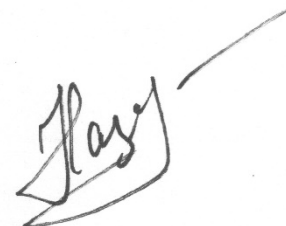


ФАНО РОССИИ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
ИНСТИТУТ ОРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ им. Н. Д. ЗЕЛИНСКОГО  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК  
(ИОХ РАН)

Экз. № 1

На правах рукописи



НАЗАРОВ  
Андрей Константинович

СИНТЕЗ  $6\alpha$ -МЕТИЛ- $16\alpha,17\alpha$ -ЦИКЛОГЕКСАНОПРОГЕСТЕРОНА  
(МЕЦИГЕСТОНА), ЕГО МЕТАБОЛИТОВ И РАЗРАБОТКА  
ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ МЕЦИГЕСТОНА С ПОВЫШЕННОЙ  
БИОЛОГИЧЕСКОЙ ДОСТУПНОСТЬЮ

02.00.10 – биоорганическая химия  
14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

ДИССЕРТАЦИЯ  
на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Научный руководитель:

Левина Инна Соломоновна  
доктор химических наук

Москва – 2017

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	4
1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР .....	10
1.1. Прогестерон и основные типы "классических" прогестинов.....	10
1.2. Модуляторы рецептора прогестерона – прегна-D'-пентараны .....	17
1.3. Селективные модуляторы рецептора прогестерона .....	26
1.4. Анализ методов повышения биологической доступности лекарственных веществ .....	35
1.4.1. Микрокапсулирование лекарственных веществ.....	39
1.4.2. Создание самоэмульгирующихся систем .....	43
1.4.3. Микронизация .....	48
2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	53
2.1. Альтернативная схема синтеза $6\alpha$ -метил- $16\alpha,17\alpha$ - циклогексанопрогестерона (мецигестона).....	54
2.2. Анализ вероятных путей биотрансформации мецигестона и его $6$ - дезметильного аналога и синтез их возможных метаболитов.....	59
2.2.1. Синтез возможных метаболитов мецигестона и его $6$ -дезметильного аналога.....	61
2.2.2. Разработка методик пробоподготовки и анализа биопроб мецигестона, его $6$ -дезметильного аналога и их синтезированных метаболитов как стандартов для изучения биотрансформации .....	65
2.3. Разработка технологии получения пероральных лекарственных форм мецигестона с повышенной биологической доступностью .....	75
2.3.1. Микронизация мецигестона.....	75
2.3.2. Получение самоэмульгирующейся системы с мецигестоном.....	79
2.3.3 Микрокапсулирование мецигестона .....	87
2.4. Исследование фармакокинетических параметров полученных экспериментальных лекарственных форм мецигестона .....	100
3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	108
3.1. Синтез $6\alpha$ -метил- $16\alpha,17\alpha$ -циклогексанопрогестерона (мецигестона).....	109

3.2. Синтезы метаболитов мецигестона и его 6-дезметильного аналога .....	113
3.3. Пробоподготовка мочи и крови лабораторных животных для аналитических исследований .....	116
3.4. Методики измерений массовой концентрации метаболитов в моче и крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с применением масс-селективного детектирования .....	119
3.5. Получение экспериментальных лекарственных форм мецигестона .....	122
3.6. Анализ полученных лекарственных форм .....	124
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	125
ВЫВОДЫ: .....	127
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	129
СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ .....	131
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	133
ПРИЛОЖЕНИЕ А.....	152
ПРИЛОЖЕНИЕ Б .....	203

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы исследования.** Стероидные гормоны являются одним из основных регуляторов жизнедеятельности животных и человека. Синтетические стероидные соединения, получаемые, в основном, модификациями природного стероидного скелета, проявляют в организме разнообразные физиологические свойства. Такой подход используется для получения большого ряда высокоэффективных соединений, широко используемых в медицине в гормональной контрацепции, заместительной гормональной и противоопухолевой терапии [1]. Среди этих соединений синтетические прогестины занимают немаловажное место. Для лечения ряда гинекологических заболеваний целесообразным является применение лекарственных средств, способных восстанавливать нормальный гормональный статус женщины и ингибировать неконтролируемый рост раковых клеток. В последние годы при лечении указанных патологий достаточно надежными и эффективными зарекомендовали себя селективные модуляторы рецептора прогестерона [2, 3, 4]. Одними из таких модуляторов являются производные прогестерона с дополнительным карбоциклом D' в положениях 16 и 17 стероидного скелета (прегна-D'-пентараны), созданные ранее в лаборатории химии стероидных соединений Института органической химии им. Н.Д. Зелинского Российской академии наук. Оказалось, что наиболее перспективным из этих стероидов является  $6\alpha$ -метил- $16\alpha,17\alpha$ -циклогексанопрегн-4-ен-3,20-дион (мецигестон). Он обладает прогестагенной активностью, превышающей активность прогестерона и его аналогов, и на 100% сохраняет беременность у овариэктомированных животных. При этом данный стероид не проявляет ни андрогенной, ни анаболической, ни эстрогенной активности. Препарат не токсичен даже в дозах, превышающих в 50 раз эффективную терапевтическую дозу; не обладает эмбриотоксическим, мутагенным и тератогенным действием; не влияет на морфологическую картину и биохимические показатели крови. Другими, не менее важными преимуществами мецигестона являются эффективный терапевтический эффект при гораздо более низких дозах, чем,

например, у применяемого в настоящее время в клинической практике препарата дюфастон (дидрогестерон), и особенности его структуры, не позволяющей ему метаболизироваться в 17-кетостероиды. Мецигестон является кандидатом для клинического использования в гормональной терапии в целях контрацепции.

Однако для применения мецигестона в клинической практике, прежде всего необходима разработка метода синтеза, способного стать основой производства данного препарата на фармацевтических предприятиях. Не менее важным является исследование его метаболизма и фармакокинетических характеристик. В этой связи синтез возможных метаболитов-стандартов мецигестона для изучения биотрансформации выступает приоритетной частью доклинических исследований. И, наконец, завершающим этапом является создание лекарственной формы с высокой биологической доступностью. Дело в том, что большинство стероидных препаратов являются гидрофобными соединениями, что весьма затрудняет их абсорбцию в желудочно-кишечном тракте, и в конечном итоге, отрицательно сказывается на их эффективности и безопасности. Низкие показатели биодоступности подразумевают назначение высоких доз, а это, как правило, связано с возникновением побочных эффектов, обусловленных, в частности, накоплением потенциально опасных метаболитов.

Таким образом, комплексное исследование, включающее разработку нового метода синтеза мецигестона и его метаболитов, создание на его основе инновационных лекарственных форм с повышенной биодоступностью, является актуальным и имеет важное практическое значение для различных отраслей фармакологии и медицины.

**Целью** настоящего исследования является разработка нового метода синтеза мецигестона, синтез его стандартов-метаболитов и создание пероральной лекарственной формы мецигестона с повышенной биологической доступностью.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие **задачи:**

1. Разработать альтернативный метод синтеза мецигестона для упрощения технологии процесса, возможности масштабирования и увеличения выхода конечного продукта.

2. Разработать методы синтеза и синтезировать возможные метаболиты мецигестона как стандарты для подтверждения основных путей его биотрансформации.

3. Разработать методики качественного и количественного определения мецигестона и его метаболитов в биологических материалах методами ВЭЖХ-МС/МС.

4. Разработать методы получения пероральных форм мецигестона и подтвердить их эффективность на основе сравнительных фармакокинетических исследований.

**Научная новизна** проведенных исследований заключается в том, что впервые:

разработан альтернативный метод синтеза мецигестона, упрощающий технологический процесс и позволяющий повысить выход конечного продукта;

разработаны методы синтеза и получены в количествах, достаточных для доклинических исследований, 11 новых химических соединений – метаболитов мецигестона и его 6-дезметильного аналога;

разработаны методики качественного и количественного определения мецигестона и его метаболитов в биологических пробах методами ВЭЖХ-МС/МС;

показано, что пентациклические стероиды могут биотрансформироваться аналогично природному прогестерону;

разработаны технологии изготовления новых лекарственных форм мецигестона с повышенной биодоступностью для перорального применения, а именно: стабильных полимерных микрокапсул, микронизированной формы препарата и самоэмульгирующейся системы.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** На основании проведенных исследований разработаны:

- альтернативный метод синтеза мецигестона;
- методы синтеза метаболитов мецигестона и его б-дезметильного аналога;
- методика определения целевых соединений и их метаболитов методом ВЭЖХ-МС/МС;
- состав и технология получения микрокапсулированной формы мецигестона;
- состав и технология получения самоэмульгирующейся системы, в состав которой входит мецигестон;
- технология получения микронизированной формы мецигестона.

Разработанные на основании результатов исследований лабораторные регламенты для производства трех перечисленных выше видов конечной продукции использованы при создании аналогичных лекарственных форм в масштабах лабораторного производства ЗАО «Изваринофарма» (Приложение Б) для наработки опытной партии продукции с дальнейшей целью их внедрения в промышленное производство.

В 2017-2020 годах ЗАО «Изваринофарма» планирует проведение доклинических исследований эффективности и безопасности лекарственных средств на основе мецигестона с использованием разработанных методов количественного и качественного анализа мецигестона в биологических жидкостях.

Результаты фармакокинетического исследования могут быть использованы при выборе терапевтических доз и режимов лечения в дальнейших клинических исследованиях новых лекарственных форм мецигестона.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Альтернативный метод синтеза мецигестона, упрощающий технологический процесс и позволяющий получать целевой продукт с высоким выходом.
2. Метод синтеза метаболитов мецигестона и его б-дезметильного аналога.
3. Методики пробоподготовки биопроб; методики качественного и количественного определения мецигестона и его метаболитов в биологических пробах методами ВЭЖХ-МС/МС.

4. Методы получения трех новых лекарственных форм мецигестона, представляющих собой самоэмульгирующуюся систему, инкапсулированную и микронизированную формы.

**Апробация результатов.** Основные экспериментальные данные получены при выполнении работ по плановой научной тематике ИОХ с 2013 по 2017 гг.

Основные результаты были доложены на следующих международных и российских научных конференциях: 1-я Международная научно-практическая конференция «Современная химико-токсикологическая экспертиза» (Москва, 2013); Всероссийская конференция с международным участием «Современные проблемы химической науки и фармации» (Чебоксары, 2014); Междисциплинарный симпозиум по медицинской, органической и биологической химии «МедОргБиоХим-2014» (Крым, Новый Свет, 2014); XX Международная научно-практическая конференция «Фундаментальные и прикладные исследования: проблемы и результаты» (Новосибирск, 2015); XXV Международная научно-практическая конференция «Приоритетные научные направления: от теории к практике» (Новосибирск, 2016).

Основные научные результаты диссертации опубликованы в 4-х статьях – в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки для публикации материалов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, а также в 1 патенте РФ.

**Личный вклад автора.** Основные научные направления, цель и содержание диссертационной работы сформулированы автором на основе выполненных лично экспериментальных исследований. Основной объем теоретических и экспериментальных исследований, изложенных в диссертации, экспериментальная апробация, оформление результатов в виде публикаций и научных докладов проведены в период с 2013 г. по 2017 г. Автор принимал участие в проведении всех исследований по теме диссертации, а также самостоятельно анализировал и обобщал полученные результаты.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, результатов собственных исследований, заключения, выводов,



списка сокращений и условных обозначений, словаря терминов и списка использованных источников литературы. Материалы изложены на 151 странице (без учета приложения) и иллюстрированы 14 таблицами, 14 схемами и 27 рисунками. Библиография содержит 174 источников. Приложение включает 88 рисунков на 52 страницах.

## 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

### 1.1. Прогестерон и основные типы "классических" прогестинов

Термин «прогестин» был впервые предложен Корнером в 1930 г. для обозначения гормона яичников, который сегодня называется прогестероном [5]. В то время второй женский гормон, секретлируемый желтым телом, еще не был выделен, поэтому термин «прогестин» просто обозначал вещество, присутствующее в спиртовых фракциях желтого тела кролика и способное индуцировать пролиферацию эндометрия при введении кастрированным крольчихам. После выделения Бутенандтом и Вестфалем [6] в 1934 г. прогестерона и установления его структуры [7] для очищенного гормона предлагался ряд названий, среди которых наиболее популярными были «лютеостерин» и «прогестерон». Последнее название было выбрано на международной конференции в 1935 г. В 1940-60-х гг. термин «прогестаген» широко использовался для обозначения общего класса прогестагенных стероидов, включавшего как сам прогестерон, так и его синтетические аналоги. Это определение применяется и сегодня. В отличие от него термин «прогестин» следует использовать только для синтетических прогестагенных стероидов [8]. В данном обзоре используется именно этот термин.

Природный прогестерон играет важную роль в регуляции функции матки, эндометрия, шейки матки, центральной нервной и гипофизарной систем. Поскольку прогестерон быстро метаболизируется в кишечном тракте, печени и многих других тканях, его эффективность зависит от способа введения. На практике используются синтетические соединения, используемые в малых дозах, так как их инактивация замедляется в силу особенностей химической структуры.

Известно, что регуляторная деятельность стероидных гормонов осуществляется через их специфическое связывание с белковыми рецепторами с образованием обратимых комплексов. В настоящее время считается установленным фактом, подтвержденным данными рентгеноструктурного анализа лиганд-связывающего комплекса самого прогестерона и его структурных аналогов, что

прогестерон связывается с рецептором прогестерона (PR), индуцируя конформационные изменения комплекса рецептор-лиганд, который в свою очередь связывается с прогестерон-чувствительными элементами в промотерах целевых генов и далее взаимодействует с коактиваторами, приводя к транскрипции этих генов и, соответственно, к биологическому ответу в организме. Такие аналоги прогестерона являются агонистами PR. В то же время лиганд-рецепторный комплекс может принять конформацию, способную к связыванию исключительно с корепрессорами, и такие лиганды являются антагонистами PR, не проявляющими в организме прогестагенного действия [9, 10, 11, 12].

Существует несколько типов «классических» прогестинов.

Синтетические прогестины, используемые в медицине, подразделяются на несколько групп или типов, родственных по химической структуре основным природным гормонам – прогестерону и тестостерону.

#### 1. Производные прогестерона:

- производные  $17\alpha$ -ацетоксипрогестерона и ретропрогестерона;
- производные 19-норпрогестерона.

#### 2. Производные тестостерона:

- производные 19-норэтистерона (эстраны);
- производные 13-этилгонана.

#### 3. Производные спиролактона.

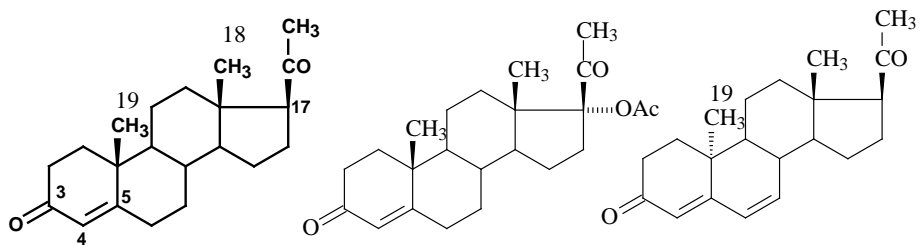
Первую группу составляют прогестины, родственные прогестерону. Их можно условно разделить на две подгруппы: производные  $17\alpha$ -ацетоксипрогестерона ( $17\alpha$ -гидроксипрогестерон лишен прогестагенной активности) и 19-норпрогестерона. К первым относятся ацетат медроксипрогестерона, ацетат мегестрола, ацетат хлормадинона и ацетат ципротерона [13] (рис. 1), ко вторым – производные 19-норпрогестерона (тримегестон, ацетат номегестрола, несторон, синтезированные в 80-х гг. XX в. [14]) (рис. 2).

Прогестины второй группы, родственные тестостерону, в свою очередь подразделяются на стероиды, содержащие  $17\alpha$ -этинильную группу и лишенные ее. 17-Этинилированные 19-нортестостероны состоят из двух семейств —

семейства норэтистерона (эстраны) и левоноргестрела (гонаны), содержащего в положении 13 стероидной молекулы этильную группу вместо характерной для природных стероидов метильной. К семейству норэтистерона относятся первые синтетические прогестины – норэтистерон, норэтинодрел, диацетат этинодиола и др. [14, 15, 16]. Главным представителем 13-этилгонанов является левоноргестрел, остальные (дезогестрел, этногестрел, гестоден, норгестимат) фактически являются его производными. Несколько особняком стоит диеногест, имеющий в своей структуре 17 $\alpha$ -цианометильную группу и обычную 13-метильную группу (рис. 3).

Наконец, к третьей группе относится один из классических прогестинов, вошедших в клиническую практику, производное 17 $\alpha$ -спиролактона – дроспиренон (рис. 1).

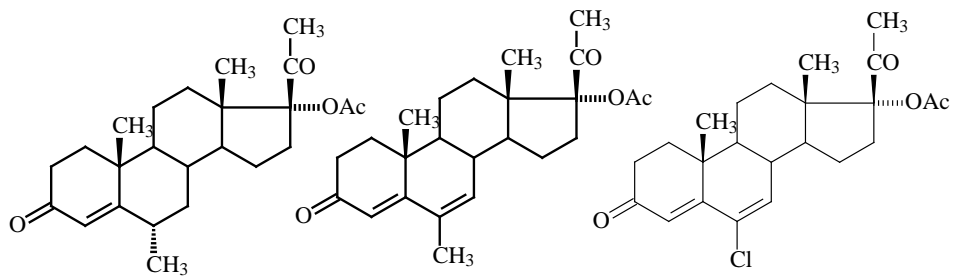
Исторически первым синтетическим прогестином, использованным в контрацепции, было производное 19-нортестостерона – норэтинодрел. Его по классификации, приведенной в [11, 12, 13], относят к 1-му поколению прогестинов. Норэтинодрел, линэстренол и диацетат этинодиола являются прогормонами и превращаются в норэтистерон для проявления своего действия. Второе поколение прогестинов по этой классификации состоит из левоноргестрела и его производных. Прогестины 3-го поколения – дезогестрел, с его активным метаболитом 3-кето-дезогестрелом (этногестрелом), гестоден и норгестримат с его активным 17-дезоксипрогестроном. К 4-му поколению относят диеногест, дроспиренон, тримегестон и ацетат номегестрола.



прогестерон

17-ацетоксипрогестерон

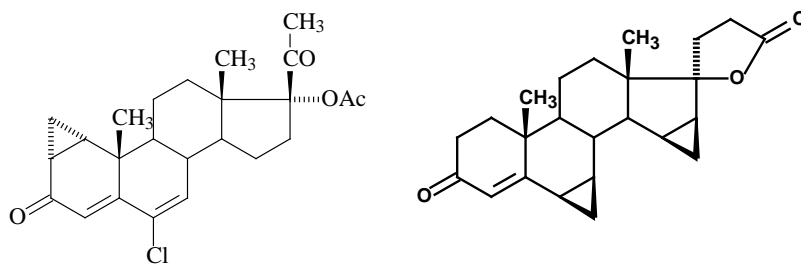
дигидрогестерон



ацетат медроксипрогестерона

ацетат мегестрола

ацетат хлормадинона



ацетат ципротерона

дроспиренон

Рисунок 1 – Структурные формулы производных прогестерона.

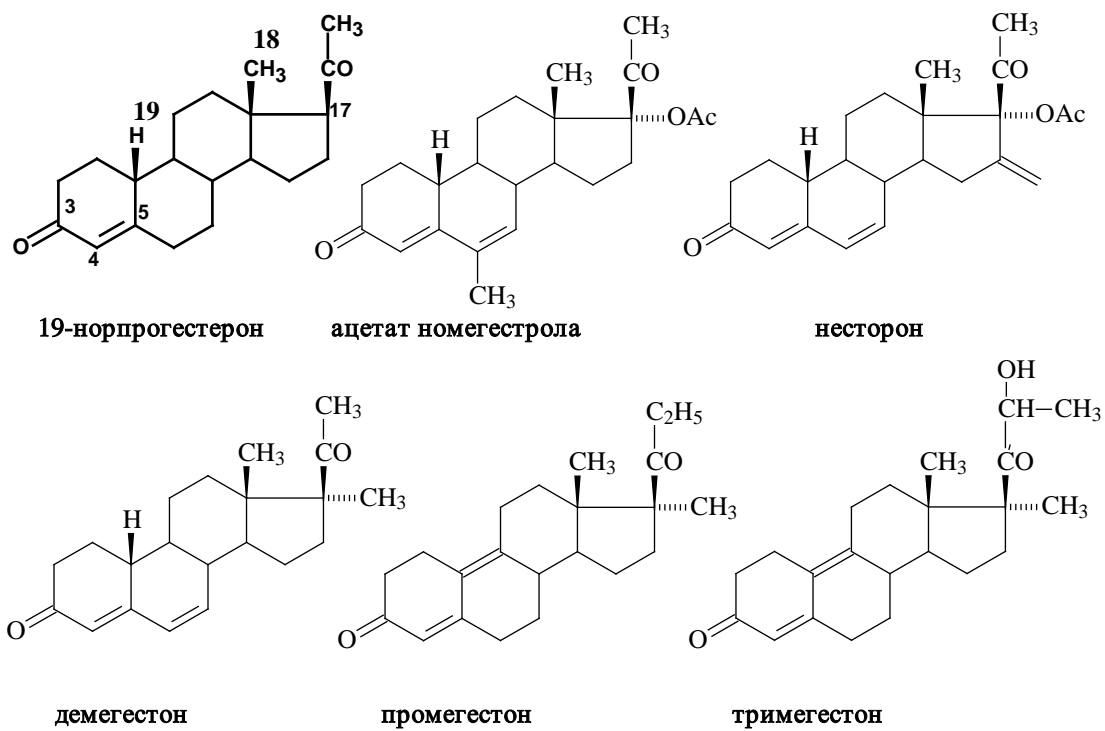


Рисунок 2 – Структурные формулы производных 19-норпрогестерона.

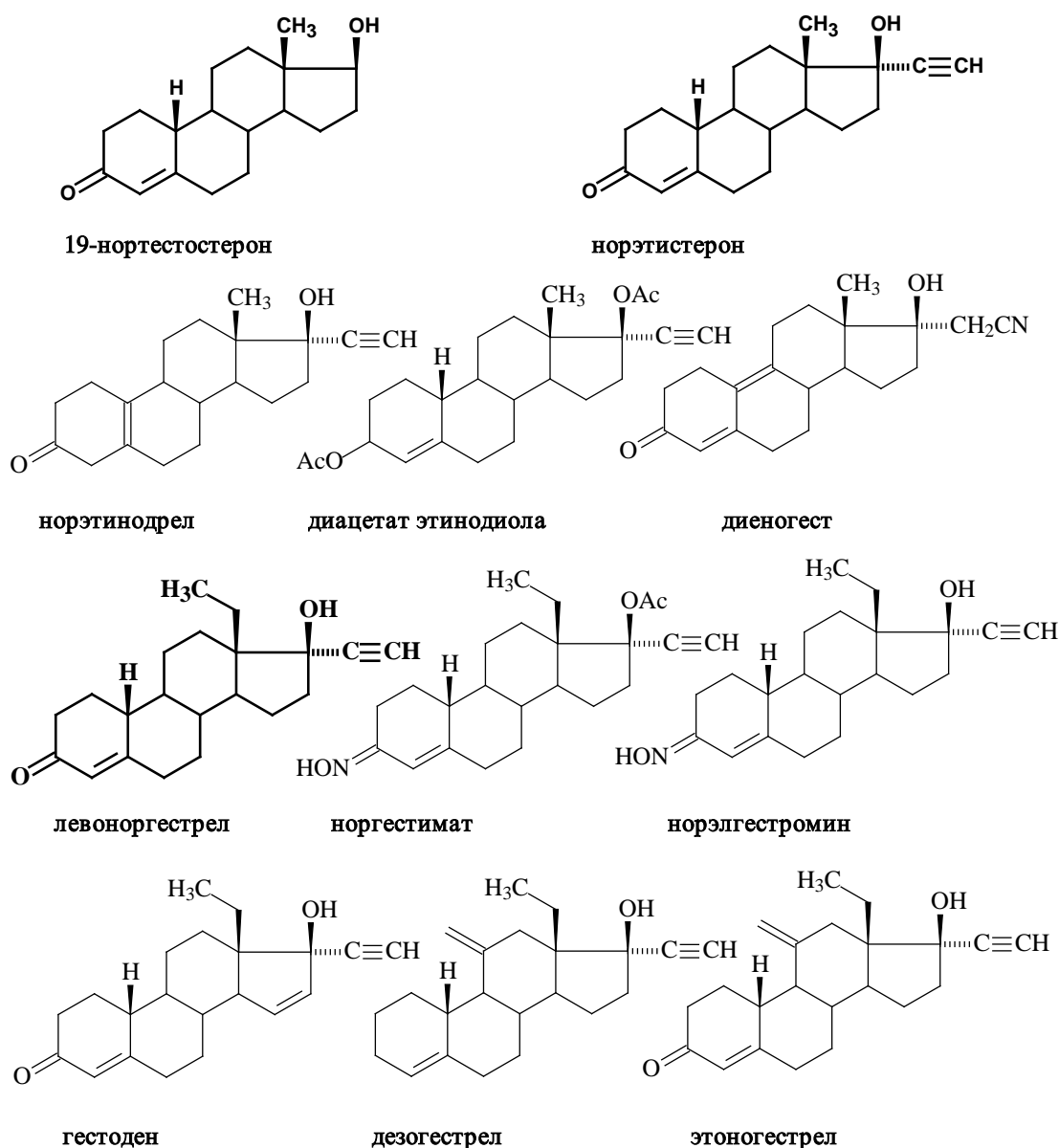


Рисунок 3 – Структурные формулы производных эстрана и гонана.

После выявления в 80-х г.г. XX в. (при изучении метаболизма) неблагоприятных побочных эффектов прогестинов усилия фарминдустрии были направлены на создание прогестагенных соединений, сочетающих высокую биологическую активность с метаболической нейтральностью. Результатом стало появление новых прогестинов, которые составили основу оральных контрацептивных препаратов, находящихся сегодня в клинической практике (по крайней мере в Европе). За исключением производных прогестерона, производные 19-норэтистерона и гонана принадлежат - с точки зрения их появления на рынке – к 3-му поколению. Прогестины последнего поколения

связываются с PR и не проявляют андрогенных, эстрогенных или глюкокортикоидных действий [14, 16, 17, 18].

Практически для всех типов прогестинов необходимым для проявления гормональной активности является наличие в их молекуле 3-кетогруппы и двойной связи C(4)-C(5) ( $\Delta^4$ -3-кетогруппировки) в кольце А; прогестины, лишённые этого свойства, представляют собой прогормоны («prodrugs») и после перорального введения быстро трансформируются в активный прогестин с  $\Delta^4$ -3-кетогруппировкой (пример – дезогестрел).

Все классические («чистые») прогестины проявляют прогестагенные и, в некоторых тканях, антиэстрогенные свойства, но существенно различаются по общему профилю гормонального действия. В зависимости от особенностей их химической структуры они могут действовать также как слабые андрогены, глюкокортикоиды или антиминералокортикоиды [19, 20, 21]. Это отчасти объясняется структурным сходством соответствующих стероидных рецепторов, которые принадлежат к одному семейству ядерных рецепторов.

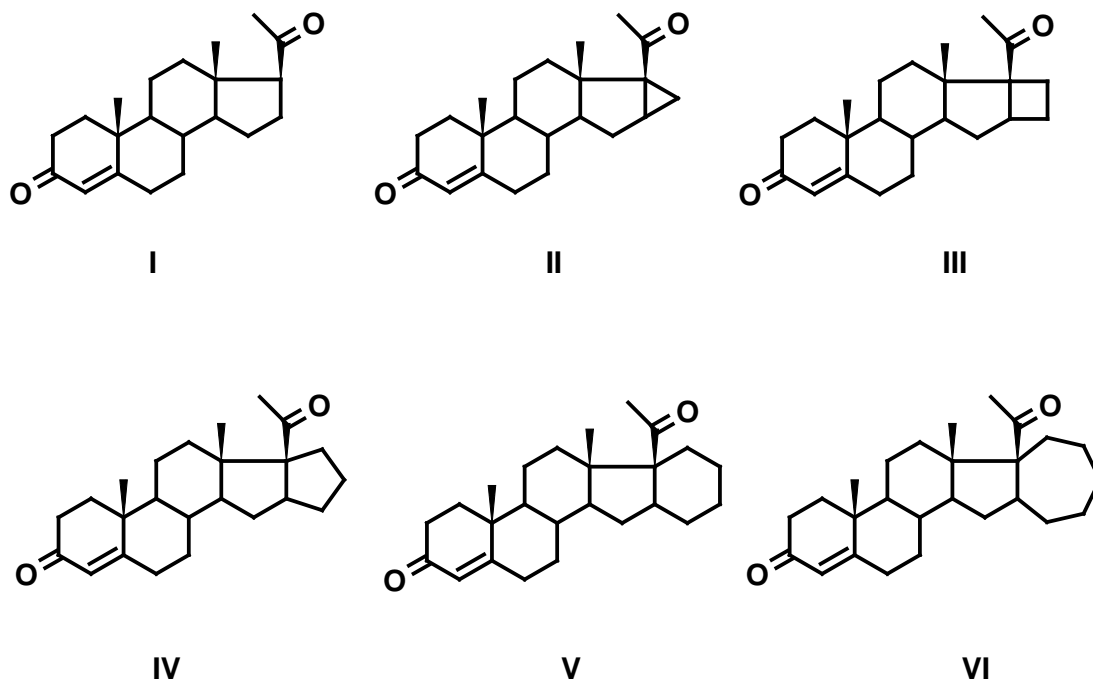
Различные прогестины могут связываться с одним или несколькими рецепторами с низкой или высокой связывающей способностью (сродством); при этом не обязательно будет соответствующий биологический ответ в организме. Результатом связывания может являться агонистическая, антагонистическая активности или вообще отсутствие клинического эффекта. Различия в структуре стероида и заместителях, как будет показано далее, и определяют фармакологические профили синтетических прогестинов последнего десятилетия – модуляторов PR. Необходимо подчеркнуть, что даже крайне малые изменения в химической структуре стероида могут быть ответственны за значительные различия в эффектах прогестинов [22, 23].



## 1.2. Модуляторы рецептора прогестерона – прегна-D'-пентараны

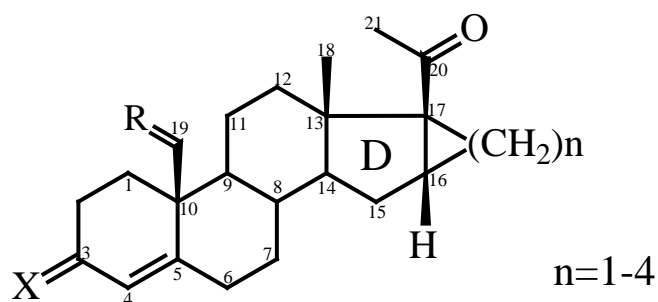
Для лечения ряда гинекологических заболеваний целесообразным является применение лекарственных средств, способных восстанавливать нормальный гормональный статус женщины и ингибировать неконтролируемый рост раковых клеток. В последние годы при лечении таких патологий достаточно надежными и эффективными зарекомендовали себя модуляторы рецептора прогестерона [24, 25]. Одним из таких модуляторов является созданный в лаборатории химии стероидных соединений ИОХ РАН новый класс прогестинов - селективных модуляторов рецептора прогестерона (PR), содержащих дополнительные циклоалкановые заместители в 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -положениях кольца D (так наз. D'-пентараны). Были получены серии этих стероидов **I—VII**, содержащих дополнительный карбоцикл от циклопропанового до семичленного, выявлены высокая гормональная активность многих из них и закономерности связи «структура-активность» (Схема 1) [26,27].

Схема 1.



Пентараны являются перспективными для практического применения синтетическими прогестинами, так как обладают высокой прогестагенной

активностью и сопоставимым с прогестероном сродством к PR [26, 27]. Важным свойством D'-пентаранов оказалась их способность ингибировать рост некоторых клеток гормонозависимых опухолей. [28, 29, 30].



X = O; H(OH); NOR'. R' = H; Me; (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H

R = H<sub>2</sub>; O; OH; NOME.

Рисунок 4 – Общая формула D'-пентаранов.

Молекула прогестерона (и большинства синтетических аналогов прогестерона) содержит на обоих концах стероидного скелета полярные группировки, ответственные за проявление прогестагенной активности:  $\Delta^4$ -3-кетогруппировку в кольце A и 20-карбонильную группу в 17 $\beta$ -ацетильной боковой цепи кольца D. После того как в 1998 г. методом рентгеноструктурного анализа (РСА) была установлена пространственная структура комплекса прогестерона с лиганд-связывающим доменом (LBD) рецептора прогестерона [9], возникла возможность прогнозировать взаимодействие синтетических аналогов с участком связывания.

Было показано, что в  $\alpha$ -области кольца D молекулы прогестерона в лиганд-связывающем домене рецептора имеется большая полость, позволяющая разместить достаточно объемистые заместители с сохранением высокой связывающей активности [9, 31]. Молекулярный докинг серии синтезированных пентаранов в лиганд-связывающий домен (LBD) PR показал, что, несмотря на большой объем молекулы пентаранов по сравнению с прогестероном, эти лиганды хорошо размещаются в LBD, причем в имеющуюся в последнем полость в  $\alpha$ -области вблизи кольца D хорошо вписывается дополнительное шестичленное кольцо D', увеличивая гидрофобное связывание без искажения общей конформации молекулы лиганда. Все стероиды располагаются сходным образом в LBD PR, их стероидный скелет перекрывается с молекулой прогестерона (рис. 5), и  $\Delta^4$ -3-

кетогруппа пентаранов может образовывать водородную связь с аминокислотным остатком белка [32, 33].

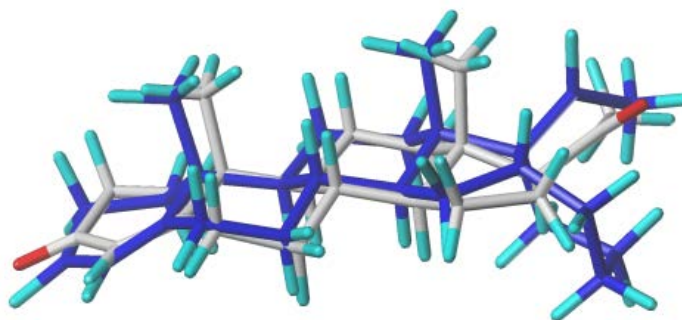


Рисунок 5 – Сопоставление положения  $16\alpha,17\alpha$ -циклогексанопрогестерона (V) после докинга с положением прогестерона в LBD PR. Структура прогестина показана темно-серым цветом, структура прогестерона – серым [33]

Таким образом, наличие дополнительного кольца D' умножает гидрофобные контакты с белком при полной аналогии конформации молекулы данного стероида с конформацией природного гормона прогестерона, что приводит к более высокому сродству этих стероидов к PR и, как следствие, к высокой прогестагенной активности *in vivo*.

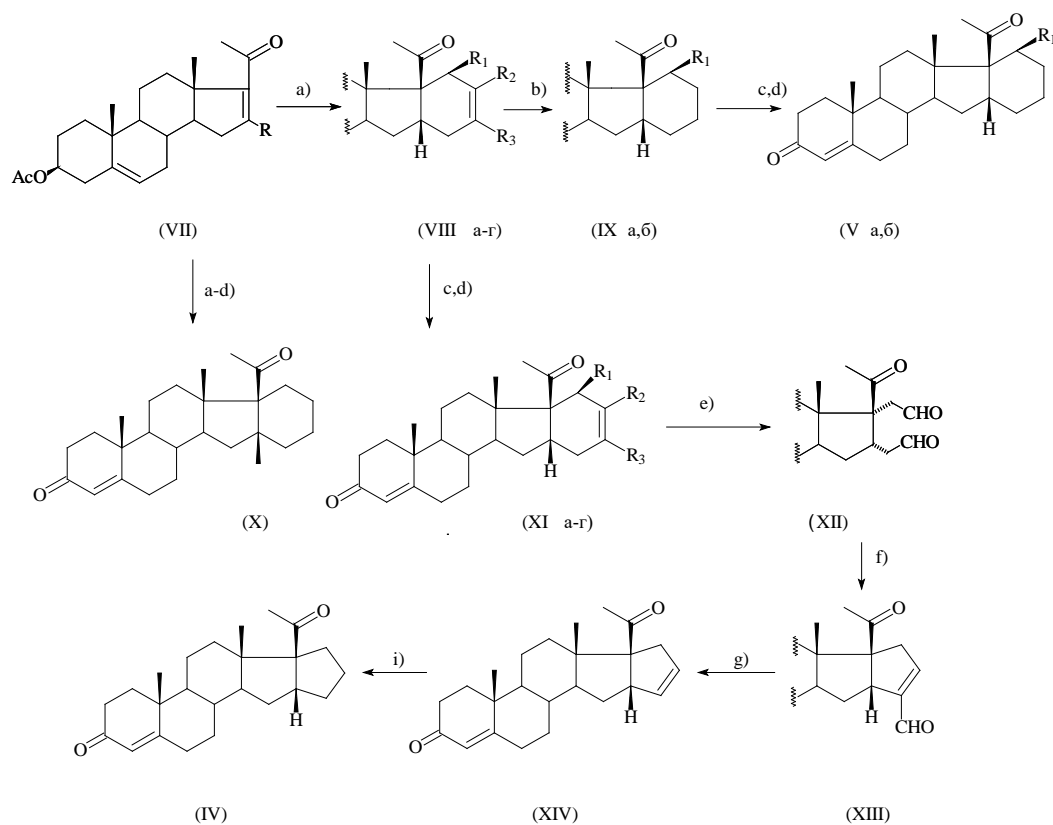
Ниже представлены синтезы основных серий пентаранов.

Ключевой стадией в синтезе прегнанных стероидов с дополнительным шестичленным кольцом D' в  $16\alpha,17\alpha$ -положениях стероидного скелета послужила открытая в лаборатории химии стероидных соединений ИОХ РАН способность стероидных 16-дегидро-20-кетонов (VII) вступать в реакцию Дильса—Альдера с диенами в качестве диенофилов [34, 35]. Катализируемая кислотами Льюиса конденсация сопряженного кетона (VII) с 1,3-диенами протекает при комнатной температуре с образованием соответствующих аддуктов (VIII а-г) с высокими выходами. Эта же реакция реализована с использованием техники высокого давления, что, в частности, позволило в итоге получить  $16\beta$ -метилзамещенный пентаран (X) [36]. Первичный аддукт ( $16\beta$ -метиланалог соединения (VIII а)) оказалось возможным получить с выходом 80% благодаря совместному применению кислоты Льюиса и высокого давления [37]. Стандартное введение 4-дегидро-3-кетогруппировки в первичные циклоаддукты (VIII а-г) и в гидрированные в

кольце D' аналоги (IX а,б) привело к сериям аналогов прогестерона (XI а-г) и (V а,б) (схема 2). Синтез D'<sub>5</sub>-(IV) и D'<sub>7</sub>-(VI) пентаранов осуществлен соответственно сокращением и расширением дополнительного кольца D'<sub>6</sub>-предшественников. 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -Циклопентенопрогестерон (XIV) получен последовательным окислением циклогексена (XI а) OsO<sub>4</sub>, расщеплением промежуточного диола HJO<sub>4</sub> в диальдегид (XII), региоспецифической циклизацией последнего в циклопентеновый альдегид (XIII) и его декарбонированием. 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -Циклопентанопрогестерон (IV) получен избирательным восстановлением двойной связи в дополнительном кольце пентарана (XIV) в присутствии катализатора Уилкинсона [38] (схема 2). Для выхода к 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогептанопрогестерону (VI) был получен циклоаддукт (XV), гидроцианирование которого привело к соединению (XVI). Гидридное восстановление последнего дало аминоспирт, охарактеризованный в форме оксазолидина (XVII). Вовлечение его в перегруппировку Демьянова—Тиффно, очистка образующейся при этом смеси изомерных семичленных кетонов и последующее гидридное восстановление соответствующих тозилгидразонов привело к смеси 3 $\beta$ ,20-дигидроксисоединений (XVIII), переведенных затем стандартными методами в целевой D'<sub>7</sub>-пентаран (VI) [39, 40] (схема 3).

На схеме 4 представлен синтез наиболее перспективных 6-метилзамещенных 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексанопрогестеронов и их дегидроаналогов. Раскрытием 5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -эпоксипентарана (XIX) MeMgI (пространственно затрудненная 20-кетогруппа остается инертной в условиях реакции Гриньяра), окислением 3 $\beta$ -гидроксигруппы в образовавшемся 5 $\alpha$ -гидрокси-6 $\beta$ -метилпентаране (XX) и последующей катализируемой кислотой дегидратации 5 $\alpha$ -гидроксигруппы, сопровождающейся эимеризацией 6-центра, получен 6 $\alpha$ -метил-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексанопрогестерон (мецигестон) (XXI). Дегидрирование последнего хлоранилом привело к 6-дегидроаналогу (XXV), а с помощью DDQ дало 1,2-дегидропентаран (XXII). Также получен и соответствующий 6-дезметильный 1,2-дегидропентаран (XXIII) [41, 42]. При дегидрировании  $\Delta^{4,6}$ -пентарана (XXV) DDQ в присутствии *p*-TsOH получен триенон (XXIV).

Схема 2.



$R = H, Me$

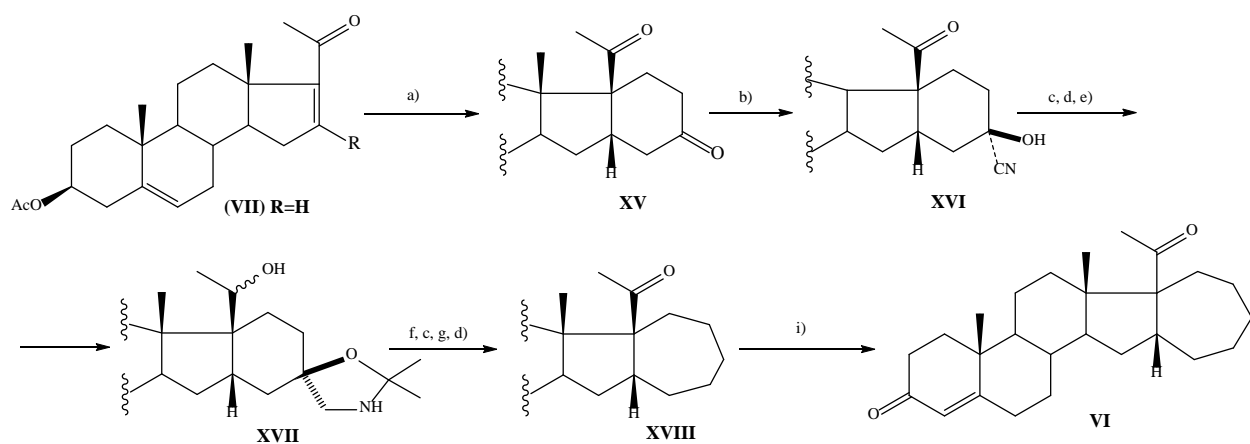
а.  $R_1=R_2=R_3 = H$ ; б.  $R_1=Me, R_2=R_3=H$ ; в.  $R_1=R_2=H; R_3=Me$ ; г.  $R_1=H; R_2=R_3=Me$

*Реагент ы.*

а)  $R_1CH=C(R_2)C(R_3)=CH_2$ , кислота Льюиса, н.у.; или 14 кбар; или кислота Льюиса, 6-14 кбар; б)  $H_2-Pd/CaCO_3$ ; в)  $OH^-$ ; г)  $Al(OPr^i)_3$ , циклогексанон;

е)  $OsO_4-HJO_4$ ; ф)  $(CH_2)_5NH, AcOH$ ; г)  $ClRh(PPh_3)_3$ ; и)  $H_2 - ClRh(PPh_3)_3$

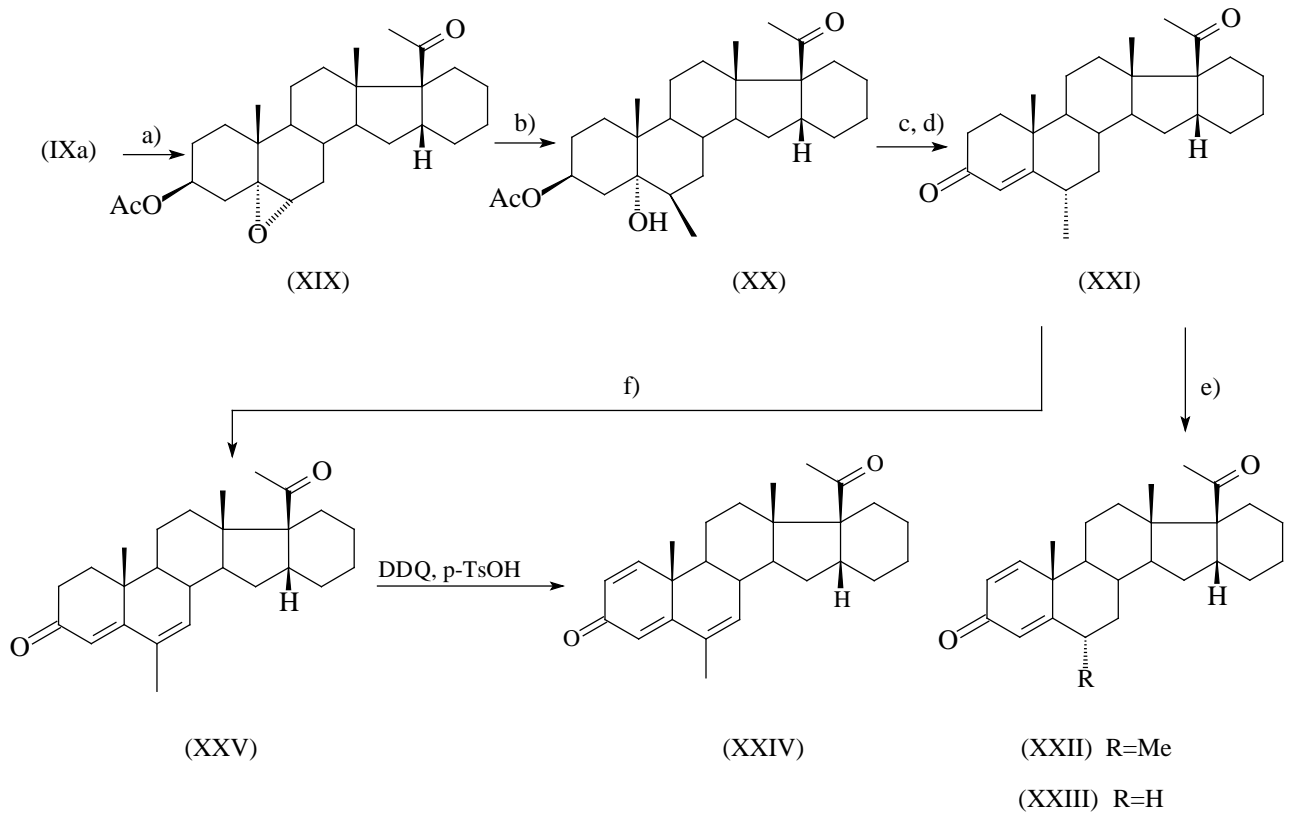
Схема 3.



