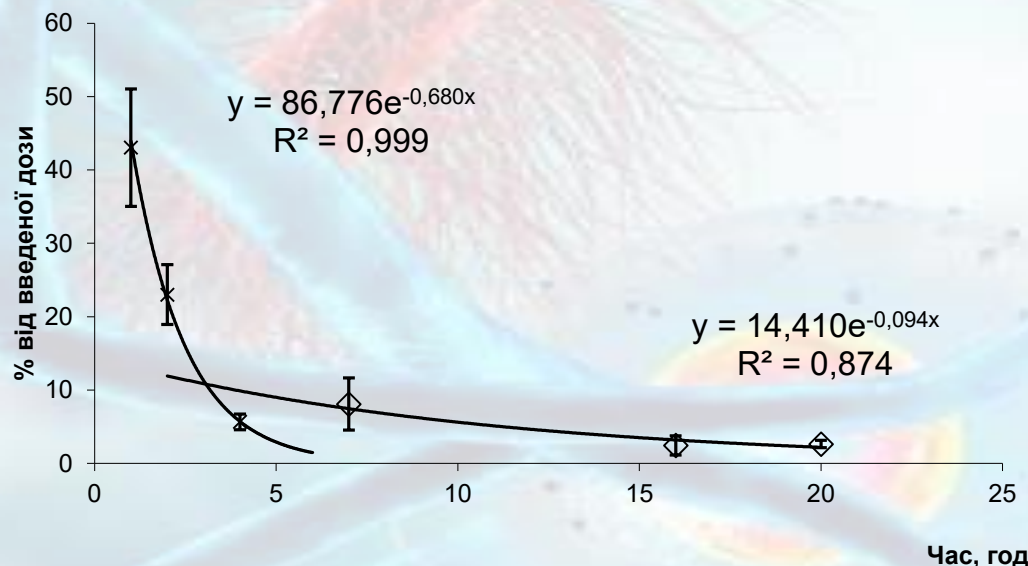


Рис. 16. Зміна вмісту радіоактивного матеріалу у шлунку після перорального введення ^{14}C -пропоксазепаму (10 мг/кг).

Евакуація ^{14}C -пропоксазепаму зі шлунку є двохфазним процесом. Перша фаза триває приблизно до 2,5 годин і має експоненційну залежність (з показником експоненти 0,68 год⁻¹, що вказує на достатньо швидкий транзит до тонкої кишки), тоді як друга фаза, у якій практично закінчується виведення сполуки зі шлунку, є повільнішою (з показником експоненти 0,094 год⁻¹). Зниження вмісту радіоактивного матеріалу у шлунку призводить до її збільшення у тонкій кишці (від 4 години до закінчення часу дослідження). Незначне підвищення вмісту радіоактивної речовини у цьому відділі ШКТ відбувається можливо за рахунок насичення процесів пасивної дифузії пропоксазепаму крізь слизову оболонку кишки. Разом з цим, його транзит до тонкої кишки не призводить до накопичення радіоактивного матеріалу, так як спостерігається повне та швидке всмоктування пропоксазепаму в цьому відділі ШКТ, що є природнім для ліпофільних сполук. Отже, тонку кишку можливо віднести до альтернативного «вікна всмоктування».

Оцінка дозозалежності всмоктування ¹⁴C-пропоксазепаму

Таблиця 5

Вміст загального радіоактивного матеріалу у різних відділах шлунково-кишкового тракту (у % від введеної дози) після інтрагастрального введення ¹⁴C-пропоксазепаму в залежності від дози (через 2 години; $M \pm m$, n=6)

Доза, мг /кг	Шлунок	Тонка кишка	Товста кишка	Сума у ШКТ, %	%абсорбції	k_{abs} , год ⁻¹
0	5,6±1,2	2,9±3,8	12,1±4,0	30,7±3,6	69,3±3,6	0,34±0,018
5	6,0±1,0	11,7±1,7	13,6±3,1	31,3±4,0	68,7±4,0	0,344±0,02
5	33,0±14,4	21,0±4,8	5,1±0,9	59,1±9,1	40,9±9,1	0,20±0,046
5	15,9±3,8	16,1±3,6	5,9±2,4	37,8±2,4	62,2±2,4	0,311±0,012