*Реагент ы:* a)  $\text{H}_2\text{C}=\text{CHC}(\text{OSiMe}_3)=\text{CH}_2$ ,  $\text{AlCl}_3$ ; b)  $\text{KCN}-\text{AcOH}$ ; c)  $\text{Ac}_2\text{O}-\text{Py}$ ; d)  $\text{LiAlH}_4$ ; e)  $\text{Me}_2\text{CO}$ ; f)  $\text{NaNO}_2-\text{AcOH}$ ; g)  $\text{H}_2\text{NNHTs}-\text{THF}$ ; i)  $[\text{Al}(\text{O}^i\text{Pr})_3, \text{PhMe}, \text{циклогексанон}]$

Были разработаны удобные методы введения оксимных групп в молекулу  $\text{D}'_6$ -пентанов. Синтез 3-, 6- и 19-оксимов  $16\alpha, 17\alpha$ - циклогексанопрегнанов представлен на схемах 5—7. Оксимирование енона (**Va**) проводилось солянокислым гидроксиламином в  $\text{Py}/\text{EtOH}$  при комнатной температуре. Были получены индивидуальные 3(*E*)-(**XXVI**) ( $\text{R}=\text{H}$ ) и 3(*Z*)- (**XXVI**) -оксииминопентараны ( $\text{R}=\text{H}$ ), соответственно, в соотношении 3 : 1. Менее стабильные (*Z*)-оксимы при выдерживании в растворе переходили в (*E*)-изомеры. Та же реакция енона (**Va**) с *O*-метилгидроксиламином дала 3(*E*)- и (*Z*)-оксииминопентараны (**XXVII**) ( $\text{R}=\text{Me}$ ), а с *O*-(3-карбоксыпропил)-гидроксиламином в  $\text{Py}$  с последующим действием диазометана на полученные продукты - 3(*E*)- и (*Z*)-оксииминопентараны (**XXVIII**) ( $\text{R}=(\text{CH}_2)_3\text{CO}_2\text{Me}$ ) (Схема 6). Исходным соединением для синтеза 6-оксимов и их производных служил полученный 5,6-эпоксид (**XIX**) (Схема 6). Его раскрытие в  $5\alpha, 6\beta$ -диол (**XXIX**) и окисление 6-гидроксильной группы дало 6-кетопентаран (**XXX**), последующее отщепление 5-гидроксила в котором дало  $3\beta$ -ацетокси  $\Delta^4$ -6-кетон (**XXXI**), а омыление 3-ацетата в последнем привело к  $\Delta^4$ -6-кетону (**XXXII**). Взаимодействие последнего с  $\text{RONH}_2 \cdot \text{HCl}$  в  $\text{Py}/\text{EtOH}$  и окисление полученных при этом  $3\beta$ -гидрокси-6-оксимов (**XXXIII**)  $\text{PDC}$  дало целевые оксимы (**XXXIV**). При этом выделены с высоким выходом только (*E*)-изомеры [29, 43].

Схема 4.



Реагент ы: a)  $\text{ArCO}_3\text{H}$ ; b)  $\text{MeMgJ}$ ; c)  $[\text{O}]$ ; d)  $\text{HCl-EtOH}$ ; e) DDQ; f) хлоранил;  
e) DDQ

Схема 5.

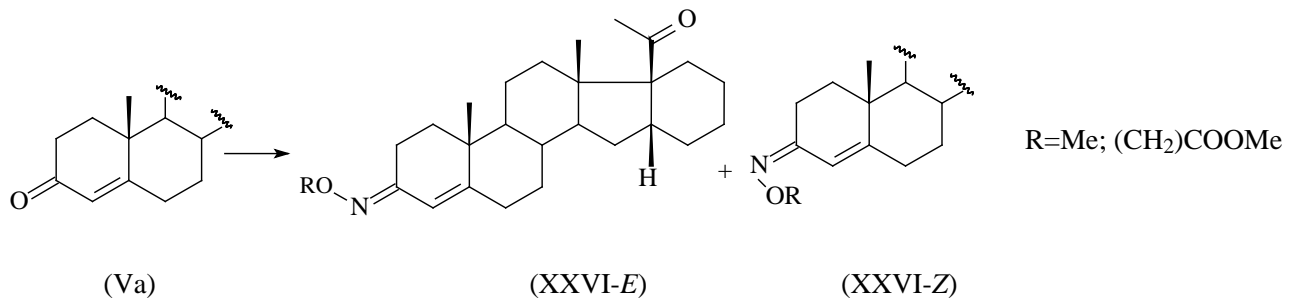
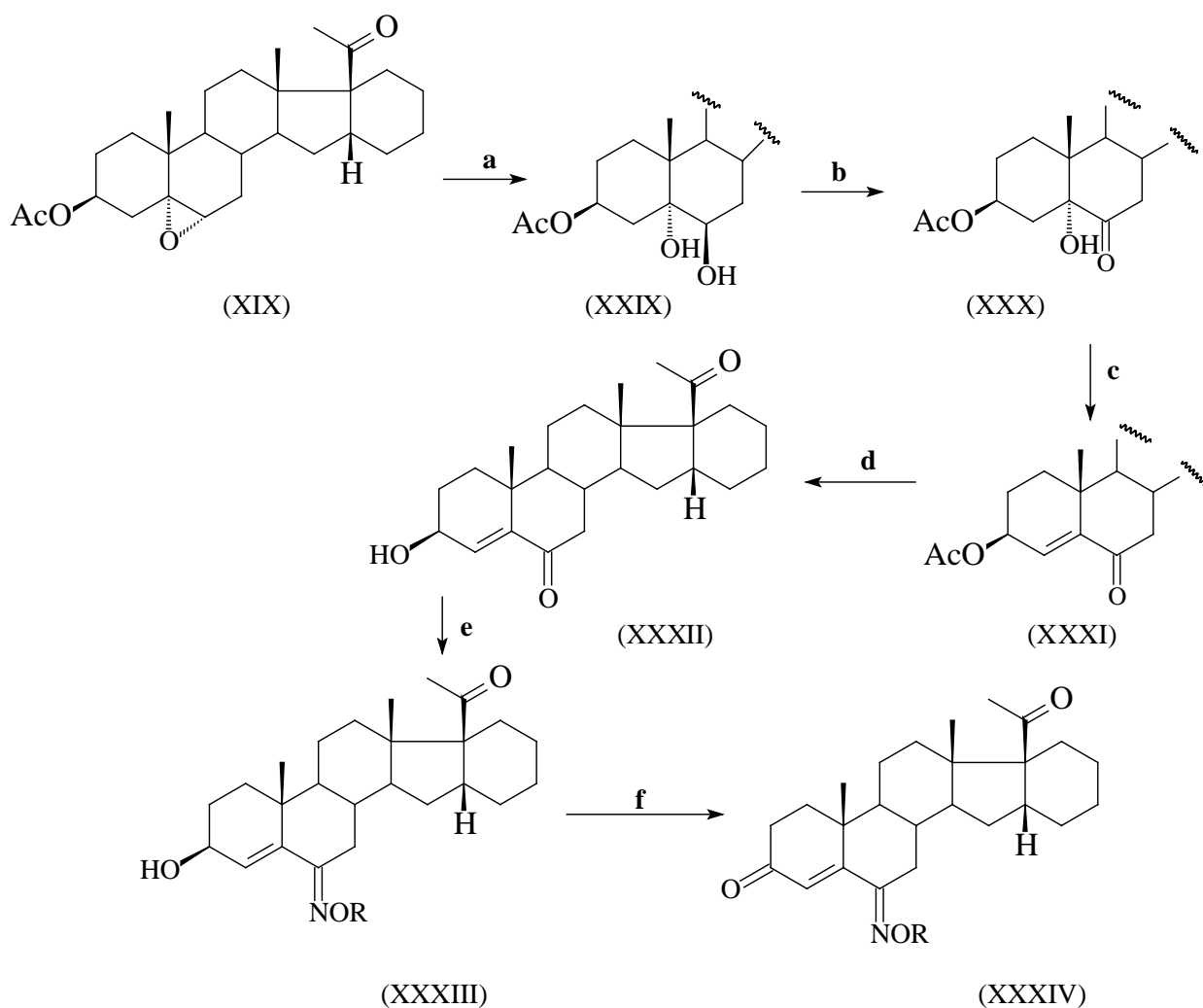


Схема 6.



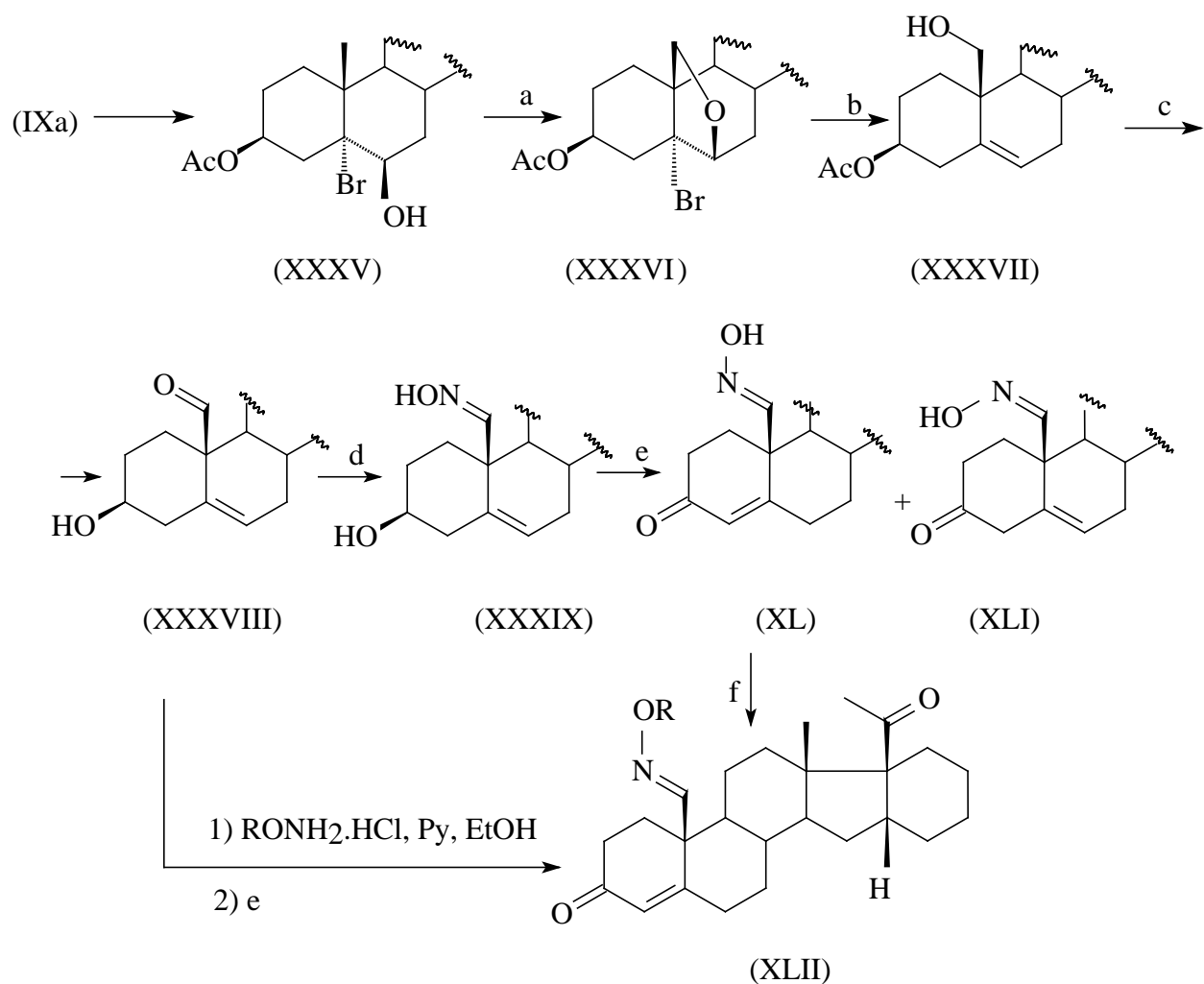
*Реагенты и условия:* а)  $\text{HClO}_4/\text{THF}$ ,  $20^\circ\text{C}$ ; б)  $\text{CrO}_3\text{-H}_2\text{SO}_4\text{-H}_2\text{O}$ /ацетон,  $5\text{-}10^\circ\text{C}$ ; в)  $\text{SOCl}_2/\text{Py}$ ,  $^\circ\text{C}$ ; г)  $\text{KOH}/\text{MeOH}$ ; д)  $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$  или  $\text{NH}_2\text{OMe}\cdot\text{HCl}$ ,  $\text{Py}$ ,  $\text{EtOH}$ , н.у.; е)  $\text{PDC}$ ,  $\text{Py}$ , н.у.

Исходным соединением для получения 19-оксимов служил пентаран (**IXa**), из которого был получен бромгидрин (**XXXV**), превращенный в  $6\beta,19$ -эпокси-производное (**XXXVI**) и далее после раскрытия этого эпоксида и отщепления  $\text{HBr}$  в последнем - в 19-гидроксистероид (**XXXVII**) (схема 7). Последующее окисление 19-гидроксильной группы в нем с помощью  $\text{PCC}$  и омыления 3-ацетоксигруппы в полученном 19-альдегиде привело к ключевому соединению (**XXXVIII**). Его взаимодействие с гидроксиламином дало смесь 19(*E,Z*)-оксимов



(XXXIX). Последующее окисление по Оппенауэру привело к двум индивидуальным оксиимино-3-кетонам (XL) и (XLI). Соединению (XL) приписана структура 19(*E*)-оксиимино- $\Delta^4$ -3-кетона, а оксиму (XLI) - 19(*Z*)-оксиимино- $\Delta^5$ -3-кетона. Попытки получить из оксима (XLI)  $\Delta^4$ -3-кето-19-оксим не привели к желаемому результату [44] (XLII).

Схема 7.



*Реагенты и условия:* a)  $\text{Pb}(\text{OAc})_4$ ,  $\text{I}_2$ , AIBN, циклогексан; b) Zn-AcOH,  $\text{Pr}^i\text{OH}$ , кип.; c)  $\text{PCC-CH}_2\text{Cl}_2$ ; KOH-MeOH; d)  $\text{HONH}_2 \cdot \text{HCl}$ , Py, EtOH; e)  $\text{Al}(\text{O}^i\text{Pr})_3$ , PhMe, циклогексанон

Среди синтезированных серий D'-пентаранов были найдены высокоактивные прогестины – агонисты PR, смешанные агонисты-антагонисты и

антагонисты PR, проявляющие *in vitro* и *in vivo* цитотоксические и противоопухолевые свойства. Наиболее перспективный из них 6 $\alpha$ -метил-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексанопрогестерон (XXIV) рекомендован в качестве лекарственного гормонального препарата.

### 1.3. Селективные модуляторы рецептора прогестерона

Как уже упоминалось, первой и необходимой стадией взаимодействия стероидных лигандов с PR является образование лиганд-рецепторного комплекса, который в зависимости от структуры лиганда изменяет свою конформацию для дальнейшего связывания с прогестерон-чувствительными элементами и получения биологического ответа в организме. PR способен связываться с огромным количеством лигандов, которые селективно активируют или ингибируют рецептор. При этом нереализуемая возможность связывания комплекса с коактиваторными элементами приводит к антагонистическому эффекту.

Агонисты обычно используются в контрацепции, заместительной гормональной терапии. Антагонисты применяются в лекарственной (терапии гинекологических дисфункций) и противоопухолевой терапии. Между агонистами и антагонистами находятся лиганды смешанного профиля, селективно влияющие на отдельные функции натурального гормона, при этом стимулируя одни эффекты и блокируя другие, в зависимости от клеточного, тканевого контекста мишени, гормонального фона [45, 46, 47]. Был предложен новый подход к классификации стероидных лигандов PR, основанный на транскрипционной активности *in vitro*. Указанные синтетические лиганды получили название селективных модуляторов рецепторов рецептора прогестерона (SPRMs) [12, 24, 25, 48]. Они характеризуются уменьшенной транскрипционной активностью по сравнению с полными агонистами, повышенной транскрипционной активностью в сравнении с полными антагонистами и обладают потенциалом для лечения различных состояний женского здоровья [49]. Открытию SPRMs, исследованию механизма действия, эффектов *in vitro* и *in vivo* посвящено значительное количество

опубликованных за последнее время обзоров [46, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56]. В то же время обзорных статей по синтезу различных SPRMs автор не обнаружил.

После открытия первого антипрогестина RU 486 (мифепристон) (рис. 6) в 1981 г. [57, 58, 59, 60] было синтезировано много его аналогов с модифицированными  $11\beta$ - и  $17\alpha$ -заместителями [61, 62, 63], причем основной целью этих работ было получение аналогов с меньшей антиглюкокортикоидной активностью (например, [64, 65]).

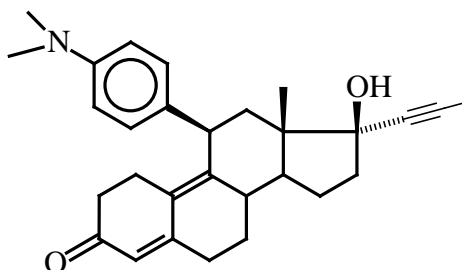


Рисунок 6 – Структурная формула RU 486 – мифепристон.

Изучение взаимосвязи структуры антипрогестинов и активности выявило определяющую роль  $11\beta$ -арильного фрагмента молекулы стероида в антипрогестагенной активности (малые  $11\beta$ -алкильные и винильные заместители такого влияния не оказывают) [61]. В дальнейшем РСА и молекулярное моделирование комплексов LBD PR с мифепристоном и рядом других антипрогестинов позволили объяснить направляющую роль  $11\beta$ -арильного фрагмента в связывании комплекса молекул этих лигандов исключительно с корепрессорными белками и, как следствие, антипрогестинный характер подобных лигандов [66, 11, 67, 68, 69]. Однако еще в 1990-х г.г. американским ученым Куком и сотр. была отмечена важная роль заместителей в кольце D молекулы мифепристона. Авторы пришли к заключению, что  $16\alpha$ -замещение играет ключевую роль в обращении профиля активности и предположили, что связывание лиганда в  $\alpha$ -области кольца D лиганд-связывающего кармана PR оказывает влияние на конформацию комплекса и, по-видимому, при этом  $11\beta$ -арильный фрагмент лиганда в комплексе с рецептором не может взаимодействовать с корепрессорными элементами белка [70]. Так, замена  $17\beta$ -гидрокси-17-пропинильного фрагмента на  $17\beta$ -ацетил-16-этильный **1** или  $17\beta$ -ацетил- $\Delta^{16}$ -фрагмент **2** приводит к обращению активности – оба

стероида с 17-ацетильной цепью (рис. 7) являются агонистами PR *in vivo*, хотя 17 $\alpha$ -ацетоксипроизводное **3** такой прогестагенной активностью не обладает, будучи SPRM [70, 71, 72] (рис.7).

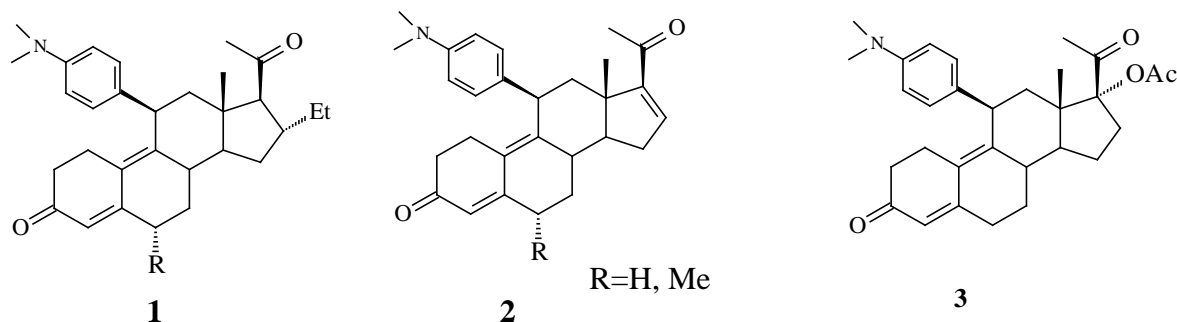
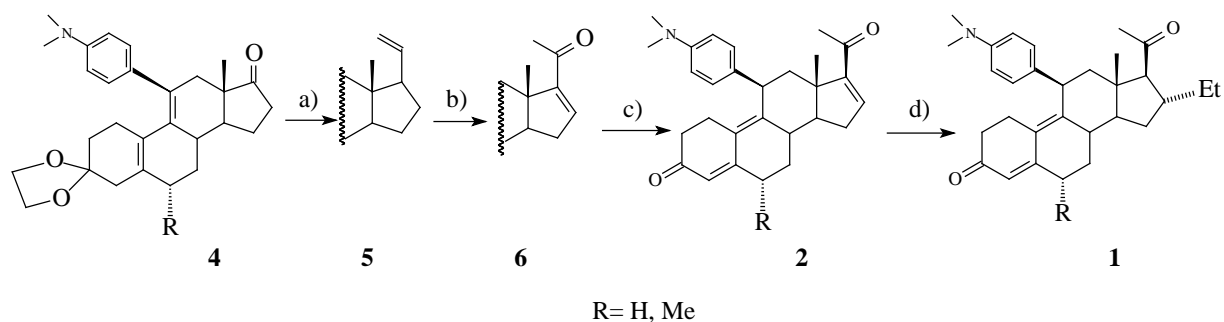


Рисунок 7 – Структурные формулы SPRMs

Ключевыми соединениями для синтеза стероидов с 17 $\beta$ -ацетильной боковой цепью **1** и **2** служили соответствующие 17-кетопроизводные **4**, которые после превращения в этилиденные производные **5**, последующего фотохимического окисления в  $\Delta^{16}$ -20-кетоны **6** и декетализации приводили к конечному продукту **2**. Сопряженное присоединение к последнему этилмагнийбромида давало 16 $\alpha$ -этилстероид **1** (Схема 8) [70].

Схема 8.

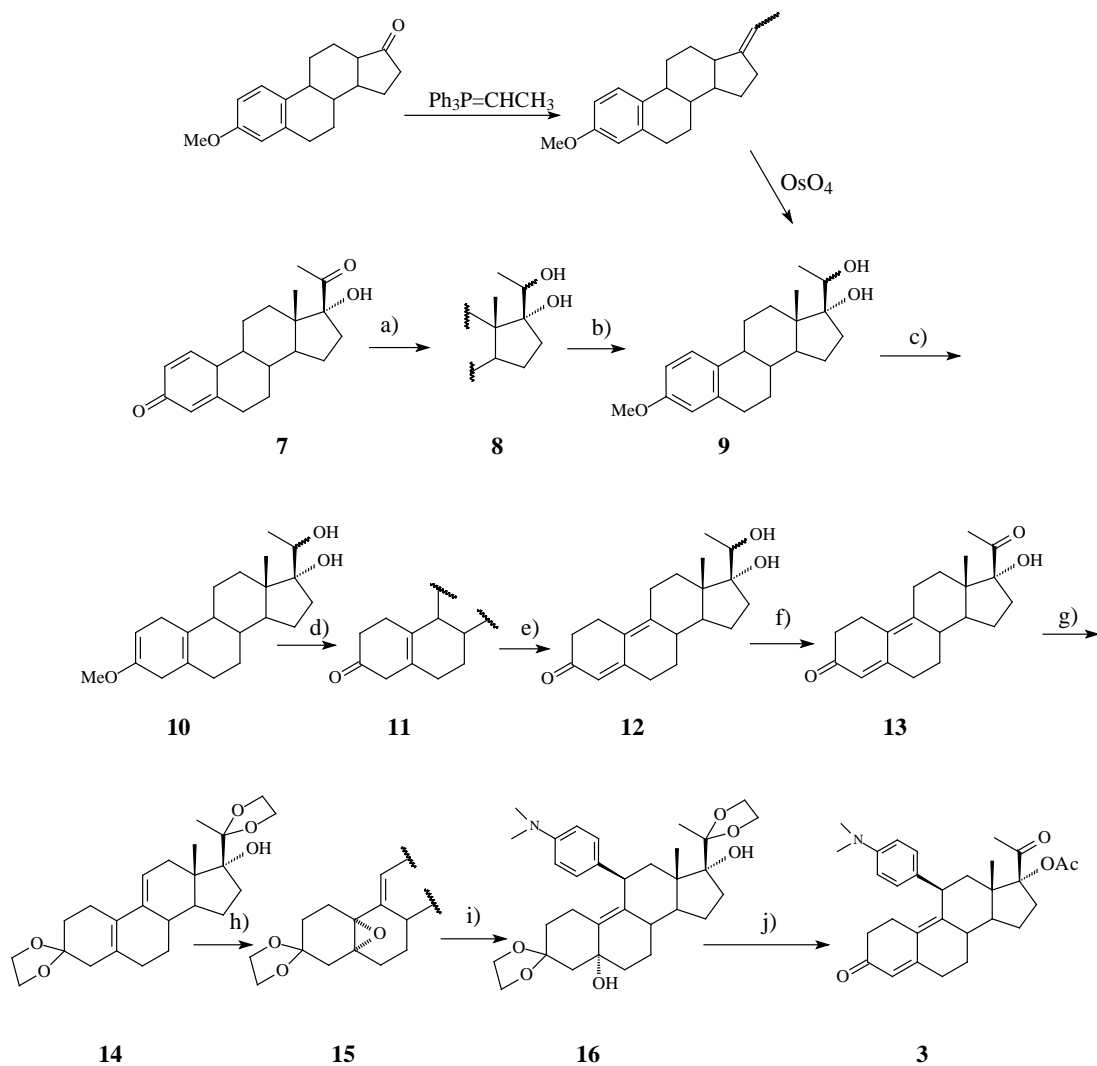


Реагенты и условия: a)  $\text{Ph}_3\text{P}=\text{CH}-\text{CH}_3$ ; b)  $\text{O}_2/\text{UV}/\text{Ac}_2\text{O}$ ; c)  $\text{HCl}-\text{EtOH}$ ; d)  $\text{EtMgBr}/\text{CuBr}/\text{Me}_2\text{S}$

Синтезы находящегося в клинической разработке [72] 17 $\alpha$ -ацетоксианалога 19-норпрогестерона **3** – SPRM с уменьшенной антиглюкокортикоидной

активностью (ацетата улипристала) - описаны в патентах [73, 74, 75]. Исходный стероид уже содержал необходимый 17-фрагмент (или его создают из метилового эфира эстрона) (верхняя строчка Схемы 9), и задача состояла в построении А/В-части молекулы SPRM аналогично последовательности стадий в синтезе мифепристона (Схема 9). Эти синтезы являются многостадийными, в них используются дорогостоящие и токсичные материалы, а выходы целевого улипристала **3** составляют всего от 1% до 14%. В 2013 и 2014 г.г. китайскими химиками опубликован новый эффективный способ получения стероида **3** в шесть стадий с выходом 27% (Схема 10) [76, 77]. Авторы использовали в качестве исходного стероида 17-кето-5(10),9(11)-диен **17**, эпоксидирование которого с количественным выходом дало смесь 5,10-эпоксидов **18a** и **18b** с высоким содержанием нужной окиси **18a** ( $5\alpha,10\alpha/5\beta,10\beta = 80 : 20$ ), что несомненно является одним из достоинств данной схемы. Далее получен 17-циангидрин **19** и его триметилсилильное производное **20**. Все последующие стадии - реакция Гриньяра с диметиламинофенилмагнийбромидом для создания соответствующего 11 $\beta$ -фрагмента **21**, затем создание 17 $\beta$ -ацетил-17 $\alpha$ -гидроксигруппировки путем еще одной реакции Гриньяра (взаимодействие метилмагнийбромида с 17-циангруппой стероида **21**) – проведены, как свидетельствуют экспериментальные данные, с исключительно высокими выходами 70-95% [77]. В 2015 г. опубликованы синтезы трех стереоизомеров ацетата улипристала **3** (рис. 8) [78].

Схема 9 [70, 73, 74].



*Реагенты и условия:* a)  $\text{NaBH}_4\text{-MeOH}$ ; b) lithium biphenyl/THF; c)  $\text{Li/NH}_3\text{-THF-}^t\text{BuOH}$ ; d)  $(\text{COOH})_2/\text{MeOH}$ ; e)  $\text{C}_5\text{H}_6\text{Br}_3\text{N/Py}$ ; f)  $(\text{COCl})_2/\text{DMSO}$ ; g)  $p\text{-TsOH} / \text{OHCH}_2\text{-CH}_2\text{OH}$ ; h) mCPBA or 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $(\text{F}_3\text{C})_2\text{CO}$ ; i)  $\text{EtMgBr/CuBr/Me}_2\text{S}$ ; j)  $\text{Ac}_2\text{O-H}_3\text{PO}_4$

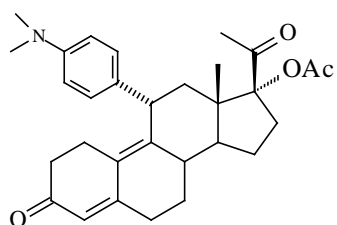
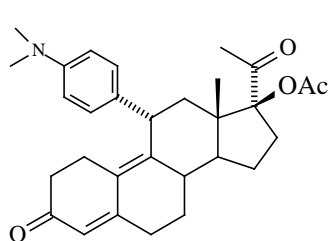
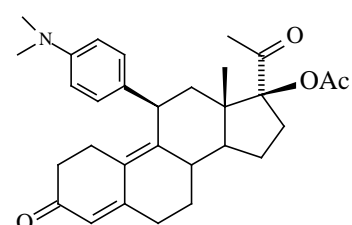
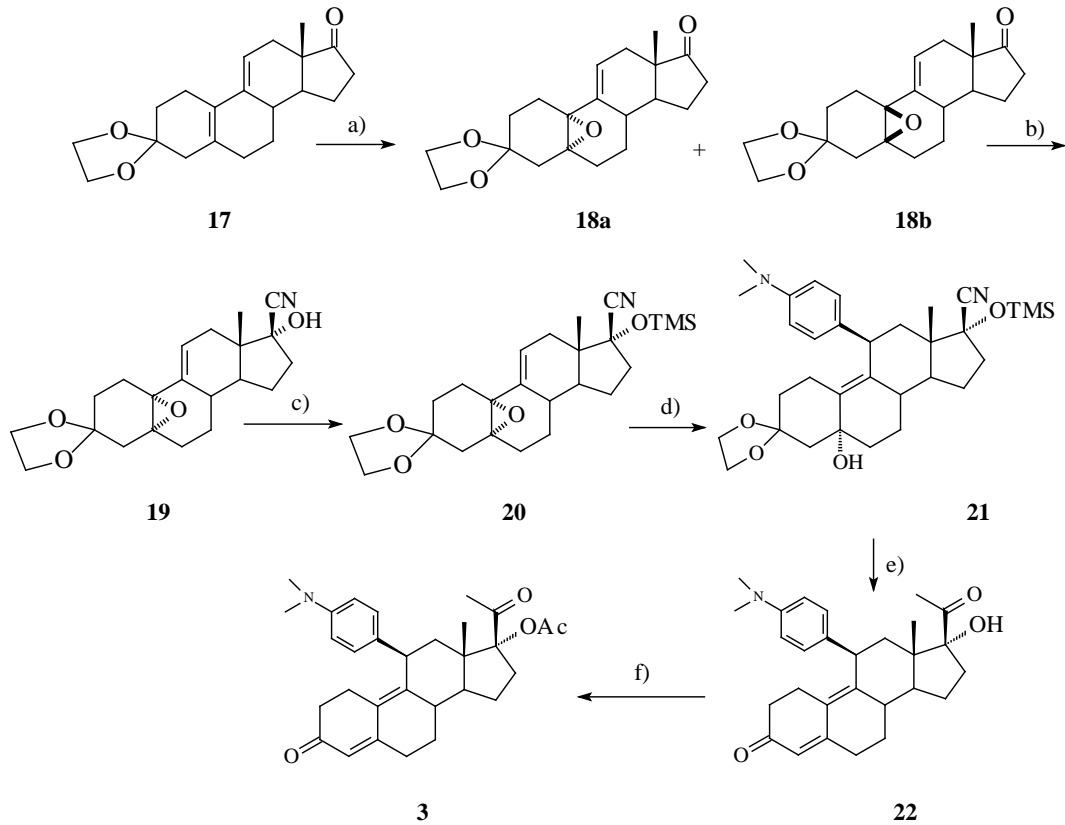
11 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -11 $\alpha$ ,17 $\beta$ -11 $\beta$ ,17 $\beta$ -

Рисунок 8 – Стереизомеры ацетата улипристала 3

Ацетат улипристала, будучи эффективным SPRM, проявляет хорошие характеристики в лечении миом матки и других прогестерон-чувствительных заболеваний [79], а также в терапии рака яичников [80].

Одним из самых известных 11 $\beta$ -замещенных смешанных агонистов/антагонистов прогестерона является *E*-бензальдоксимный аналог – **азоприснил 30**. Способ его получения представлен на Схеме 11 [81]. Реакция 3,3-диметоксиэстра-5(10),9(11)-диен-17-она **23** с хлоральгидратом и Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> с выходом 55% привела к оксирану **24**, Катализируемое солями меди присоединение к нему реактива Гриньяра из диметилацетата 4-бромбензальдегида дало 11-замещенное производное **25**. Реакция Кори—Чайковского последнего с сульфониевым илидом привела к спироэпоксиду **26**, при раскрытии которого получен 17 $\alpha$ -метоксиметилстероид **27** и далее после метилирования 17-гидроксильной группы - 17 $\beta$ -эфир **28**. Кислотная обработка последнего привела к 11 $\beta$ -бензальдегид-4,(10)диеновому стероиду **29**. Его оксимирование с получением смеси *E*-и *Z*-изомеров **30** и **29** в соотношении 95 : 5 завершает синтез азоприснила **30**. *E*-Изомер обладал более высокой связывающей активностью по сравнению с *Z*-изомером [69]. В работах [69, 81] изложены результаты РСА комплекса PR LBD с азоприснилом, которые впервые свидетельствовали о том, что этот лиганд способен индуцировать конформацию комплекса, благоприятную для связывания как с корепрессорами, так и с коактиваторами. Способность азоприснила в определенных условиях проявлять антагонистические и частичные агонистические свойства была подробно изучена в самых различных биологических системах *in vitro* и *in vivo*. Он оказался эффективным тканеселективным агентом в терапии различных гинекологических расстройств (например, контроль болевого синдрома при эндометриозах, в снижении количества операционных вмешательств при миомах) [81, 82, 83, 84].

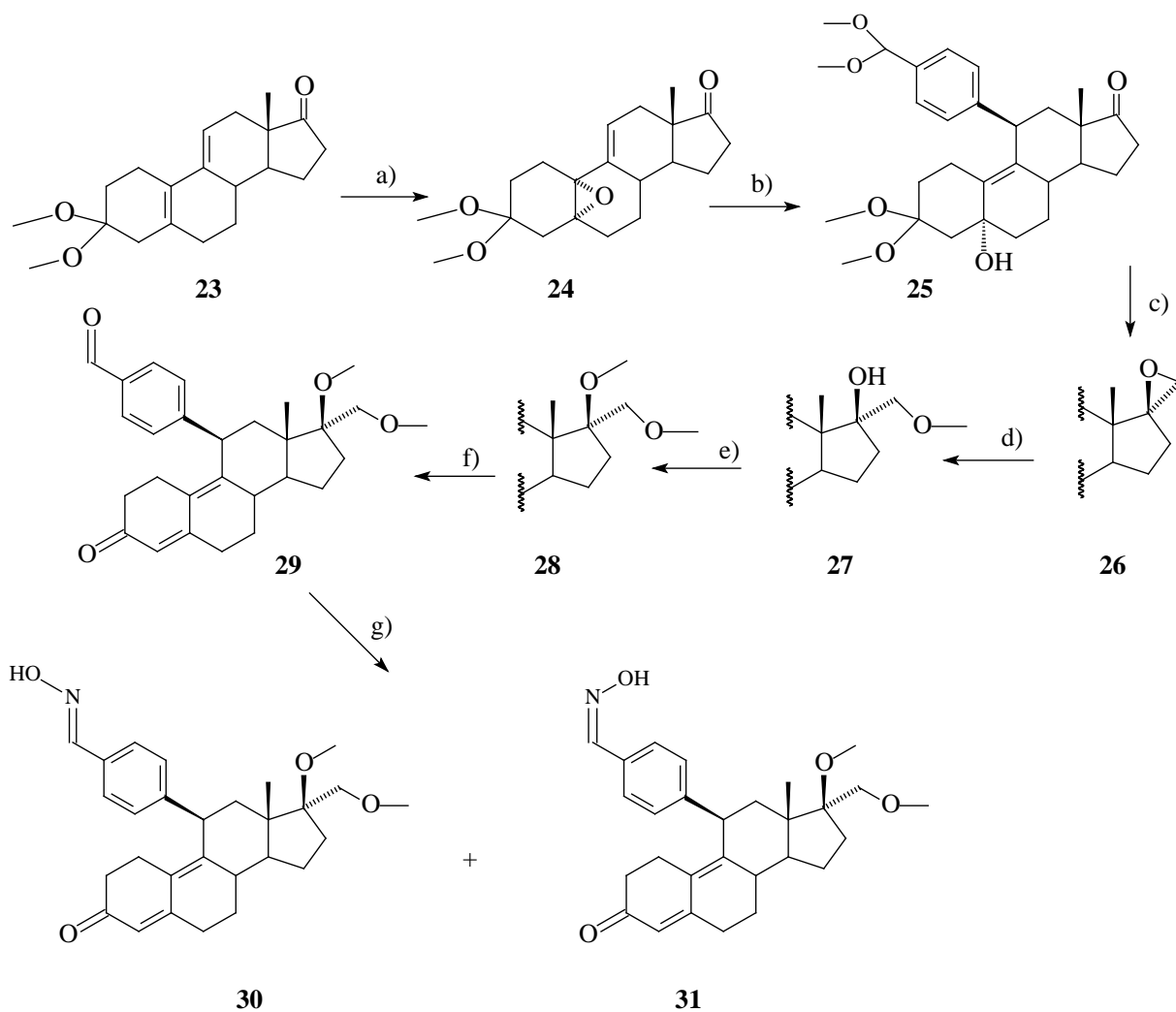
Схема 10.



*Реагенты и условия:* а) 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $(\text{F}_3\text{C})_2\text{CO}$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 100%; б) acetone cyanhydrin, DBU, н.у., 55%; в)  $\text{TMSCl}$ , imidazole, 100%; г)  $\text{Me}_2\text{NPhMgBr}$ ,  $\text{CuCl}$ , THF, 76%; д)  $\text{MeMgBr}$ , PhMe, 68%; е)  $\text{Ac}_2\text{O}/\text{HClO}_4$ , 95%.

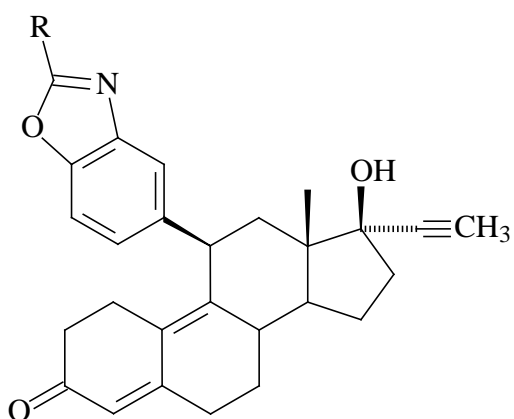


Схема 11.

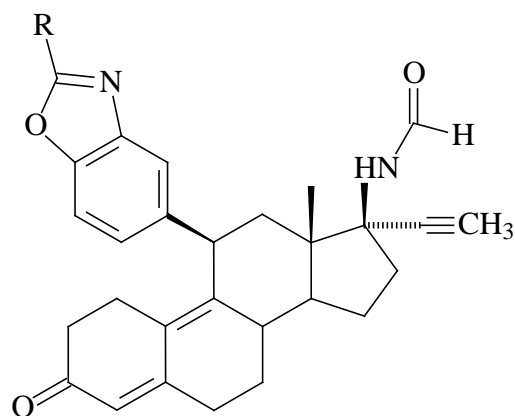


*Реагенты и условия:* a) chloral hydrate,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ ; b) 4-brombenzaldehyde dimethylacetal, Mg; c)  $\text{Me}_3\text{S}^+\text{OEt}^-$ ,  $^t\text{BuOK}$ , DMF; d)  $\text{MeONa}/\text{MeOH}$ ; e)  $\text{MeI}$ ,  $^t\text{BuOK}$ ; f)  $p\text{-TsOH}/\text{Me}_2\text{CO}$ ; g)  $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}/\text{Py}$ ; н.у. [81]

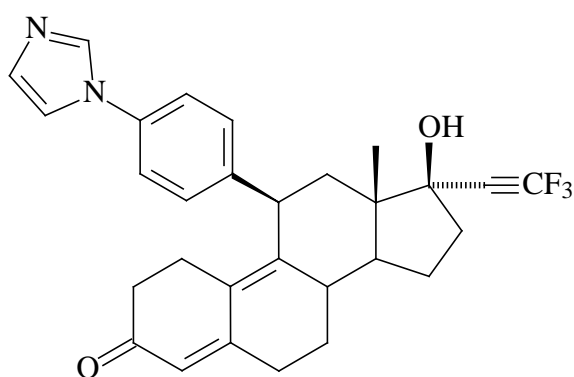
Были опубликованы многостадийные синтезы аналогов мифепристона – антагонистов PR с  $11\beta$ -бензаксазольным заместителем типа **32** и **33** и  $11\beta$ -имидазолилфенилстероиды **34** и **35**. Они представляют собой отдельную группу селективных модуляторов PR с различным соотношением PR-агонистических и антагонистических свойств (рис. 9) [85, 86].



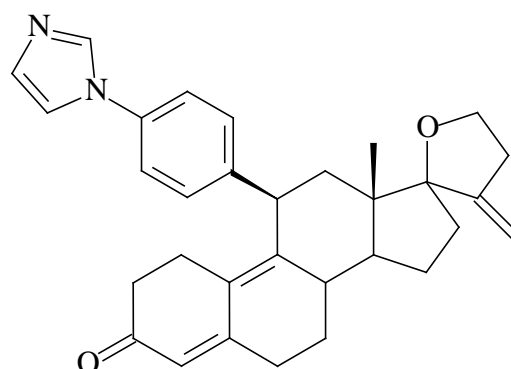
32



33



34



35

Рисунок 9 – Селективные модуляторы рецептора прогестерона.

Несколько синтезированных SPRMs проходят в настоящее время доклиническую и клиническую проверку (или уже используются) как препараты для лечения гинекологических расстройств и предраковых и раковых опухолей эндокринной системы женщин (рис. 10) [48, 50, 56, 79, 80, 87, 88, 89].

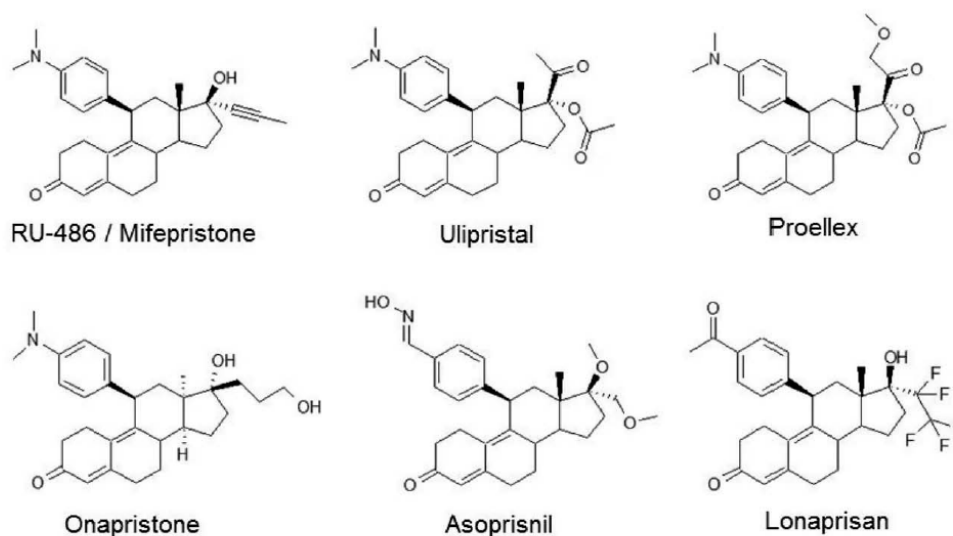


Рисунок 10 – Структуры SPRMs, применяемые в медицинской практике и находящиеся в стадиях клинических испытаний [56].

#### 1.4. Анализ методов повышения биологической доступности лекарственных веществ

Биологическая доступность лекарственных средств (ЛС) определяется количеством содержащегося во вводимом препарате лекарственного вещества (ЛВ), которое попадает в системный кровоток в неизменном виде. Ее величину измеряют отношением количества ЛВ в крови к введенной дозе и выражают в процентах. Теоретические основы определения и прогнозирования биодоступности на практике проводят согласно биофармацевтической классификационной системе (БКС). По двум показателям - растворимость и всасывание активного фармакологического ингредиента (АФИ) - все имеющиеся вещества могут быть разделены на четыре класса (рис. 11). Количественно это можно представить следующим образом: если коэффициент проникновения ( $P_{eff}$ ) АФИ более  $2 \cdot 10^{-4}$  см/с, то всасывание считается высоким, и биодоступность составит величину более 85% (определяемой на основании баланса масс или по сравнению с внутривенно вводимой дозой).

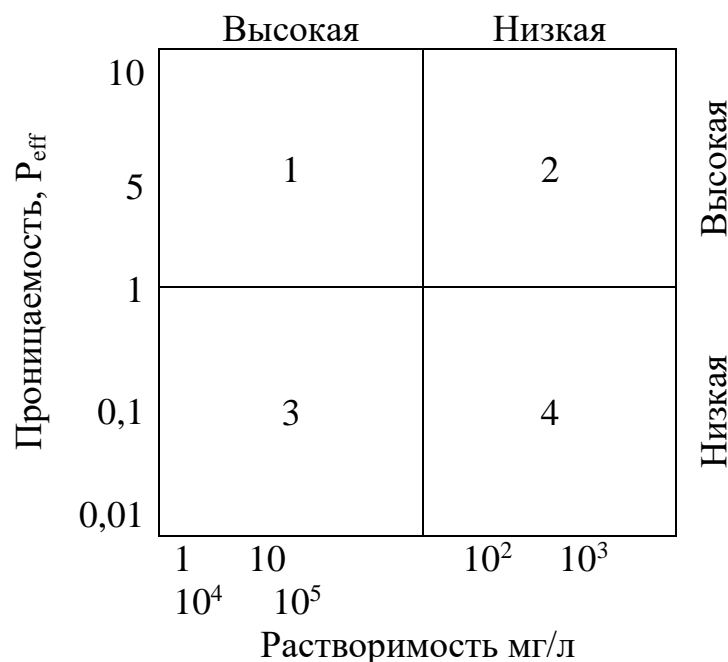


Рисунок 11 – Биофармацевтическая классификационная система.

I-й класс: водорастворимые АФИ с относительно высоким значением общей растворимости ( $C_s$ ), что приводит к увеличению концентрации ЛС в водной внешней среде, непосредственно прилегающей к поверхности мембраны ( $C_{Aq}$ ), и хорошо всасываемые из желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). Степень и скорость растворения должны быть относительно высокими, т.е. около 85% дозы АФИ растворяется за 15 мин [90]. АФИ, относящиеся к 1 классу, обладают липофильными свойствами и имеют молекулярную массу менее, чем 500 и растворимость не менее 1 мг/мл.

II-й класс: относительно липофильные и водорастворимые АФИ (т.е.  $C_s$  не более 0,1 мг/мл) с высокой всасываемостью из ЖКТ [91].

К III-му классу относятся водорастворимые АФИ, имеющие высокое значение  $C_s$ . Они не способны быстро проникать через биомембраны. Фактором, ограничивающим скорость всасывания этих препаратов, является проницаемость биомембран.

IV-й класс состоит из водонерастворимых ЛС, которые в процессе растворения слабо проникают через биомембраны. Они имеют ограничения при пероральном применении.

Примерно 40% новых химических соединений, показавших при скрининге фармакологическую активность, относятся ко II и IV классам [92]. Затруднение перехода ЛВ в раствор обуславливает отсутствие корреляции дозы и фармакологического эффекта, низкую биодоступность и, как следствие, снижение или изменение фармакологического эффекта.

Увеличение доли ЛВ, переходящего в раствор, вызывает существенное повышение биодоступности ЛВ II класса. Если ЛВ, относящиеся ко II классу, сохранить в растворенном состоянии в кишечнике, то можно будет достичь профиля абсорбции, близкого к профилю соединений I класса БКС.

Данное правило не распространяется на III и IV классы, так как для этих ЛВ затруднена проницаемость через биологические мембраны, следовательно, увеличение растворимости приведет к несущественному повышению биодоступности. Повысить биодоступность данных веществ можно, увеличив проницаемость через биологические мембраны. Для получения лекарственных форм с высокой биологической и фармацевтической доступностью применяется ряд подходов (таблица 1), среди которых выделяют физические, химические и физико-химические, а также некоторые технологические приемы. Во всех перечисленных методах основополагающим элементом являются вспомогательные вещества (ВВ), играющие ключевую роль в улучшении биологической и фармацевтической доступности лекарственных веществ [93].

Таблица 1 – Методы повышения биологической доступности лекарственных веществ [94,95, 96, 97, 98, 99, 100]

Методы повышения биологической доступности лекарственных веществ	Вспомогательные вещества
Химический метод	
Химическая модификация структуры ЛВ (получение эфиров ЛВ, ионизация ЛВ)	Олигопептиды; насыщенные органические кислоты
Физические методы	
Получение твердых дисперсных систем (методом отгонки растворителя, экстракции и микронизации)	Полимерная матрица: поливинилпирролидон и его производные, полиэтиленгликоль (ПЭГ), производные акриловой кислоты, эфиры целлюлозы
Физико-химические методы	

Методы повышения биологической доступности лекарственных веществ	Вспомогательные вещества
Изменение рН (ионизация структуры)	Вещества кислого или основного характера, буферные растворы, разрешенные к применению в фармации
Использование (со)растворителей, смешивающихся с водой	ПЭГ, этанол, пропиленгликоль, глицерин, 3-метил-2-пирролидон, диметилацетамид, диметилсульфоксид, диметилформамид
Солубилизация - введение в рецептуру поверхностно-активных веществ (ПАВ)	Stemphor, d- $\alpha$ -токоферолполиэтиленгликоль 1000 сукцинат, полисорбаты, полиэтиленгликоля гидроксистеарат, поллоксамеры, полиоксиэтиленированные глицериды (Gellucire® 44/14, Softigen® 767, Gattefosse, Франция) и эфиры PEG 300, 400 или 1750 и одной или двух остатков жирных кислот
Введение в рецептуру веществ липидной природы	гидрогенизированные растительные масла, олеиновая кислота, среднецепочечные моно- и диглицериды; гидрогенизированный соевый фосфатидилглицерин, дистеароилфосфатидилглицерин, L- $\alpha$ -димиростоилфосфатидилхолин, L- $\alpha$ -димиростоилфосфатидилглицерин
Комплексообразование	Циклодекстрины ( $\alpha$ -циклодекстрин, $\beta$ -циклодекстрин, гидроксипропил- $\beta$ -циклодекстрин, сульфобутиловый эфир $\beta$ -циклодекстрина)
<b>Технологические приемы</b>	
Эмульгирование (получение нано-, микроэмульсий и самоэмульгирующихся систем)	ПАВ (ионогенной и неионогенной природы), вещества липидной структуры, (со)растворители
Получение дисперсных систем	Мукоадгезивные ВВ: производные акриловой кислоты, эфиры целлюлозы; набухающие гидроколлоиды, полисахариды и матрицеобразующие полимеры (поликарбонат, полиакрилат и полистерин)
Получение лекарственных форм с модифицированным высвобождением	Матрицеобразующие полимеры: производные целлюлозы и акриловой кислоты; пленочные покрытия (полимеры пленкообразователи)
Получение липосом	Фосфолипиды различного строения
Получение нано- и микрочастиц	Биоразлагаемые полимерные материалы: полимеры и сополимеры молочной кислоты, полицианоакрилаты
Использование супердезинтегрантов и веществ, способствующих повышению распадаемости ЛФ	кросс-повидон; модифицированные крахмалы; полисахариды сои; полимеры метакриловой кислоты; микрокристаллическая целлюлоза; лактоза; ПАВ
Сорбция самоэмульгирующихся систем на твердом носителе	Твердые носители: алюмометосиликат магния, силикагель

Поступление ЛВ в системный кровоток происходит путем освобождения его из лекарственной формы и последующего всасывания через биологические мембраны. Освобождение ЛВ определяется скоростью дезинтеграции лекарственной формы и временем растворения вещества в биологических жидкостях [101]. Как правило, между скоростью растворения в биологических жидкостях и

его биодоступностью имеется линейная зависимость. Всасывание ЛВ через биологические мембраны зависит от многих факторов: размера частиц лекарственной формы (нано- и микрочастицы), типа лекарственной формы (введение ЛВ в эмульсию) и т.д. [94].

Далее рассматриваются современные подходы для получения готовой лекарственной формы (ГЛФ) с повышенной биодоступностью: микронизация, получение систем, способных к самоэмульгированию, и микрокапсулирование. Все эти приемы позволяют улучшить растворимость ЛВ и их проницаемость через естественные барьеры.

#### 1.4.1. Микрокапсулирование лекарственных веществ

Микрокапсулирование – процесс заключения микроскопических твердых, жидких или газообразных веществ в оболочку, изолирующую их от внешней среды. Микрокапсулы чаще всего имеют размеры от 1 до 500 мкм. Более крупные, покрытые оболочкой частицы размером до 6,5 мм называются капсулами. Технология образования оболочек в последнее время позволяет наносить покрытия на частицы размером 50—200 нм. Такие частицы с оболочкой называют нанокapsулами, а процесс их образования – нанокapsулированием. Форма микрокапсул определяется агрегатным состоянием их содержимого и методом получения: жидкие и газообразные вещества придают микрокапсулам шарообразную форму, твердые – овальную или неправильную геометрическую форму [102].

В состав содержимого микрокапсул может входить инертный наполнитель - среда, в которой диспергировалось вещество в процессе микрокапсулирования. Содержание инкапсулируемого вещества в микрокапсулах обычно составляет 50-90%, но может достигать до 95-98% от массы капсул. Эта величина может колебаться в зависимости от условий получения, соотношения количеств материала оболочек и инкапсулируемого вещества, температуры, степени диспергирования, вязкости среды, наличия ПАВ и т.д.

В качестве материала оболочек могут использоваться любые вещества, обладающие пленкообразующими свойствами. Большинство из них являются инертными в обычных условиях и пригодны для пищевых продуктов и медицинских препаратов. Типичными материалами оболочек служат: 1) органические полимеры: белки (желатин, альбумин); полисахариды (декстраны и камеди, например, гуммиарабик); воска; парафин; производные целлюлозы (метил-, этил-, ацетил-, ацетилфталил-, нитро-, карбоксиэтилзамещенные); полиолефины (поливиниловый спирт, поливинилацетат, поливинилхлорид, полиэтилен и др.); полиакриламид; полисилоксаны; полималеинаты; эпоксидные смолы; полисульфиды; поликарбонаты; полиуретаны; полиэфиры; полиамиды; 2) неорганические материалы: металлы; углерод; силикаты; карбиды и др. Выбор материала оболочек зависит от назначения и свойств каждого вещества, способа высвобождения инкапсулируемого вещества и выбранного метода микрокапсулирования.

Высвобождение содержимого микрокапсул, предназначенных для терапевтического использования, происходит при взаимодействии вещества оболочки со средой при растворении в результате диффузии содержимого при набухании стенок капсул в окружающей жидкости. Для получения пролонгированного терапевтического эффекта особенно важно замедленное высвобождение продуктов в жидких средах при инкапсулировании лекарственных веществ в материалы, способные набухать или медленно растворяться в используемой среде.

При набухании оболочек скорость диффузии капсулированного вещества во внешнюю среду обратно пропорциональна толщине стенок капсул. Кроме того, скорость высвобождения зависит от размера капсул, возрастая при их уменьшении вследствие увеличения поверхности контакта микрокапсул с окружающей средой и в результате уменьшения толщины оболочек.

При постоянстве размеров микрокапсул и изменении соотношения входящих в их состав компонентов скорость высвобождения путем диффузии определяется толщиной оболочки. Последнюю, а, следовательно, и скорость высвобождения содержимого путем диффузии, можно регулировать либо изменением



размера микрокапсул, либо изменением соотношения капсулируемого и капсулирующего компонентов.

Проницаемость оболочек микрокапсул зависит от свойств самих микрокапсул и условий их использования. Так, проницаемость оболочек уменьшается при увеличении плотности, степени сшивания полимерного материала, увеличении количества наполнителя и использовании в процессе получения микрокапсул растворителей с хорошей растворяющей способностью по отношению к пленкообразующему материалу.

Микрокапсулирование позволяет получить препараты с регулируемой скоростью выделения ЛС. В качестве материалов для оболочек, хорошо прилипающих к капсулируемому веществу и обеспечивающих герметичность, эластичность, определенную проницаемость, прочность и стабильность при хранении, используют натуральные и синтетические полимеры [102]. Большое распространение в качестве инертных полимеров для нанесения оболочек получили производные целлюлозы. Используя различные методы, описанные ниже, возможно получение новых лекарственных средств (ЛС), способных к контролируемому высвобождению субстанции, в результате чего концентрация лекарства в кровяном русле поддерживается на нужном уровне в течение необходимого времени.

К наиболее распространенным методам микрокапсулирования относятся:

- разделение фаз путем изменения температуры системы;
- испарение легколетучего растворителя в эмульсионной среде;
- испарение легколетучего растворителя;
- напыление;
- введение осадителя;
- распылительная сушка.

Метод разделения фаз путем изменения температуры обычно реализуется посредством охлаждения технологической системы в целях индукции коацервации полимера на поверхности субстрата. Для формирования стенок микрокапсул применяется этилцеллюлоза.

Метод испарения легколетучего растворителя эффективен при инкапсулировании водорастворимых ЛВ. Этилцеллюлозу растворяют в органическом растворителе или смеси соразтворителей. Субстрат добавляют к данному раствору и растворитель выпаривают. По мере испарения его растворяющая способность по отношению к этилцеллюлозе снижается. Концентрация растворенной этилцеллюлозы возрастает до критического значения, при котором насыщенная этилцеллюлозой фаза отделяется и образует коацерват на поверхности субстрата. Дальнейшее испарение растворителя способствует завершению коацервации [103].

Реализация метода испарения легколетучего растворителя в эмульсионной среде обычно начинается с получения простой эмульсии. Дисперсная фаза обычно содержит ЛВ и этилцеллюлозу, а дисперсионная среда включает в свой состав эмульгатор, способствующий диспергированию капель дисперсной фазы. Как только заданная эмульсия образовалась, происходит испарение растворителя из дисперсной фазы с выделением насыщенной этилцеллюлозой фазы, что индуцирует формирование микрокапсул. При этом могут использоваться как эмульсии типа «масло в воде», так и неводные эмульсии [104].

Формирование микрокапсул методом напыления обычно осуществляется путем нанесения покрытий на порошки, крупинки, гранулы или пеллеты в псевдооживленном слое. Создание этого слоя способствует равномерному нанесению покрытия на каждую частицу. Эффективность инкапсулирования составляет 100%. Однако полученные данным путем множественные частицы в оболочках фактически не являются микрокапсулами, поскольку их размеры обычно находятся в миллиметровом диапазоне [105].

Метод введения осадителя характеризуется добавлением осадителя к раствору полимера, что приводит к разделению фаз. Осадитель снижает растворяющую способность растворителя за счет сокращения количества межмолекулярных взаимодействий растворителя и растворенного полимерного материала для построения стенок микрокапсул. Уменьшение растворяющей способности растворителя вызывает выделение полимера в отдельную фазу и последующую его

коацеварцию на поверхности субстрата. Этот метод применяется для получения этилцеллюлозных микрокапсул, содержащих различные кристаллические вещества: аскорбиновую, ацетилсалициловую и лимонную кислоты, порошки свинца, железа, цинка, диоксида титана, гидрида кальция, хлорида натрия и т. п. [106]. Суммарное содержание всех инкапсулированных веществ при этом составляет 90-95 % от массы полученного продукта [107, 108].

Распылительная сушка обычно приводит к получению микросфер, а не микрокапсул, так как к микрокапсулам относят ядра ЛВ, заключенные в тонкое полимерное барьерное покрытие, а к микросферам – сферические матрицы, состоящие из ЛВ и полимера, перемешанных на всем протяжении частицы. Недостатками метода является низкая плотность микросфер и их монолитное строение, а также необходимость дополнительной стадии последующей обработки вакуумной сушкой для максимального снижения количества остаточного растворителя. Однако противовесом указанным недостаткам служат простота и широкая распространенность метода распылительной сушки. Этот метод применяется по отношению как к растворам, так и к дисперсиям, однако при работе с дисперсиями должны быть предприняты все меры по предотвращению их осаждения [109].

Из всего многообразия методов микрокапсулирования чаще всего используется метод введения осадителя (простая коацервация), поскольку он позволяет получить продукт с желаемыми свойствами при относительно мягких условиях и весьма простом аппаратном оформлении процесса.

#### 1.4.2. Создание самоэмульгирующихся систем

Использование самоэмульгирующихся систем лекарственной доставки (self-emulsified drug delivery systems, SEDDS) или самоэмульгирующихся композиций на основе масляной фазы (self-emulsifying oil formulations, SEOF) по праву считается достоверно эффективным подходом для увеличения биодоступности препарата при пероральном приеме плохо растворимых в воде и липофильных ЛВ.

SEDDS представляют собой изотропные смеси природных или синтетических масел, твердых или жидких ПАВ, а как альтернативный вариант – одного или нескольких гидрофильных растворителей и соразтворителей/ПАВ [110, 111, 112, 113, 114, 115].

Такие системы способны быстро формировать в желудочно-кишечных средах тонкие эмульсии типа «масло в воде», т. е. самоэмульгироваться. Маленькие капли масла, диспергированные в желудочно-кишечных средах, обеспечивают возрастание площади границы раздела фаз и увеличение активности панкреатической липазы, что способствует ускорению высвобождения ЛВ и/или формированию смешанных мицелл желчных солей, содержащих ЛВ. Более того, ПАВ, включенное в состав SEDDS, в большинстве случаев увеличивает биодоступность ЛВ в растворе и одновременно предотвращает переход растворенного вещества в кристаллическое состояние и повышает проницаемость кишечного эпителия. Кроме того, образование масляных капелек ведет к более быстрому и равномерному распределению ЛВ в желудочно-кишечном тракте. При этом раздражение, возникающее при контакте лекарственного вещества со стенкой кишечника, сводится к минимуму [110, 111, 112, 113]. Липиды воздействуют на пероральную биодоступность посредством нескольких механизмов (защита ЛВ от ферментативного и химического разложения в масляных капельках и активация липопротеинов, способствующих транспорту липофильных лекарственных веществ через лимфатическую систему) [116].

SEDDS, как правило, образуют эмульсии с размером капель от 100 до 300 нм, тогда как системы лекарственной доставки с самопроизвольным формированием микроэмульсии (self-micro-emulsifying drug delivery systems, SMEDDS) образуют прозрачные микроэмульсии с размером капелек менее 50 нм. По сравнению с обычными эмульсиями, которые являются неустойчивыми и чувствительными к внешним условиям дисперсными системами, SEDDS стабильны и просты в производстве композиции. Таким образом, данные системы позволяют увеличить скорость и объем абсорбции липофильных ЛВ, всасывание которых ограничено скоростью растворения.

SEDDS представляют собой изотропные смеси липидов и липофильных ПАВ, которые самоэмульгируются в водной среде с образованием тонких эмульсий типа «масло в воде» [117]. Самоэмульгирование, как правило, достигается при относительном содержании ПАВ свыше 25% (в массовом отношении). Однако при его содержании 50 – 60% процесс эмульгирования может быть нарушен за счет образования вязкого жидкокристаллического геля на границе раздела водной и масляной фаз [118]. Плохорастворимые в воде лекарственные вещества могут быть растворены в SEDDS и заключены в твердые или мягкие желатиновые капсулы, что позволяет получить удобную для применения дозированную лекарственную форму однородной структуры. Липидные составы обладают преимуществом, позволяющим ускорить длительную стадию растворения, типичную для твердых дозированных лекарственных форм. Кроме того, такие композиции способны к формированию обширной границы раздела фаз, что в свою очередь обеспечивает возможность эффективного распределения лекарственного вещества между масляными капельками и водной фазой, из которой происходит всасывание [119].

При введении в состав гидрофильных ПАВ возможно создание SMEDDS, характерной особенностью которых является включение в их состав водорастворимых ЛВ. С помощью SEDDS и SMEDDS удалось увеличить пероральную биодоступность некоторых плохо растворимых в воде ЛВ. Одним из наиболее известных примеров успешного выхода на рынок лекарственного препарата на основе технологии SMEDDS является Неорал® (действующее вещество – циклоспорин), в состав которого вошли моно-, ди- и триглицериды кукурузного масла в качестве липидной фазы, кремофор RH40® (полиоксил 40 гидрированное касторовое масло) в качестве ПАВ, пропиленгликоль и этанол в качестве соразрешителей и D,L- $\alpha$ -токоферол в качестве антиоксиданта [120,121].

Примеры исследований по повышению биодоступности плохо растворимых в воде лекарственных веществ путем изготовления таких лекарственных форм, как SEDDS и SMEDDS, приведены в таблице 2.

Таблица 2 - Примеры исследований, описывающих увеличение биодоступности (БД) плохорастворимых в воде ЛВ в составе композиций SEDDS и SMEDDS.

Соединение	Лекарственная форма (композиция)	Показатель	Результат	Ссылки
Win 54954	SEDDS (35% - лекарственное вещество, 40% - Neobee® M5 (среднецепочечные триглицериды) и 25% - Tagat® TO) или раствор с ПЭГ 600	Относительная БД у собак	БД не изменилась, но повысилась ее воспроизводимость, увеличилась C <sub>max</sub>	[119]
	Сандиммун® (SEDDS: кукурузное масло и этанол) или неорал® (SMEDDS: глицериды кукурузного масла, кремофор® RH 40, пропиленгликоль, D,L-α-токоферол и этанол)	Относительная БД у человека	Увеличенная БД и C <sub>max</sub> , сниженное t <sub>max</sub>	[112]
Циклоспорин	Сандиммун® (SEDDS) или Неорал® (SMEDDS)	Относительная БД у человека	Увеличенная C <sub>max</sub> , AUC, приближение зависимости «доза-системная концентрация ЛВ» к линейной, снижение влияния приема пищи	[122]
	Сандиммун® (SEDDS) или Неорал® (SMEDDS)	Относительная БД у человека	Снижение вариабельности профилей концентрации в плазме крови при сопоставлении показателей нескольких пациентов или одного пациента после повторных приемов	[123]
Онтазоласт	Эмульсия соевого масла, раствор лекарственного вещества в ресеол®, суспензия лекарственного вещества или 2 пластичные SEDDS, содержащие Gelucire® 44/14 и ресеол® в соотношении 50 : 50 и 80 : 20	Абсолютная БД у крыс	БД возросла, по крайней мере, в 10 раз	[124]
Витамин Е	SEDDS (твин 80 : спан 80 : пальмовое масло (длинноцепочечные триглицериды) в пропорции 4:2:4) или раствор в соевом масле (длинноцепочечные триглицериды)	Относительная БД у человека	3-х кратное увеличение БД	[125]
Кофермент Q10	SMEDDS (40% - майвасет 9-45, 50% - labrasol®, 10% - лаурогликоль) или композиция в форме порошка	Относительная БД у собак	2-х кратное увеличение БД	[126]

Соединение	Лекарственная форма (композиция)	Показатель	Результат	Ссылки
Симвастатин	SMEDDS (37% - каприол 90, 28% - кремофор® EL, 28% - карбитол) или таблетки	Относительная БД у собак	БД в 1,5 раза выше	[127]
Карведилол	SEDDS (лабрафил® M1944CS, твин 80 и транскутол®) или таблетки	Относительная БД у собак	4-х кратное увеличение БД	[128]
Токотриенол	2 SEDDS (твин 80 и labrasol®) или раствор длинноцепочечных триглицеридов	Относительная БД у человека	БД в 2–3 раза выше	[129]
Бифенилдиметилдикарбоксилат	SEDDS (43% - твин 80, 35% - триацетин и 22% - Neobee® M5) или композиция в форме порошка	Относительная БД у крыс	5-ти кратное увеличение БД	[130]
Индометацин	SEDDS (70% - этилолеат и 30% - твин 85) или композиция в форме порошка	Относительная БД у крыс	Значимое увеличение БД	[131]

Подводя итог вышесказанному, можно сделать вывод, что использование SEDDS представляет собой перспективный подход в производстве лекарственных препаратов на основе действующих веществ с низкой растворимостью в воде. С помощью SEDDS возможно осуществление пероральной доставки гидрофобных лекарственных соединений, т.к. согласно экспериментальным данным SEDDS существенно увеличивают пероральную биодоступность. Жидкие SEDDS являются превосходной альтернативой традиционным лекарственным формам, поскольку обеспечивают снижение затрат на выпуск продукции, рационализацию промышленного производства и увеличенную стабильность препаратов наряду с повышенной комплаентностью пациентов. Наиболее важен тот факт, что SEDDS хорошо подходят для включения в различные технологии получения твердых дозированных лекарственных форм для приема внутрь и парентерального введения. Более того, такие системы позволяют предотвращать раздражение ЖКТ и получать лекарственные формы с контролируемым/продолжительным высвобождением.

## 1.4.3. Микронизация

Большое количество новых разрабатываемых АФИ, особенно стероидных препаратов, относятся ко II классу БКС. Для этих веществ важной проблемой является растворимость и повышение ее скорости. Поэтому в фармации на решение этой проблемы направлено много усилий.

Скорость растворения описывается уравнением Нойеса—Уитни [132]:

$$dC/dT = SD(C_s - C)/h, \quad (1)$$

где  $dC/dT$  – скорость растворения;

$S$  – площадь поверхности, доступной для растворения;

$D$  – коэффициент диффузии;

$C_s$  – растворимость вещества;

$C$  – концентрация вещества во время  $t$ ;

$h$  – толщина диффузионного слоя, прилегающего к поверхности растворяющегося вещества.

Из этого уравнения следует, что большей скорости растворения лекарственных веществ возможно добиться за счет увеличения площади, доступной для растворения, путем уменьшения размера частиц и/или улучшения смачиваемости поверхности растворяющегося вещества, уменьшения толщины диффузионного слоя или повышения растворимости ЛВ. Гидродинамические условия растворения *in vivo* трудно изменить, поэтому основные подходы к улучшению растворимости ЛВ заключаются в воздействии на площадь поверхности и растворимость вещества.

Растворение твердого вещества представляет собой совокупность нескольких процессов. При растворении вещества происходит разрыв связей между ионами, атомами или молекулами в его структуре, что требует затраты энергии ( $\Delta H_{\text{структ.}} > 0$ ). Чем больше энергия связи между частицами в веществе, тем выше  $\Delta H_{\text{структ.}}$ . Одновременно происходит взаимодействие частиц растворяемого вещества с растворителем, сопровождающееся выделением энергии ( $\Delta H_{\text{сольв.}} < 0$ ). Общий энергетический эффект зависит от соотношения поглощаемой и выделяемой энергии, т.е. затрат энергии на разрушение решетки при



отрыве молекулы и переходе ее в раствор и выигрыша энергии в результате сольватации и возрастания энтропии системы [133]:

$$\Delta H_{\text{раств.}} = \Delta H_{\text{крист.}} + \Delta H_{\text{сольв.}} \quad (2)$$

Таким образом, разрушая кристаллическую решетку и получая твердое вещество в аморфном или дефектном микрокристаллическом состоянии, мы облегчаем переход молекул в раствор. Появившиеся в последние 20 лет обзоры работ [134,135], посвященных микронизации ЛВ, свидетельствуют о бурном развитии этой области в связи с ее важностью для модифицирования свойств фармацевтических субстанций и получения лекарственных форм с улучшенными терапевтическими свойствами.

Повышение скорости растворения ЛВ увеличивает их биологическую доступность и, следовательно, позволяет уменьшить дозировку в готовой форме при сохранении терапевтической активности.

Для каждого материала существует предельная степень микронизации, которая зависит от многих факторов: типа оборудования, интенсивности и продолжительности механической обработки, структуры и агрегатного состояния вещества, температуры, наличия влаги и других посторонних веществ и т.п. Характеристикой дисперсности материала служит удельная поверхность ( $S_{уд.}$ ) – отношение общей поверхности измельченных частиц к единице объёма (или массы), обратно пропорциональная среднему диаметру частиц. Благодаря увеличению поверхности при измельчении может повышаться скорость растворения лекарственного вещества. Однако важность измельчения не исчерпывается повышением скорости растворения. Растворимость также зависит от размеров кристалла согласно уравнению Оствальда—Фрейндлиха [136]:

$$\rho \frac{RT}{M} \ln\left(\frac{S_r}{S_\infty}\right) = \frac{2\gamma sl}{r}, \quad (3)$$

где  $\rho$  – плотность;

$M$  – молекулярная масса;

$R$  – универсальная газовая постоянная;

$T$  – абсолютная температура;

$Sr$  и  $S$  – растворимости сферического кристалла радиуса  $r$  и бесконечного радиуса (т.е. плоскости);

$\gamma_{sl}$  – поверхностное натяжение жидкости.

В фармацевтической промышленности для получения микронизированных субстанций используют различные технологические приемы, суть которых сводится к аморфизации и увеличению количества дефектов и образованию кристаллитов внутри кристалла. В уравнении  $r$  относится к радиусу кристаллитов. Хотя данное уравнение подвергалось критике, экспериментальные результаты показывают, что растворимость действительно увеличивается для достаточно маленьких кристаллитов (обычно,  $r < 20$  нм). Например, растворимость гризеофульвина в воде увеличивается от 11,9 мкг/см<sup>3</sup> (макрокристалл) до 60,2 мкг/см<sup>3</sup> (нанокристалл) [137], ацетата метилгидроксипрогестерона – от 1,2 мкг/см<sup>3</sup> (макрокристалл) до 3,5 мкг/см<sup>3</sup> (нанокристалл) [138], нимесульфида - от 11 мкг/см<sup>3</sup> (макрокристалл) до 25 мкг/см<sup>3</sup> (нанокристалл) [139].

Влияние микронизации на физико-химические свойства низкомолекулярных органических веществ хорошо изучено для целого ряда лекарственных препаратов, относящихся к разным классам химических соединений и обладающих различным фармакологическим действием [140]. В подавляющем большинстве случаев используется метод механической активации, позволяющий повысить скорость растворения и количество вещества, перешедшего в раствор, а, следовательно, и биодоступность плохо растворимых препаратов.

Практическим доказательством результативности данного подхода служат препараты как уже используемые в клинической практике, так и проходящие

доклинические исследования: "Утрожестан" – микронизированный прогестерон [141], бетаметазон [142], циклоспорин [143], фенилбутазон [144].

Однако в настоящее время в литературе отсутствуют сведения по применению для микронизации стероидных препаратов метода распылительной сушки. По нашему мнению, этот метод позволит получить ЛВ в микронизированном состоянии и изучить влияние морфологии и размера кристаллов субстанции на фармакокинетические показатели в экспериментах *in vivo*.

Таким образом, анализ имеющихся литературных данных показал, что по синтезу прогестинов, в том числе и пентациклических аналогов прегестерона, имеются многочисленные публикации. Описано получение разнообразных производных прогестерона и их биологические свойства.

В последнее время пентациклические прогестины, в первую очередь мецигестон, хорошо зарекомендовали себя в ходе доклинических и клинических исследований в качестве терапевтических лекарственных средств, а также для целей контрацепции.

В то же время методы синтеза, описанные в литературе, не позволяют получать мецигестон и его аналоги с достаточно высоким выходом. Кроме того, эти методы из-за сложности процесса затрудняют наработку субстанций в укрупненных масштабах.

Следует отметить, что в литературе полностью отсутствуют данные о метаболитах пентациклических стероидов, хотя, несомненно, они, как ближайшие аналоги прогестерона, должны претерпевать в организме животных и человека сходные превращения.

Представлялось целесообразным с целью упрощения технологии процесса, возможности масштабирования и увеличения выхода конечного продукта провести следующие работы:

- разработать альтернативные методы получения пентациклических аналогов прогестинов;
- разработать методы синтеза и получить возможные метаболиты мецигестона как стандарты для подтверждения основных путей его биотрансформации;

– разработать методики качественного и количественного определения мецигестона и его метаболитов в биологических материалах методами ВЭЖХ-МС/МС;

– разработать методы получения пероральных форм мецигестона и подтвердить их эффективность на основе сравнительных фармакокинетических исследований.

## 2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

6 $\alpha$ -Метил-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексанопрогестерон (мецигестон) **1** прошел полный цикл необходимых экспериментальных исследований при пероральном применении. Он в комбинации с одной пятидесятой частью эстрогена местранола (метиловый эфир 17-этинилэстрадиола) (таблетки 3 мг и 0.06 мг местранола) прошел клинические испытания в семи клиниках в качестве лечебного средства при угрожающем привычном выкидыше, дисфункциональных маточных кровотечениях, предменструальным синдромом, дисфункции яичников и гиперпластических процессах эндометрия. В результате были выданы положительные рекомендации для его применения в клинической практике.

Мецигестон обладает высокой прогестагенной активностью, превышающей активность прогестерона и его аналогов, на 100% сохраняет беременность у овариэктомированных животных. При этом он обладает целым рядом преимуществ перед известными 19-норпрогестинами, не проявляя ни андрогенной, ни анаболической, ни эстрогенной активности. Препарат не токсичен даже в дозах, в 50 раз превышающей эффективную терапевтическую, не обладает эмбриотоксическим, мутагенным и тератогенным действием, не влияет на морфологическую картину и биохимические показатели крови. Другими, не менее важными преимуществами этого прогестина являются эффективный терапевтический эффект в гораздо более низких дозах, чем, например, у применяемого в настоящее время в клинической практике препарата дюфастон (дидрогестерон), и особенности его структуры, не позволяющей ему метаболизироваться в 17-кетостероиды.

**Задачами синтетической части работы** явились 1) поиск и разработка оптимального альтернативного метода синтеза субстанции мецигестона через ключевой продукт - 6-метилено-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексанопрегн-4-ен-3,20-дион - и упрощение технологии его получения и высокого выхода целевого соединения, 2) синтез возможных метаболитов мецигестона для анализа его фармакокинетики.

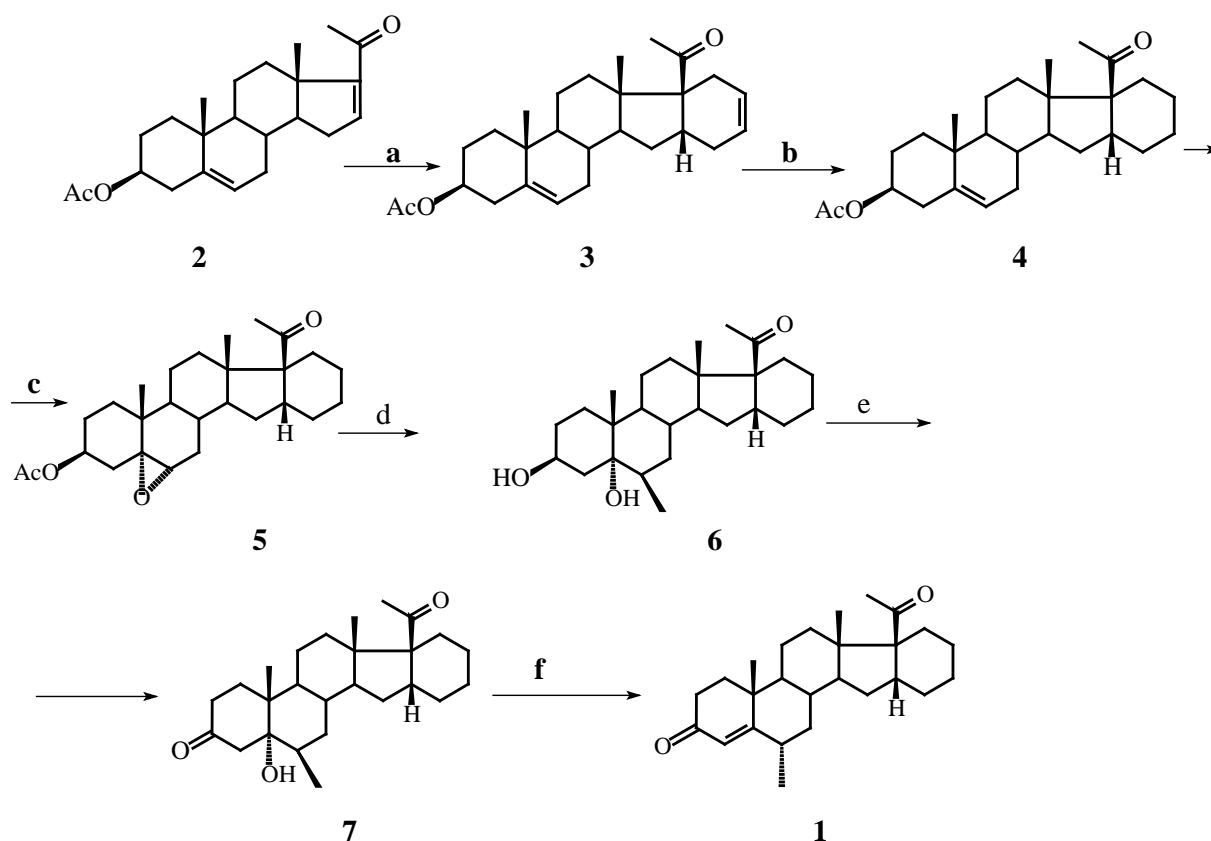
## 2.1. Альтернативная схема синтеза

 $\beta$  $\alpha$ -метил-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексанопрогестерона (мецигестона)

В настоящем разделе представлен альтернативный способ получения субстанции мецигестона через ключевое производное - 6-метилено-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексанопрегн-4-ен-3,20-дион **11** (см. Схему 13).

Как уже было описано в представленном в настоящей работе литературном обзоре, ключевой стадией в создании прегнанных стероидов с дополнительным шестичленным кольцом D' в 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -положениях стероидного скелета (D'-пентаранов) служит открытая способность стероидных 16-дегидро-20-кетонов (**2**) вступать в реакцию Дильса-Альдера с диенами в качестве диенофилов [34, 35]. На Схеме 12 представлен известный метод синтеза субстанции мецигестона через ключевой 5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -эпоксид **5**. Катализируемая кислотами Льюиса конденсация ацетата 16-дегидропрегненолона **2** с 1,3-бутадиеном приводила к аддукту (**3**). Его избирательное гидрирование давало аддукт **4**. Для введения необходимой 6-метильной группы в молекулу этого пентарана ранее была использована схема через 5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -эпоксид **5**, раскрытие которого иодистым метилмагнием происходило без затрагивания стерически затрудненной 20-карбонильной группы боковой цепи стероида и приводило к соответствующему 5 $\alpha$ -гидрокси-6 $\beta$ -метилстероиду **6**. Последующее окисление 3-гидроксильной группы давало 3-кетопродукт **7**, дегидратация в последнем 5 $\alpha$ -гидрокси группы с одновременной изомеризацией 6 $\beta$ -метильной группы в термодинамически более устойчивый экваториальный 6 $\alpha$ -эпимер давала желаемый мецигестон **1** (схема 12). Общий выход из расчета на исходный ацетат 16 дегидропрегненолон **2** составил 25%.

Схема 12.



Реагенты и условия: а)  $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}_2$ , к-та Льюиса, н.у.; б)  $\text{H}_2$ -Pd/CaCO<sub>3</sub>; с) ArCO<sub>3</sub>H; д) MeMgI; е) CrO<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; ф) HCl-EtOH

Однако указанный метод имеет ряд недостатков. Прежде всего, инертность 20-карбонильной группы в реакции Гриньяра ключевого эпоксида (**5**) хотя и позволяла селективно проводить эту реакцию без предварительной защиты 20-карбонила, тем не менее при укрупнении синтеза мецигестона на стадии выделения 5 $\alpha$ -гидрокси-6 $\beta$ -метилстероида из реакции Гриньяра наблюдаются побочные продукты, затрудняющие очистку. Помимо этого, само эпоксидование 5,6-двойной связи в аддукте **4** перкслотами протекает не стереоселективно, приводя к смеси 5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ - и 5 $\beta$ ,6 $\beta$ -эпоксилов, из которой целевой 5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -эпоксипродукт (**5**) выделяют многократной дробной кристаллизацией. И, наконец, использование на этой стадии в качестве эпоксилирующего агента перкислот не отвечает требованиям безопасности при масштабировании данного метода получения мецигестона.

Другой метод введения необходимой метильной группы в положение 6 молекулы пентарана был ранее осуществлен путем прямого  $\gamma$ -метилирования 4-дегидро-3-оксопентарана **6** с производным формальдегида (диэтилацеталем формальдегида) в инертном растворителе в присутствии сильного кислого конденсирующего агента [145] (см. схему 13). Однако этот метод также имеет ряд недостатков: длительное кипячение реакционной смеси и необходимость хроматографической очистки продукта реакции не позволяют достичь выхода 6-метиленопентарана **11** более 50%.

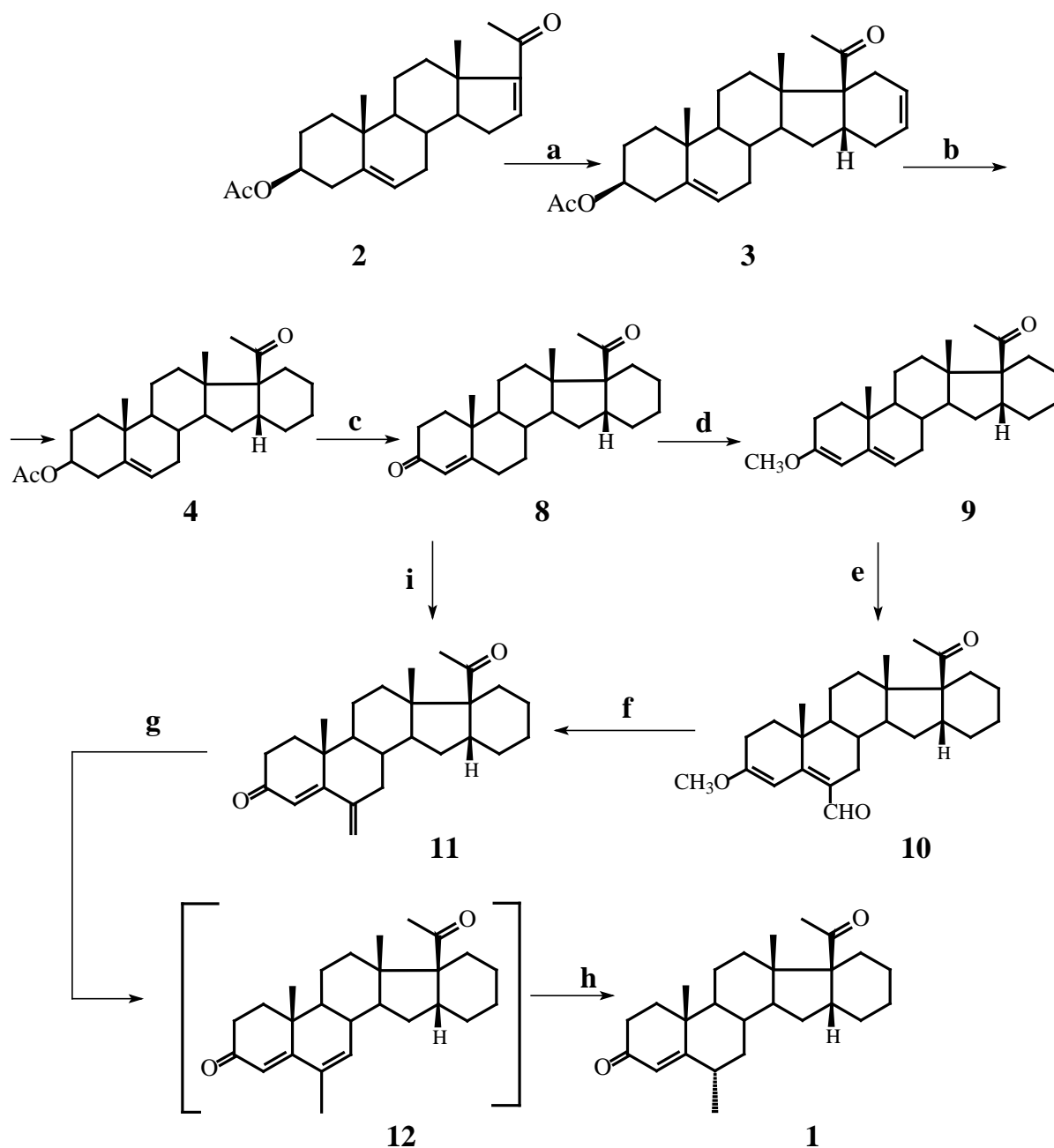
С целью устранения указанных недостатков и повышения выхода целевого стероида в настоящей работе разработан новый альтернативный метод синтеза мецигестона через ключевой продукт - 6-метилено-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексано-прегн-4-ен-3,20-дион **11**, получаемый на основе реакции Вильсмейера [146, 147] (см. схему 13).