Кількість загального радіоактивного матеріалу, що абсорбується (% всмоктування), та того, що залишається в ШКТ, не залежить від дози, що вводилась. Вміст радіоактивного матеріалу у шлунку зменшується внаслідок евакуації його вмісту до проксимальних відділів ШКТ, найперше – тонкої кишки. Зміна кількості ¹⁴C-продуктів у тонкій кишці обумовлена сумою декількох процесів – надходження зі шлунку та процесами всмоктування до системного кровообігу разом з транзитом до товстої кишки. Оскільки вміст радіоактивного матеріалу у даному сегменті ШКТ не зазнає статистично вірогідних змін, тонка кишка може розглядатись, як неспецифічне «вікно всмоктування» для пропоксазепаму.

Розподіл пропоксазепаму в організмі мишей

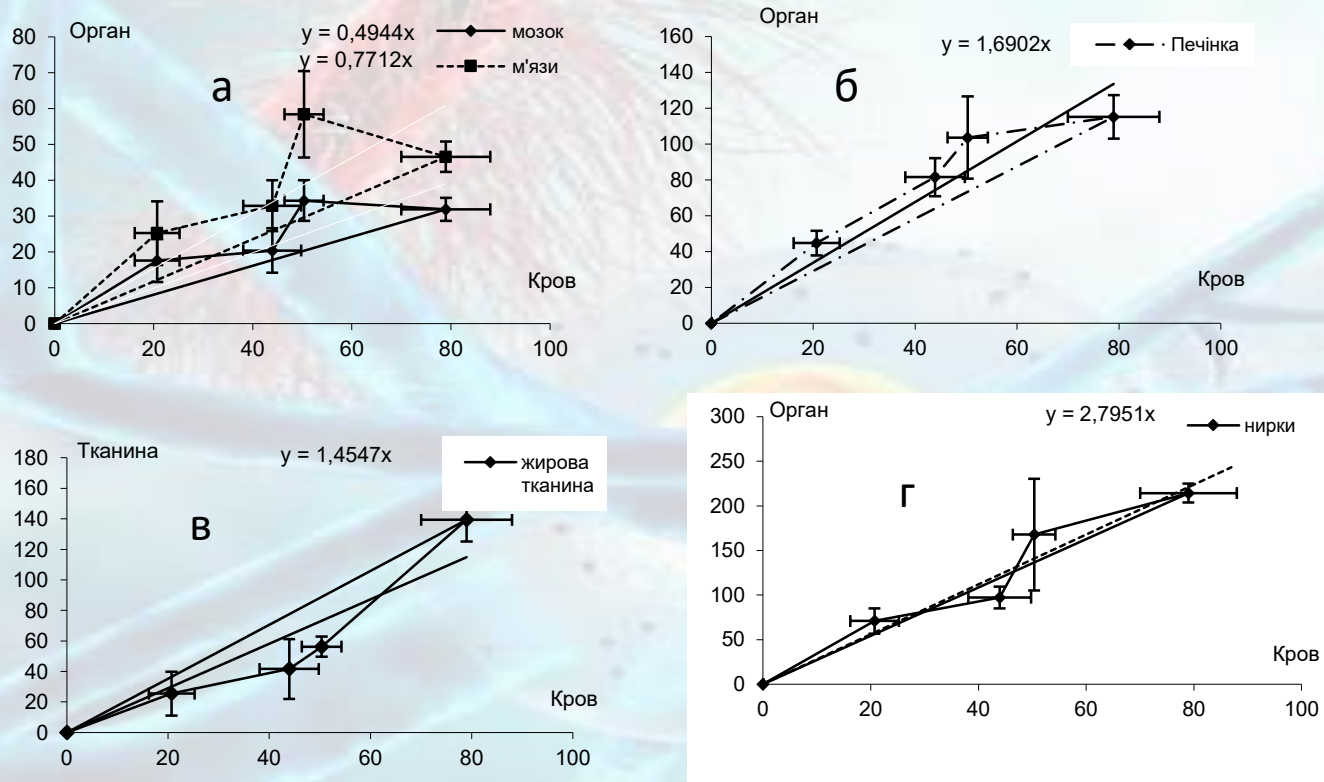
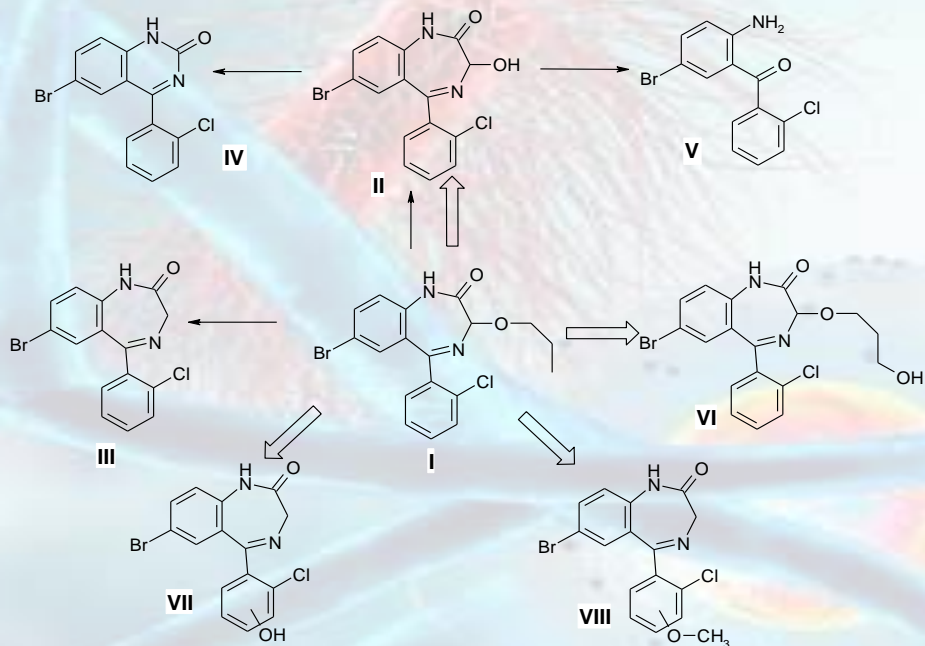