Прежде всего мы разработали препаративные условия катализируемой кислотами Льюиса ( $\text{AlCl}_3$  или  $\text{TiCl}_4$ ) конденсации ацетата 16-дегидропрегненолона **2** с 1,3-бутадиеном при комнатной температуре в среде хлористого метилена или толуола и кислоты Льюиса при мольном соотношении ацетата 16-дегидропрегненолона, 1,3-бутадиена и кислоты Льюиса равным 1 : 2 – 3: 0,2 -0,4, при температуре  $-10^\circ\text{C}$  с последующим доведением температуры реакционной смеси до комнатной и обработкой реакционной смеси раствором соды и водой с последующим выделением аддукта **3**. Другим вариантом обработки является пропускание реакционной смеси через слой сорбента и выделение целевого продукта после удаления элюата, что значительно упрощает выделение продукта реакции. Выход продукта **3** составляет 85-87%. Использование 2-3 моль/экв. 1,3-бутадиена и 0,2-0,4 моль/экв. кислоты Льюиса (безводный  $\text{AlCl}_3$  или  $\text{TiCl}_4$ ) позволяет избежать дополнительного образования примесей, связанных с продуктами уплотнения бутадиена и осмоления исходного стероида. Далее для следующей стадии - гидрирования аддукта **3** - был использован высокопористый ячеистый катализатор на основе гамма-формы оксида алюминия и 0.5 – 5% палладия. Ацетат 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексано-прегн-5-ен-3 $\beta$ -ол-20-она (**4**) получен при этом с



количественным выходом. Омыление ацетатной группы и окисление по Оппен-уэру полученного  $16\alpha,17\alpha$ -циклогексанопрегн-5-ен-3 $\beta$ -ол-20-она (не показан на схеме 13) дало 4-дегидро-3-оксопентаран **8** с выходом 70%. Реакция последнего с триметилортоформиатом ( $\text{CH}(\text{OMe})_3$ ) в метаноле в присутствии *p*-TsOH, взаимодействие полученного при этом 3,5-диенольного эфира **9** с оксихлоридом фосфора ( $\text{POCl}_3$ ) в DMF и обработка реакционной смеси водным раствором углекислого калия, содержащим хлористый натрий, привели с количественным выходом к 3-метокси-6-формил-3,5-диену (**10**). После восстановления альдегида (**10**) борогидридом натрия в метаноле и последующей дегидратации образовавшегося 6-гидроксиметил-енольного эфира конц. соляной кислотой получили 6-метилденопентаран **11**. На всех стадиях образуются легко выделяемые кристаллические продукты практически с количественным выходом (Схема 13).

Схема 13



Реагенты и условия: а)  $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}_2$ , к-та Льюиса, н.у.; б)  $\text{H}_2$ -Pd/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>; в) KOH-MeOH; (iPrO)<sub>3</sub>Al, циклогексанон; PhMe; д)  $\text{CH}(\text{OMe})_3$ , MeOH, p-TsOH, е) POCl<sub>3</sub>, DMF, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-NaCl; ф) NaBH<sub>4</sub>, MeOH; HCl; г) циклогексенн, 5% Pd/C-EtOH; и) CH<sub>2</sub>(OEt)<sub>2</sub>, POCl<sub>3</sub>, NaOAc.

Последующее восстановление 6-экзометиленовой связи в соединении **11** в этаноле, содержащем циклогексен как донор водорода, в присутствии 5% Pd/C давало целевой 6α-метил-16α,17α-циклогексанопрогестерон **1** с высоким

выходом. Реакция при этом протекает через промежуточную изомеризацию экзометиленовой связи в положении 6,7 цикла В молекулы стероида (соединение **12** на схеме 13) [148]. Общий выход из расчета на исходный ацетат 16-дегидро-прегненолон **2** составил 42%.

Таким образом, разработанный метод может быть использован при масштабируемом производстве субстанции мецигестона.

## 2.2. Анализ вероятных путей биотрансформации мецигестона и его б-дезметильного аналога и синтез их возможных метаболитов

Введение дополнительных фрагментов (как, например, 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексанового и б-метильного заместителей) в молекулу природного прогестерона можно рассматривать как способ «замедления» метаболизма молекулы (на этом были основаны синтезы большинства известных синтетических прогестинов). Тем не менее доведение субстанции до лекарственного препарата требует исследования его фармакокинетики и, в частности, его возможных метаболитов. Поэтому важной (приоритетной) частью исследований лекарственного препарата, предназначенного для использования в медицинской практике, является изучение его метаболизма. Литературные данные свидетельствуют о том, что природный прогестерон биотрансформируется в большое количество метаболитов (более 30). Основными метаболитами являются восстановленные по 4,5-двойной связи 5 $\alpha$ - и 5 $\beta$ -производные, 20-дигидропроизводные: 5 $\beta$ -прегнан-3,20-дион, 5 $\beta$ -прегнан-3,20-диола, 5 $\beta$ -прегнан-3 $\alpha$ -ол-20-он, 5 $\alpha$ -прегнан-3,20-дион, 5 $\alpha$ -прегнан-3,20-диола, 5 $\alpha$ -прегнан-3 $\alpha$ ( $\beta$ )-ол-20-оны, 5 $\alpha$ -прегнан-3 $\alpha$ ( $\beta$ ),20-диола (рис. 12) [149]. Данные превращения происходят, в частности, в почках с участием таких гидроксистероиддегидрогеназ (hydroxysteroid dehydrogenases или HSDs), как: 20 $\alpha$ -HSD, 17 $\beta$ -HSD тип 5, 3 $\alpha$ ( $\beta$ )-HSD тип 2 и 3 $\alpha$ -HSD тип 3, 5 $\alpha$ ( $\beta$ )-редуктаза (5 $\alpha$ ( $\beta$ )-Red) тип 1. Следует отметить, что метаболиты прогестерона не являются интактными и могут проявлять в организме различные физиологические действия (например, пролиферативную и антипролиферативную активность) [150, 151].

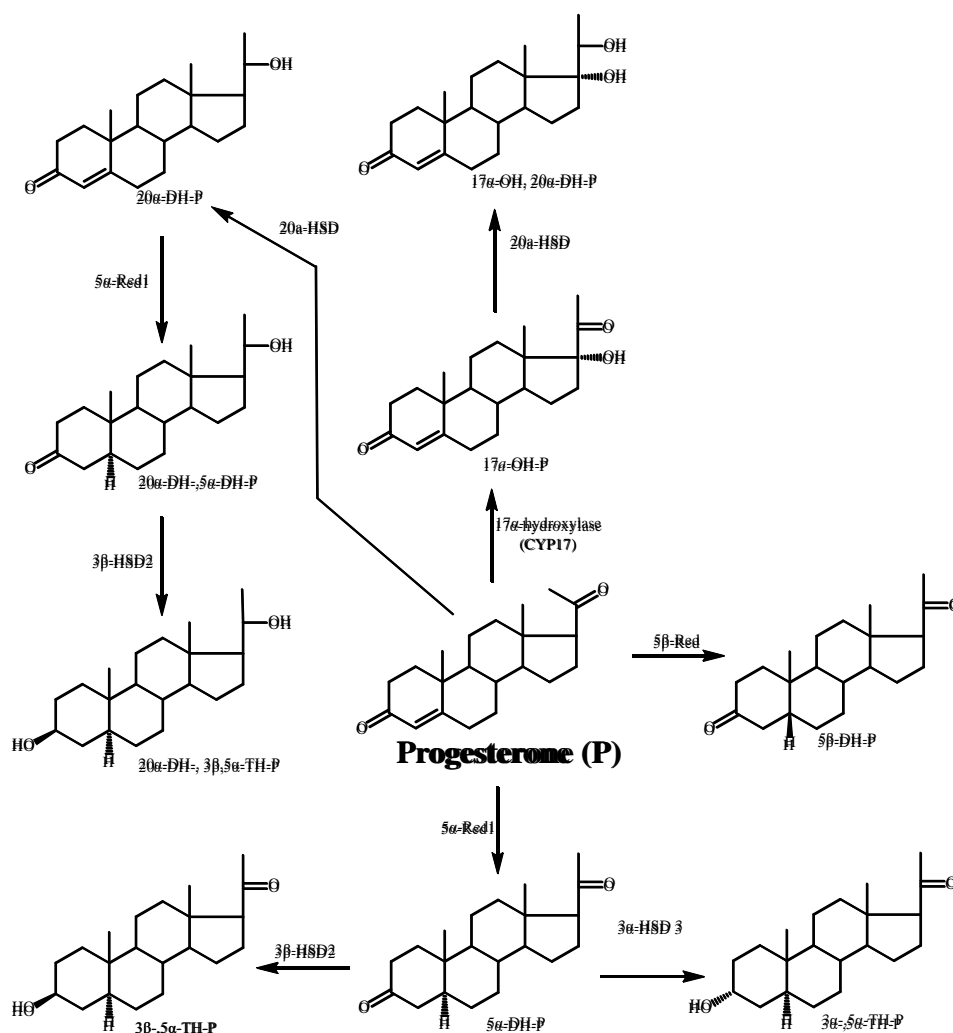


Рисунок 12 – Метаболические превращения прогестерона

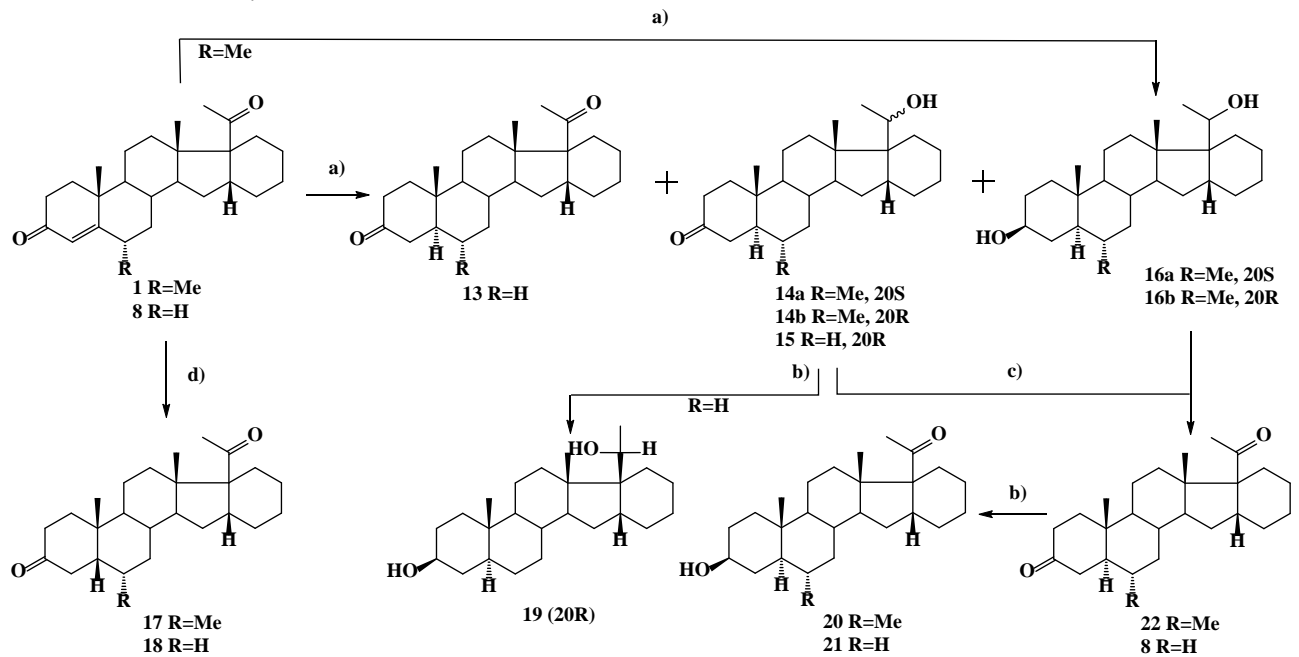
Поскольку мецигестон **1** является структурным аналогом природного прогестерона, мы предположили, что его метаболизм протекает сходным образом. Под действием 5-редуктазы может происходить гидрирование  $\Delta^4$ -двойной связи мецигестона с образованием 5Н-метаболитов, а затем, с участием гидроксистероид дегидрогеназ, восстановление 3- и 20-оксогрупп в молекуле исследуемого стероида [152].

### 2.2.1. Синтез возможных метаболитов мецигестона и его б-дезметильного аналога

Для изучения биотрансформации мецигестона **1** был осуществлен синтез вероятных (возможных) продуктов его метаболизма, которые были использованы в качестве стандартов для идентификации найденных нами метаболитов в биопробах. Для оценки влияния б-метильной группы в молекуле мецигестона **1** также были специально синтезированы и изучены метаболиты его б-дезметильного аналога **8**.

Для подтверждения наших предположений и обнаружения этих метаболитов в пробах мочи были использованы методы высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией, позволяющие сравнивать оба вещества по таким параметрам, как время удерживания и характеристичные ионные переходы, что позволяет выявить структурное сходство исследуемого стандарта и метаболита в биопробе. Синтез полученных соединений **13-22** представлен на Схеме 14.

Схема 14.



Реагенты и условия: a) Li/NH<sub>3</sub>, THF; b) NaBH<sub>4</sub>/MeOH; c) PDC/Py; d) 5% Pd-C, THF-EtOH (1:1), HBr

Соединения формулы **14** и **16** получены восстановлением 4,5-двойной связи 6 $\alpha$ -метил-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексанопрегн-4-ен-3,20-диона **1** литием в жидком аммиаке. При этом кратковременное выдерживание (5-10 мин) исходного сопряженного кетона приводило к смеси 3-оксо-20(*R,S*)-гидроксиэпимеров **14a,b** и 3 $\beta$ ,20(*R,S*)-дигидроксиэпимеров **16a,b**, а при более длительной экспозиции реакционной смеси получены только дигидроксиэпимеры **16a,b**. При восстановлении 4,5-двойной связи в 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексанопрегн-4-ен-3,20-дионе **8** литием в жидком аммиаке получены 5 $\alpha$ -прегнан-3,20-дион **13** и 3-кето-20*R*-гидроксиэпимер **15** в соотношении 3:2. Хроматографическое разделение всех полученных смесей дало индивидуальные стереоизомеры, структуры которых и конфигурация 20-центра доказаны методом ЯМР.

Конфигурацию ассиметрического центра С-20 в 3-оксо-20(*R,S*)-гидроксиэпимерах **14a,b** и 3 $\beta$ ,20(*R,S*)-дигидроксиэпимерах **16a,b**, определяли в экспериментах 2D NOESY и сравнением значений химических сдвигов <sup>13</sup>С обоих эпимеров с учетом ранее полученных данных (табл. 3). Ранее для родственных соединений, 3,20*R*-дигидрокси- и 3,20*S*--дигидроксипрегна-1,3,5(10)-триенов, конфигурация одного из которых была установлена методом рентгеноструктурного анализа, было показано, что для *S*-эпимера сигналы атомов С16 и С20 сдвигаются в слабое поле примерно на 4 м.д., а сигнал С18 – в сильное поле примерно на 0,5 м.д. по сравнению с соответствующими сигналами в *R*-эпимере. Соответствующая разность химсдвигов наблюдалась и в исследуемых нами соединениях: для пар эпимеров **14a/14b** и **16a/16b** для С16 +4,5 и +4,6 м.д., для С20 +4,5 и +3,4 м.д. и для С18 -0,5 и -0,5 м.д., соответственно, что указывало на *S*- конфигурацию при С20 для **14a** и **16a** и *R*-конфигурацию для **14b** и **16b**. Дополнительное подтверждение было получено из анализа спектров 2D NOESY соединений **14a** и **14b**. В спектре 20*S*-эпимера **14a** наблюдался кросс пик между протоном гидроксила (4,08) при С20 и сигналом Н16 (1,18), а для *R*-эпимера **14b** - между протоном гидроксила (4,06) при С20 и сигналом СН<sub>3</sub>-18 (0,82), что указывало на пространственную сближенность указанных протонов и соответствовало *R*- и *S*-конфигурации эпимеров.

Реокисление 20-гидроксильной группы в 6 $\alpha$ -метил-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексано-5 $\alpha$ H-прегнан-20(*R,S*)-гидрокси- и дигидроксистероидах **14** и **16** с помощью пиридинийдихромата в пиридине дало 6 $\alpha$ -метил-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексано-прегн-5 $\alpha$ -прегнан-3,20-дион **22** с выходом 80%.

5 $\beta$ -Метаболиты **17** и **18** получены стереоселективным восстановлением 4,5-двойной связи 6 $\alpha$ -метил-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексано-прегн-4-ен-3,20-диона **1** и дезметильного аналога **8** 5%-ным палладием на угле в присутствии каталитических количеств бромистоводородной кислоты.

Для получения 3 $\beta$ -гидрокси-5 $\alpha$ -прегнановых метаболитов с 20-оксогруппой **19** и с 20-гидроксигруппой **20** 3-оксогруппу в исходных соединениях **15** и **22**, соответственно, восстанавливали NaBH<sub>4</sub> в MeOH. При этом стерически затрудненная 20-оксогруппа в диоксистероиде **15** не затрагивалась, и в обоих случаях получены 3 $\beta$ -гидроксистероиды **19** и **20**.

Таким образом, получены серии возможных метаболитов мецигестона **1** (соединения **14a**, **14b**, **16a**, **16b**, **17**, **20**, **22**) и его 6-дезметильного аналога **8** (соединения **13**, **15**, **18**, **19**, **21**).

Таблица 3 – Химические сдвиги соединений **14a**, **14b** и **16a**, **16b** в спектрах ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$ 

№№ атома	<b>16a</b>	<b>16a</b>	<b>16b</b>	<b>16b</b>	<b>14a</b>	<b>14a</b>	<b>14b</b>	<b>14b</b>
N	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$
1	37,1	1,72, 0,94	37,1	1,72, 0,94	38,3	2,00, 1,28	38,3	2,00, 1,28
2	31,3	1,78, 1,40	31,3	1,78, 1,40	37,8	2,38, 2,26	37,8	2,38, 2,26
3	71,8	3,53	71,8	3,53	212,5	-	212,7	-
4	33,9	1,94, 1,10	33,9	1,94, 1,10	41,2	2,43, 2,09	41,2	2,43, 2,09
5	51,4	0,74	51,3	0,74	52,8	1,15	52,8	1,15
6	31,0	1,35	31,0	1,35	32,0	1,42	32,0	1,42
7	42,2	1,64, 0,63	42,2	1,64, 0,63	41,7	1,66, 0,67	41,7	1,66, 0,67
8	35,2	1,43	35,3	1,43	35,1	1,47	35,2	1,47
9	54,3	0,59	54,3	0,60	53,6	0,68	53,7	0,68
10	35,7	-	35,7	-	35,8	-	35,8	-
11	20,8	1,51, 1,26	21,0	1,49, 1,30	20,9	1,52, 1,35	21,0	1,51, 1,38
12	24,4	1,62, 1,53	24,3	1,66, 1,34	24,2	1,64, 1,53	24,2	1,60, 1,53
13	47,8	-	49,3	-	47,7	-	49,2	-
14	50,1	1,52	49,7	1,46	49,9	1,55	49,7	1,47
15	33,3	1,57, 1,33	33,8	1,57, 1,33	33,2	1,56, 1,32	33,7	1,58, 1,32
16	40,6	2,28	36,1	2,00	40,5	2,28	36,1	2,02
17	49,7	-	49,8	-	49,7	-	49,7	-
18	14,5	0,77	15,0	0,91	14,4	0,78	14,9	0,93
19	13,3	0,81	13,4	0,83	12,4	1,00	12,5	1,02
20	77,0	4,02	73,5	4,01	76,8	4,01	73,4	4,01
21	20,0	1,22	22,1	1,26	20,0	1,21	22,1	1,26
22	24,6	1,75, 1,33	24,1	1,74, 1,34	24,6	1,75, 1,33	24,0	1,74, 1,30
23	20,7	1,50, 1,18	20,5	1,50, 1,18	20,7	1,50, 1,18	20,4	1,50, 1,18
24	32,1	1,40	29,8	1,51	32,0	1,42	29,7	1,51
25	30,9	1,74, 1,60	33,3	1,57, 1,49	30,7	1,74, 1,58	33,0	1,60, 1,49
26	20,4	0,82	20,4	0,83	19,9	0,80	19,9	0,81



### 2.2.2. Разработка методик пробоподготовки и анализа биопроб мецигестона, его 6-дезметильного аналога и их синтезированных метаболитов как стандартов для изучения биотрансформации

Основными методами анализа при исследовании гормональных соединений являются метод газовой хроматографии с масс-селективным детектированием и метод ВЭЖХ-МС. При использовании методов газовой хроматографии с масс-селективным детектированием возникает ряд ограничений и усложнений в процедурах подготовки проб, заключающихся в обязательном проведении дериватизации, которая вносит дополнительные погрешности и увеличивает вариабельность результатов измерений. Этим недостаткам лишены методы ВЭЖХ.

При исследовании лекарственных гормональных препаратов используют два основных метода: метод ВЭЖХ с тандемной масс-спектрометрией и метод ВЭЖХ с применением масс-спектрометрии высокого разрешения.

Для идентификации метаболитов **1** в моче крыс необходимо, прежде всего, выбрать оптимальные условия экстракции **1**, **8** и его синтезированных стандартов-метаболитов. Как известно [153], низкая полярность неконъюгированных стероидов облегчает их экстракцию из биологических жидкостей (мочи) такими органическими растворителями, как эфир, пентан или гексан. Для экстракции гидроксильных метаболитов предпочтительным является использование более полярных растворителей, например, этилацетата или хлористого метилена [154]. Выбор оптимальной экстрагирующей системы мы проводили в соответствии с методикой, описанной в экспериментальной части. Полученные результаты по выбору оптимальных процедур пробоподготовки приведены в таблице 4.

Таблица 4 – Результаты по определению коэффициента извлечения мецигестона из мочи интактных животных

Тип экстракции	Тип объекта	Экстрагирующая система	Исходная концентрация, нг/мл	Концентрация измеренная, нг/мл	Коэффициент извлечения, %
Кислая	Моча	Хлористый метилен	200	95,03	48
		Ацетонитрил		84,39	42
		Диэтиловый эфир/ трет-Бутилметило- вый эфир		126,08	63
		Гесан/хлористый метилен		174,13	<b>87</b>
		<i>изо</i> -Бутанол/ <i>изо</i> -пропанол/ этилацетат		22,39	11
Щелочная	Моча	Хлористый метилен		98,66	49
		Ацетонитрил		86,17	43
		Диэтиловый эфир/ трет-бутилметило- вый эфир		120,03	<b>60</b>
		Гесан/хлористый метилен		104,46	52
		<i>изо</i> -Бутанол/ <i>изо</i> -пропанол/ этилацетат		76,63	38
Нейтральная	Моча	Хлористый метилен	93,6	47	
		Ацетонитрил	88,89	44	
		Диэтиловый эфир/ трет-бутилметило- вый эфир	106,83	<b>53</b>	
		Гесан/хлористый метилен	98,86	49	
		<i>изо</i> -Бутанол/ <i>изо</i> -пропанол/ этилацетат	86,12	43	

Приведенные данные свидетельствуют о том, что наиболее оптимальной является система экстракции в кислых условиях смесью гексан-хлористый метилен в соотношении 85:15 (*v/v*). Коэффициент извлечения мецигестона из мочи составил 87%.

В таблице 5 приведены коэффициенты извлечения исследуемых стандартов-метаболитов с использованием той же системы для экстракции, что и для мецигестона **1**.

Таблица 5 – Результаты по определению коэффициента извлечения синтезированных стандартов из мочи интактных животных смесью гексан/хлористый

## метилен в кислой среде

Номер соединения	Исходная концентрация, нг/мл	Концентрация измеренная, нг/мл	Коэффициент извлечения, %
<b>1</b>	200	174,13	87
<b>6</b>		127,2	63,6
<b>11</b>		136,4	74,2
<b>12a</b>		166,8	84
<b>12b</b>		170,4	86
<b>14a</b>		172,6	87
<b>14b</b>		175,3	88
<b>15</b>		176,1	89
<b>16</b>		146,4	73,2
<b>17</b>		136,2	67,5
<b>18</b>		150,4	75,2
<b>19</b>		162,8	81,4
<b>20</b>		174,8	88

Для обнаружения метаболитов в пробах мочи был использован метод высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией, позволяющий определить стероиды в биопробе до пикограммовых количеств [155, 156].

На следующем этапе работы получены масс-спектры высокого разрешения для всех синтезированных нами стандартов с применением двух методов ESI и APСI [157, 158]. Из-за более высокой интенсивности сигналов в области молекулярного иона и высокого отношения сигнала к шуму был выбран метод ESI. Детектирование осуществляли при двух режимах ионизации, что позволило определить точные массы ионов, соответствующие моноизотопным массам протонированных молекул метаболитов. Согласно результатам предварительных экспериментов, в режиме регистрации положительно заряженных ионов чувствительность определения соединений выше, а масс-спектры интенсивнее, чем в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов. Поэтому в дальнейшей работе использовали только первый из указанных режимов. Ионы с максимальной интенсивностью использовали в качестве ионов-предшественников. Спектры MS/MS получали, варьируя энергии соударительной диссоциации в диапазоне 10-70 В с шагом в 10 В.

HPLC анализ стероидов **1**, **8** и стандартов-метаболитов осуществляли в режиме обращенно-фазового градиентного элюирования. В качестве элюентов были выбраны 0,1 %-ный раствор муравьиной кислоты в смеси

ацетонитрил/вода в соотношении 5 : 95 (об.) (элюент А) и 0,1 % раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (элюент В). В качестве неподвижной фазы применяли сорбент на основе силикагеля, модифицированный группами C18 (Hypersil Gold aQ) с полярными функциональными группами. Для определения оптимальных параметров при идентификации каждого стандарта-метаболита выбрали характеристичные фрагментные ионы с максимальной интенсивностью в MS/MS-спектрах и определили зависимость площадей пиков ионов от энергии фрагментации при регистрации положительно заряженных ионов. Согласно полученным данным максимальные площади пиков ионов изучаемых соединений в условиях регистрации положительно заряженных ионов достигаются при 40 В.

При анализе масс-спектрометрических данных идентификацию соединений проводили по точным массам ионов и временам удерживания (совпадение с аналитическим стандартом в пределах 0.3 мин). Для всех стандартов характеристичным является положительнозаряженный ион  $[M+H]^+$  с массами, представленными в таблице 4. Особое внимание было уделено масс-спектрам одинаковых по молекулярной массе и брутто-формуле соединений. По результатам экспериментов HPLC-MS/MS получены данные по времени удерживания изомеров (RT), которые отличаются друг от друга на 1 и более минут. Следовательно, основываясь на RT и масс-спектрометрических данных, можно с высокой степенью достоверности идентифицировать каждый из стандартов.

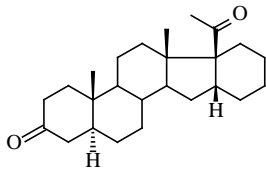
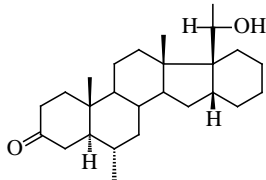
Однако есть несколько исключений - это изомерные соединения **16a** и **16b**, для которых вследствие нестабильности молекулярного иона  $[M+H]^+$  в качестве предшественника выбраны наиболее интенсивные ионы  $[M-2H_2O+H]^+$  с  $m/z$  353,320. При анализе еще одного стандарта - стероида **19**, (в концентрации 100 нг/мл) практически не наблюдался пик однозарядного протонированного иона с  $m/z$  375,32576, но четко фиксировался сигнал иона  $[M-2H_2O+H]^+$  с  $m/z$  339,30463 (Приложение А). В указанных трех случаях эти ионы были выбраны в качестве родительских для (MS-MS)-анализа. Порог устойчивого обнаружения исследуемых соединений из растворов стандартов составлял 0,5 нг на ввод.

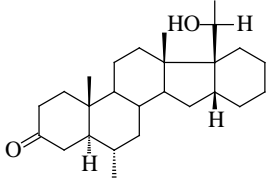
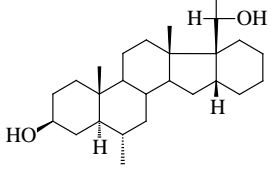
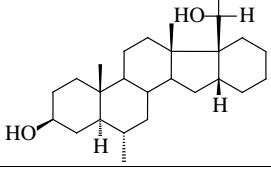
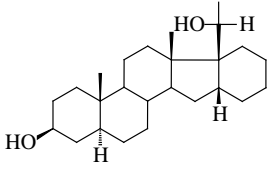
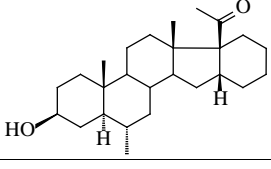
Таким образом, были получены масс-хроматограммы и масс-спектры всех

стандартов: в режиме регистрации положительно заряженных ионов исследуемые соединения образуют либо протонированную молекулу  $[M+H]^+$ , либо ион  $[M-2H_2O+H]^+$ .

Далее исследовали диссоциацию ионов предшественников ( $[M+H]^+$  и  $[M-2H_2O+H]^+$ ) для выбора характеристичных ионных переходов, которые в дальнейшем использованы для идентификации предполагаемых метаболитов в биопробах в режиме MS/MS. Полученные фрагментные масс-спектры приведены в приложении А. В качестве характеристичных ионных переходов выбирали пики с максимальной интенсивностью, соответствующие как отщеплению боковых цепей, так и структурным перегруппировкам. Оптимизированные параметры масс-спектрометрического детектирования определяемых стандартов представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Оптимизированные параметры масс-спектрометрического детектирования определяемых стандартов в режиме регистрации положительно заряженных ионов

№, п/п	Структурная формула определяемого вещества	Ион предшественник $[M+H]^+$ ( $[M-2H_2O+H]^+*$ ) Да	Время удерживания, мин	Брутто-формула иона предшественника	Энергия столкновений, В	Фрагментные ионы, Да (отн. интенсивность, %)	Брутто-формулы ионов-продуктов
1		383,29416	14,19	$C_{26}H_{39}O_2$	40	365,28357 (10) 339,26797 (15) 123,08057 (100)	$C_{24}H_{37}O$ $C_{24}H_{35}O$ $C_8H_{11}O$
8		369,27917	13,45	$C_{256}H_{37}O_2$	40	351,26819 (15) 109,06514 (25) 97,06527 (40)	$C_{25}H_{35}O$ $C_8H_{13}$ $C_7H_{13}$
13		371,29410	14,63	$C_{25}H_{39}O_2$	40	353,28344 (90) 125,0962 (80) 149,12982 (70)	$C_{25}H_{37}O$ $C_8H_{13}O$ $C_9H_{16}O$
14a		387,3257	15,51	$C_{26}H_{42}O_2$	40	325,28879 (75) 125,0961 (45) 369,31509 (25)	$C_{24}H_{37}$ $C_8H_{13}O$ $C_{26}H_{39}O$

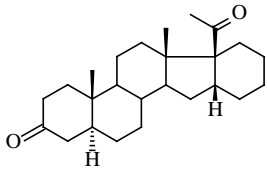
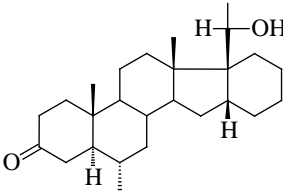
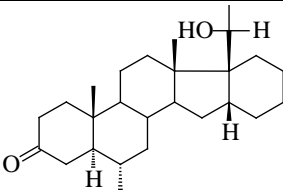
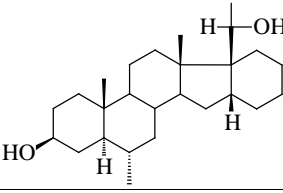
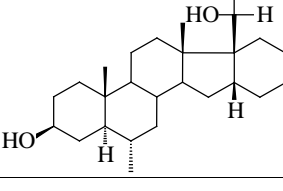
№, п/п	Структурная формула определяемого вещества	Ион предшественник [M+H] <sup>+</sup> ([M-2H <sub>2</sub> O+H] <sup>+</sup> )* Да	Время удерживания, мин	Брутто-формула иона предшественника	Энергия столкновений, В	Фрагментные ионы, Да (отн. интенсивность, %)	Брутто-формулы ионов-продуктов
14b		387,3257	15,21	C <sub>26</sub> H <sub>42</sub> O <sub>2</sub>	40	325,28879 (75) 125,0961 (45) 369,31509 (25)	C <sub>24</sub> H <sub>37</sub> C <sub>8</sub> H <sub>13</sub> O C <sub>26</sub> H <sub>39</sub> O
16a		353,3203*	16,47	C <sub>26</sub> H <sub>44</sub> O <sub>2</sub>	40	123,1169 (55), 109,10149 (75)	C <sub>9</sub> H <sub>15</sub> C <sub>8</sub> H <sub>13</sub>
16b		353,3203*	15,39	C <sub>26</sub> H <sub>44</sub> O <sub>2</sub>	40	123,1169 (55), 109,10149 (75)	C <sub>9</sub> H <sub>15</sub> C <sub>8</sub> H <sub>13</sub>
17		385,3103	14,37	C <sub>26</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>	40	367,2995 (100) 125,0961 (80)	C <sub>26</sub> H <sub>39</sub> O C <sub>8</sub> H <sub>13</sub> O
18		371,29453	13,91	C <sub>25</sub> H <sub>39</sub> O <sub>2</sub>	40	353,28385 (100) 125,09633 (90) 149,13257 (90)	C <sub>25</sub> H <sub>37</sub> O C <sub>8</sub> H <sub>13</sub> O C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> O
19		339,30463*	14,65	C <sub>25</sub> H <sub>39</sub>	40	135,1170 (100) 109,1016 (75) 203,1796 (55)	C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> C <sub>8</sub> H <sub>13</sub> C <sub>15</sub> H <sub>23</sub>
20		387,32538	15,45	C <sub>26</sub> H <sub>43</sub> O <sub>2</sub>	40	125,09633 (90) 369,3149 (25) 351,3045(25)	C <sub>8</sub> H <sub>13</sub> O C <sub>26</sub> H <sub>37</sub> O C <sub>25</sub> H <sub>35</sub> O
21		373,30945	15,17	C <sub>25</sub> H <sub>42</sub> O <sub>2</sub>	40	125,0962 (100) 337,2880 (25) 355,2988 (20)	C <sub>8</sub> H <sub>13</sub> O C <sub>24</sub> H <sub>33</sub> O C <sub>25</sub> H <sub>39</sub> O
22		385,30984	15,02	C <sub>26</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>	40	367,2995 (100) 125,0961 (80)	C <sub>26</sub> H <sub>39</sub> O C <sub>8</sub> H <sub>13</sub> O

Изучение метаболизма проводили при однократном внутрижелудочном введении исследуемых препаратов **1** и **8** в дозе, соответствующей предполагаемой терапевтической (с учетом коэффициента переноса на животных) при данном

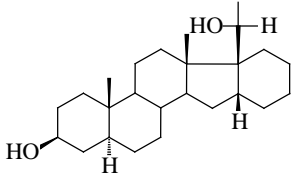
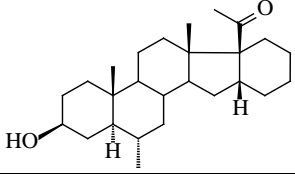
пути введения. Принимая во внимание данные по доклиническим и клиническим исследованиям широко используемого в последнее время препарата-аналога – дидрогестерона (коммерческое название «Дюфастон») [159], нами была выбрана эффективная доза для проведения экспериментальных работ *in vivo*, равная 0,55 мг/кг. Анализ мочи крыс в двух группах – №1 (экспонированной мецигестонем 1) и №2 (экспонированной 6-дезметильным аналогом 8) —проводили с использованием выбранных выше параметров для синтезированных стандартов-метаболитов. Сбор мочи разделили на три интервала: I – моча, собранная в течение 2 часов после введения препарата; II – моча, собранная в период со 2-го по 6-ой час после введения; III – моча, собранная в период с 6-го по 24-ый час после введения. Выделение продуктов метаболизма стероидов 1 и 8 см. экспериментальную часть.

Детектирование проводили в двух сегментах: в режиме полного ионного сканирования и регистрации выбранных ионных переходов. Соответствующие масс-хроматограммы образцов проб из мочи, полученных от лабораторных животных, с полным ионным сканированием и детектированием по выбранному ионному переходу приведены в приложении. В случае обнаружения метаболита проводилось его количественное определение по заранее построенному градуировочному графику в диапазоне от 1 до 1000 нг/мл. Найденное значение концентрации каждого метаболита в образцах мочи, время их элиминации (I - III), а также регистрируемое время удерживания и ионные переходы представлены в таблице 7.

анализу метаболитов в исследуемых пробах мочи, собранной спустя заданные промежутки времени

№, п/п	Структурная формула детектируемого вещества	Ион предшественник [M+H] <sup>+</sup> ([M-2H <sub>2</sub> O+H] <sup>+</sup> *) Да	Время удерживания стандарта, мин	Время удерживания экстрагированного метаболита, мин	Фрагментные ионы, Да (отн. интенсивность, %)	Концентрация метаболита в моче, нг/мл
1		383,29416	14,19	-	365,28357 (10) 339,26797 (15) 123,08057 (100)	I – 0 II – 0 III – 0
8		369,27917	13,45	-	351,26819 (15) 109,06514 (25) 97,06527 (40)	I – 0 II – 0 III – 0
13		371,29410	14,63	14,68	353,28344 (90) 125,0962 (80) 149,12982 (70)	I – 0 II – 0,166 III – 0
14a		387,3257	15,51	15,51	325,28879 (75) 125,0961 (45) 369,31509 (25)	I – 0, II – 0,58 III – 0,17
14b		387,3257	15,21	15,23	325,28879 (75) 125,0961 (45) 369,31509 (25)	I – 0 II – 0,32 III – 0
16a		353,3203*	16,47	16,47	123,1169 (55), 109,10149 (75)	I – 0 II – 0,14 III – 0,13
16b		353,3203*	15,39	-	123,1169 (55), 109,10149 (75)	I – 0 II – 0 III – 0
17		385,3103	14,37	14,35	367,2995 (100) 125,0961 (80)	I – 0,825 II – 0 III – 0
18		371,29453	13,91	13,85	353,28385 (100) 125,09633 (90) 149,13257 (90)	I – 0 II – 0,148 III – 0,122



№, п/п	Структурная формула детектируемого вещества	Ион предшественник [M+H] <sup>+</sup> ([M-2H <sub>2</sub> O+H] <sup>+</sup> *) Да	Время удерживания стандарта, мин	Время удерживания экстрагированного метаболита, мин	Фрагментные ионы, Да (отн. интенсивность, %)	Концентрация метаболита в моче, нг/мл
19		339,30463*	14,65	-	135,1170 (100) 109,1016 (75) 203,1796 (55)	I – 0 II – 0 III – 0
20		387,32538	15,45	15,47	125,09633 (90) 369,3149 (25) 351,3045(25)	I – 0,15 II – 0,143 III – 0,178
21		373,30945	15,17	15,26	125,0962 (100) 337,2880 (25) 355,2988 (20)	I – 0,138 II – 0,264 III – 0,11
22		385,30984	15,02	15,02	367,2995 (100) 125,0961 (80)	I – 0,77 II – 0,36 III – 0

Примечание - I – моча, собранная в течение 2 часов после введения, II – моча, собранная в период со 2-го по 6-ой час после введения, III – моча, собранная в период с 6-го по 24-ый час после введения.

Результаты, представленные в таблице 7, показывают, что из проанализированных стандартов в пробах мочи крыс, экспонированных мецигестоном **1**, найдены стандарты-метаболиты **14a**, **14b**, **16a**, **17**, **19**, **22**, за исключением соединения **16b**. 6-Дезметильный аналог мецигестона - стероид **8** - метаболизируется сходным образом: в пробах мочи найдены метаболиты **13**, **18** и **21** и не зафиксирован стероид **19**. Интересно, что эти оба стероида, не найденные среди предполагаемых метаболитов мецигестона **1** и его аналога **8**, представляют собой один и тот же 20(*R*)20-гидроксидиастереоизомер – **16b** и **19**.

Особенностью метаболизма исследуемых стероидов **1** и **8** является их полная биотрансформация, о чем свидетельствует отсутствие этих соединений в исследуемых биологических пробах мочи.

Очевидно, что найденные метаболиты мецигестона **1** и его аналога **8** представляют собой продукты восстановления 4,5-двойной связи (5 $\alpha$ H - и 5 $\beta$ H -соединения), 3-кетогруппы и 3,20-дигидроксилированные стероиды.

Таким образом, можно констатировать, что проведенная работа по синтезу стандартов метаболитов и разработке аналитического метода контроля в биологических жидкостях продуктов биотрансформации мецигестона **1** и его дезметильного аналога **8** показала сходство путей метаболизма прегна-D'-пентаранов и эндогенного прогестерона. Можно полагать, что несмотря на наличие дополнительного кольца D' и метильной группы в положении 6 мецигестона, его основные ферментативные превращения происходят аналогично таковым для природного гормона прогестерона.

### 2.3. Разработка технологии получения пероральных лекарственных форм мецигестона с повышенной биологической доступностью

Для внедрения нового лекарственного средства в клиническую практику необходимыми условиями являются не только разработка технологического способа получения фармакологической субстанции и изучение ее метаболизма, но и создание соответствующей лекарственной формы с высокой биодоступностью. Исследование в области разработки перспективных лекформ является одним из наиболее интенсивно развивающихся направлений в фармации.

Учитывая вышесказанное, мы поставили задачу разработать несколько лекарственных форм мецигестона и оценить их относительную биодоступность. В последующих разделах описана технология получения микронизированной, микрокапсулированной форм мецигестона и самоэмульгирующейся системы с мецигестоном.

#### 2.3.1. Микронизация мецигестона

Одним из широко применяемых в практике фармацевтического производства способов для получения микронизированной субстанции является метод распылительной сушки. Сущность данного метода заключается в том, что раствор субстанции через форсунки распыляется в сушильную камеру, где ламинарным потоком газа удаляется растворитель, образовавшийся при этом порошок собирается на коллекторе частиц и выводится из камеры.

Структура высушенных частиц зависит прежде всего от молекулярной структуры вещества и заданного режима сушки. Нами проведены эксперименты по определению оптимальных параметров получения микронизированной субстанции мецигестона и максимального выхода микронизированной субстанции.

Микрокристаллическую форму мецигестона получали из его раствора в смеси дихлорметан/этанол 70:30 (v/v) методом распылительной сушки на нанораспылительной сушилке NANO Spray dryer BUCHI B-90 (BUCHI Labortechnik AG) с использованием замкнутого контура с инертным газом.

Для оценки влияния на размер частиц в ходе эксперимента меняли размер (4,0, 5,5 или 7,0 мкм) отверстий мембраны форсунки. Для увеличения выхода готового продукта варьировали также концентрация исходного раствора и температура в распылительной камере. В качестве исходного раствора были использованы образцы с 1%-ной концентрацией мецигестона. Этот раствор распыляли при разных температурах внутри камеры (табл. 8). Для каждого эксперимента брали 1 г образца. Высушенные частицы охлаждали до комнатной температуры в электростатическом коллекторе, полученный порошок собирали в пробирку и взвешивали. Относительные выходы (%) приведены в таблице 8. Морфологию и размер частиц высушенного порошка мецигестона изучали с помощью сканирующей электронной микроскопии (SEM).

На рисунках 12 и 13 приведены фотографии исходной субстанции мецигестона и его микронизированной формы.