Рис. 16 Зміна концентрації радіоактивного матеріалу в органах та тканинах (а- мозок та м'язи, б – печінка, в – жирова тканина, г - нирки) залежно від концентрації в крові при введенні різних доз ^{14}C -пропоксазепаму.

Мозок та м'язи за величиною константи розподілу пропоксазепаму (0,49 та 0,77 відповідно) можуть бути поєднані до єдиного відсіку масообміну внаслідок ймовірно фізіологічних властивостей (високе значення кровообігу). Загалом розподіл пропоксазепаму по зазначених органах та тканинах у досліджуваному інтервалі доз може бути визначений як процес масопереносу, що є лінійним із швидким перерозподілом сполуки між органами та кров'ю. Не спостерігається статистично значущих відмінностей між розподілом пропоксазепаму в жировій тканині та м'язах, хоча, внаслідок більшої спорідненості до ліпідів вміст загального радіоактивного матеріалу у жировій тканині має слабо визначений максимум, тоді як у м'язах їх вміст протягом часу експерименту не зазнає значних коливань. Певне підвищення ^{14}C -продуктів у нирках та м'язах наприкінці експерименту може бути пов'язане з накопиченням (та виведенням) більш гідрофільних метаболітів.

Рис.17 Теоретична схема метаболізму пропоксазепаму

- метаболізм відсутній
- метаболізм в організмі мишей.



Метаболізм пропоксазепаму

Отже, експериментальні дослідження довели, що в процесі метаболізму пропоксазепаму поряд з вихідною сполукою (I) утворюються, принаймні, наступні метаболіти: 3-гідорксіпохідне (II), окислений по ароматичному кільцю (VII), його метоксильоване похідне (VIII) та окислений по алкоксильному радикалу (V).

Екскреція пропоксазепаму

Таблиця 6

Параметри екскреції метаболітів, що виводяться з організму мишей після внутрішньоочеревинного введення ¹⁴C-пропоксазепаму (35 мг/кг, M±m, n=3)

Показник	Сеча	Кал	Сеча+кал
Максимальна кількість речовини, що виводиться при нескінченній експозиції (Q_{\max} , у % від введеної дози)	31,2±0,5	46,1±6,7	77,3±11,3
Константа елімінації (k_{el} , год ⁻¹)	0,038±0,005	0,014±0,005	0,010±0,004

Ступень абсорбції ¹⁴C-пропоксазепаму в ШКТ складає ~ 80 % з максимумом процесу на період 4 – 7 годин. Інтрагастральне введення ¹⁴C-пропоксазепаму характеризується швидкою абсорбцією з та надходженням до системного кровообігу (0,371 ± 0,098 год⁻¹) із повільним процесом елімінації радіоактивних метаболітів ($k_{el} = 0,009 \pm 0,002$ год⁻¹). Через 2 години процес всмоктування становить ~ 60 % від введеної дози (в інтервалі доз 10-45 мг/кг); тонка кишка виступає, як неспецифічне «вікно всмоктування». Константа абсорбції ¹⁴C-пропоксазепаму становить ~0,3 год⁻¹ незалежно від введеної дози, що вказує на лінійність процесів його масопереносу з ШКТ до системного кровообігу.

Визначення *in silico* можливої взаємодії пропоксазепаму з іншими лікарськими засобам.

Ізоформа CYP	Субстрат Ліганд	Пропоксазе- пам E_{prop} ккал/моль	Субстр ат E_{substr} ккал/ моль	Відносна різниця вільної енергії, ($\Delta E/E_{\text{prop}}$ *1 00%)	Ліганд E_{lig} ккал/м оль	Відносна різниця вільної енергії, ($\Delta E/E_{\text{substr}}$ *100%)
1A2	фенацетин α -нафтол	9,82	7,31	25,56	10,81	32,38
2B6	бупропіон борнан	8,89	6,19	30,37	4,39	-41,00
2C8	амодіахін фелодипін	9,37	8,73	6,83	7,99	-9,26
2C9	диклофенак S-варфарин	8,79	7,62	13,31	8,74	12,81
2C19	S-мефенітоїн OXV ¹	8,7	7	19,54	8,57	18,32
2D6	буфуралол хінідін	8,15	9,38	-15,09	10,24	8,40
3A4	Тестостерон ² Мідазолам ²	8,93	8,94	-0,11	8,32	-7,45

Загалом аналіз взаємодій пропоксазепаму з різними ізоформами CYP з урахуванням їх індивідуальних субстратів дозволяє припустити існування конкурентної взаємодії для 1A2, 2C19, та 2C8 й, у меншому ступені, 2C9, 3A4 та 2B6.

Загальні висновки

1. У роботі наведено результати фундаментальних та прикладних досліджень новаторського протиепілептичного засобу пропоксазепам: 7-бром-5 (о-хлорфеніл)-3-пропокси-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-он. На моделях хімічно індукованих судом визначено величини середніх вагових ефективних доз (ED_{50}) пропоксазепаму: за антагонізмом з пікротоксином $1,67 \pm 0,09$ мг/кг, коразолом $0,9 \pm 0,04$ мг/кг, стрихніном $14,24 \pm 0,47$ мг/кг, бімегридом $0,39 \pm 0,05$ мг/кг та 4-амінопіридином $37,3 \pm 7,9$ мг/кг, що свідчать про високу активність речовини. У тесті максимального електрошоку середня ефективна доза пропоксазепаму складає $0,57 \pm 0,23$ мг/кг ($1,39 \pm 0,56$ мкмоль/кг) із нахилом кривої «доза ефект» 0,51, що вказує на неспецифічність захисного ефекту сполуки у даній фармакологічній моделі. За результатами дисперсійного аналізу внесок фактору дози пропоксазепаму при виявленні його протисудомної дії на моделі кіндлінг-епілепсії складає від 11,8 % до 51,9 % для доз 0,2-2,0 мг/кг).
2. Встановлено, що протисудомна дія сполуки безпосередньо пов'язана з активацією ГАМК-ергічних механізмів і рецепторів гліцину, глутаматної передачі та побічно натрієвих, кальцієвих і калієвих каналів, а також попереджує судоми, викликані блокатором синтезу ГАМК – тіосемикарбазидом. Наведені дані свідчать про найбільшу безпечність використання пропоксазепаму у терапії епілептичного синдрому, що моделюється введенням коразолу (клонічні, тоніко-клонічні та генералізовані судоми), оскільки для даної моделі спостерігається найбільш високе значення всіх індексів та низьке значення T_{int} , що підтверджує швидке зростання ефекту від введеної дози. Високі показники T_I за тестами антагонізму з тіосемикарбазидом та максимальним електрощоком також демонструють високу безпечність використання сполуки при патологіях ГАМК-дефіциту та первинно-генералізованих судамах (епілептичний статус) і парціальних пароксизмах.