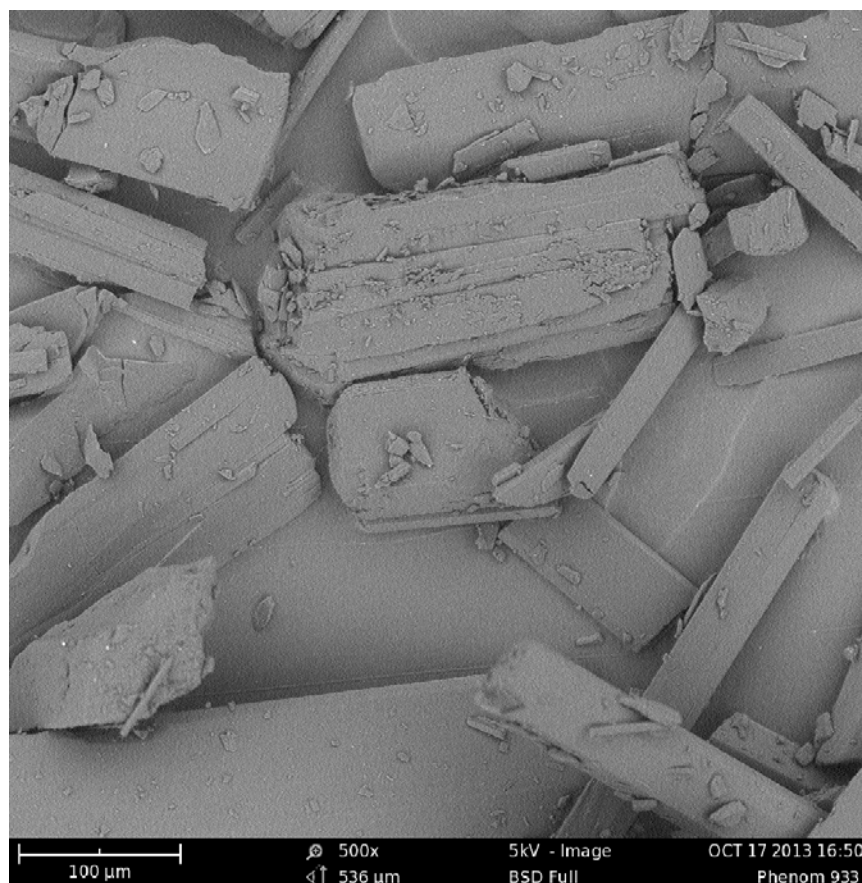


Рисунок 12 – Электронная микроскопия исходной субстанции мецигестона

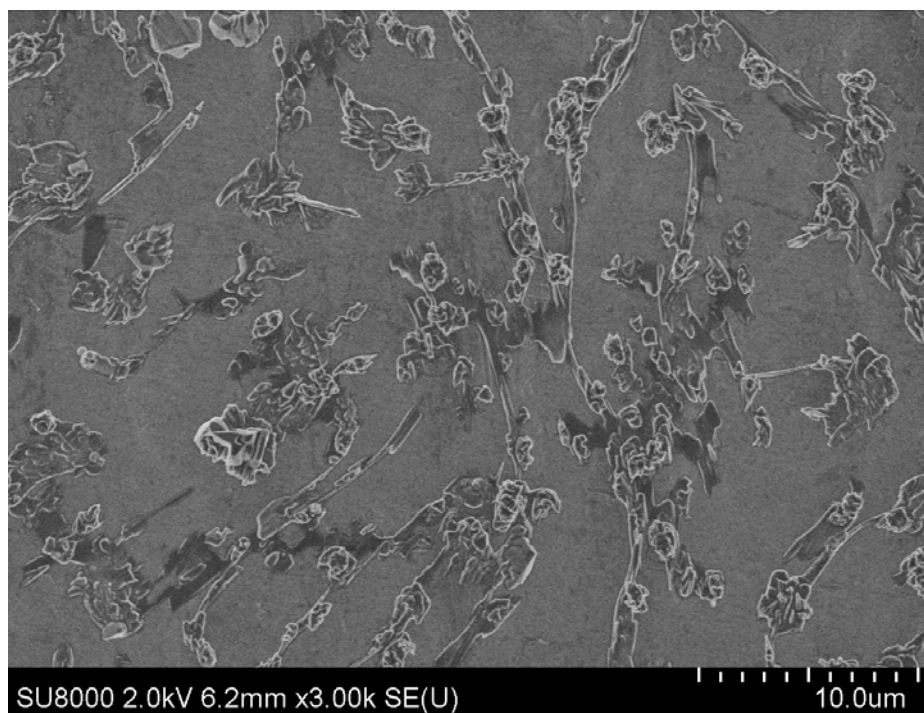


Рисунок 13 – Электронная микроскопия микронизированной субстанции мецигестона

Исходная субстанция (рис. 12) имеет размер 200 мкм, а после микронизации (рис.13) - не более 0,4-4 мкм (при использовании форсунки с диаметром отверстий 4 мкм), т.е. произошло более чем 50-кратное уменьшение размеров кристаллов мецигестона.

Так как объем распыления раствора за единицу времени имеет прямую зависимость от размера отверстий мембраны форсунки, нами были выбраны наиболее оптимальные скорости подачи растворенного препарата в распылительную камеру (рис.14).

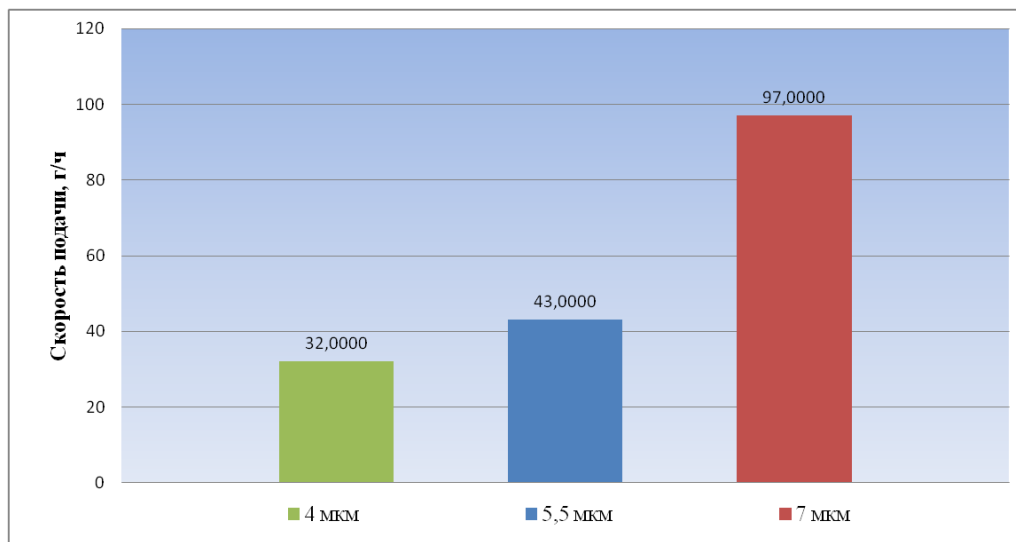


Рисунок 14 – Влияние размера отверстий мембраны распылительной форсунки на скорость подачи образцов

Результаты экспериментального исследования влияния концентрации образца, температуры на входе и размера отверстий мембраны распылительной форсунки на размер частиц, выход продукта и остаточное содержание растворителя представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Результаты экспериментального исследования микронизации мецигестона

Условия эксперимента	№ эксперимента							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Размер отверстий распылительной мембраны (мкм)	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	5,5	<b>4,0</b>
Содержание сухого мецигестона в растворе, %	<b>0,2</b>	<b>1,0</b>	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Температура на входе, °С	17	20	<b>25</b>	<b>30</b>	<b>35</b>	<b>40</b>	35	35
Т на выходе, °С	21	24	26	28	30	32	30	30
Т распылительной мембраны, °С	28	31	33	42	46	50	42	44
Время сушки, мин.	22	25	30	25	25	25	95	155
Выход продукта, мг	н. и.	227	285	310	418	410	444	370
Выход продукта, %	н. и.	45	57	62	83	82	88	74
Размер частиц, мкм	от 1 до 10	от 0,8 до 9	от 0,8 до 13	от 0,7 до 13	от 0,8 до 12	от 0,8 до 15	от 0,7 до 7	от 0,4 до 4
Остаточное содержание растворителя, %	0,15	0,14	0,14	0,14	0,10	0,10	0,10	0,10
Примечание: следующие параметры были неизменными: 70:30 дихлорметана к этанолу, 50 г раствора, воздух в качестве сушильного газа, расход сушильного газа - 140 л/мин, амплитуда колебания пьезоэлемента распылительной головки мембраны – 60% от максимально возможной, внутреннее давление - 60 мбар, скорость аспирации – 47 Гц, н. и. - не измерялся)								

Из табл. 8 видно, что при использовании мембраны с отверстиями диаметром 5,5 мкм большинство частиц имели размер в диапазоне от 0,7 до 7 мкм; при диаметре 4,0 мкм – в диапазоне от 0,4 до 4 мкм и при диаметре 7 мкм от 0,8 до 15 мкм. Общая концентрация раствора не влияет на размер и распределение частиц. Влияние температуры на входе на остаточное содержание растворителя было протестировано при температурах от 20°С до 40°С. Для этого эксперимента использовали мембрану распылительной форсунки с отверстиями размером 7

мкм и 1%-ный раствор мецигестона. Наименьшее остаточное содержание растворителя было установлено при 35°C и 40°C, которое составило 0,1%.

Таким образом, в процессе микронизации были установлены следующие факты:

– произошло более чем 50-кратное уменьшение размеров кристаллов (с 200 до 0,4-4 мкм), что, в свою очередь, увеличивает суммарную площадь поверхности и, предположительно, биодоступность мецигестона;

– в диапазоне температур на входе от 35 до 40°C наблюдается максимальное снижение остаточного содержания растворителя (до 0,10%).

– размер образующихся частиц и их распределение коррелирует с размером ° отверстий мембраны распылительной форсунки;

– при использовании мембраны с диаметром отверстий 4 мкм получают наименьшие по размеру кристаллы мецигестона (от 0,4 до 4 мкм) с наиболее узким диапазоном распределения частиц по размерам.

Выход целевого продукта составил от 45 до 88%.

Таким образом, метод распылительной сушки позволяет получить субстанцию мецигестона в микронизированном состоянии и изучить влияние морфологии и размера кристаллов субстанции на фармакокинетические показатели в экспериментах *in vivo*.

### 2.3.2. Получение самоэмульгирующейся системы с мецигестоном

Для разработки самоэмульгирующейся системы (SEDDS) с мецигестоном необходимо было прежде всего разработать состав из поверхностно активного вещества (ПАВ и соПАВ) и липидной фазы (предконцентрат).

Первой стадией исследований являлось определение растворимости мецигестона в липидной фазе и в вододиспергируемых и водонерастворимых ПАВ методом перенасыщения (рис.15).

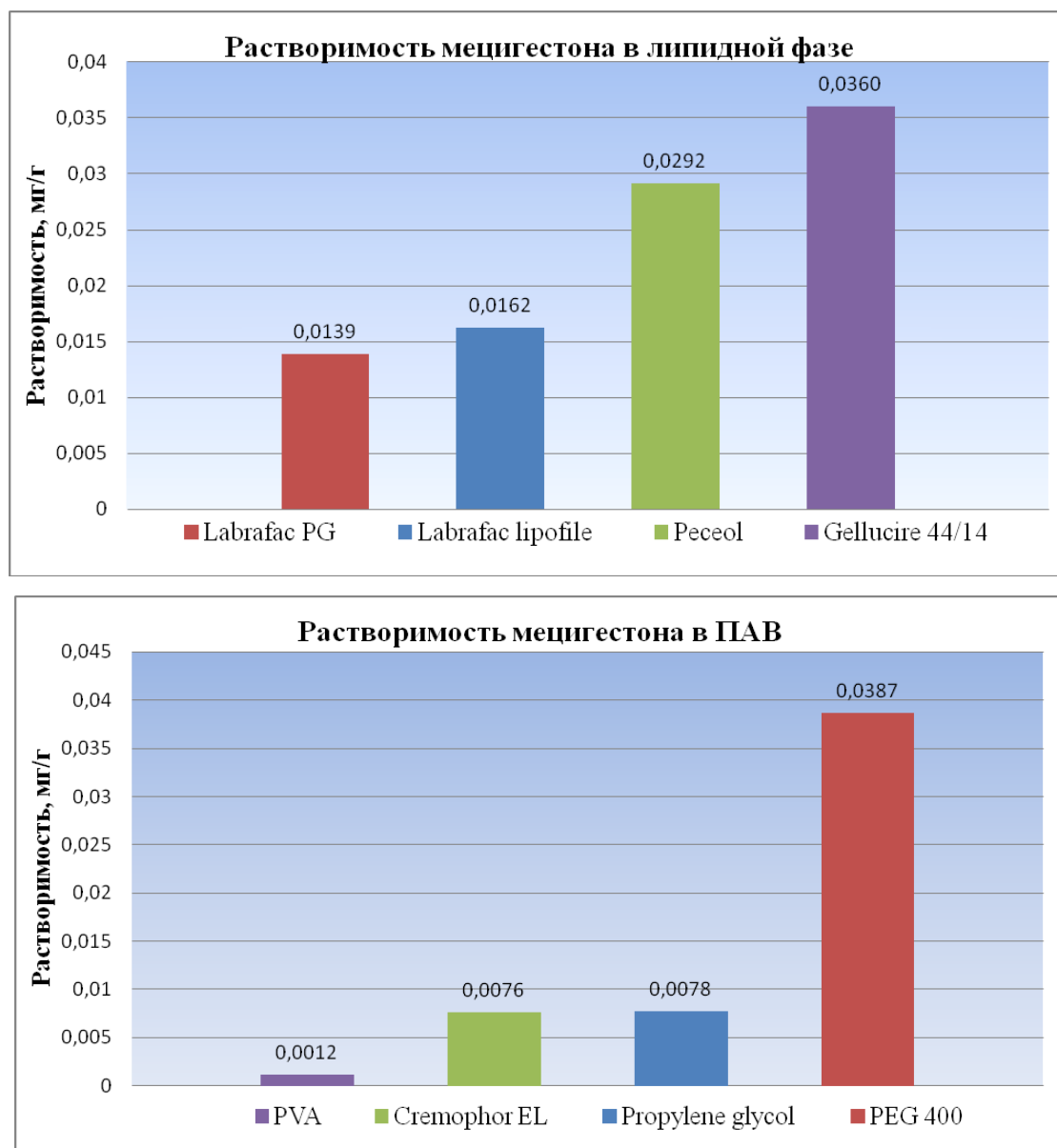


Рисунок 15 – Растворимость мецигестона во вспомогательных веществах

Из данных представленных на рис. 15 видно, что мецигестон обладает наибольшей растворимостью в липидной фазе Peceol, Gellucire 44/14 и в ПАВ PEG 400, и Propylene glycol.

Перенасыщенные растворы мецигестона в различных вспомогательных веществах (ВВ) готовились растворением его избытка (0,5 г) в 1 г ВВ. Полученную смесь встряхивали в течение 5 мин на вортексе, оставляли для установления



равновесия в роторном шейкере при комнатной температуре и 100 об/мин на 72 ч и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 мин для разделения нерастворившегося мецигестона и верхнего слоя. Последний отбирали и использовали в дальнейших экспериментах. Концентрацию мецигестона в растворе определяли методом ВЭЖХ. ВВ, используемые для SEDDS, должны обладать максимальной растворимостью для субстанции с целью обеспечения его максимальной солюбилизации [160].

В соответствии с классификацией LFCS нами был выбран тип эмульсии (3A) с высоким содержанием триглицеридов (липидной фазы), что обуславливает высокую растворимость в них липофильных веществ, к которым относятся стероиды, в том числе мецигестон. Исходя из этого, для каждого состава были выбраны четыре композиции, различающихся содержанием липидной фазы от 20 до 80% от массы смеси ПАВ, шаг 10%. Таким образом, в каждом составе представлено семь вариантов соотношений ПАВ+коПАВ/триглицериды. В качестве добавки для стабилизации эмульсии использован поливиниловый спирт (PVA).

Потенциальные комбинации мецигестона и ВВ выбирали на основании результатов его растворимости во ВВ. Соотношения ПАВ к ко-ПАВ оставались постоянными. Соотношение масла к смеси ПАВ и ко-ПАВ варьировалось от 2/8 до 8/2 с шагом 10%.

Для определения наименьшего количества ПАВ, необходимого для спонтанного образования микроэмульсии, в каждый образец предконцентрата массой 500 мг (5—95% по массе) вносили по капле – 25 мкл – (от 95 до 5% по массе) дистиллированной воды. Во время титрования образцы энергично встряхивали до полной гомогенизации (степень гомогенизации оценивали визуально, просвечивая образцы светом на темном фоне) [161]. Приемлемым результатом считалось образование прозрачного или слабо опалесцирующего раствора [162].

Для исследования были выбраны следующие соотношения компонентов:

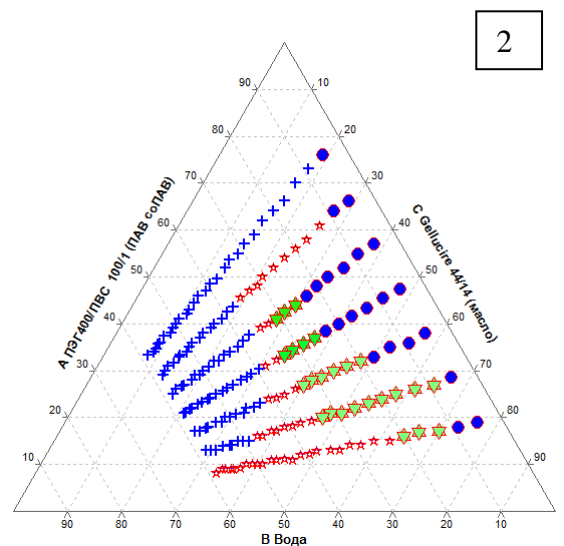
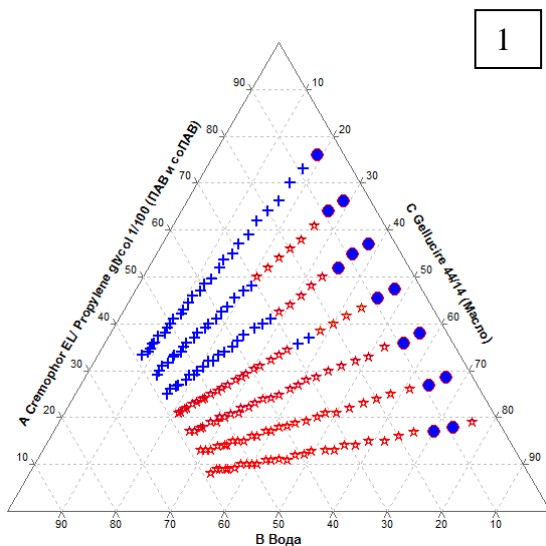
1. Gellucire 44/14/Cremophor EL/ Propylene glycol
2. Gellucire 44/14/PEG400/PVA
3. Peseol/Cremophor EL/ Propylene glycol

#### 4. Peseol/PEG400/PVA

Оценку эффективности образования микроэмульсий в зависимости от соотношения входящих в их состав компонентов проводили с помощью псевдотрехфазных фазовых диаграмм. Фазовые диаграммы были построены с использованием программного обеспечения Tri Plot V 4.1.3 (рис. 16).

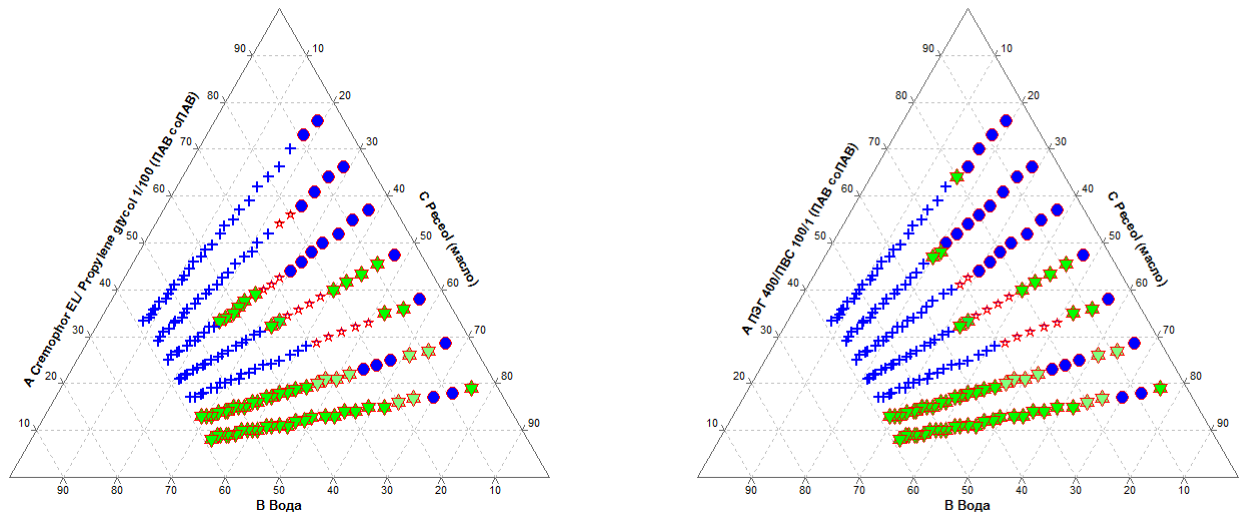
Исходя из данных рис. 16, наиболее перспективными для дальнейшего изучения с точки зрения соотношения вспомогательных компонентов являются микроэмульсии, полученные из предконцентратов, следующего состава:

- 1) Gellucire 44/14/Cremophor EL/ Propylene glycol (содержание Gellucire 44/14 40%);
- 2) Gellucire 44/14/PEG400/PVA (содержание Gellucire 44/14 70 %);
- 3) Peseol/Cremophor EL/ Propylene glycol (содержание Peseol 60 %);
- 4) Peseol/PEG400/PVA (содержание Peseol 60 %).



3

4



- 1 - Gellucire 44/14/Cremophor EL/ Propylene glycol содержание Gellucire 44/14 40%,
- 2 - Gellucire 44/14/PEG400/PVA содержание Gellucire 44/14 70 %,
- 3 - Peceol/Cremophor EL/ Propylene glycol содержание Peceol 60 %,
- 4- Peceol/PEG400/PVA содержание Peceol 60%.

● – эмульсия тип вода/масло, ■ – гель, ☆ – грубая эмульсия, + – микроэмульсия

Рисунок 16 – Псевдотроичные фазовые диаграммы, определяющие область существования микроэмульсий

Далее необходимо было оценить термодинамическую стабильность выбранных микроэмульсий. Для этого к 1 мл предконцентрата при перемешивании на скорости 100 об/мин добавляли 19 мл 10 мМ фосфатно-солевого буфера (PBS). После образования однородной эмульсии перемешивание прекращали и через определенные промежутки времени (2, 4, 6 и 8 ч) визуально оценивали образцы по фазовому разделению. Образцы, не показавшие признаков разделения через 8 ч седиментации, подвергали двум циклам замораживания/оттаивания по 4 ч каждый при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  и  $+25^{\circ}\text{C}$  соответственно. Распределение, размер и электрокинетический потенциал частиц полученных предконцентратов микроэмульсий до замораживания и после оттаивания определяли на анализаторе Malvern Zetasizer NanoZS (табл. 9).

Таблица 9 – Размеры,  $\zeta$ -потенциал и индекс полидисперсности частиц предконцентрата разного состава до и после двух циклов замораживания/оттаивания

Состав предконцентрата	До двух циклов замораживания / оттаивания, $\bar{x} \pm \sigma$			После двух циклов замораживания / оттаивания, $\bar{x} \pm \sigma$		
	размер, мкм	индекс полидисперсности	дзета-потенциал ( $\zeta$ ), мВ	размер, мкм	индекс полидисперсности	дзета-потенциал ( $\zeta$ ), мВ
Gellucire 44/14/Cremophor EL/ Propylene glycol (содержание Gellucire 44/14 – 40%)	1,808±0,12	0,245±0,027	+24,2±1,6	14,62±0,38	0,276±0,34	+23,8±1,7
<b>Gellucire 44/14/PEG400/PVA</b> (содержание Gellucire 44/14 – 70%)	<b>1,628±0,11</b>	<b>0,179±</b>	<b>+27±2,3</b>	<b>1,635±0,12</b>	<b>0,182±</b>	<b>+27,4±2,4</b>
Peceol/Cremophor EL/ Propylene glycol (содержание Peceol – 60%)	2,286±0,17	0,161±	+32,1±1,3	9,507±0,26	0,188±	+32,4±2,1
Peceol/PEG400/PVA (содержание Peceol – 60%)	6,92±0,23	0,130±	+36,1±1,9	20,48±0,76	0,222±	+35,8±2,6
Примечания: 1 $\bar{x} \pm \sigma$ – среднее арифметическое значение; 2 $\sigma$ – среднее квадратическое отклонение.						

Как следует из представленных данных, наибольшую стабильность при циклах замораживания/оттаивания показал образец предконцентрата Gellucire 44/14/PEG400/PVA (содержание Gellucire 44/14 – 70 %).

Таким образом, оптимальным для создания SEDDS является следующий состав вспомогательных веществ: Gellucire 44/14/PEG400/PVA (содержание Gellucire 44/14 – 70 %).

SEDDS с мецигестонем изготавливали следующим образом: мецигестон добавляли при постоянном перемешивании в расплавленную при 60°C масляную фазу предконцентрата (Gellucire 44/14). Концентрация мецигестона составляла 5% от общей массы ВВ (см. рис.8). Систему ПАВ готовили отдельно путем смешивания PEG400 и PVA в соотношении 100:1. Масляный раствор, содержащий мецигестон, при температуре 60°C и постоянном перемешивании добавляли к системе ПАВ. Перемешивание продолжали до образования гомогенной смеси.

Распределение, размер и электрокинетический потенциал частиц полученных микроэмульсий определяли методом динамического светового рассеяния с

помощью Malvern Zetasizer NanoZS (рис.17). Для этого к 1 мл SEDDS (с мецигестоном) при постоянном перемешивании на магнитной мешалке добавляли 19 мл 10 мМ-ного PBS.

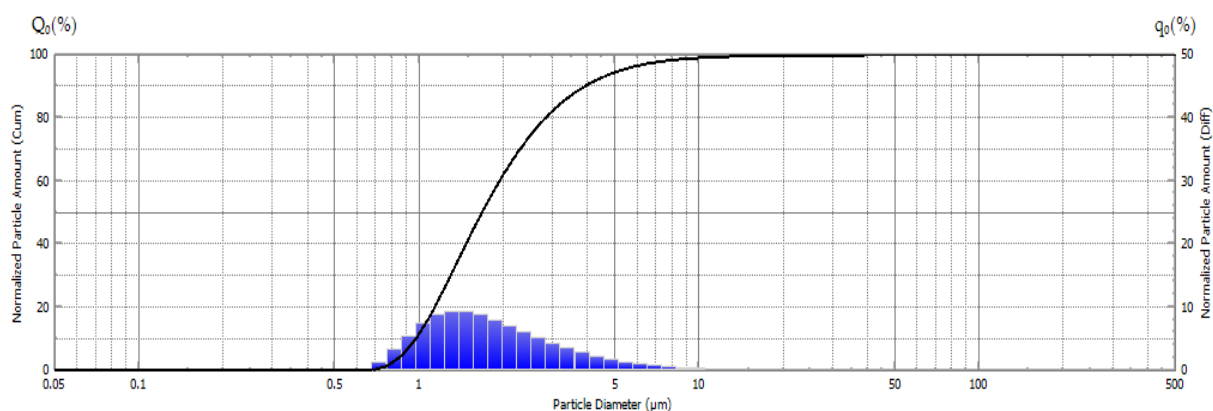


Рисунок 17 – Распределение, размер и электрокинетический потенциал частиц полученных микроэмульсий

По результатам измерений установлено, что средний размер частиц SEDDS составляет 1,6 мкм, индекс полидисперсности – 0,6,  $\zeta$ -потенциал +27 мВ.

Концентрацию мецигестона в образцах определяли методом ВЭЖХ-МС на хроматографе Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 с масс-спектрометрическим детектором LCQ Fleet. Результаты представлены на рисунке 18.

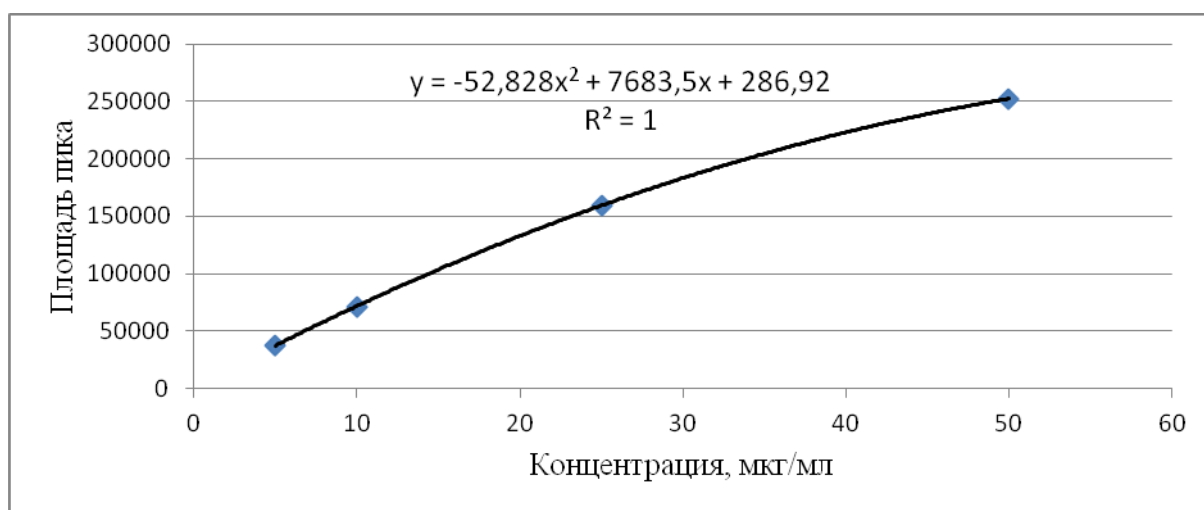


Рисунок 18– калибровочная кривая для определения мецигестона в SEDDS

Концентрация мецигестона в полученной самоэмульгирующейся системе составляет 4%.

Таким образом, в результате проведенных исследований получена стабильная самоэмульгирующаяся система следующего состава: мецигестон – 4%, Gellucire 44/14 – 70 %, полиэтиленгликоль PEG400 – 24,75%, поливиниловый спирт – 0,25%. Средний размер частиц полученной SEDDS составляет 1,6 мкм, индекс полидисперсности – 0,6, дзета-потенциал – +27 мВ.

### 2.3.3 Микрокапсулирование мецигестона

Технология микрокапсулирования позволяет заключать в полимерную оболочку вещества, находящиеся в различном агрегатном состоянии. Чаще всего осуществляется инкапсулирование жидких и твердых (кристаллических) веществ и их смесей. Из всего многообразия методов микрокапсулирования для инкапсулирования кристаллических веществ наилучшим образом подходят физико-химические методы, основанные на коацервации, поскольку они позволяют получить продукт с желаемыми свойствами при относительно мягких условиях и весьма простом аппаратном оформлении процесса. Данный метод заключается в возникновении в растворе полимера или полимеров капель, обогащенных растворенным полимерным веществом. Коалесценция образующихся капель приводит к разделению системы на два равновесных жидких слоя: с малым содержанием полимера и с повышенной его концентрацией. Вызвать коацервацию в растворе полимера можно различными способами. Для микрокапсулирования мецигестона был выбран метод разделения фаз путем введения осадителя, позволяющий получать микрокапсулы с содержанием действующего вещества до 80%. Этот метод достаточно прост по сравнению с другими технологиями микрокапсулирования и легко может быть масштабирован вплоть до уровня промышленного производства [163]. При разработке технологии мы учитывали скорость введения осадителя, соотношение «действующее вещество/полимер», соотношение «растворитель/осадитель», температуру процесса и выбор полимера для оболочки капсулы. Система «растворитель/осадитель» является одним из важных параметров. От нее зависят процесс коацервации и свойства оболочек микрокапсул [164,165]. Чаще всего в фармацевтической промышленности в качестве полимерной основы для оболочек микрокапсул применяют этилцеллюлозу, метилцеллюлозу и гипромеллозу. Все перечисленные полимеры являются продуктами переработки целлюлозы, что определяет их относительно низкую стоимость и возможность получения в промышленных масштабах. Наиболее подходящим полимером является этилцеллюлоза благодаря тому, что она не растворима

в воде. Помимо этого, широкий интервал молекулярных масс коммерчески доступных видов этилцеллюлозы позволяет выбрать полимер с необходимой скоростью диффузии лекарственного вещества через оболочку микрокапсул.

Для изготовления микрокапсул были выбраны этилцеллюлоза (полимер); этилацетат, дихлорметан и ацетон (растворители) и циклогексан (осадитель).

Технология разделения фаз введением осадителя требует выбора осадителя, способного смешиваться с растворителем, в котором нерастворима этилцеллюлоза. Различия в растворяющих способностях ( $\Delta\delta$ ) растворителя и осадителя в системах «этилацетат/циклогексан» (Э/Ц), «дихлорметан/циклогексан» (Д/Ц), «ацетон/циклогексан» (А/Ц) составили 0,8; 1,5; 1,7 соответственно [166,167,168]. Как правило, чем ниже значение  $\Delta\delta$  системы, тем лучше смешиваются растворитель и осадитель. Начало коацервации влечет за собой обмен веществом между растворителем и осадителем путем диффузии, скорость которой тесно связана со способностью к смешиванию. Поэтому коацервация/разделение фаз проще и быстрее происходит в системе с низким значением  $\Delta\delta$ , чем в системе с высоким значением данного параметра.

Известно [169,170,171], что чем больше разница между растворяющими способностями растворителя и осадителя, тем ниже скорость высвобождения действующего вещества, и наоборот. Это может быть обусловлено тем, что в системах с высоким значением  $\Delta\delta$  коацервация/разделение фаз протекает медленно ввиду низкой способности к смешиванию между собой растворителя и осадителя; следовательно, зарегистрированная низкая скорость высвобождения лекарственного вещества микрокапсулами объясняется их плотной структурой. Напротив, в системах с низким значением  $\Delta\delta$  коацервация/разделение фаз, происходит настолько быстро, что образование замкнутой оболочки на поверхности икапсулируемых частиц не завершается из-за быстрого смешивания растворителя и осадителя, вследствие чего получают микрокапсулы с рыхлой оболочкой и высокой скоростью высвобождения действующего вещества. Отсюда для создания пролонгированных форм стероидных препаратов наибольший интерес



представляют системы «растворитель/осадитель» с высоким  $\Delta\delta$ . Нами была выбрана пара «ацетон/циклогексан» с  $\Delta\delta$ , равной 1,7.

Для определения соотношения растворитель/осадитель и оптимальной концентрации этилцеллюлозы в растворе была найдена область формирования коацервата этилцеллюлозы по троичной фазовой диаграмме (рис. 19). Для этого определили положение границы раздела фаз при смешивании различных соотношений этилцеллюлозы, ацетона и циклогексана после уравнивания системы. Смесь этилцеллюлозы с ацетоном перемешивали в течение 1 ч до полного растворения, затем в этот раствор добавляли различные объемы циклогексана, выдерживали в течение 24 ч и определяли количества этилцеллюлозы в двух фазах при различных условиях.

В раствор 4 г этилцеллюлозы в 60 мл ацетона добавляли различные количества циклогексана вплоть до помутнения раствора, смесь выдерживали 24 ч и разделяли надосадочную жидкость и коллоидную фазу. Количество этилцеллюлозы в надосадочной жидкости определяли после выпаривания. Осадок из коллоидной фазы удаляли, промывали, высушивали и взвешивали, а оставшуюся коллоидную фазу также высушивали и взвешивали. Все исследования проводили при трех температурных режимах – 2, 20 и 40°C: 40°C – температура, близкая к точке кипения ацетона, но не достигающая ее во избежание вскипания и, соответственно, вспенивания коацервата; +2°C – температура, близкая к минимально возможной для образования коацервата, т.к. при более низких температурах увеличится вязкость дисперсионной фазы. Полученные результаты представлены в таблице 10.

Таблица 10 – Количество этилцеллюлозы, оставшееся в надосадочной жидкости системы «ацетон/циклогексан» с  $\Delta\delta=1,7$  после выпаривания при различных температурных режимах (n=3)

Соотношение циклогексан/ацетон	Количество этилцеллюлозы, оставшееся в надосадочной жидкости после выпаривания при температуре, %, $x \pm \sigma$		
	2°C	20°C	40°C
1/5	72±0,4	100±0,6	100±0,61
2/5	48±0,25	74,2±0,38	98,7±0,54
3/5	31±0,8	43,8±0,25	84,8±0,46
4/5	17±0,12	34,1±0,27	69,4±0,51

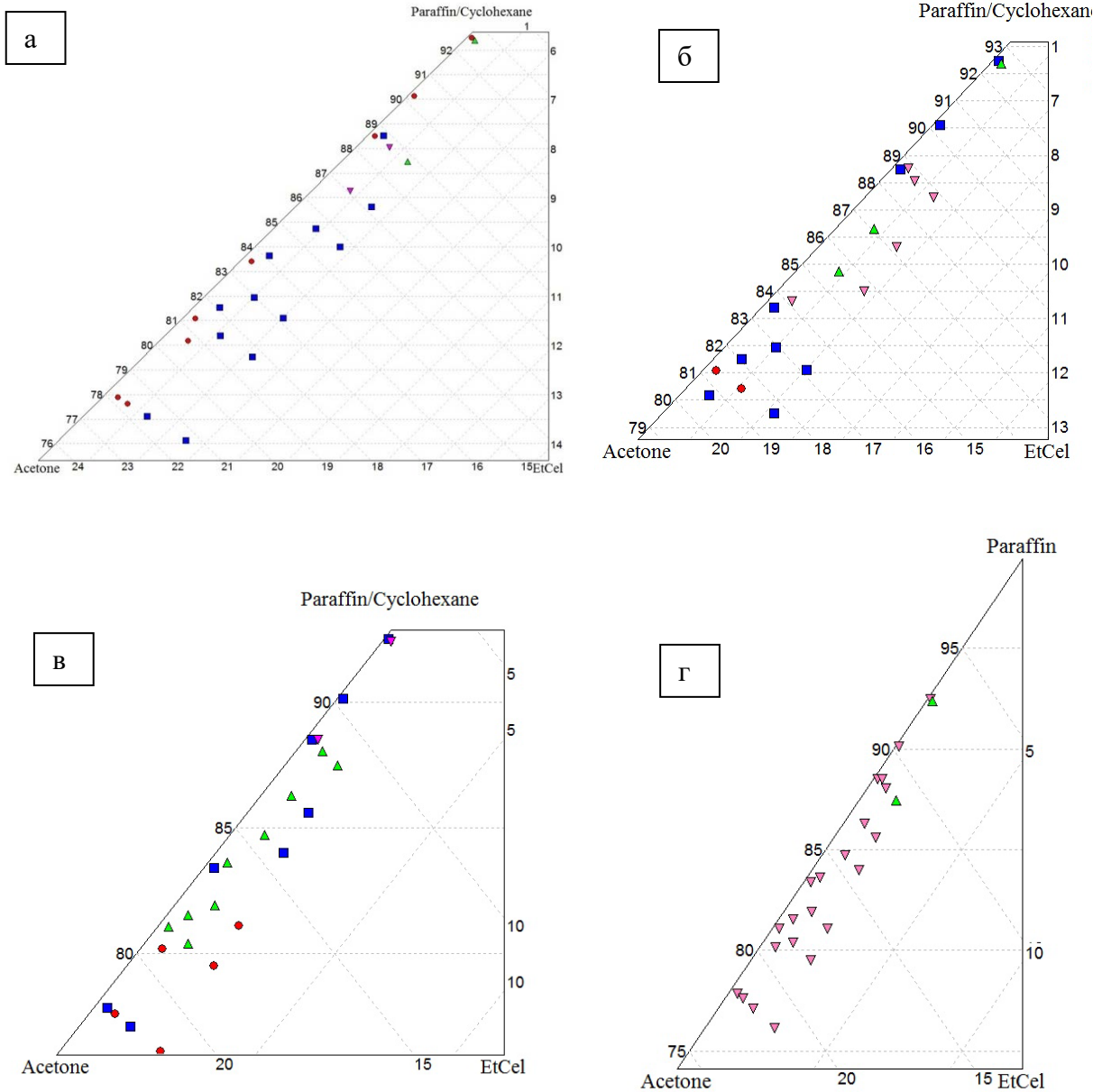
Соотношение циклогексан/ацетон	Количество этилцеллюлозы, оставшееся в надосадочной жидкости после выпаривания при температуре, %, $x \pm \sigma$		
	2°C	20°C	40°C
5/5	15,4±0,17	23,8±0,41	61,2±0,45
6/5	11,7±0,08	19,4±0,28	49,4±0,25
7/5	9,8±0,09	17,8±0,17	43,1±0,37
8/5	7,13±0,04	16,4±0,17	39,4±0,2
9/5	6,2±0,03	15,2±0,16	33,7±0,23
10/5	5,8±0,03	15±0,14	29,8±0,2
11/5	4,1±0,02	14,3±0,1	27,4±0,28
12/5	3,2±0,02	14,1±0,08	27±0,19
13/5	<b>2,1±0,02</b>	8,4±0,07	25,9±0,19

По результатам, приведенным в табл. 10, можно сделать вывод, что в уравновешенном растворе наименьшее количество этилцеллюлозы остается при более низких температурах, следовательно процесс микрокапсуляции будет наиболее эффективным при 2°C.

Для стабилизации образующегося коацервата мы впервые в дополнение к циклогексану ввели в систему жидкий парафин как дисперсионную среду, препятствующую агрегации микрокапсул.

Для определения оптимального соотношения осадителей циклогексан-жидкий парафин смешивали в пропорциях 3:2, 2:3, 1:9 и 0:1 (по массе) соответственно. В эту смесь добавляли 1,5%, 3%, 6% и 12%-ные растворы этилцеллюлозы. При более высоких концентрациях этилцеллюлозы в ацетоне получается вязкий гель, неприемлемый для микрокапсулирования. Предварительно охлажденные до 2°C компоненты смешивали в стеклянных пробирках с герметичными крышками, встряхивали до полного смешивания компонентов (1 мин) на вортексе и выдерживали 12 ч при температуре 4°C. Смесь контролировали на наличие помутнения (снижение показателя световой проницаемости); ресуспендируемого осадка (истинно твердые частицы, не прилипшие к внутренней поверхности пробирки); осадка, обладающего адгезивными свойствами (прилипающего к стенкам пробирки), или двух жидких фаз (различимое визуальное разделение смеси на два жидких компонента: мутный и прозрачный).

С целью определения области существования ресуспендируемого коацервата были построены троичные фазовые диаграммы (рис. 19).



а – ацетон, циклогексан/ жидкий парафин 3/2, б – ацетон, циклогексан/ жидкий парафин 2/3, в – ацетон, циклогексан/ жидкий парафин 1/9, г – ацетон, жидкий парафин. ● -прозрачный раствор, ■ - помутнение, ▲ -ресуспендируемый осадок, ▼ - адгезия.

Рисунок 19 – Троичные диаграммы фазового состояния этилцеллюлозы

В системе осадителя циклогексан-жидкий парафин (60:40) при 1,5–3%-ной концентрации этилцеллюлозы в растворе и большом избытке осадителя на диаграммах состояния появляется небольшой участок, отвечающий наличию ресуспендируемого осадка; при более высоких концентрациях этилцеллюлозы разделение фаз невозможно. Отсутствие адгезии, наблюдаемое между частицами

этилцеллюлозы, может указывать на образование отдельных одноядерных микрокапсул.

В системе осадителя циклогексан-жидкий парафин (40:60) образуется осадок с адгезивными свойствами. При меньших количествах жидкого парафина осадок способен к ресуспендированию и не прилипает к стенкам пробирки. Участок, который отражает наличие осадка (как ресуспендируемого, так и область помутнения) на диаграмме, занимает большую площадь по сравнению с соотношением циклогексан-жидкий парафин 60:40. Отсюда было целесообразно дальнейшее уменьшение концентрации циклогексана в составе осадителя.

Как видно из диаграммы, в системе с осадителем, состоящим из 10% циклогексана и 90% жидкого парафина, наблюдается хорошо выраженная область ресуспендируемого осадка практически на всем протяжении концентрации осадителя для системы с начальной концентрацией раствора целлюлозы 6%. Отсюда следует, что жидкий парафин больше подходит в качестве осадителя этилцеллюлозы, чем чистый циклогексан. На это указывает и отсутствие твердого осадка, отраженное на рисунке 15 (а и б).

Однако в системе, состоящей только из жидкого парафина в качестве осадителя, практически весь осадок приобретает адгезивные свойства (рис. 11, г). Этилцеллюлоза формирует липкие твердые образования в всем диапазоне концентраций и получившиеся микрокапсулы характеризуются многоядерностью. К тому же диаграммы состояния (рис. 16, г) свидетельствуют о том, что микрокапсулирование происходит быстро, поскольку этилцеллюлоза осаждается на всем протяжении областей начала и завершения микрокапсулирования. Этилцеллюлоза начнет осаждаться сразу после добавления в систему, тут же формируя структуру оболочек. Форма ресуспендируемого осадка образуется только при очень высоких концентрациях осадителя.