Загальні висновки (продовження)

3. Для оцінки фармакокінетичних параметрів пропоксазепаму було синтезовано його ^{14}C -аналог, за допомогою якого було визначено всмоктування (шлунково-кишковий тракт – кров – органи/тканини) Розрахунковими методами визначено ліпофільність ($\log P$ $4,31 \pm 0,64$) та константи іонізації сполуки (pK_{a1} та pK_{a2} $10,65 \pm 0,7$ та $1,2 \pm 0,5$ відповідно), що підтверджує її існування у неіонізованому стані при фізіологічних умовах. Евакуація ^{14}C -пропоксазепаму зі шлунка (інтрагастральне введення, 10 мг/кг) є двофазним процесом (перша фаза з $kel = 0,68$ год $^{-1}$, друга з $kel = 0,0094$ год $^{-1}$). Загальна кількість дози, що всмокталася протягом часу експерименту становила близько 80 %, а константа абсорбції $0,371 \pm 0,098$ год $^{-1}$. Близькі значення об'ємів розподілу (743 ± 195 та 1090 ± 421 г/кг для крові та мозку відповідно) дають змогу припустити інтенсивність процесів масообміну. Аналітичними методами встановлено структури метаболітів пропоксазепаму та їх кількісне співвідношення. Не знайдено реакційноздатних метаболітів, які можуть викликати токсичність і навіть канцерогенез.

4. Розроблено технологічний регламент синтезу сполуки та готової лікарської форми (таблетки 1; 2 і 5 мг). Отримано дозвіл МОЗ України на проведення клінічних випробувань. Пропоксазепам після перорального прийому одноразової дози (5 мг) добровольцями, в межах проведення 1-ї фази клінічних досліджень, показав добру переносимість і фармакокінетично характеризувався швидкою абсорбцією, повільним виведенням і виділенням із сечею малої кількості вихідного препарату в незміненому вигляді. Окислений метаболіт (3-гідроксипропоксазепам) і його глюкуронід виводяться із сечею в сумі до 10,5 % введеної дози, що передбачає високий ступінь його метаболізму.

5. Аналіз взаємодій пропоксазепаму з різними ізоформами CYP з урахуванням їх індивідуальних субстратів дозволяє припустити існування конкурентної взаємодії для 1A2, 2C19, та 2C8 й, у меншому ступені, 2C9, 3A4 та 2B6.

В даний час закінчуються клінічні випробування пропоксазепаму 2-ї фази.

Практична значимість

- Завдяки отриманим даним, щодо протисудомної дії пропоксазепаму у нас з'явилась можливість розширити показання препарату. Відомо, що для більшості невропатій характерним є спонтанна пароксизмальна біль, яка, нагадує епілепсію, що привило навіть до терміну «Епілептиформна невралгія». Більш того, наявність протисудомної дії сполуки є предиктором анагетичної її дії відносно нейропатичного болю. Найбільш ефективними препаратами для лікування нейропатичного болю є прегабалін та габапентин, які створювалися як антиепілептичні засоби. Входячи із зазначеного, в інституті було проведено дослідження анальгетичної дії пропоксазепаму. Виявилось, що препарат одночасно гальмує гострий і хронічний біль та має протизапальну дію. Було створено необхідну документацію (досьє на препарат), що дало змогу отримати дозвіл МОЗ України (наказ від 23 лютого 2021 р. № 310) на проведення 1-ї фази клінічних випробувань. З цією метою клінічній базі передано необхідну кількість таблеток під шифром 007 у дозах 1; 2 і 5 мг (див. фото), створених ТДВ «Інтерхім». Біоаналітична лабораторія отримала потрібну кількість субстанції та її похідної, що вміщує дейтерій для внутрішнього стандарту в аналітичних дослідженнях фармакокінетики у людей (добровольців).



The background of the slide is a microscopic image with a light blue and cyan color palette. It features several large, branching, filamentous structures that resemble biological cells or fibers. Some of these structures have a reddish-brown, fuzzy or hair-like texture. In the center, there is a bright, circular, yellowish-orange structure. The overall appearance is that of a complex biological or chemical network.

ДЯКУЮ ЗА УВАГУ!