Таким образом, мы определили, что для получения микрокапсулированных форм мецигестона наилучшим вариантом является система, состоящая из 6 %-ного раствора этилцеллюлозы в ацетоне и смеси осадителей «циклогексан/парафин» в соотношении 1/9 (рис. 15).

## Получение микрокапсул

Процедура получения этилцеллюлозных микрокапсул, содержащих мецигестон, представлена следующим образом: 0,6 г этилцеллюлозы растворяли в 10 мл ацетона для образования раствора полимера, в котором, в свою очередь, растворяли 0,06 г мецигестона. Полученный раствор эмульгировали в 95 мл жидкого парафина, содержащего 1% (в массово-объемном отношении) Span 80 (неионогенный ПАВ будет препятствовать возможной агрегации получаемых микрокапсул), при скорости перемешивания 1800 об/мин. Затем для осаждения этилцеллюлозы и содержащегося в растворе мецигестона по каплям (со скоростью 1,0—1,5 мл/мин) добавляли 5 мл циклогексана (осадитель). Перемешивание продолжал в течение 12 ч при 4°C. Микрокапсулы собирали фильтрованием, дважды промывали в 50 мл петролейного эфира, затем в 100 мл гептана. Микрокапсулы высушивали в течение 24 ч при комнатной температуре и нормальном атмосферном давлении.

Далее нами было изучено влияние основных параметров технологического процесса, влияющих на физические свойства микрокапсул и профиль высвобождения действующего вещества: концентрации полимера, типа и концентрации эмульгатора, а также соотношения «вещество/полимер» в следующих вариантах условий:

а) для исследования влияния концентрации полимера использовали три раствора полимера с разными концентрациями (6, 8 и 10% в масс-объемном отношении). Концентрация эмульгатора (Span 80) и соотношение «вещество/полимер» в каждой системе поддерживали на уровне 1% (в масс-объемном отношении) и 1:3 соответственно;

б) концентрация эмульгатора (Span 80) составляла 1,0; 1,50; 2,0% (в масс-объемном отношении), концентрация полимера и соотношение «вещество/полимер» — 6% (в масс-объемном отношении) и 1:10 соответственно;

в) четыре значения соотношения «вещество/полимер» (1/10, 1/5, 1/2 и 1/1) при концентрации полимера 6% (в масс-объемном отношении) и эмульгатора (Span 80) – 2,0% (в масс-объемном отношении).

Анализ размера частиц проводили с помощью прибора Malvern Morphologi 3GS.

Количество мецигестона в каждой серии опытов определяли методом ВЭЖХ (после растворения 10 мг микрокапсул в 2 мл дихлорметана). Каждый анализ проводился трижды. Результаты представлены в таблицах 11 и 12. Тест на растворимость проводили согласно ОФС 42-0049-07 [172].

Таблица 11 – Влияние концентрации полимера на размер микрокапсул и эффективность включения в них мецигестона (n=3)

Концентрация полимера, %	Средний диаметр микрокапсул, мкм, $\bar{x} \pm \sigma$	Содержание мецигестона, %, $\bar{x} \pm \sigma$	Выход, %, $\bar{x} \pm \sigma$
<b>6</b>	94±1,6	9,7±0,038	93±0,1
8	127±±2,3	9,5±0,34	91±0,12
10	158±2,8	9,8±0,36	87±0,08

Было показано, что при увеличении концентрации полимера наблюдается рост диаметра полученных микрокапсул, что связано с возрастающей вязкостью полимера. Потерь мецигестона практически не происходило, однако выход инкапсулированной субстанции уменьшался пропорционально увеличению концентрации полимера. Таким образом, для получения микрокапсул наименьшего размера оптимальной является 6%-ная концентрация полимера.

Для лучшего разделения фаз при эмульгировании (уменьшение агрегации эмульгируемого полимера) в систему необходимо добавлять неионогенный ПАВ Span 80 (см. табл. 12).

Таблица 12 – Влияние концентрации Span 80 на эффективность включения препарата и размер микрокапсул (n=3)

Концентрация ПАВ, %	Средний диаметр микрокапсул, мкм, $\bar{x} \pm \sigma$	Содержание мецигестона, %, $\bar{x} \pm \sigma$	Выход, %, $\bar{x} \pm \sigma$
1	94±1,3	9,7±0,34	98±0,17
1,5	92±1,0	9,7±0,35	97,4±0,17
<b>2</b>	88±0,9	9,8±0,38	98±0,21

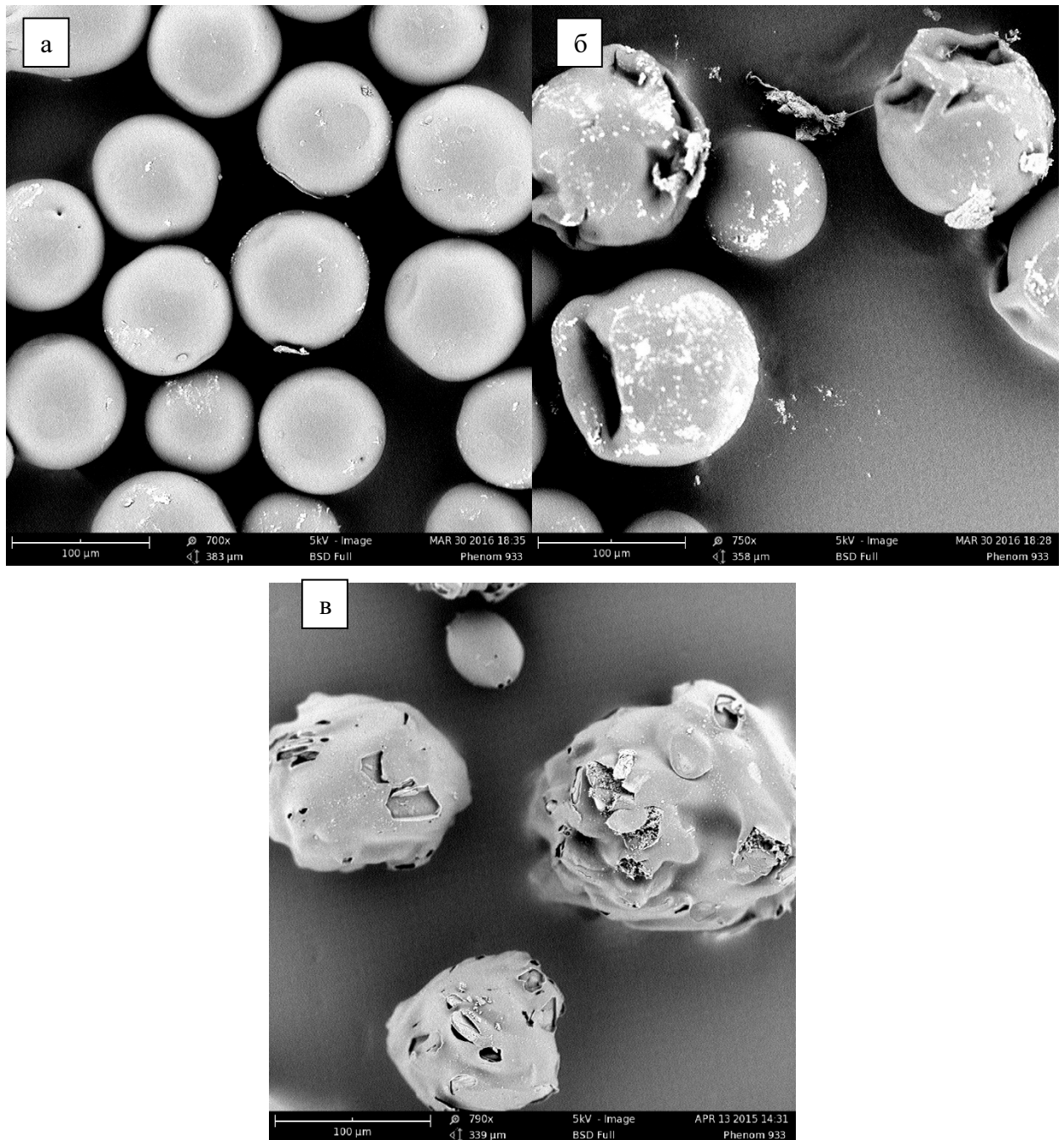
Наименьший размер частиц и наименьшие потери лекарственного вещества были зафиксированы при концентрации эмульгатора 2,0% (в масс-объемном отношении).

Влияние соотношения «действующее вещество/полимер» на физические свойства микрокапсул представлено в таблице 13.

Таблица 13 – Влияние соотношения «мецигестон/полимер» на физические свойства микрокапсул (n=3)

Соотношение «мецигестон/полимер»	Средний диаметр микрокапсул, мкм, $\bar{x} \pm \sigma$	Содержание мецигестона в микрокапсуле, %, $\bar{x} \pm \sigma$	Выход, % $\bar{x} \pm \sigma$
<b>1/10</b>	88±2,8	9,8±0,03	98±0,16
1/5	92±2,6	18,7±0,034	97,3±0,16
1/2	104±3,2	25,4±0,32	97,2±0,12
1/1	120±4,2	43,2±0,38	98,1±0,14

Как следует из представленных данных, при фиксированных количествах полимера и растворителя средний размер микрокапсул увеличивается с ростом соотношения «действующее вещество/полимер». Морфологию полученных микрокапсул оценивали при помощи сканирующей электронной микроскопии (рис. 20).



соотношение «мецигестон/полимер» а – 1/10, б – 1/5, в – 1/1

Рисунок 20 – Микрокапсулы, содержащие мецигестон.

Раствор с более высокой концентрацией мецигестона при соотношении «вещество/полимер» 1:1 склонен к образованию микрокапсул с неправильной формой и чуть большего размера, что обусловлено сокращением времени разделения фаз полимера и растворителей. Это, в свою очередь, ведет к выкристаллизации на поверхности микрокапсул инкапсулируемого мецигестона. Так, его потери при соотношении «вещество/полимер» 1:10 значительно меньше, чем при



соотношении 1:1, что связано с неоднородностью матрицы полимера из-за уменьшения содержания полимера в матрице.

Во всех опытах происходило формирование микрокапсул сферической формы. Однако рельеф поверхности микрокапсул, полученных при значениях соотношения «вещество/полимер» менее чем 1/10, был неровным, поскольку в данном случае инкапсулируемая субстанция выкристаллизовывается из полимера в виде конкреций.

Размер микрокапсул можно регулировать изменением либо концентрации полимера, либо скорости перемешивания. Оптимальными оказались 6%-ная концентрация полимера и скорость перемешивания 1200-1800 об/мин. При более высоких скоростях происходит вспенивание коацервата, а при снижении скорости ниже порогового значения происходит образование «зон застоя», что влечет за собой агрегацию частиц. При указанных скоростях диаметр образующихся частиц находится в пределах значений 88-216 мкм.

Таким образом, по результатам проведенных исследований можно сделать вывод, что наилучшими для приготовления микрокапсул диаметром 88-216 мкм при минимальных потерях мецигестона оказались следующие условия: 6%-ный (в масс-объемном отношении) раствор полимера, концентрация Span 80 – 2% (в масс-объемном отношении) и соотношение «мецигестон/полимер» 1:10.

#### **Кинетика высвобождения действующего вещества из микрокапсул**

Зависимость количества высвобождения мецигестона от размера микрокапсул была определена экспериментально. Для этого были наработаны три партии микрокапсул разного размера – 88, 140 и 216 мкм – при соотношения «мецигестон/полимер» 1:10. График, представленный на рисунке 21, отражает характер влияния размеров микрокапсул на количество и скорость высвобождения из них мецигестона. Концентрацию мецигестона в аликвотах проб (тест растворения) определяли методом ВЭЖХ-МС.

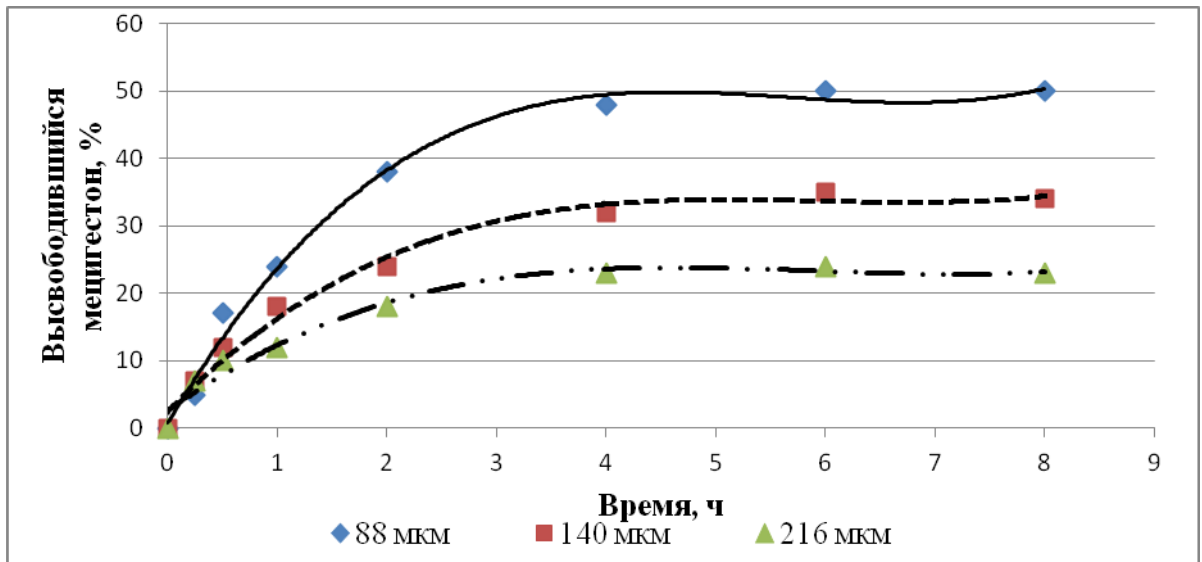


Рисунок 21 – Зависимость скорости высвобождения мецигестона от размера микрокапсул.

Установлено, что скорость высвобождения мецигестона из микрокапсул снижается при увеличении размера частиц. Как правило, чем меньше микрокапсулы, тем быстрее и полнее высвобождается лекарственное вещество. Такая закономерность обусловлена повышением суммарной площади поверхности микрокапсул.

Из данных, приведенных на рис. 21, следует, что лекарственное вещество высвобождается из микрокапсул не в полном объеме. Это объясняется плотной структурой полимера. Для того, чтобы количественно увеличить высвобождение препарата, было принято решение включить в состав микрокапсулы набухающий полимер — ацетобутират целлюлозы.

Ацетобутират целлюлозы — единственный из набухающих полимеров близкий к этилцеллюлозе по вязкости и растворимости в ацетоне [172]. Введение набухающего полимера за счет связывания молекул воды приводит к увеличению расстояния между цепями полимера, снижая тем самым плотность структуры микрокапсулы. Вводя данный полимер в матрицу разрабатываемой лекарственной формы, мы можем с большой точностью добиться заданного количества высвобождения из микрокапсул мецигестона.

Для определения оптимального количества ацетобутирата целлюлозы экспериментально исследовано его влияние на степень высвобождения мецигестона в зависимости от содержания: 1, 2 и 4% от массы полимера, результаты представлены на рисунке 22. Дальнейшее увеличение концентрации набухающего полимера будет способствовать еще большему возрастанию скорости высвобождения лекарственного вещества, что нецелесообразно, в частности, для пролонгированного препарата.

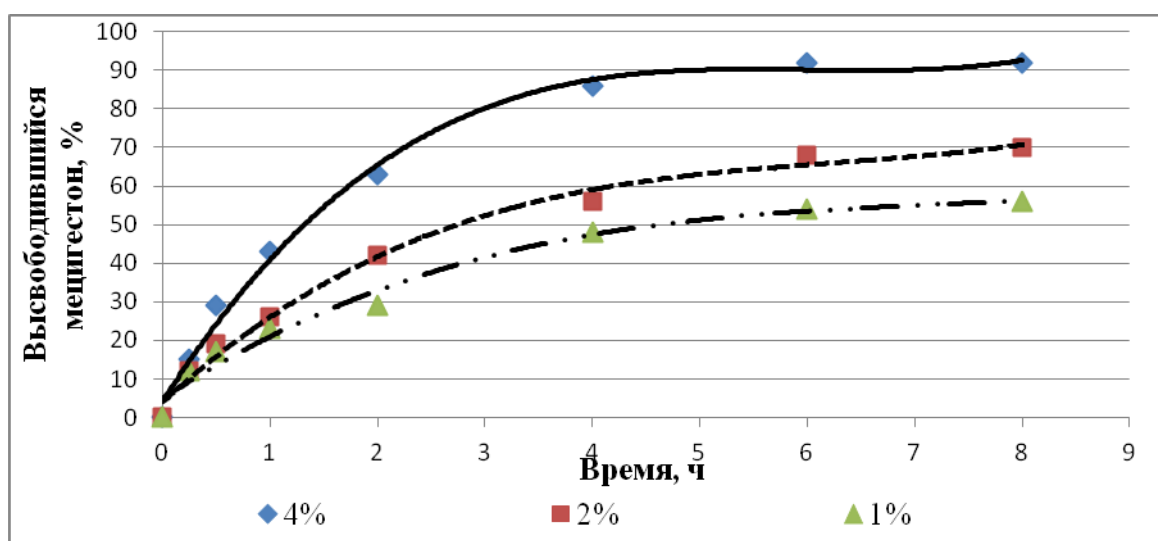


Рисунок 22 – Влияния количества набухающего полимера на степень высвобождения мецигестона микрокапсулами.

В результате установлено, что скорость высвобождения препарата из микрокапсул максимальна при 4%-ной концентрации ацетобутирата целлюлозы.

Таким образом, с помощью метода введения осадителя с использованием системы «ацетон/циклогексан/парафин» мецигестон может быть заключен в микрокапсулы с минимальными потерями. Процесс микрокапсуляции наиболее эффективно протекает при температуре +2°C. Для получения инкапсулированных форм мецигестона диаметром 88-216 мкм при минимальных потерях лекарственного вещества наиболее целесообразно использовать раствор этилцеллюлозы в ацетоне с концентрацией 6%, смесь осадителей «циклогексан/парафин» в

соотношении 1/9, Span 80 в концентрации 2% и значение соотношения «мецигестон/полимер» 1:10. Установлено, что наиболее полно мецигестон высвобождают микрокапсулы, содержащие 4% ацетобутирата целлюлозы в качестве набухающего полимера.

#### 2.4. Исследование фармакокинетических параметров полученных экспериментальных лекарственных форм мецигестона

Следующим этапом фармакокинетических исследований стало изучение сравнительной биодоступности разработанных лекарственных форм. Для этого были определены концентрации мецигестона в сыворотке крови крыс, рассчитаны основные фармакокинетические параметры, позволяющие охарактеризовать величины площадей под фармакокинетическими «кривыми» зависимости «концентрация-время» ( $AUC_{0-t}$ ), время достижения максимальной концентрации ( $T_{max}$ ) и значения максимальных концентраций ( $C_{max}$ ). В эксперименте использовали белых беспородных крыс-самцов массой 250-350 г. Мецигестон вводили внутривенно в виде суспензии в 0,3 %-ном водном растворе Tween 80 с использованием зонда. Дозировка препарата составляла 0,55 мг/кг. Забор крови производили из хвостовой вены по заданным интервалам времени через 30, 60, 90, 120, 180 мин.

Предварительно, так же как и в случае изучения метаболитов, были проведены исследования по определению условий, позволяющих с максимальной эффективностью экстрагировать целевое соединение из проб крови. Для выбора оптимальных методов проводили три типа экстракции, полученные данные представлены в таблице 14.

Таблица 14 – Результаты по определению коэффициента извлечения мецигестона из крови интактных животных

Тип экстракции	Тип объекта	Экстрагирующая система	Исходная концентрация, нг/мл	Концентрация измеренная, нг/мл	Коэффициент извлечения, %
Кислая	Кровь	Хлористый метилен	200	7,90	4
		Ацетонитрил		23,95	12
		Диэтиловый эфир/ трет-бутилметиловый эфир		51,16	<b>26</b>
		Гесан/хлористый метилен		21,54	11
		2-Бутанол/ 2-пропанол/ этилацетат		27,92	14
Щелочная	Кровь	хлористый метилен	200	2,7	1
		Ацетонитрил		16,66	8
		Диэтиловый эфир/ трет-бутилметиловый эфир		71,01	<b>35</b>
		Гесан/хлористый метилен		37,83	19
		2-Бутанол/ 2-пропанол/ этилацетат		44,54	22
Нейтральная	Кровь	Хлористый метилен	200	–	–
		Ацетонитрил		86,91	43
		Диэтиловый эфир/ трет-бутилметиловый эфир		128,61	<b>64</b>
		Гесан/хлористый метилен		71,02	35
		2-Бутанол/ 2-пропанол/ этилацетат		25,87	13

Приведенные в таблице 14 данные свидетельствуют о том, что наиболее оптимальной является система экстракции в нейтральных условиях при извлечении смесью диэтиловый/трет-бутилметиловый эфиры в соотношении (9:1). Коэффициент извлечения из крови в этом случае максимален и составляет 64%.

Для определения содержания мецигестона в крови использовали метод внешних стандартов. Идентификация мецигестона осуществлялась по

соответствию времени удерживания и масс-спектральных характеристик вещества, полученным по градуировочным и анализируемым растворам. На рисунке 23 приведена масс-хроматограмма градуировочного раствора мецигестона с концентрацией 200 нг/мл.

RT: 0.00 - 23.00 SM: 7G

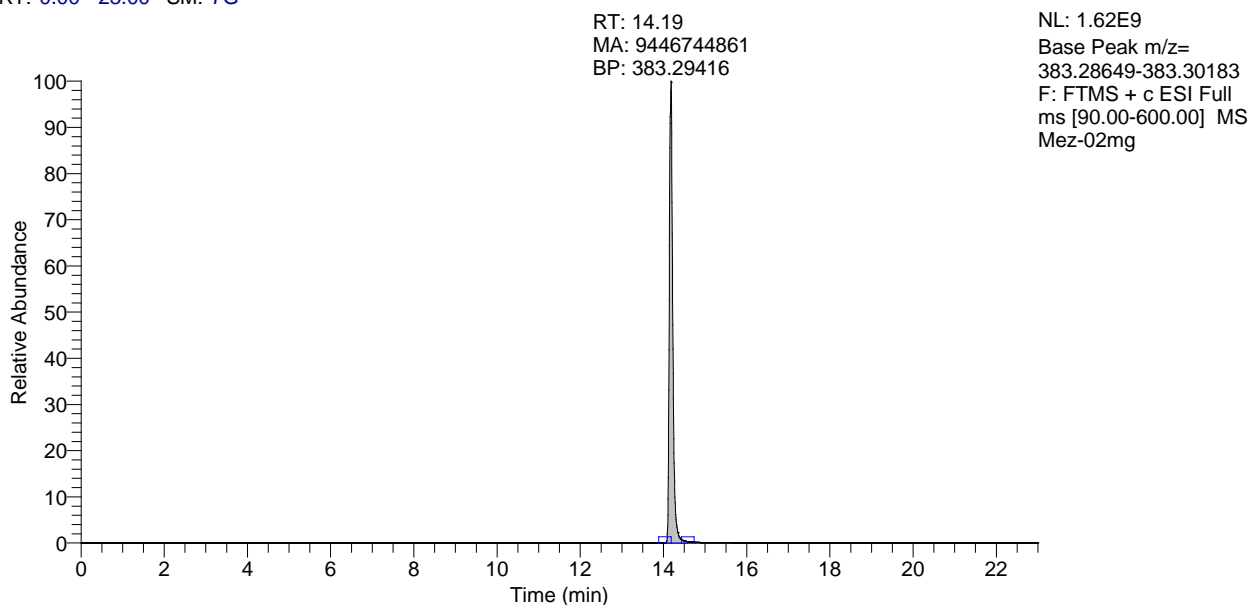


Рисунок 23 – Масс-хроматограмма раствора мецигестона с концентрацией 200 нг/мл.

Спектр мецигестона, полученный в режиме МС/МС, приведен на рисунке 24.

Mez-02mg #5890 RT: 14.18 AV: 1 SB: 1582 10.31-14.02, 14.40-18.39 NL: 2.73E8  
F: FTMS + c ESI Full ms2 383.30@hcd35.00 [53.33-800.00]

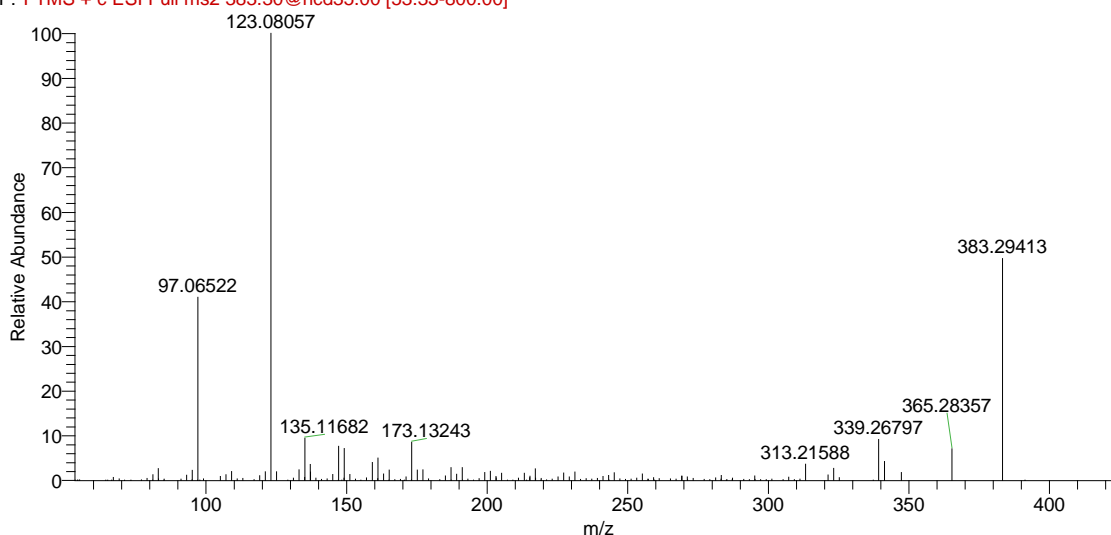


Рисунок 24 – Масс-спектр мецигестона, полученный в режиме МС/МС.

Предел детектирования по мецигестону при этих условиях хроматографирования и работы масс-спектрометра составляет 0,8 нг/мл по градуировочным растворам.

На рисунке 25 представлены усредненные фармакокинетические кривые содержания мецигестона в сыворотке крови крыс при однократном пероральном применении 0,55 мг/кг исходной субстанции и идентичной дозы микронизированного препарата.

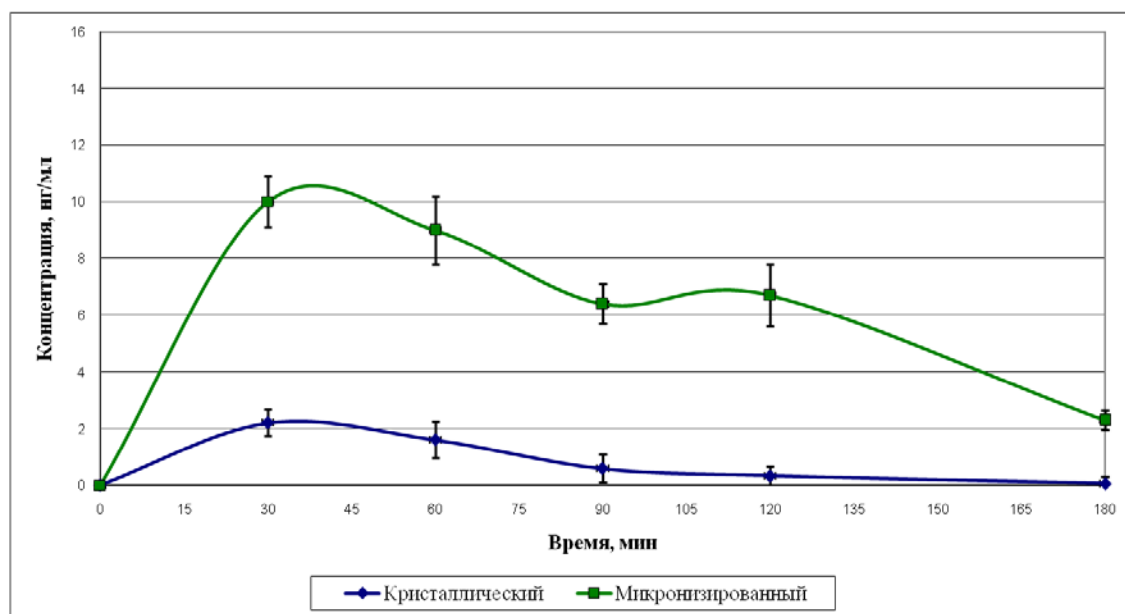


Рисунок 25 – Фармакокинетические профили мецигестона и его микронизированной формы

С целью оценки биодоступности мецигестона сравнивали значения максимальных концентраций ( $C_{max}$ ), времени их достижения ( $T_{max}$ ), площадей под фармакокинетическими кривыми (AUC) и отношения  $C_{max}/AUC$  микронизированной формы и исходной субстанции.

Из графиков, приведенных на рисунке 24, видно, что фармакокинетический профиль изменения концентрации мецигестона при применении микронизированной субстанции существенно отличается от профиля исходной субстанции мецигестона. В обоих случаях  $T_{max}$  фиксируется спустя примерно 40 мин;  $C_{max}$

для микронизированной субстанции стало достоверно выше (10,1 против 2,2 нг/мл). Скорости всасывания для обеих кристаллических форм мецигестона близки. Величина  $C_{\max}/AUC$ , отражающая скорость всасывания исходного и микронизированного препарата, составила  $0,014 \pm 0,003$  и  $0,009 \pm 0,002$  ч<sup>-1</sup> соответственно.

Наблюдаются достоверные различия в степени всасывания при применении микронизированной и исходной субстанции. Так, согласно расчетам площадь под усредненной фармакокинетической кривой (AUC) при применении исходной субстанции (R) составляет  $51,6 \pm 14,2$ , а при применении микронизированного препарата (T) –  $381,6 \pm 73,4$  нг/мл/ч. Относительная биодоступность микронизированного мецигестона (F), рассчитанная как отношение площадей под фармакокинетическими кривыми «концентрация—время», для тест- (T) и референс- (R) препарата составила:

$$F = AUC_{(T)}/AUC_{(R)} * 100\% = 747\%, \quad (15)$$

Таким образом, при одинаковых скоростях степень всасывания микронизированного мецигестона из желудочно-кишечного тракта превышает таковую при применении крупнокристаллической исходной субстанции в 7,5 раз.

По аналогичным фармакокинетическим параметрам был исследован микрокапсулированный препарат мецигестона (рис. 26).



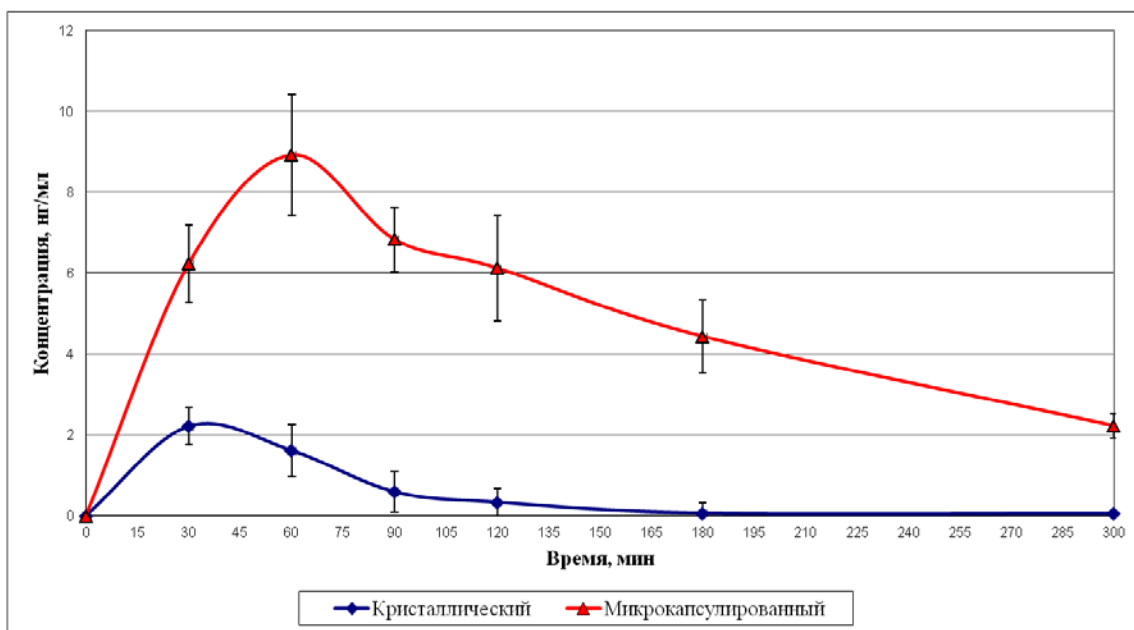


Рисунок 26 – Фармакокинетические профили мецигестона и его микрокапсулированной формы

Из данных, приведенных на графике, видно, что профиль концентрации мецигестона при применении микрокапсул существенно отличается от профиля исходной субстанции. В случае применения микрокапсулированного препарата  $T_{\max}$  смещается вправо и регистрируется спустя 60 мин;  $C_{\max}$  для микрокапсулированной формы стала достоверно выше (8,7 против 2,2 нг/мл). Скорости всасывания для обоих типов мецигестона близки. Величина  $C_{\max}/AUC$ , отражающая скорость всасывания исходного и микрокапсулированного препарата, составила  $0,024 \pm 0,003$  и  $0,043 \pm 0,002$  ч<sup>-1</sup>.

Таким образом, при одинаковых скоростях степень всасывания микрокапсулированного мецигестона из желудочно-кишечного тракта превышает такую при применении крупнокристаллической исходной субстанции в 6,9 раза.

Фармакокинетические параметры также были определены для самоэмульгирующейся системы (рис. 27).

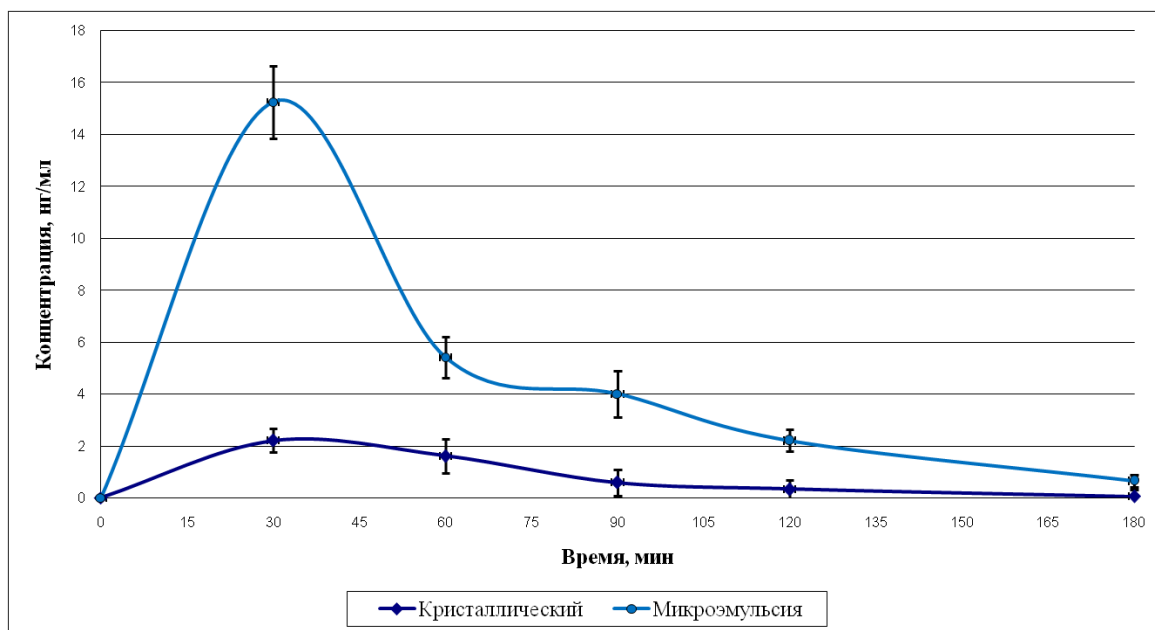


Рисунок 27 – Фармакокинетические профили мецигестона и самоэмульгирующей системы с ним

Из данных, приведенных на рис. 27, видно, что профиль концентрации мецигестона при применении SEDDS существенно отличается от профиля чистой субстанции. В обоих случаях  $T_{max}$  фиксируется спустя примерно 40 мин;  $C_{max}$  для микронизированной субстанции стало достоверно выше (15,2 против 2,2 нг/мл). Скорости всасывания для обеих лекарственных форм близки. Величина  $C_{max}/AUC$ , отражающая скорость всасывания исходного и микронизированного препарата, составила  $0,041 \pm 0,003$  и  $0,043 \pm 0,002$  ч<sup>-1</sup>.

Наблюдаются достоверные различия в степени всасывания при применении SEDDS мецигестона и исходной субстанции. Так, согласно расчетам площадь под усредненной фармакокинетической кривой (AUC) при применении исходной субстанции (R) составляет  $51,6 \pm 14,2$ ; при применении микронизированного препарата (T) –  $368,7 \pm 59,4$  нг/мл/ч. Относительная биодоступность SEDDS мецигестона (F), рассчитанная как отношение площадей под фармакокинетическими кривыми «концентрация – время», для тест- (T) и референс(R)-препарата составила 721%.

Таким образом, при одинаковых скоростях степень всасывания мецигестона в составе самоэмульгирующейся системы из ЖКТ превышает таковую при применении крупнокристаллической исходной субстанции в 7,2 раза.

## 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Температуры плавления определены на нагревательном столике Voetius со скоростью нагревания в точке плавления 4 °С в минуту и не корректировались. Спектры ПМР ( $\delta$  м.д.,  $\text{CHCl}_3$ , 30 °С) регистрировались на спектрометрах Bruker AM-300 (300,13 МГц для  $^1\text{H}$  и 75,5 МГц для  $^{13}\text{C}$ ) и Bruker AV-6 (600,13 МГц для  $^1\text{H}$  и 150,9 МГц для  $^{13}\text{C}$ ). В качестве стандарта использовали сигнал остаточного  $\text{CHCl}_3$  ( $\delta_{\text{H}}$  7,27 м.д. и  $\delta_{\text{C}}$  77,0 м.д.). Двумерные спектры получали по стандартным методикам, содержащимся в программном обеспечении фирмы "Bruker". Масс-спектры высокого разрешения были зарегистрированы на приборе Bruker micrOTOF II методом электрораспылительной ионизации (ESI). Измерения выполнены на положительных (напряжение на капилляре – 4500 В) ионах. Диапазон сканирования масс —  $m/z$  50—3000 Да, калибровка — внешняя (Electrospray Calibrant Solution, Fluka). Растворы веществ в MeOH или  $\text{CH}_3\text{CN}$  вводили через шприц (скорость ввода 3 mL/min). Газ-распылитель — азот (8 л/мин), температура интерфейса — 200 °С. Аналитическую ТСХ проводили на пластинах Silica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck). Вещества обнаруживали 1%-ным раствором  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$  в 10%-ном водном растворе  $\text{H}_2\text{SO}_4$  с последующим прогревом. Для препаративного разделения использовали хроматографию на колонке с силикагелем Kieselgel 60 (0,063-0,200 мкм) (Merck) при соотношении вещество-сорбент = 1 : 40. Растворители очищали по стандартным методикам. Под обычной обработкой органических экстрактов имеется в виду их промывание до нейтральной реакции промывных вод, высушивание  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и упаривание в вакууме. Выходы индивидуальных продуктов даны на перекристаллизованные образцы.

3.1. Синтез 6 $\alpha$ -метил-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексанопрогестерона (мецигестона)**Ацетат 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогекс-3',4'-енопрегн-5-ен-3 $\beta$ -ол-20-она (3)**

а) К перемешиваемой суспензии 10 г (28 ммоль) тщательно высушенного ацетата 16-дегидропрегненолона **2** и 0,8 г (6 ммоль) безв. AlCl<sub>3</sub> в 40 мл сух. хлористого метилена при -10°C прибавили 6 мл (70 ммоль) свежеперегнаного 1,3-бутадиена и продолжали перемешивание в течение 3 ч. Затем убрали охлаждение, дали температуре реакционной массы подняться до комнатной и оставили стоять еще 10 ч (контроль ТСХ). Реакционную смесь пропустили через слой окиси алюминия, сорбент промыли толуолом и окончательно хлороформом. Объединенные элюаты упарили, к полученному остатку прибавили петролейный эфир и отфильтровали полученный кристаллический осадок. Получено 9,85 г (86%) ацетата 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогекс-3',4'-енопрегн-5-ен-3,20-диона (**3**) с т.пл. 166-168°C (ацетон-гексан). Спектр ЯМР <sup>1</sup>H ( $\delta$ , м.д.): 0,72 (с, 3 H, Me(18)); 1,01 (с, 3 H, Me(19)); 2,02 (с, 3 H, 3-OAc); 2,15 (с, 3 H, Me(21)); 3,10 (м, 1 H, H(16)); 4,60 (м, 1 H, H(3)); 5,38 (м, 1 H, H(6)); 5,80 (м, 2 H, H(3'), H(4')).

б) К перемешиваемой суспензии 10 г (28 ммоль) тщательно высушенного ацетата 16-дегидропрегненолона **2** и 0,8 г (6 ммоль) безв. AlCl<sub>3</sub> в 40 мл сух. хлористого метилена прибавили при -10 °C 6 мл (70 ммоль) свежеперегнаного 1,3-бутадиена и перемешивание продолжали в течение 3 ч. Затем охлаждение убрали, давали температуре реакционной массы подняться до комнатной и оставили стоять еще 10 ч (контроль ТСХ). Реакционную смесь разбавили хлористым метиленом, обработали 30 мл насыщ. раствора Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, органический слой отделили и промыли водой, водный экстрагировали хлористым метиленом. Объединенные органические слои промыли водой, сушили MgSO<sub>4</sub> и большую часть растворителя удалили. К полученному остатку добавили петролейный эфир и выпавший осадок отфильтровали, промыли на фильтре петролейным эфиром и сушили на воздухе. Получено 9,95 г (87%) ацетата 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогекс-3',4'-енопрегн-5-ен-3,20-диона **3** с т.пл. 166-8°C (ацетон-гексан).

в) К перемешиваемой суспензии 10 г (28 ммоль) тщательно высушенного ацетата 16-дегидропрегненолона **2** и 0,8 г (6 ммоль) безв.  $AlCl_3$  в 150 мл толуола прибавили при  $-10^\circ C$  6 мл (70 ммоль) 1,3-бутадиена и продолжили перемешивание в течение 5 ч. Затем охлаждение убрали, температуре реакционной массы дали подняться до комнатной и оставили стоять еще 10 ч (контроль ТСХ). Реакционную смесь пропустили через слой сорбента – окись алюминия. После обработки, аналогичной описанной в примере а), получено 9,7 г (85%) г соединения (**3**).

#### **Ацетат 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексанопрегн-5-ен-3 $\beta$ -ол-20-она (4).**

В реактор загрузили 400 мл диоксана и добавили 20,5 г (100 ммоль) ацетата 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогекс-3',4'-енопрегн-5-ен-3 $\beta$ -ол-20-она **3**. В среднюю часть реактора поместили высокопористый ячеистый катализатор, содержащий 0,5% палладия. Реактор с помощью зажима закрепили на качалке. Свободный объем реактора заполнили водородом до 5 атм. и включили перемешивание (качалка). Через 3 ч гидрирование закончили (контроль ТСХ), реакционную массу выгрузили и реактор (и катализатор) промыли диоксаном. От объединенного органического раствора удалили растворитель и получили 20,0 г (колич.) кристаллического ацетата 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексанопрегн-5-ен-3 $\beta$ -ол-20-она (**4**) с т.пл. 184-187 $^\circ C$  (ацетон-гексан). Спектр ЯМР  $^1H$  ( $\delta$ , м.д.): 0,73 (с, 3 H, Me(18)); 1,01 (с, 3 H, Me(19)); 2,02 (с, 3 H, 3-OAc); 2,15 (с, 3 H, Me(21)); 3,10 (м, 1 H, H(16)); 4,60 (м, 1 H, H(3)); 5,38 (м, 1 H, H(6)).

#### **16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексанопрегн-4-ен-3,20-дион (8)**

Суспензию 4,1 г (10 ммоль) ацетата **4** в 70 мл MeOH и 1,3 г KOH в 6 мл  $H_2O$  перемешивали при 40  $^\circ C$  3 ч. Реакционную смесь нейтрализовали 10%-ной соляной кислотой, вылили в 400 мл ледяной воды и отфильтровали выпавший осадок. После высушивания на воздухе получили 3,7 г хроматографически однородного 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексанопрегн-5-ен-3 $\beta$ -ол-20-она, который далее окислили по Опенауэру кипячением с 2,3 г  $Al(Pr^iO)_3$  и 22 мл циклогексанона в 80 мл толуола в течение 3 ч. Реакционную смесь подкислили разбавленной AcOH,

органический слой отделили, промыли до нейтральной реакции промывных вод, высушили безв.  $MgSO_4$  и растворитель удалили в вакууме. Получено 2,57 г (70%) сопряженного кетона **8** с т.пл. 201-204°C (ацетон). Спектр ЯМР  $^1H$  ( $\delta$ , м.д.): Спектр ЯМР  $^1H$  ( $\delta$ , м.д.): 0,73 (с, 3 H, Me(18)); 1,15 (с, 3 H, Me(19)); 2,15 (с, 3 H, Me(21)); 3,0 (м, 1 H, H(16)); 5,78 (уш.с, 1 H, H(4)).

**3-Метокси-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексанопрегна-3,5-диен-20-он (9).** К суспензии 1 г (2,7 ммоль) сопряженного кетона **8** в 15 мл  $CH(OMe)_3$  и 40 мл безв. MeOH добавили 200 мг п-толуолсульфокислоты и перемешивали на магнитной мешалке при 26–28 °C в течение 1 ч (ТСХ – контроль: элюент - гексан: ацетон = 2:1 и 1 капля  $Et_3N$ ). По окончании реакции в реакционную массу добавили несколько капель триэтиламина до ее обесцвечивания и при температуре 15–16 °C небольшими порциями прибавили раствор 300 мл  $H_2O$  и 10 мл 25%-ного водного  $NH_3$ . Полученную суспензию выдержали при этой температуре 30 мин, кристаллический осадок отфильтровали, промыли водой и сушили на воздухе. Получено 0,98 г диенола **9** с т.пл. 168-173 °C (выход 94%). Спектр ЯМР  $^1H$  ( $\delta$ , м.д.): 0,70 (с, 3 H, Me(18)); 0,98 (с, 3 H, Me(19)); 2,15 (с, 3 H, Me(21)); 2,98 (м, 1 H, H (16)); 3,55 (с, 3 H, OMe); 5,13 (д,  $J=1,2$  Гц, 1 H, H (4)); 5,22-5,25 (м, 1 H, H (6)).

**6-Формил-3-метокси-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексанопрегна-3,5-диен-20-он (10).** К раствору 0,7 г (1,8 ммоль) 3-метилового енольного эфира **9** в 30мл DMF при 5°C при перемешивании на магнитной мешалке прибавили раствор Вильсмейера, полученный из 0,34 мл (3,6 ммоль)  $POCl_3$  и 9 мл DMF. Реакционную массу выдержали 1 ч при 5 °C (контроль ТСХ : элюент гексан : ацетон = 1:1, 1 капля  $Et_3N$ ) и небольшими порциями при перемешивании вылили в охлажденный до 15 °C 100 мл 5%-ный водного раствора  $K_2CO_3$ , содержащего 5 г NaCl. Выпавший осадок отфильтровали, промыли водой до pH 7 и сушили при комнатной температуре. Получено 0,71 г альдегида **10** с т.пл. 117-121°C (выход 95%)  $[\alpha]_D -26.8$  (с 1.0). Масс-спектр: Найдено:  $m/z$  433,2713  $[M+Na]^+$   $C_{27}H_{38}O_3$ . Вычислено:  $M = 410,2820$ . Спектр ЯМР  $^1H$  ( $\delta$ , м.д.): 0,70 (с, 3 H, Me(18)); 1,12 с (3 H, Me(19)); 2,15

(с, 3 Н, Me(21)); 2,98 (м, 1 Н, Н (16)); 3,65 (с, 3 Н, OMe); 6,30 (с, 1 Н, Н (4)); 10,28 (с, 1 Н, CHO).

**6-Метилидено-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексанопрегн-4-ен-3,20-дион (11).**

К раствору 0,7 г (1,7 ммоль) альдегида **10** в 40мл MeOH при 20-22°C и перемешивании небольшими порциями прибавили 0,37 г (9,7 ммоль) (5,7 – кратный избыток) NaBH<sub>4</sub> Реакционную массу перемешивали 30 минут при 20-22°C (контроль ТСХ: элюент - гексан : ацетон = 2:1), охладили до 10 °С, добавили по каплям конц. соляную кислоту до pH 2 и перемешивали в течение 1 ч при 10 °С. Затем реакцию массу разбавили 60 мл воды и экстрагировали хлористым метиленом (40 мл x 2). Экстракт промыли водой до pH 7, сушили сульфатом натрия и растворитель упарили в вакууме. Получено 0,6 г (92%) кристаллического целевого соединения **11** с т.пл. 182-185 °С (из смеси эфир-гексан).  $[\alpha]_D^{25} +144.4$  (с 1.40). Масс-спектр: Найдено:  $m/z$  403,2591 [M+Na]<sup>+</sup>. C<sub>26</sub>H<sub>36</sub>O<sub>2</sub>. Вычислено M = 391,2715. Спектр ЯМР <sup>1</sup>H ( $\delta$ , м.д.): 0,70 (с, 3 Н, Me(18)); 1,10 с (3 Н, Me(19)); 2,15 (с, 3 Н, Me(21)); 2,98 (м, 1 Н, Н (16)); 4,94-5.06 (д, 2 Н, 6 =CH<sub>2</sub>); 5,92 (с, 1 Н, Н (4)).

**6 $\alpha$ -метил-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексанопрегн-4-ен-3,20-дион (мецигестон) (1).**

Смесь 0,6 г (1.6 ммоль) 6-метилиденостероида **11**, 5 мл циклогексена и 0,2 г 5%-ного Pd/C в 40 мл EtOH кипятили при перемешивании 10 ч. По охлаждении реакционной смеси катализатор отфильтровали, в фильтрат добавили 0,05 мл конц. HCl и большую часть этанола удалили в вакууме. Выпавший после добавления воды кристаллический остаток отфильтровали, промыли водой и высушили на воздухе. Получено 0,57 г (94%) 6 $\alpha$ -метил-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексанопрегн-4-ен-3,20-диона **1** с т.пл. 178-177 °С. Спектр ЯМР <sup>1</sup>H ( $\delta$ , м.д.): 0,72 (с, 3 Н, Me(18)); 1,10 (д, J=7,1 Гц, 3 Н, Me(6)); 1,20 (с, 3 Н, Me(19)); 2,15 (с, 3 Н, Me(21)); 2,98 (м, 1 Н, Н (16)); 5,78 (с, 1 Н, Н (4)).



## 3.2. Синтезы метаболитов мецигестона и его 6-дезметильного аналога

**6 $\alpha$ -Метил-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексанопрегн-5 $\alpha$ -прегнан-20S-гидрокси-3-он (14a)** и **6 $\alpha$ -Метил-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексано-5 $\alpha$ -прегнан-20R-гидрокси-3-он (14b)**. К перемешиваемому раствору 320 мг Li в 40 мл аммиака при -50 °С в течение 3 мин прибавили раствор 1,14 г (3 ммоль)  $\Delta^4$ -3-кетостероида **1** в 45 мл ТГФ. Через 5 мин реакционную смесь обработали 1 г NH<sub>4</sub>Cl до обесцвечивания и после удаления аммиака разбавили водой и экстрагировали CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Полученный после обычной обработки твердый остаток (1.20 г) несколько раз перекристаллизовали из смеси ацетон—гексан. Получено 930 мг (81%) кристаллической смеси 3-кето-20-гидроксиэпимеров **14a** и **14b**. Порцию (220 мг) 20-гидроксиэпимеров **14a** и **14b** хроматографировали на колонке. При элюировании смесью CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>—гексан (1 : 2) с добавкой 1% ацетона выделено 56 мг индивидуального 20S-эпимера **14a** с т.пл. 194-196 °С (ацетон—гексан—CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). Масс-спектр: Найдено: m/z 387.3258 [M+H]<sup>+</sup> C<sub>26</sub>H<sub>42</sub>O<sub>2</sub>. Вычислено: M = 386.3185. Спектры ЯМР см. табл. 3. Дальнейшее элюирование смесью CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>—гексан (1 : 2) с добавкой 2% ацетона дало 86 мг индивидуального 20R-эпимера **14b** с т.пл. 229-232 °С (ацетон—гексан—CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). Масс-спектр: Найдено: m/z 387,3253 [M+H]<sup>+</sup>. C<sub>26</sub>H<sub>42</sub>O<sub>2</sub>. Вычислено: M = 386,3185. Спектры ЯМР см. табл. 3.

При дальнейшем элюировании системой с добавкой 3% ацетона из колонки выделено 40 мг смеси 3,20-дигидроксиэпимеров **14a,b**.

**6 $\alpha$ -Метил-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексано-3 $\beta$ ,20S-дигидрокси-5 $\alpha$ -прегнан (16a)** и **6 $\alpha$ -метил-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексано-3 $\beta$ ,20R-дигидрокси-5 $\alpha$ -прегнан (16b)**. После выдерживания в течение 50 мин реакционной смеси, полученной из 1,14 г  $\Delta^4$ -3-кетостероида **1** аналогично предыдущему опыту, и последующей стандартной обработки получено 0,9 г смеси эпимерных диолов **16a** и **16b**, которую очищали кристаллизацией (гексан—ацетон). Порцию (200 мг) из полученных кристаллов хроматографировали на колонке. При элюировании смесью CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>—гексан (1:2) с добавкой 3% ацетона выделено 54 мг индивидуального 20S-эпимера **16a** с т.пл. 250-253 °С (ацетон—гексан—CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). Масс-спектр: Найдено: m/z 411,3234

$[M+Na]^+$ .  $C_{26}H_{44}O_2$ . Вычислено:  $M=388,3341$ . Спектры ЯМР см. табл. 3. Дальнейшее элюирование дало 106 мг индивидуального 20R-эпимера **16b** с т.пл. 213–214 °С (ацетон—гексан). Масс-спектр: Найдено:  $m/z$  411,3234  $[M+Na]^+$ .  $C_{26}H_{44}O_2$ . Вычислено:  $M=388,3341$ . Спектры ЯМР см. табл.3.

**16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -Циклогексанопрегн-5 $\alpha$ -прегнан-3,20-дион (13) и 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексанопрегн-5 $\alpha$ -прегнан-20R-гидрокси-3-он (15)**. К перемешиваемому раствору 320 мг Li в 40 мл аммиака при -50 °С в течение 2 мин прибавили раствор 1,47 г (4 ммоль)  $\Delta^4$ -3-кетостероида **8** в 45 мл ТГФ. Через 5 мин реакционную смесь обработали 100 мг  $NH_4Cl$  до обесцвечивания и после удаления аммиака разбавили водой и экстрагировали  $CH_2Cl_2$ . Полученный после обычной обработки твердый остаток перекристаллизовали из смеси ацетон—гексан. Получено 1,15 г (77%) кристаллической смеси 3,20-дикето-5 $\alpha$ -стероида **13** и 3-кето-5 $\alpha$ -20R-гидроксистероида **15**, которую хроматографировали на колонке. При элюировании смесью  $CH_2Cl_2$ —гексан (1:2) с добавкой 0,3 →5% ацетона выделено 442 мг 5 $\alpha$ -прегнан-3,20-диона **13** с т.пл. 198—200 °С (ацетон—гексан). Масс-спектр: Найдено:  $m/z$  371,2945  $[M+H]^+$   $C_{25}H_{38}O_2$ . Вычислено:  $M=370,2872$ . Спектр ЯМР  $^1H$ : 0,70 (с, 3 H, Me(18)); 1,0 (с, 3 H, Me(19)); 1,15 (м, 1H, H(5)); 2,12 (с, 3 H, Me(21)), 2,97 (м, 1 H, H(16)). Дальнейшее элюирование дало 511 мг индивидуального 3-кето-20R-гидрокси-эпимера **15** с т.пл. 250–252 °С (ацетон—гексан). Масс-спектр: Найдено:  $m/z$  373,3101  $[M+H]^+$ .  $C_{25}H_{40}O_2$ . Вычислено:  $M=372,3028$ . Спектр ЯМР  $^1H$ : 0,92 (с, 3 H, Me(18)); 1,0 (с, 3 H, Me(19)); 1,15 (м, 1H, H(5)); 1,26 (д,  $J=7$  Гц, 3 H, Me(21)); 2,97 (м, 1 H, H(16)).

**6 $\alpha$ -Метил-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексанопрегн-5 $\alpha$ -прегнан-3,20-дион (20)**

Смесь 710 мг (1.85 ммоль) смеси диолов **16a,b**, 1,53 г (4.08 ммоль) PDC в 10 мл Ру выдержали при перемешивании в течение 10 ч при комнатной температуре. Реакционную смесь разбавили EtOAc, коричневый осадок отфильтровали, фильтрат промыли 10%-ной HCl до pH 5, 5%-ным  $NaHCO_3$  и полученный после обычной обработки остаток хроматографировали на колонке. При элюировании смесью петр.эфир—ацетон (5 →10%) выделено 570 мг (80%) дикетона **22** с т.пл. 218–220 °С. Масс-спектр: Найдено:  $m/z$  407,2913  $[M+Na]^+$ .  $C_{26}H_{40}O_2$ . Вычислено:  $M=$

384,3028. Спектр ЯМР  $^1\text{H}$ : 0,70 (с, 3 H, Me(18)); 0,82 (д,  $J=7,4$  Гц, 3 H, Me(6)); 1,06 (с, 3 H, Me(19)); 1,15 (м, 1H, H(5)); 2,15 (с, 3 H, Me(21)); 2,97 (м, 1 H, H(16)).

Дикетон **22** получен также в аналогичных условиях окисления из эпимерной смеси 20-гидроксистероидов **14a,b**.

**6 $\alpha$ -Метил-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексано-3 $\beta$ -гидрокси-5 $\alpha$ -прегнан-20-он (18).**

Смесь 350 мг дикетона **22**, 35 мг  $\text{NaBH}_4$  в 135 мл MeOH перемешивали 1 ч при комнатной температуре. По окончании реакции смесь вылили в ледяную воду, выпавший осадок отфильтровали, промыли водой, сушили на воздухе и перекристаллизовали из смеси ацетон—гексан— $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Получено 260 мг (74%) 3 $\beta$ -гидроксистероида **20** с т.пл. 296-297 °С. Масс-спектр: Найдено:  $m/z$  387,3249  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{26}\text{H}_{42}\text{O}_2$ . Вычислено:  $M = 386,3185$ . Спектр ЯМР  $^1\text{H}$ : 0,68 (с, 3 H, Me(18)); 0,82 (с, 3H, Me(19) и 3H, д,  $J=7.4$  Гц, Me(6)); 2,13 (с, 3 H, Me(21)); 2,97 (м, 1 H, H(16)); 3,57 (м, 1 H, H(3)).

Аналогично из 330 мг 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексано-5 $\alpha$ -прегнан-3,20-диона **13** получено 240 мг (73%) 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексано-3 $\beta$ -гидрокси-5 $\alpha$ -прегнан-20-она (**21**), т.пл. 224-229°С (ацетон-гексан). Масс-спектр: Найдено:  $m/z$  373,3101  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{25}\text{H}_{40}\text{O}_2$ . Вычислено:  $M = 372,3028$ . Спектр ЯМР  $^1\text{H}$ : 0,68 (с, 3 H, Me(18)); 0,82 (с, 3H, Me(19)); 2,13 (с, 3H, Me(21)); 2,97 (м, 1 H, H(16)); 3,60 (м, 1 H, H(3)).

Аналогично из 220 мг 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексанопрегн-5 $\alpha$ -прегнан-20R-гидрокси-3-она **15** получено 185 мг (84%) 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексано-3 $\beta$ ,20R-дигидрокси-5 $\alpha$ -прегнана (**19**), т.пл. 191-193 °С (ацетон-гексан). Масс-спектр: Найдено:  $m/z$  397,3077  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .  $\text{C}_{25}\text{H}_{40}\text{O}_2$ . Вычислено:  $M = 374,3185$ . Спектр ЯМР  $^1\text{H}$ : 0,70 (с, 3 H, Me(18)); 1,0 (с, 3H, Me(19)); 1,27 (д,  $J=7$  Гц, 3H, Me(21)); 4,01 (м, 1 H, H(20)).

**6 $\alpha$ -Метил-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексанопрегн-5 $\beta$ -прегнан-3,20-дион (17).** Раствор 500 мг  $\Delta^4$ -3-кетостероида **1** в 20 мл смеси THF—EtOH (1:1) и 0,06 мл конц. HBr гидрировали в присутствии 0.1 г 5% -ного Pd/C при атмосферном давлении. Катализатор отфильтровали, к фильтрату прибавили 1 мл воды и смесь выдержали при комнатной температуре 0.5 ч. Остаток, полученный после

удаления растворителей, перекристаллизовали из смеси  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ —гексан. Получено 390 мг соединения **7** с т.пл. 222-224°C. Масс-спектр: Найдено:  $m/z$  385,3106  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{26}\text{H}_{42}\text{O}_2$ . Вычислено:  $M = 384,3028$ . Спектр ЯМР  $^1\text{H}$ : 0,70 (с, 3 H, Me(18)); 0,82 (д,  $J=7,4$  Гц, 3 H, Me(6)); 1,02 (с, 3 H, Me(19)); 2,15 (с, 3 H, Me(21)); 2,97 (м, 1 H, H(16)).

Аналогично, из  $\Delta^4$ -3-кетостероида **6** получен **16a,17a-циклогексано-прегн-5 $\beta$ -прегнан-3,20-дион (18)**, т.пл. 198-203°C. Масс-спектр: Найдено:  $m/z$  371,2950  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{25}\text{H}_{38}\text{O}_2$ . Вычислено:  $M = 370,2872$ . Спектр ЯМР  $^1\text{H}$ : 0,70 (с, 3 H, Me(18)); 1,05 (с, 3 H, Me(19)); 2,15 (с, 3 H, Me(21)); 2,72 (м, 1H, H(5)); 2,97 (м, 1 H, H(16)).

### 3.3. Пробоподготовка мочи и крови лабораторных животных для аналитических исследований

Исследование проводили на самцах крыс линии Вистар, весом 250-350 г. Животные содержались на стандартной диете в проветриваемых клетках в виварии в отдельной комнате со световым режимом «12 ч – свет, 12 ч – темнота» при температуре 18-22 °C и относительной влажности 40-60 %. После поступления в виварий животные находились в карантине в течение 14 суток.

Перед началом исследований крысы были распределены на группы по 5-6 особей в каждой с помощью метода рандомизации. Критериями включения считали отсутствие внешних признаков заболеваний и гомогенность групп по массе тела ( $\pm 10\%$ ). В процессе эксперимента животные имели свободный доступ к питьевой воде и специализированному корму типа гранулированного ПК-120 без применения иных кормовых добавок и препаратов.

Экспериментальные образцы вводили внутрижелудочно в объеме 3 мл в дозе 0,55 мг/кг массы животного по корню языка. Контрольным животным вводили дистиллированную воду.

Перед введением, а также через 30, 60, 90, 120, 180 мин после начала эксперимента, у крыс отбирали кровь из хвостовой вены. Пробы крови отбирали в

вакуумные пробирки Vacuette для гематологии с ЭДТА в соответствии с инструкциями по взятию образцов крови для клинического анализа и наносилит на них лабораторную маркировку. Отобранные биопробы допускается хранить в холодильнике при температуре от 4 до 6 °С не более 1 суток и не более 30 суток при температуре не выше - 20°С. Далее проводили экстракцию и количественное определение образца в крови по вышеописанным методикам.

Экспериментальные исследования проб мочи проводили с использованием биологической модели белых беспородных крыс-самцов массой 250-350 г с использованием обменных камер типа «Metabolic cage for rats». Сбор мочи животных осуществляли с оценкой ее объема. Параллельно испытаниям опытных животных проводили оценку контрольных особей, получающих вместо исследуемых веществ растворитель. Контрольные образцы получали при том же пути введения в организм и в те же сроки. Животных маркировали и распределяли по группам. Не менее чем за два часа до начала исследований животных опытной и контрольной групп ограничивали доступ к пище при сохранении свободного доступа к воде.

Для проведения пробоподготовки выбрали процедуры, основанные на жидкость-жидкостной экстракции. С целью подбора оптимальных методов использовали щелочную, нейтральную и кислую экстракции различными экстрагирующими системами: хлористый метилен; ацетонитрил; смесь диэтилового и трет-бутилметилового эфиров в соотношении 9:1 (v/v); смесь гексана с хлористым метиленом в соотношении 85:15 (v/v); смесь *изо*-бутанол : *изо*-пропанол : этилацетат (40:30:30).

Кислую экстракцию для мочи проводили следующим образом: к модельному образцу мочи с концентрацией стероида 200 нг/мл объемом 2 мл вносили 1,0 мл PBS, 30 мкл β-глюкуронидазы, инкубировали в течение 80 мин, затем последовательно добавили 30-50 мкл концентрированной соляной кислоты, 1 г хлорида натрия и 5 мл органического растворителя или их смеси, тщательно перемешивали, центрифугировали, замораживали при температуре -70 °С в течение 40 мин. Надосадочный слой переносили в другую виалу, упаривали досуха, перерастворяли в 0,1 мл DMSO и анализировали.

Щелочную экстракцию для мочи проводили следующим образом: к модельному образцу мочи с концентрацией стероида 200 нг/мл объемом 2 мл вносили 1,0 мл фосфатного буфера, 30 мкл  $\beta$ -глюкуронидазы, инкубировали в течение 80 мин, последовательно добавляли 1,0 мл карбонатного буфера, 1 г хлорида натрия и 5 мл органического растворителя или их смеси, тщательно перемешивали, центрифугировали, замораживали при  $-70^{\circ}\text{C}$  в течение 40 мин, надосадочный слой переносили в другую виалу, упаривали досуха, перерастворяли в 0,1 мл DMSO и анализировали.

Нейтральную экстракцию для мочи проводили следующим образом: к модельному образцу мочи с концентрацией стероида 200 нг/мл объемом 2 мл вносили 1,0 мл фосфатного буфера, 30 мкл  $\beta$ -глюкуронидазы, инкубировали в течение 80 мин, вносили 1 г хлорида натрия и 5 мл органического растворителя или их смеси, тщательно перемешивали, центрифугировали, замораживали при  $-70^{\circ}\text{C}$  в течение 40 мин, надосадочный слой переносили в другую виалу, упаривали досуха, перерастворяли в 0,1 мл DMSO и анализировали.

Кислую экстракцию для крови проводили следующим образом: к модельному образцу крови с концентрацией стероида 200 нг/мл объемом 2 мл вносили 1,0 мл фосфатного буфера, вносили 30-50 мкл конц.соляной кислоты, добавили 1 г хлорида натрия и 5 мл органического растворителя или их смеси, тщательно перемешивали, центрифугировали, надосадочный слой переносили в другую виалу, упаривали досуха, перерастворяли в 0,1 мл DMSO и анализировали.

Щелочную экстракцию для крови проводили следующим образом: к модельному образцу крови с концентрацией стероида 200 нг/мл объемом 2 мл вносили 1,0 мл фосфатного буфера, вносили 1,0 мл карбонатного буфера, добавили 1 г хлорида натрия и 5 мл органического растворителя или их смеси, тщательно перемешивали, центрифугировали, надосадочный слой переносили в другую виалу, упаривали досуха, перерастворяли в 0,1 мл DMSO и анализировали.

Нейтральную экстракцию для крови проводили следующим образом: к модельному образцу крови с концентрацией стероида 200 нг/мл объемом 2 мл вносили 1,0 мл фосфатного буфера, 1 г хлорида натрия и 5 мл органического растворителя или их смеси, тщательно перемешивали, центрифугировали,

надосадочный слой переносили в другую виалу, упаривали досуха, перерастворяли в 0,1 мл DMSO и анализировали.

#### 3.4. Методики измерений массовой концентрации метаболитов в моче и крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с применением масс-селективного детектирования

Были использованы следующие химические реактивы: метанол («Merck», Германия), ацетонитрил для градиентной ВЭЖХ («Merck», Германия), муравьиная кислота («Fluka», Германия) – для приготовления подвижных фаз; картриджи для сорбционного концентрирования (ТФЭ) HLB и DSC-18 вместимостью 6 мл с массой сорбента 200 мг («Supelco», Германия) – для подготовки биопроб; хлористый метилен («МедХимПром», Россия), диэтиловый эфир («МедХимПром», Россия), трет-бутилметиловый эфир («Panreac», Испания), гексан («МедХимПром», Россия), изобутиловый спирт («LiChrosolv®», Германия), изопропиловый спирт («LiChrosolv®», Германия), этилацетат («Chromasolv®», Германия) – для проведения жидкостно-жидкостной экстракции; безводный дигидрофосфат калия («Merck», Германия) и 12-водный гидрофосфат натрия («Merck», Германия) – для приготовления фосфатного буферного раствора с pH 6,5; хлорид натрия («Sigma-Aldrich», Германия); концентрированная соляная кислота («ХимМед», Россия); карбонат и гидрокарбонат калия («ХимМед», Россия) – для приготовления карбонатного буферного раствора с pH 10,0; бета-глюкуронидаза из E-coli K 12 (раствор в 50% глицерине, «Roche diagnostics GmbH», Германия) – для ферментативного гидролиза.

В исследовании биопроб применяли высокоэффективный жидкостной хроматограф Ultimate 3000, оснащенный автосамплером Dionex Ultimate 3000 RS Autosampler, градиентным насосом Dionex Ultimate 3000 RS Pump, дегазатором и блоком для термостатирования хроматографической колонки, соединенным с гибридным масс-спектрометром QExactive с квадрупольным масс-анализатором и с орбитальной ионной ловушкой высокого разрешения («Thermo Scientific»,

США), с возможностью использовать источники ионизации IonMax HESI-II и APCI.

Хроматографическое разделение проводили при постоянной температуре 30 °С на колонке Hypersil Gold aQ, длиной 150 мм, внутренним диаметром 2,1 мм, размером зерна сорбента 3 мкм с предколонкой («Thermo Scientific», США). В качестве подвижной фазы использовали 0,1%-ный раствор муравьиной кислоты в смеси ацетонитрил—вода в соотношении 5 : 95 (об.) (А) и 0,1% раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (В). Хроматографическое разделение веществ проводили в режиме градиентного элюирования: 0–2 мин — 5% В; 15 мин — 95% В; 15–18 мин — 95% В; 19–23 мин — 5% В. Температура колонки составляла 30 °С, скорость потока подвижной фазы – 0,5 мл/мин. Время анализа с учетом стабилизации системы перед вводом следующего образца составляло 23 мин. Объём вводимой пробы – 1 мкл.

Определение метаболитов проводили с использованием источников ионов с ионизацией электрораспылением (ИЭР) и химической ионизацией при атмосферном давлении (ХИАД), соединённых с гибридным масс-спектрометром QExactive с орбитальной ионной ловушкой высокого разрешения. Ток коронного разряда составлял 2 мкА (в случае использования ХИАД), напряжение на капилляре – 3,5 кВ; температура капилляра – 320 °С; температура на распылителе – 280 °С; скорость потока распыляющего газа (азот) – 0,40 л/мин; скорость потока вспомогательного газа (азот) – 0,1 л/мин; скорость потока газа-осушителя (азот) – 0,05 л/мин. Детектирование осуществляли в диапазоне масс 100–1500 Да и 80–1200 Да при регистрации положительно и отрицательно заряженных ионов, соответственно, с разрешением 35 000 (на половине высоты) и точностью определения масс 5 миллионных долей (м.д.). Масс-спектры фрагментных ионов получали высокоэнергетической диссоциацией соударением (HCD), варьируя энергии в диапазоне 10–70 В с шагом 10 В. Обработку данных проводили с применением программного обеспечения Xcalibur версии 2.2.

Предел детектирования по метаболитам составил 0,8 нг/мл по градуировочным растворам.



По значению площади хроматографических пиков с использованием градуировочных характеристик и программы обработки данных находили концентрацию исследуемых соединений в анализируемом экстракте.

Вычисление массовой концентрации аналитов в экстракте пробы проводили для каждого из двух параллельных определений по формуле (4). За результат измерения принимали среднее арифметическое значение результатов двух параллельных определений одного экстракта.

За результат идентификации принимали:

- соответствие времени удерживания ( $T_{уд}$ ) пиков на хроматограммах в режиме МС/МС исследуемого раствора, мин;
- значение массовых чисел характеристических ионов.

Формула (4)

$$C_{гр} = \frac{K \cdot V_{ал}}{V_{пр}} \cdot C_{std} \quad (4)$$

где  $C_{гр}$  – концентрация соединения, найденная по градуировочной характеристике, мг/мл;

$K$  – коэффициент извлечения;

$V_{ал}$  – объем аликвоты после пробоподготовки, мл;

$V_{пр}$  – объем пробы используемый для пробоподготовки, мл.

Коэффициент извлечения  $K$  вычисляли по формуле (5):

$$K = \frac{C_{расч}}{C_{std}} \quad (5)$$

где  $C_{std}$  – концентрация пробы, найденная по градуировочной характеристике при внесении целевых компонентов в интактную («бланковую») кровь, мг/мл;

$C_{расч}$  – концентрация пробы, мг/мл, рассчитанная по формуле (6)

при внесении целевых компонентов в «бланковую» кровь:

$$C_{расч} = C_{пр} \cdot V_{пр} \cdot V_{ал} \quad (6)$$

где  $C_{пр}$  – концентрация пробы в рабочем растворе, вносимого в пробу мочи (крови), мг/мл;

$V_{std}$  – объем рабочего раствора пробы, вносимого в пробу мочи (крови), мл;

$V_{ал}$  – объем аликвоты после пробоподготовки, мл.

Вычисления проводили для каждого из двух параллельных определений, получая, соответственно, значения  $C_1$  и  $C_2$ .

За результат измерений массовой концентрации соединения в пробе мочи (крови) принимали среднее арифметическое значение результатов двух параллельных определений:

$$C = \frac{C_1 + C_2}{2} \quad (7)$$

### 3.5. Получение экспериментальных лекарственных форм мецигестона

В работе использовались сополимер молочной и гликолевых кислот (PLGA 50/50) (производство, Boehringer Engelheim), поливиниловый спирт (ПВС) молекулярная масса 30000 – 70000 степень гидролиза 85% (производство Sigma Aldrich, 98%), полиэтиленгликоль 400 (ПЭГ 400), lauroil polyoxyglycerid фармакопейный (производство Gattefosse, Франция), дихлорметан (производство Sigma Aldrich, 99,5%), азот газообразный, о.с.ч., марки А, ТУ 51-940-80, натрия хлорид (производство Sigma Aldrich, 98%), эфир диэтиловый ч.д.а., ТУ 2600-001-45682126-06, калия гидрокарбонат ч., ГОСТ 4143-78, калия дигидрофосфат безводный (производство «Merck», 99%), калия карбонат х.ч., ГОСТ 4221-76, натрия гидрофосфат 12-водный ч.д.а., ГОСТ 4172-76. трет-бутилметиловый эфир (производство Panreac).

Распределение и размер частиц полученных микроэмульсий определяли методом лазерной дифракции на лазерном анализаторе частиц Shimadzu SALD 2300 (Япония), а электрокинетический потенциал – методом динамического светового рассеяния с помощью Malvern Zetasizer NanoZS (UK).

В работе использовались магнитная мешалка ИКА С MAG HS 7, гомогенизатор механический ИКА Ultra Turrax T25, перемешивающее устройство ИКА

EUROSTAR P cv 6000, сканирующие электронные микроскопы Phenom Pro X, Hitachi SU8000, нанораспылительная сушилка – NANO Spray dryer BUCHI B-90 (Швейцария), анализатор размера частиц Shimadzu SALD 2300 (Япония).

**Микронизацию субстанции мецигестона** проводили на нанораспылительной сушилке с использованием замкнутого контура с инертным газом [173]. Для сушки был получен раствор субстанции в органическом растворителе. Для этого навеску 500 мг мецигестона растворили в 50 мл хлористого метилена. Для снижения концентрации кислорода до 4% использовали азот. Перед началом сушки раствора включали нагрев. Температура потока газа на входе - 40 °С, на выходе - 34 °С. Скорость проточной подачи раствора I через распылительную головку устанавливали 3 мл/мин. Скорость потока газа в замкнутом контуре стабилизируют на значении 135 л/мин, при этом давление в системе составляет 65 мбар. Диаметр пор в мембране использованных форсунок 4 мкм. После прогрева системы, стабилизации температуры и снижения концентрации кислорода до 4% начинают процесс распыления, включив подачу раствора и распылительную форсунку.

#### **Получение микрокапсулированной формы.**

1. Этилцеллюлозу (вязкость 20 мПа 3,84 г) и ацетобутират целлюлозы 0,16 г (Mn 65000 ацетил 29,5% бутирил 17%) растворяют в ацетоне (60 мл), затем вносят навеску микронизированного мецигестона (0,4 г) и полученную суспензию гомогенизируют на ультразвуковом диспергаторе (15 мин, 130 W).

2. Парафин (500мл) смешивают с SPAN 80 (9.2г/500 мл, 1.8%) перемешивают (500 об/мин) в течение 5-10 мин.

Органическую фазу (раствор мецигестона в полимере) смешивают с парафином, полученную смесь перемешивают со скоростью 1800 об/мин при 2 °С 1 ч, после чего прикапывают 24 мл осадителя циклогексана со скоростью 3 мл/мин и оставляют перемешиваться на ночь. Затем температуру поднимают сначала до 30°С на 2 ч и далее до 45°С 4 ч, парафин декантируют, остаток промывают петролейным эфиром (50 мл x 3) и гептаном (30 мл x 2). Промытые микрокапсулы

сушат 12 ч на фильтровальной бумаге, оставшийся растворитель удаляют под давлением на ротационном испарителе

Окончательно проводится сканирующая электронная микроскопия и гравиметрический анализ полученных микрокапсул.

### **Получение самоэмульгирующейся системы**

В лабораторный стакан с рубашкой охлаждения помещают липидную фазу предконцентрата (Gellucire 44/14) массой 7 г, подключают к рубашке циркуляционный термостат и перемешивают на магнитной мешалке при 60 °С. В полученный расплав при перемешивании добавляют мецигестон массой 0,4 г, продолжают перемешивание до полного растворения препарата. Отдельно готовят смесь ПАВ, для чего в химический стакан помещают PEG40 (2,475 г), добавляют поливиниловый спирт (0,025 г) и перемешивание продолжают до полного растворения. Полученный раствор приливают к нагретому расплаву, перемешивают до образования однородной прозрачной массы, выливают в чашку Петри, охлаждают до комнатной температуры и полученный состав используют для получения эмульсии.

## **3.6. Анализ полученных лекарственных форм**

**Гранулометрический анализ.** Измерения размеров частиц полученных лекарственных форм проводили на лазерном анализаторе частиц Shimadzu SALD 2300 методом лазерной дифракции. Измерение проводили с применением «мокрого» метода: навеску препарата помещали в виалу объемом 15мл с дистиллированной водой (7 мл), содержащей ПАВ, и встряхивали на вортексе в течение 10-15 сек. После этого полученную взвесь переливали в емкостную кварцевую кювету и проводили измерение. При этом необходимым условием является

оптическая плотность образца в пределах 0,2-1; при необходимости образец либо разбавляли, либо делали более насыщенным. Для каждого измерения делали 10 повторов.

Электрокинетический потенциал частиц полученных микроэмульсий определяли методом динамического светового рассеяния с помощью Malvern Zetasizer NanoZS (UK), согласно программному обеспечению ZetasizerNano – DTS (Nano). Для измерения  $\zeta$ - потенциала используют универсальную капиллярную U-образную кювету, либо кюветы с квадратным отверстием в сочетании с электродами погружного типа.

**Сканирующая электронная микроскопия.** Микроструктуру полученных микронизированных образцов мецигестона изучали также методом сканирующей электронной микроскопии с полевой эмиссией (FE-SEM) на электронном микроскопе Hitachi SU8000. Съемку изображений вели в режиме регистрации вторичных электронов при ускоряющем напряжении 2 кВ и рабочем расстоянии 5-7 мм. Перед съемкой образцы помещали на поверхность алюминиевого столика диаметром 25 мм, фиксировали при помощи проводящего клея. Морфологию образцов исследовали в нативных условиях, чтобы исключить поверхностные эффекты от напыления проводящего слоя [174].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований была разработана альтернативная схема синтеза мецигестона, позволяющая повысить его выход до 42%, осуществлять процесс в мягких условиях и получать целевой продукт высокой степени очистки без применения препаративной хроматографии. Разработанный метод может также найти применение в производстве промежуточных продуктов при синтезе стероидных гормонов прегнанового ряда, которые являются ценными гормональными препаратами.

Проведенная работа по синтезу стандартов метаболитов — восстановленных по 4,5-двойной связи 5 $\alpha$ - и 5 $\beta$ -производных, 20-гидрокси- и 3,20-

гидроксипроизводных — и разработке аналитического метода контроля в биологических жидкостях продуктов биотрансформации мецигестона и его дезметильного аналога выявила сходство путей метаболизма прегна-D'-пентаранов и эндогенного прогестерона. В ходе изучения превращений препаратов *in vivo* установлено, что особенностью метаболизма исследуемых стероидов является их полная биотрансформация.

Таким образом, можно считать, что несмотря на наличие дополнительного кольца D', основные ферментативные превращения происходят аналогично таковым для природного гормона.

Для создания инновационных лекарственных форм мецигестона нами были использованы современные технологические решения. Основой разработки стали следующие концептуальные подходы: инкапсулирование в полимерную матрицу, микронизация субстанции и создание самоэмульгирующихся систем лекарственной доставки (SEDDS).

Все три направления получили свою реализацию в форме мелкосерийной партии готовых препаратов, которые были изучены не только по основным физико-химическим параметрам, но и в экспериментах *in vivo* с целью верификации основных параметров фармакокинетики.

С целью изучения фармакокинетики полученных инновационных лекарственных форм мецигестона и детектирования сверхнизких концентраций его метаболитов специально была разработана методика пробоподготовки крови и мочи лабораторных животных для измерения количественных характеристик изучаемых субстанций методом ВЭЖХ-МС.

Исследования разработанных экспериментальных лекарственных форм, содержащих мецигестон, в сравнении с исходной субстанцией продемонстрировали изменение фармакокинетического профиля препарата в плазме крови. Было установлено, что увеличивается период полувыведения ( $T_{1/2}$ ) и среднее время удерживания лекарственного вещества в организме (MRT), а также площадь под фармакокинетической кривой «концентрация – время» (AUC), что обеспечивает более длительное нахождение мецигестона в кровеносном русле.

Таким образом, в результате проведенных исследований обоснованы и реализованы подходы к оптимизации синтеза целевого соединения, впервые синтезированы и подтверждены прогнозируемые метаболиты, воплощены в жизнь новые технологические решения, направленные на создание пероральной формы нового лекарственного средства — мецигестона — путем повышения его биодоступности, и сформулированы следующие выводы.

#### ВЫВОДЫ:

1. Разработан альтернативный метод синтеза субстанции мецигестона через ключевой продукт – 6-метилено-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексанопрегн-4-ен-3,20-дион, упрощающий технологический процесс и позволяющий увеличить выход целевого продукта в 1,5 раза по сравнению с известным способом.
2. Проведено прогнозирование основных метаболитов мецигестона и его 6-дезметильного аналога и синтезированы 11 возможных метаболитов в качестве стандартов для подтверждения основных путей биотрансформации.
3. Разработана методика качественного и количественного определения мецигестона и его 6-дезметильного аналога, а также их метаболитов в биологических материалах методами ВЭЖХ-МС/МС.
4. Впервые показано, что пентациклические стероиды претерпевают биотрансформацию в организме. Выделены метаболиты мецигестона и его аналога. Показано сходство путей метаболизма прегна-D'-пентаранов и эндогенного прогестерона.
5. Разработаны методы получения микрокапсулированных, микронизированных и самоэмульгирующихся форм мецигестона. Проведенные сравнительные фармакокинетические исследования показали, что данными методами возможно получать как пролонгированные лекарственные формы, так и формы с сопоставимым для прогестинов фармакокинетическим профилем, но во всех случаях биодоступность повышается до семи раз.

Разработанные на основании результатов исследований лабораторные регламенты для производства трех вышеперечисленных видов конечной продукции использованы при создании аналогичных лекарственных форм в масштабах лабораторного производства ЗАО «Изваринофарма» (Приложение Б) для наработки опытной партии продукции с дальнейшей целью их внедрения в промышленное производство.

В 2017—2020 году ЗАО «Изваринофарма» (Приложение Б) планирует проведение доклинических исследований эффективности и безопасности лекарственных средств на основе мецигестона с использованием разработанных методов количественного и качественного анализа мецигестона в биологических жидкостях.

Результаты фармакокинетического исследования могут быть использованы при выборе терапевтических доз и режимов лечения в дальнейших клинических исследованиях новых лекарственных форм мецигестона.



## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

AUC	-	основной фармакокинетический параметр, характеризующий площадь под фармакокинетической «кривой» зависимости «концентрация—время»
DMCO	-	диметилсульфоксид
LFCS	-	система классификации лекарственных составов на липидной основе
PBS	-	фосфатно-солевой буферный раствор
PLGA	-	сополимер молочной и гликолевых кислот
PVA	-	поливиниловый спирт
SEDDS	-	self-emulsified drug delivery systems (самоэмульгирующиеся системы доставки лекарств)
SEOF	-	self-emulsifying oil formulations (самоэмульгирующиеся композиции на основе липидной фазы)
SMEDDS	-	self-micro-emulsifying drug delivery systems (системы лекарственной доставки с самопроизвольным формированием микроэмульсии)
$T_{max}$	-	время достижения максимальной концентрации препарата в крови
$\Delta\delta$	-	различия в растворяющих способностях растворителя и осадителя
БКС	-	биофармацевтическая классификационная система
ВВ	-	вспомогательное вещество
ВЭЖХ	-	высокоэффективная жидкостная хроматография
ВЭЖХ-МС	-	высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-селективным детектированием
ГСПС	-	глобулины, связывающие половые стероиды
ДНК	-	дезоксирибонуклеиновая кислота

ЖКТ	-	желудочно-кишечный тракт
ЛВ	-	лекарственное вещество
ЛС	-	лекарственное средство
ПАВ	-	поверхностно-активное вещество
ПЭГ	-	полиэтиленгликоль
pH	-	мера активности ионов водорода в растворе, количественно выражающая его кислотность, вычисляется как отрицательный десятичный логарифм активности ионов водорода, выраженной в молях на литр
$C_{\max}$	-	максимальная концентрация препарата в крови
ЭДТА	-	этилендиаминтетраацетат
ЯМР	-	ядерно-магнитный резонанс

Прогестерон – стероидный гормон из группы С21-стероидов, участвующий в женском менструальном цикле, беременности и эмбриогенезе людей и других видов млекопитающих.

Прогестины – синтетических прогестагенные стероиды.

Мецигестон (6 $\alpha$ -метил-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексапрегн-4-ен-3,20-дион) – оригинальный отечественный гормональный препарат, показавший сопоставимую с зарубежными аналогами селективную прогестагенную и цитотоксическую активности *in vitro* и *in vivo*, кандидат для использования в медицинской практике для лечения прогестерондефицитных заболеваний и гормонально-зависимых опухолей, а также в целях контрацепции.

Сорастворители - смесь растворителей, часто используется для солюбилизации нерастворимых в воде лекарственных веществ.

Микрокапсулирование – процесс заключения микроскопических твердых, жидких или газообразных веществ в оболочку, изолирующую их от внешней среды. Микрокапсулы чаще всего имеют размеры от 1 до 500 мкм. Более крупные покрытые оболочкой частицы размером до 6,5 мм называются капсулами.

SEDDS представляют собой изотропные смеси природных или синтетических масел, твердых или жидких поверхностно-активных веществ, а как альтернативный вариант – одного или нескольких гидрофильных растворителей и со-растворителей/поверхностно-активных веществ, образуют эмульсии с размером капелек от 100 до 300 нм.

SMEDDS образуют прозрачные микроэмульсии с размером капелек менее 50 нм.

Биодоступность в фармакокинетике и фармакологии — это количество лекарственного вещества, достигающее до места его действия в организме человека (способность препарата усваиваться), главный показатель, характеризующий количество потерь. Обычно биодоступность определяют по количеству лекарственного вещества в крови, то есть величине введенной дозы неизмененного лекарства, которая достигла системного кровообращения. При внутривенном введении биодоступность лекарства составляет 100%. Если же данное вещество введено другими путями (например, перорально), то его биодоступность уменьшается в результате его неполного всасывания и метаболизма, которому это лекарственное средство подвергается.

Абсолютная биодоступность – это отношение биодоступности, определенной в виде площади под кривой «концентрация-время» (area under the curve – AUC) активного лекарственного вещества в системном кровотоке после введения путем иным, чем внутривенный (перорально, ректально, чрезкожно, подкожно), к биодоступности того же самого лекарственного вещества, достигнутой после внутривенного введения.

Относительная биодоступность – это AUC определенного лекарства, сравниваемая с другой рецептурной формой этого же лекарства, принятой за стандарт, или введенной в организм другим путем. Когда стандарт представляет внутривенно введенный препарат, мы имеем дело с абсолютной биодоступностью.

Микронизация – это процесс уменьшения средних размеров частиц путем их дробления до микронных размеров.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zeelen, F.J. Medicinal Chemistry of Steroids / F.J. Zeelen. – Amsterdam-Oxford-New-York-Tokyo: Elsevier, 1990.– 370 с.
2. Progestogens used in postmenopausal hormone therapy: differences in their pharmacological properties, intracellular actions, and clinical effects / F.Z. Stanczyk, J.P. Hapgood, Sh. Winer, D. R. Mishell, Jr. // *Endocr. Rev.*– 2013.– V.34.– P. 171–200.
3. Selective progesterone receptors modulators (SPRMs): progesterone receptor action, mode of action on the endometrium and treatment options in gynaecological therapies / A. Wagenfeld, Ph. Saunders, L. Whitaker [et al.] // *Exp. Opin. Therap. Targ.*– 2016.– V. 20.– P. 1045-1054.
4. Selective progesterone receptor modulators: an update / G. Benagiano, C. Bastianelli, M. Farris, I. Brosens // *Expert Opin. Pharmacother.*– 2014.– V. 15, № 10.– P. 1403-1415.
5. Allen, W.M. Progesterone: how did the name originate? / W.M. Allen // *South Med J.*– 1970.– V. 63, №10.– P. 1151-1155.
6. Butenandt, A. Zur Isolierung und Charakterisierung des Corpus-luteum-Hormons / A. Butenandt, V. Westphal // *Berl. Dtsch. Chem. Ges.*– 1934.– № 67.– P. 1140.
7. Slotta, K.H. Reindarstellung der Hormone aus dem Corpus Luteum / K.H. Slotta, H. Ruschig, E. Fells // *Berl. Dtsch. Chem. Ges.*– 1934.– № 67.– P. 624.
8. Stanczyk, F.Z. The use of the name “progestin” / F.Z. Stanczyk, M.R. Henzl // *J. Contraception.*– 2001.–V. 64.– P. 1-2.
9. Williams, Sh. P. Atomic structure of progesterone complexed with its receptor / Sh. P. Williams, P. B. Sigler // *Nature.*– 1998.– V. 393.– P. 392-396.
10. Progesterone action in human tissues: regulation by progesterone receptor (PR) isoform expression, nuclear positioning and coregulator expression / K.M. Scarpin, J.D. Graham, P.A. Mote, C.L. [et al.] // *Nucl. Recept. Signal.*– 2009.– V. 7.– P. 1-13.

11. X-ray structures of progesterone receptor ligand binding domain in its agonist state reveal differing mechanisms for mixed profiles of 11 $\beta$ -substituted steroids / S.J. Lusher, H.C. Raaijmakers, D. Vu-Pham [et al.] // *J. Biol. Chem.*– 2012.– V. 287.– P. 20333-20343.
12. Madauss, P. The evolution of progesterone receptor ligands / P. Madauss, E.L. Stewart, Sh.P. Williams // *Med. Res. Rev.*– 2007.– V. 27.– P. 374-400.
13. Kuhl, H. Pharmacology of progestogens. Basic aspects – progesterone derivatives / H. Kuhl // *Menopause Rev.*– 2001.– V. 6.– P. 9-16.
14. Sitruk-Ware, R. New progestogens: a review of their effects in perimenopausal and postmenopausal women / R. Sitruk-Ware // *Drug Aging.*– 2004.– V. 21.– P. 865-883.
15. Benagiano, G. Clinical profile of contraceptive progestins / G. Benagiano, F.M. Primiero, M. Farris // *Eur. J. Contracept. Reprod. Health Care.*– 2004.– V. 9.– P. 182-193.
16. Sitruk-Ware, R. Pharmacological profile of progestins / R. Sitruk-Ware // *Maturitas.*– 2004.– V. 47. P. 277-83.
17. Kuhl, H. Comparative pharmacology of newer progestogens / H. Kuhl // *Drugs.*– 1996.– V. 51.– P. 188-215.
18. Classification and pharmacology of progestins / A.E. Schindler, C. Campagnoli, R. Druckmann [et al.] // *Maturitas.*– 2003.– V. 46, № 1.– P. 7-16.
19. Raudrant, D. Progestogens with androgenic properties / D. Raudrant, Th. Rabe // *Drugs.*– 2003.– V. 63.– P. 463-92.
20. Kuhl, H. Pharmacology of estrogens and progestogens: influence of different route of administration / H. Kuhl // *Climacteric.*– 2005.– V. 8, №1.– P. 3-63.
21. Synthetic progestins used in HRT have different glucocorticoid agonist properties / D. Koubovec, K. Ronacher, E. Stubbsrud [et al.] // *Mol. Cell Endocrinol.*– 2005.– V. 242.– P. 23-32.

22. Multiple nuclear receptor signaling pathways mediate the actions of synthetic progestins in target cells / N.L. Moore, Th.E. Hickey, L.M. Butler, W.D. Tilley // *Mol. Cell. Endocrinol.*– 2012.– V. 357.– P. 60–70.
23. Progestogens used in postmenopausal hormone therapy: differences in their pharmacological properties, intracellular actions, and clinical effects / F.Z. Stanczyk, J.P. Hargood, Sh. Winer, D.R. Mishell Jr. // *Endocr. Rev.*– 2013.– V. 34.– P. 171–200.
24. Global gene expression profiling of progesterone receptor modulators in T47D cells provides a new classification system / W. Afhuppe, J. Muller, W. Schwede [et al.] // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*– 2009.– V. 113.– P. 105–115.
25. Recent advances in structure of progestins and their binding to progesterone receptors / M. Cabeza, Y. Heuze, A. Sanchez [et al.] // *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*– 2015.– V. 30.– P. 152-159.
26. Камерницкий, А.В. Прегна-D'-пентараны – прогестины и антипрогестины. I. Разделение биологических функций стероидных гормонов (обзорная статья) / А.В. Камерницкий, И.С. Левина // *Биоорг. химия.* – 2005. – Т. 31, № 2. – С. 115-129.
27. Камерницкий, А.В. Прегна-D'-пентараны – прогестины и антипрогестины. II. Пути и механизмы осуществления стероидными гормонами отдельных биологических функций / А.В. Камерницкий, И.С. Левина. – *Биоорг. химия.* – 2005. – Т. 31, № 3. – С. 227-238.
28. Способность 6 $\alpha$ -метил-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексано-прогестерона и прогестерона ингибировать рост опухолевых клеток линий MCF-7 и HeLa, чувствительных к доксирубицину / Н.Л. Шимановский, А.В. Семейкин, Т.А. Федотчева [и др.] // *Бюлл. эксп. биол. мед.*– 2002.– № 10.– С. 447-450.
29. Синтез и цитостатическая активность ряда прегна-D'-пентаранов на культуре клеток HeLa / А.В. Семейкин, Т.А. Федотчева, И.С. Левина [и др.] // *Хим.-фарм. ж.*– 2014.– № 48.– С. 9-13.

30. Влияние производных прогестерона на жизнеспособность и экспрессию мРНК эстрогенного рецептора альфа в клетках HeLa / А.В. Семейкин, Е.Н. Карева, Т.А. Федотчева [и др.] // Эксп. и клин. фарм.– 2016.– Т. 79, № 9.– С. 22-24.
31. Progesterone receptor ligand binding pocket flexibility: crystal structures of the norethindrone and mometasone furoate complexes / K. P. Madauss, S. Deng, R. J. H. Austin [et al.] // J. Med. Chem.– 2004.– V. 47. P. 3381-3387.
32. Федюшкина, И.В. Молекулярный докинг и 3D-QSAR производных 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексанопрогестерона как лигандов рецептора прогестерона / И.В. Федюшкина, В.С. Скворцов, И.В. Ромеро-Рейес // Биомедицинская химии.– 2013.– Т. 59, № 6.– С. 622-635.
33. Цитотоксическая активность и молекулярное моделирование прогестинов - прегна-D'-пентаранов / А.М. Щербаков, И.С. Левина, Л.Е. Куликова [и др.] // Биомедицинская химия.– 2016.– Т. 62, №3.– С. 290-294.
34. Pregna-D'-pentaranes - a new class of active gestagenes / A.V. Kamernitzky, I.S. Levina, L.E. Kulikova [et al.] // J. Steroid Biochem.– 1982.– V. 16.–С. 61-67.
35. Левина, И.С. Прегна-D'-пентараны: синтез, модификации, структура / И.С. Левина, А.В. Камерницкий // Хим.-фарм.ж.– 1990.– V. 24, №10.– P. 31-39.
36. Осуществление чрезвычайно затрудненных реакций Дильса-Альдера при совместном применении катализаторов - кислот Льюиса и высокого давления / Б.С. Эльянов, И.С. Левина, Л.Е. Куликова [и др.] // Изв. АН СССР. Сер. хим.– 1989.– № 3.– С. 743-744.
37. Катализ кислотами Льюиса при высоком давлении как метод вовлечения затрудненных стероидных диенофилов в реакцию Дильса-Альдера / Б.С. Эльянов, И.С. Левина, Л.Е. Куликова [и др.] // Изв. АН СССР. Сер. хим.– 1992.– №7.– С. 1622-1627.
38. Камерницкий, А.В. Синтез D'5-пентаранов – пентациклических стероидов с дополнительным кольцом D' в положении 16,17 / А.В. Камерницкий, Л.Е. Куликова, И.С. Левина // Изв. АН СССР. Сер. хим.– 1978.– № 6.– С. 1395-1397.



39. Левина, И.С. Одностадийный синтез 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексанонопрегнанов при атмосферном и высоком давлении / И.С. Левина, Л.Е. Куликова, Б.С. Эльянов // Изв. АН СССР. Сер. хим.– 1982.– № 6.– С. 1399-1401.
40. Камерницкий, А.В. Гомологизация кольца D' в 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексанопрегнанах (D'6-пентаранах) / А.В. Камерницкий, Куликова Л.Е., Левина И.С. // Изв. АН СССР. Сер. хим.– 1982.– № 11.– С. 2552-2557.
41. Высокоэффективное не прямое электроокисление 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -дигидрокси-6 $\beta$ -метил-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексанопрегнан-20-она до соответствующего 5 $\alpha$ -гидрокси-3,20-диона с медиаторной парой 4-замещенных ТЕМРО-бромид натрия / Yu.N. Ogibin, I.S. Levina, A.V. Kamernitzky, G.I. Nikishin // Mendeleev Commun.– 1995.– V. 5.– P. 185-187.
42. Синтез и изучение взаимодействия [3H]циклоалканопрогестеронов с рецептором прогестерона / А.В. Камерницкий, И.С. Левина, Л.Е. Куликова [и др.] // Изв. АН СССР. Сер. хим.– 1997.– № 8.– С. 1532-1535.
43. Патент № 2534995, РФ, МПК А61К31/57; А61Р35/00; С07J53/00. 6-оксимы 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексанопрегненов, обладающие цитотоксической активностью по отношению к опухолевым клеткам человека. / И.С. Левина; ГБОУ ВПО РНИМУ Минздрава России.– RU20130131326; дата подачи 07.09.2013; опубликовано 12.10.2014. – 8 с.
44. 3- and 19-Oximes of 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -cyclohexanoprogesterone derivatives and interactions with progesterone receptor and other proteins / I.S. Levina, E.V. Pokrovskaya, L.E. Kulikova [et al.] // Steroids.– 2008.– V. 73.– P. 815-827.
45. Selective progesterone receptor modulators and progesterone antagonists: mechanisms of action and clinical applications / N. Chabbert-Buffet, G. Meduri, Ph. Bouchard, I.M. Spitz // Human Reprod. Update.– 2005.– V. 11.– P. 293-307.
46. Endocrine pharmacological characterization of progesterone antagonists and progesterone receptor modulators with respect to PR-agonistic and antagonistic activity / W. Elger, J. Bartley, B. Schneider [et al.] // Steroids.– 2000.– V. 65.– P. 713-723.

47. Selective progesterone receptors modulators (SPRMs): progesterone receptor action, mode of action on the endometrium and treatment options in gynaecological therapies / A. Wagenfeld, Ph. Saunders, L. Whitaker, H. Critchley // *Exp. Opin. Therap. Targ.*— 2016.— V. 20.— P. 1045-1054.
48. Whitaker, L.H.R. Selective progesterone receptor modulators / L.H.R. Whitaker, A.R.W. Williams, H.O.D. Critchley // *Curr. Opin. Obstetr. Gynecol.*— 2014.— V. 26.— P. 223-321.
49. Selective progesterone receptor modulator development and use in the treatment of leiomyomata and endometriosis / K. Chwalisz, M.C. Perez, D. Demanno [et al.] // *Endocr. Rev.*— 2005— V. 26.— P. 423–438.
50. Selective progesterone receptor modulators: an update / G. Benagiano, C. Bastianelli, M. Farris, I. Brosens // *Expert Opin. Pharmacother.*— 2014.— V. 15 № 10.— P. 1403-1415.
51. Contraceptive applications of progesterone receptor modulators / N. Chabbert-Buffet, S. Ouzounian, A. P. Kairisx, Ph. Bouchard // *Eur. J. Contracept. Reprod. Health Care.*— 2008.— V. 13.— P. 222-230.
52. Wardell, S.E. Mechanisms controlling agonist and antagonist potential of selective progesterone receptor modulators (SPRMs) / S.E. Wardell, D.P. Edwards // *Semin. Reprod. Med.*— 2005.— V. 23.— P. 9-21.
53. Benagiano, G. Selective progesterone receptor modulators 2: use in reproductive medicine / G. Benagiano, C. Bastianelli, M. Farris // *Expert Opin. Pharmacother.*— 2008.— V. 9.— P. 3473-2485.
54. In vitro characterization of ZK 230211—A type III progesterone receptor antagonist with enhanced antiproliferative properties / W. Afhuppe, J.M. Beekman, Ch. Otto [et al] // *J. Steroid Bioch. Mol. Biol.*— 2010.— V. 119.— P. 45-55.
55. Leo, J.C. The activities of progesterone receptor isoform A and B are differentially modulated by their ligands in a gene-selective manner / J.C. Leo, V.C. Lin // *Int. J. Cancer.*— 2008.— V. 122.— P. 230-243.

56. Selective progesterone receptors modulators (SPRMs): progesterone receptor action, mode of action on the endometrium and treatment options in gynaecological therapies / A. Wagenfeld, Ph. Saunders, L. Whitaker, H. Critchley // *Exp. Opin. Therap. Targ.*– 2016.– V. 20.– P. 1045-1054.
57. Patent № 2 497 807, FR, Int. Cl. A61K31/565; A61K31/57; A61K31/58. Steroid derivatives substituted in the 11-beta position, process for their preparation, their utilization as medicaments and compositions containing them. / J. Teutsch; Roussel uclaf.– FR19810000272; pending 01.09.1981; published 07.15.1982. – 34 p.
- 58 Patent № 3 307 143, DE, Int. Cl. A61K31/56; A61P5/00; A61P5/38. 3-keto-delta 4,9-19-norsteroids. / D. Philibert; Roussel uclaf.– DE19833307143; pending 03.01.1983; published 09.08.1983. – 74 p.
- 59 Philibert, D. RU 38486: an original multifaceted antihormone in vivo / D. Philibert // Adrenal steroid antagonism. Satellite Workshop of the VII. International Congress of Endocrinology Quebec, Canada, July 7, 1984.– Berlin: Walter de Gruyter.– 1984.– P. 77-101.
60. Teutsch, G. History and perspectives of antiprogestins from the chemist's point of view / G. Teutsch, D. Philibert // *Human Reprod.*– 1994.– V. 9.– P. 12-31.
61. Belanger, A. Regio and stereospecific synthesis of 11 $\beta$ -substituted 19-norsteroids, influence of 11 $\beta$ -substitution on progesterone receptor affinity / A. Belanger, D. Philibert, G. Teutsch // *Steroids.*– 1981.– V. 37.– P. 361-82.
62. Synthesis of Ent-17-(Prop-1-ynyl-17 $\beta$ -hydroxy-11 $\beta$ -[4-N,N-dimethylamino]-Phenyl)-4,9-estradien-3-one, the antipode of RU-38486 / E. Ottow, S. Beier, W. Elger [et al.] // *Steroids.*– 1984.– V. 44.– P. 519-530.
63. Synthesis of 11 $\beta$ -(4-dimethylaminophenyl)-17  $\beta$ -hydroxy-17 $\alpha$ -(3-methyl-1-butynyl)-4,9-estradien-3-one: two new analogs of mifepristone (RU-486) / G.B. Hazra, B. Sourav, S.P. Vandana [et al.] // *Steroids.*– 2000.– V. 65.– P. 157–162.
64. Cleve, A. Beneficial effects of fluorine in the anti-progestin ZK 230211 / A. Cleve, U. Klar, W. Schwede // *J. Fluorine Chem.*– 2005.– V. 126.– P. 217–220.

65. Synthesis and antiprogesterone properties of novel 17-fluorinated steroids / K. Nickisch, H.B. Nair, N. Kesavaram [et al.] // *Steroids*.– 2013.– V. 78.– P. 909-919.
66. A structural and in vitro characterization of asoprisnil: a selective progesterone receptor modulator / S.J. Lusher, H.C.A. Raaijmakers, D. Vu-Pham [et al.] // *Mol. Endocrinol.*– 2007.– V. 21, №5.– P. 1066–1081.
67. S.J. Lusher. Molecular Determinants of Partial Agonism by Progesterone Receptor Modulators. 2013. Dissertation. Radboud University Nijmegen.
68. Molecular determinants of the recognition of ulipristal acetate by oxo-steroid receptors / I. Petit-Topin, M. Fay, M. Resce-Rigon [et al.] // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*– 2014.– V. 144.– P. 427-35.
69. A structural and in vitro characterization of asoprisnil: a selective progesterone receptor modulator / K.P. Madauss, E.T. Grygielko, Su-Jun Deng [et al.] // *Mol. Endocrinol.*– 2007.– V. 21, № 5.– P. 1066–1081.
70. Effects of D-ring substituents on antiprogesterone (antagonist) and progesterone (agonist) activity of 11 $\beta$ -aryl steroids / C.E. Cook, Y.-W. Lee, M.C. Wani [et al.] // *Hum. Reprod.*– 1994.– V. 9, № 1.– P. 32-39.
71. 16 $\alpha$ -Substituted analogs of the antiprogesterone RU486 induce a unique conformation in the human progesterone receptor resulting in mixed agonist activity / B.L. Wagner, G. Polliot, S. Leonardt [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*– 1996.– V. 93.– P. 8739-8744.
72. Ulipristal acetate does not impact human normal breast tissue / L. Communal, M. Vilasco, J. Hugon-Rodin // *Hum. Reprod.*– 2012.– V. 27.– P. 2785-2798.
73. Patent № 8912448, WO, Int. Cl. A61K31/00; A61K31/57; A61K31/58. 11 beta - substituted progesterone analogs. / C. E. Cook; RES TRIANGLE INST.– WO1989US02706; pending 06.26.1989; published 12.28.1989. – 51 p.
74. Patent № 9630390, WO, Int. Cl. C07J21/00; C07J41/00; C07J51/00. Method for preparing 17 alpha -acetoxy-11 beta -(4-n,n-dimethylaminophenyl)-19-norpregna-4,9-diene-3,20-dione, intermediates useful in the method, and methods for the preparation

of such intermediates. / K. Hyun; US HEALTH.– WO1996US03660; pending 03.18.1996; published 10.03.1996. – 42 p.

75. Patent № 2007144674, WO, Int. Cl. C07J21/00; C07J31/00; C07J41/00. Industrial process for the synthesis of 17 $\alpha$ -acetoxy-11 $\beta$ -[4-(N,N-dimethyl-amino)- phenyl]-19-norpregna-4,9-diene-3,20-dione and new intermediates of the process. / D. Lajosne; RICHTER GEDEON NYRT.– WO2007HU00045; pending 05.18.2007; published 12.21.2007. – 24 p.

76. A simple and convenient synthetic route to Ulipristal acetate / Y. Yu, Y. He, Yi. Zhao [et al.] // Steroids.– 2013.– V. 78.– P. 1293-1297.

77. A new and efficient method for the synthesis of Ulipristal acetate / Xu Cheng, Xiaocen Li, Yanjun Duan [et al.] // Steroids.– 2014.– V. 84.– P. 78-83.

78. First synthesis and characterization for the stereoisomers of Ulipristal acetate / Yi Zhao, Xiaolong Li, Hong Liu [et al.] // Steroids.– 2015.– V. 95.– P. 7-16.

79. Endometrial morphology after treatment of uterine fibroids with the selective progesterone receptor modulator, ulipristal acetate / A.R. Williams, F.R.C. Path, Ch. Bergeron [et al.] // Intern. J. Gynecol. Pathol.– 2012.– V. 31.– P. 556–569.

80. Goyeneche, A.A. Growth inhibition induced by antiprogestins RU-38486, ORG-31710, and CDB-2914 in ovarian cancer cells involves inhibition of cyclin dependent kinase 2 / A.A. Goyeneche, E.E. Seidel, C.M. Telleria // Invest. New Drugs.– 2012.– V. 30.– P. 967-980.

81. Discovery, chemistry and reproductive pharmacology of asoprisnil and related 11 $\beta$ -benzaloxime substituted selective Progesterone Receptor Modulators (SPRMs) / G. Schubert, W. Elger, G. Kaufmann [et al.] // Semin. Reprod. Med.– 2005.– V. 23, № 1.– P. 58-73.

82. A new generation of progesterone receptor modulators / R. Winneker, A. Fensome, P. Zhang [et al.] // Steroids.– 2008.– V. 73.– P. 689.

83. Therapeutic potential for the selective progesterone receptor modulator Asoprisnil in the treatment of leiomyomata/ K. Chwalisz, D, DeManno, R. Garg, [et al.] // Semin. Reprod. Med.– 2004.– V. 22.– P. 113-119.

84. Comparative effects of SPRM asoprisnil (J867) on proliferation, apoptosis, and the expression of growth factors in cultured uterine leiomyoma cells and normal myometrial cells / N. Ohara , A. Morikawa , W. Chen [et al.] // *Reprod Sci.*– 2007.– V. 14.– P. 20-27.
- 85 Synthesis and antihormonal properties of novel  $11\beta$ -benzoxazole-substituted steroids. *Bioorg* / Ch. Jin, S.E. Fix, J.A. Kepler, C.E. Cook // *Med. Chem. Lett.*– 2012.– V. 22.– P. 1705–1708.
86. Synthesis and biological evaluation of  $11'$  imidazolyl antiprogestins and mesoprogestins / K. Nickisch, W. Elger, B. Santhamma [et al.] // *Steroids.*– 2014.– V. 92.– P. 45-55.
87. Antiprogestins in breast cancer treatment: are we ready? / C. Lanari, V. Wargon, P. Rojas, A. A. Molinolo // *Endocrine-Related Cancer.*– 2012.– V. 19.– P. 35-50.
88. Antiprogestins in Gynaecological Diseases / A.A. Goyeneche, C.M. Telleria // *Reproduction.*– 2015.– V. 149.– P. 15-33.
89. BAY 1002670: a novel, highly potent and selective progesterone receptor modulator for gynaecological therapies / A. Wagenfeld, W. Bone, W. Schwede [et al.] // *Hum Reprod.*– 2013.– V. 28, № 8.– P. 2253-64.
90. Aungst, B.J. Intestinal absorption barriers and transport mechanisms, including secretory transport, for a cyclic peptide, fibrinogen antagonist / B.J. Aungst, H. Saitoh // *Pharm Res.*– 1996.– V. 13, № 1.– P. 114-119.
91. Lennernäs, H. Does fluid flow across the intestinal mucosa affect quantitative oral drug absorption? Is it time for a reevaluation? / H. Lennernäs // *Pharm Res.*– 1995.– V. 12, № 11.– P. 1573-1582.
92. Алексеев, К.В. Применение биофармацевтической классификационной системы для установления корреляции *in vivo* и *in vitro* / К.В. Алексеев, Е.В. Блынская, Е.А. Литвин // *Вестник новых медицинских технологий.* – 2009.– Т. XVI, № 3. – С. 137-139.
93. Strickley, R.G. Solubilizing Excipients in Oral and Injectable Formulations / R.G. Strickley // *Pharmaceutical Research.* – 2004. – V. 21, № 2. – P. 201-230.

94. Алексеев, К.В. Технология повышения биологической и фармацевтической доступности лекарственных веществ / К.В. Алексеев, Н.В. Тихонова, Е.В. Блынская // Вестник новых медицинских технологий. – 2012. – Т. XIX, № 4. – С. 43-47.
95. Основные направления в технологии получения наноносителей лекарственных веществ / К.В. Алексеев, Р.Н. Аляутдин, Е.В. Блынская, Б.Т. Квинх // Вестник новых медицинских технологий. – 2009. – №2. – С. 142-145.
96. Adessi, C. Strategies to improve stability and bioavailability of peptide drugs / C. Adessi, C. Sotto // *Frontiers Med Chem.* – 2004. – № 1. – P. 513-527.
97. Floating drug delivery systems: A review / S. Arora, A. Ali, A. Ahuja [et al.] // *AAPS PharmSciTech.* – 2005. – V.6, № 3. – P. 372-390.
98. Cyclodextrins in Drug Delivery: An Updated Review / R. Challa, A. Ahuja, J. Ali, R.K. Khar // *AAPS PharmSciTech.* – 2005. – V.6, № 2. – P. 329-357.
99. Madgulkar, A. Studies on formulation development of mucoadhesive sustained release Itraconazole tablet using response surface methodology / A. Madgulkar, S. Kadam, V. Pokharkar // *AAPS PharmSciTech.* – 2008. – Vol. 9, №. 3. – P. 998-1005.
100. Rowe, R.C. Handbook of Pharmaceutical Excipients / R.C. Rowe, P.J. Sheskey, P.J. Weller // Pharmaceutical Press, London: United Kingdom and Washington: The American Pharmaceutical Association. – 2003. – 776 p.
101. Miller, D.A. Targeted intestinal delivery of supersaturated Itraconazole for improved oral absorption / D.A. Miller, J.C. DiNunzio, W. Yang // *Pharmaceutical Research.* – 2008. – Vol. 25, № 6. – P.1450-1459.
102. Промышленная технология лекарств: Учебник. В 2-х томах / В.И. Чуешов, М.Ю. Чернов, Л.М. Хохлова [и др.]; Под ред. В.И. Чуешова. – Х.:МТК Книга. Изд-во НФАУ, 2002. – Т.2. – 716 с.
103. Moldenhauer, M.G. The effect of rate of evaporation on the coat structure of ethylcellulose microcapsules / M.G. Moldenhauer, J.G. Nairn // *J Controlled Release.* – 1991. – № 17. – P. 49–60.

104. Amperiadou, A. Controlled release salbutamol sulfate microcapsules prepared by emulsion solvent-evaporation technique and study on the release affected parameters / A. Amperiadou, M. Georgarakis // *Int J Pharm.* – 1995. – № 115. – P. 1-8.
105. Lippold, B.H. Parameters controlling drug release from pellets coated with aqueous ethyl cellulose dispersion / B.H. Lippold, B.K. Sutter, B.C. Lippold // *Int J Pharm*, 1989. – № 54. – P. 15–25.
106. D’Onofrio, G.P. Encapsulated microcapsules / G.P. D’Onofrio, R.C. Oppenheim, N.E. Bateman // *Int J Pharm.* – 1979.– № 2. – P. 91–99.
107. Patent № 3 748 277, USA, U.S. Cl. 252/316, Int. Cl. B01j 13/02; B44d 1/02. Process of forming minute capsules. / Wagner J.; The National Cash Register Company. – № US19650496133 19651014; pending 14.10.1965; published 24.07.1973. – 10 p.
108. Patent № 3 415 758, USA, U.S. Cl. 252/316. Process of forming minute capsules en masse / Powell T.C., Steinle M.E., Yoncoskie R.A. [et al.]; The National Cash Register Company. – № US19620192071 19620503; pending 03.05.1962; published 10.12.1968. – 8 p.
109. Drug release from spray-dried and spray-embedded microparticles of diltiazem hydrochloride / F. Forni, G. Coppi, M.A. Vandelli, R. Cameroni // *Chemical & Pharmaceutical Bulletin.*– 1991.– № 39.– P. 2091–2095.
110. Wakerly, M.G. Evaluation of the self-emulsifying performance of a non-ionic surfactantvegetable oil mixture / M.G. Wakerly, C.W. Pouton, B.J. Meakin // *J Pharm Pharmacol.*– 1987. – № 39.– P. 6.
111. Selfemulsification of vegetable oil non-ionic surfactant mixtures / M.G. Wakerly, C.W. Pouton, B.J. Meakin, F.S. Morton // *Am Chem Soc Symp Series.*– 1986.– № 311.– P. 242-255.
112. Selfemulsifying drug delivery systems: formulation and biopharmaceutic evaluation of an investigational lipophilic compound / S.A. Charman, W.N. Charman, M.C. Rogge [et al.] // *Pharm Res.* – 1992.– № 9.– P. 87-93.



113. Selfemulsifying drug delivery systems (SEDDS) with polyglycolized glycerides for improving in vitro dissolution and oral absorption of lipophilic drugs / N. H. Shah, M.T. Carvagal, C.L. Patel [et al.] // *Int J Pharm.* – 1994. – № 106. – P. 15-23.
114. Neslihan Gursoy, R. Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) for improved oral delivery of lipophilic drugs / R. Neslihan Gursoy, S. Benita // *Biomedecine & Pharmacotherapy.*– 2004.– V. 58, № 3. – P. 173-182.
115. Constantinides, P.P. Lipid microemulsions for improving drug dissolution and oral absorption: physical and biopharmaceutical aspects / P.P. Constantinides // *Pharm Res.*– 1995.– № 12.– P. 1561-1572.
116. Pouton, C.W. Lipid formulations for oral administration of drugs: nonemulsifying, self-emulsifying and selfmicroemulsifying drug delivery systems / C.W. Pouton // *Eur. J. Pharm. Sci.*– 2000.– № 11.– P.93-98.
117. Pouton, C.W. Formulation of self-emulsifying drug delivery systems/ C.W. Pouton // *Adv. Drug Deliver. Rev.*– 1997.– № 25.– P. 47-58.
118. Evaluation of the impact of surfactant digestion on the bioavailability of danazol after oral administration of lipidic self-emulsifying formulations to dogs / J.F. Cuine, C.L. McEvoy, W.N. Charman [et al.] // *J. Pharm. Sci.*– 2008.– № 97.– P. 993-1010.
119. Gershanik, T. Self-dispersing lipid formulations for improving oral absorption of lipophilic drugs / T. Gershanik, S. Benita // *Eur. J. Pharm. Sci. Biopharm.*– 2000.– № 50.– P. 179-188.
120. Strickley, R.G. Solubilizing excipients in oral and injectable formulations / R.G. Strickley // *Pharm. Res.*– 2004.– № 21.– P. 201-230.
121. A new solid selfmicroemulsifying formulation prepared by spray-drying to improve the oral bioavailability of poorly water soluble drugs / T. Yi, J.L. Wan, H.B. Xu [et al.] // *Eur. J. Pharm. Biopharm.*– 2008.– № 70.– P. 439-444.
122. Enhanced absorption of new oral cyclosporin microemulsion formulation, Neoral, in liver transplant recipients with external biliary diversion / A.K. Trull, K.K.C. Tan, L. Tan [et al.] // *Transplant. Proc.*– 1994.– № 26.– P. 2977-2978.

123. Improved dose linearity of cyclosporine pharmacokinetics from a microemulsion formulation / E.A. Mueller, J.M. Kovarik, J.B. Van Bree [et al.] // *Pharm. Res.*– 1994.– № 11.– P. 301-304.
124. Reduced inter-and intra individual variability in cyclosporine pharmacokinetics from a microemulsion formulation / J.M. Kovarik, E.A. Mueller, J.B. Van Bree [et al.] // *J. Pharm.Sci.*– 1994.– № 83.– P. 444-446.
125. Lipidbased delivery systems for improving the bioavailability and lymphatic transport of a poorly water-soluble LTB4 inhibitor / D.J. Hauss, S.E. Fogal, J.V. Ficorilli [et al.] // *J. Pharm. Sci.*– 1998.– № 87.– P. 164-169.
126. Julianto, T. Improved bioavailability of vitamin E with a self emulsifying formulation / T. Julianto, K.H. Yuen, A.Mohammad Noor // *Int. J. Pharm.*– 2000.– № 200.– P. 53-57.
127. Selfemulsifying drug delivery systems (SEDDS) of coenzyme Q10: formulation development and bioavailability assessment / T.R. Kommuru, B. Gurley, M.A. Khan [et al.] // *Int. J. Pharm.*– 2001.– № 212.– P. 233-246.
128. Development of self-micro emulsifying drug delivery systems (SMEDDS) for oral bioavailability enhancement of simvastatin in beagle dogs / B. K. Kang, J. S. Lee, S. K. Chon [et al.] // *Int. J. Pharm.*– 2004. – № 274.– P. 65-73.
129. Preparation and evaluation of SEDDS and SMEDDS containing carvedilol / L. Wei, P. Sun, S. Nie [et al.] // *Drug Dev. Ind. Pharm.*– 2005.– № 31.– P. 785-794.
130. Yap, S.P. Influence of lipolysis and droplet size on tocotrienol absorption from self emulsifying formulations / S.P. Yap, K.H. Yuen // *Int. J. Pharm.*– 2004.– № 281.– P. 67-78.
131. Kim, C.K. Preparation and evaluation of biphenyl dimethyl dicarboxylate microemulsions for oral delivery / C. K. Kim, Y. J. Cho, Z. G. Gao // *J. Control. Release.*– 2001.– № 70.– P. 149-155.
132. Noyes, A.A. The rate of solution of solid substances in their own solutions / A.A. Noyes, W.R. Whitney // *J. Am. Chem. Soc.* – 1897. – V. 19. – P. 930-934.

133. Water-Insoluble Drug Formulation Second Edition/ R. Liu [et al.]; edited by Rong Liu. – Florida: CRC Press: Boca Raton.– 2008.– 670 p.
134. Дубинская, А.М. Превращения органических веществ под действием механических напряжений / А.М. Дубинская // Успехи химии.– 1999.– Т. 68, № 8.– С. 708-724.
135. Colombo, I. Drug mechanochemical activation / I. Colombo, G. Grassi, M. Grassi // J. Pharm. Sci. – 2009. – V. 98. – P. 3961-3986.
136. Adamson, A.W. Physical Chemistry of Surfaces / A.W. Adamson, A.P. Gast. – New York: Wiley-Interscience Publications.– 1997. – 804 p.
137. Understanding drug release and absorption mechanisms: A physical and mathematical approach / M. Grassi, G. Grassi, R. Lapasin, I. Colombo. – Florida: CRC Press: Boca Raton.– 2007.– 628 p.
138. Grassi, M. Drug release from an ensemble of swellable crosslinked polymer particles / M. Grassi, I. Colombo, R. Lapasin // J. Control. Rel. – 2000. – V. 68. – P. 97-113.
139. Grassi, M. Effect of milling time on release kinetics from co-ground drug polymer systems / M. Grassi, N. Cocceani, L. Magarotto. – Salt lake City: AAPS Annual Meeting and Exposition: Proceed. – 2003. – 1201 p.
140. Colombo, I. Drug mechanochemical activation / I. Colombo, G. Grassi, M. Grassi // J. Pharm. Sci. – 2009. – V. 98. – P. 3961-3986.
141. Effets de la progesterone naturelle micronisee sur le foie au cours du troisieme trimestre de la grossesse / J.L. Beifla, M. Dumont, M. Levardion [et al.] // Contracept Fertil Sex.– 1997.– № 25.– P. 165-169.
142. Rasenack, N. Micronization of anti-inflammatory drugs for pulmonary delivery by a controlled crystallization process / N.Rasenack, H. Streckel, B. W. Muller // J. Pharm. Sci.– 2003.– V. 92, № 1.– P. 35–44.
143. Polymeric nanoparticles from rapid expansion of supercritical fluid solution / Y.P. Sun, M.J. Meziani, P. Pathak, L. Qu // Chemistry. – 2005.– V. 11, № 5.– P. 1366-1373.

144. Chem Micronization of phenylbutazone by rapid expansion of supercritical CO<sub>2</sub> solution / K. Moribe, S. Tsutsumi, S. Morishita [et al.] // *Pharm Bull.*– 2005.– V. 53, № 8.– P. 1025-1028.
145. Левина, И.С. Синтез 6 $\alpha$ -метил-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексанопрогестерона через  $\gamma$ -метиленирование 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексанопрегн-4-ен-3,20-диона / И.С. Левина, А.В. Камерницкий // *Изв. АН СССР. Сер. хим.*– 1997.– № 6.– P.1234-1235.
146. Патент № 2566368, РФ, МПК C07J53/00. Способ получения 6-метилено-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексанопрегн-4-ен-3,20-диона. / А. Назаров; ИОХ РАН.– RU20140149035; дата подачи 12.05.2014; опубликовано 10.27.2015. – 9 с.
147. Синтез 6-метилен-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексапрегн-4-ен-3,20-диона / А.К. Назаров, Н.В. Сига́й, И.В. Заварзин, И.С. Левина // *Изв. АН. Сер.хим.*– 2014.– № 9.– С. 2064-2066.
148. Burn, D. Modified steroid hormones—XXXVIII : Some transformations of steroidal 3-alkoxy-6-formyl-3,5-dienes and related compounds // D.Burn, D.N.Kirk, V.Petrow // *Tetrahedron.*– 1965.– V.21, №6.– P. 1619-1624.
149. Pharmacokinetics of progesterone and its metabolites allopregnanolone and pregnanolone after oral administration of low-dose progesterone / L. Andréén, O. Spigset, A. Andersson [et al.] // *Maturitas.*– 2006.– V. 54.– P. 238–244.
150. Wiebe, J.P. Progesterone metabolites in breast cancer / J.P. Wiebe // *Endocr.-Relat. Cancer.*– 2006.– V.13, № 3.– P. 717–738.
151. Progesterone-induced stimulation of mammary tumorigenesis is due to the progesterone metabolite, 5 $\alpha$ -dihydroprogesterone (5 $\alpha$ P) and can be suppressed by the 5 $\alpha$ -reductase inhibitor, finasteride / John P. Wiebe, M.A. Rivas, [et al.] // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*– 2015.– V. 149.– P. 27–34.
152. Expression of the progesterone receptor and progesterone-metabolising enzymes in the female and male human kidney / C. Bumke-Vogt, V. Bähr, S. Diederich [et al.] // *J. Endocrinol.*– 2002.– V. 175, № 2.– P. 349-64.
153. Hugh, L. Steroid Analysis / L. Hugh, J. Makin, D.B. Gower. – Springer Science & Business Media.– 2010.– 1224 p.

154. Investigation of endogenous corticosteroids profiles in human urine based on liquid chromatography tandem mass spectrometry / J. Marcos, N. Renau, G. Casals [et al.] // *J. Anal. Chim. Acta.*– 2014.– V. 812.– P. 92-104.
155. Detection, quantification and confirmation of anabolic steroids in equine plasma by liquid chromatography and tandem mass spectrometry / F. Guan, C.E Uboh, L.R. Soma [et al.] // *J Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*– 2005.– V. 829, № 1-2.– P. 56-68.
156. Development of an LC-MS/MS method for the determination of endogenous cortisol in hair using (13)C3-labeled cortisol as surrogate analyte / T.M Binz, U. Braun, M.R. Baumgartner, T. Kraemer // *J Chromatogr B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*– 2016.– V. 1033-1034.– P. 65-72.
157. Liquid chromatography tandem mass spectrometry for analysis of steroids in clinical laboratories / M.M. Kushnira, A.L. Rockwooda, W.L. Roberts a [et al.] // *J. Clinical Biochemistry.*– 2011.– V. 44, № 1.– P. 77–88.
158. Determination of estrogens and progestogens by mass spectrometric techniques (GC/MS, LC/MS and LC/MS/MS) / M.S. Díaz-Cruz, M.J. López de Alda, R. López, D. Barceló // *J Mass Spectrom.*– 2003.– V. 38, № 9.– P. 917-923.
159. Schindler, A.E. Progestational effects of dydrogesterone in vitro, in vivo and on the human endometrium / A.E. Schindler // *Maturitas.*– 2009.– V. 65, № 1.–P. 3-11.
160. Reddy, M. Sunitha Solubility enhancement of fenofibrate, a BCS class II drug, by self emulsifying drug delivery systems / M. Reddy // *IRJP.*– 2011.– V.2., № 11. P. 173-177.
161. Zargar-shoshtari, S. Formulation and physicochemical characterization of imwitor 308 based self microemulsifying / S. Zargar-shoshtari // *Drug Delivery Systems. Chem. Pharm. Bull.*– 2010.– V. 58, №10.– P. 1332-1338.
162. Setthacheewakul, S. Controlled release of oral tetrahydrocurcumin from a novel Self-emulsifying floating (SEFDDS) / S. Setthacheewakul // *Drug Delivery System. AAPS PharmSciTech.*– 2011.– V. 12, № 1.– P. 152-164.

163. Nixon, J.R. The in vivo performance of theophylline microcapsules / J.R. Nixon, M.R. Meleka // *J. Microencap.* – 1984.– № 1.– P. 65–72.
164. El-Sayed, A.A. Effect of solvent used in the preparation of solid dispersions and microcapsules on the dissolution of drugs / A.A. El-Sayed, A.A. Badawi, A.M. Fouli // *Pharm Acta Helv.*– 1982.– V. 57, № 2.– P. 61-64.
165. Robinson, D.H. Ethyl Cellulose-Solvent Phase Relationships Relevant to Coacervation Microencapsulation Processes / D.H. Robinson // *Drug Development and Industrial Pharmacy.*– 1989.– V. 15, №№ 14-16.– P. 2597-2620.
166. Suh, K.W. Cohesive energy densities of polymers from turbidimetric titrations / K.W. Suh, D.H. Clarke // *J. Polym. Sci. A-1 Polym. Chem.* – 1967. – № 5. – P. 1671-1681.
167. Suh, K.W. Turbidimetric determinations of theta compositions / K.W. Suh, D.H. Clarke // *J. Appl. Polym. Sci.*– 1968.– № 12.– P. 1775–1779.
168. Burrell, H. Solubility parameter values, in *Polymer Handbook* / H. Burrell, edited by J. Brandrup and E.H. Immergut. – New York: John Wiley & Sons-Interscience.– 1975.– № 4.– 337 p.
169. Suh, K.W. Cohesive energy densities of polymers from turbidimetric titrations / K.W. Suh, D.H. Clarke // *J. Polym. Sci. A-1 Polym. Chem.* – 1967. – № 5. – P. 1671-1681.
170. Suh, K.W. Turbidimetric determinations of theta compositions / K.W. Suh, D.H. Clarke // *J. Appl. Polym. Sci.*– 1968.– № 12.– P. 1775–1779.
171. Burrell, H. Solubility parameter values, in *Polymer Handbook* / H. Burrell, edited by J. Brandrup and E.H. Immergut. – New York: John Wiley & Sons-Interscience.– 1975.– № 4.– 337 p.
172. Государственная Фармакопея Российской Федерации XII издание (2 часть).– М.: Научный центр экспертизы средств медицинского применения.– 2010.– 600 с.

173. Nano and microparticle engineering of water insoluble drugs using a novel spray-drying process / N. Schafroth, C. Arpagaus, UY. Jadhav [et al.] // *Colloids Surf B: Biointerfaces*.– 2012.– V. 90.– P. 8-15.

174. Кашин, А.С. Формирование наноразмерных покрытий и наночастиц металлов путем магнетронного распыления и их исследование методом сканирующей электронной микроскопии / А.С. Кашин, В.П. Анаников // *Известия АН Сер. Хим.*– 2011.– № 12.– С. 2551-2556.

## ПРИЛОЖЕНИЕ А

В соответствии с протоколом испытаний на лабораторных животных описанным в разделе 3.3 и с применением разработанных методик измерений массовой концентрации метаболитов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с применением масс-селективного детектирования изложенным в разделе 3.4 настоящей диссертации были проведены исследования направленные на поиск метаболитов целевых соединений в моче белых беспородных крыс. Для достижения максимальной сходимости результатов целевое соединение вводили внутрижелудочно 2 группам крыс. Пробы мочи маркировали в соответствии с таблицами 1 и 2

Таблица 1. Время отбора проб мочи у лабораторных животных экспонированных соединением **1**.

Мецигестон (соединение <b>1</b> )	
1-1-1 и 1-1-2	моча собранная в течении 2 часов после введения у группы №1 и группы №2
1-2-1 и 1-2-2	моча собранная в период с 2-го по 6-ой час после введения у группы №1 и группы №2
1-3-1 и 1-3-2	моча собранная в период с 6-го по 24-ый час после введения у группы №1 и группы №2

Таблица 2. Время отбора проб мочи у лабораторных животных экспонированных соединением **8**.

6-дезметильный аналог мецигесатона (соединение <b>8</b> )	
8-1-1 и 8-1-2	моча собранная в течении 2 часов после введения у группы №1 и группы №2
8-2-1 и 8-2-2	моча собранная в период с 2-го по 6-ой час после введения у группы №1 и группы №2
8-3-1 и 8-3-2	моча собранная в период с 6-го по 24-ый час после введения у группы №1 и группы №2



Результаты полученные после анализа представлены на рисунках 1-12

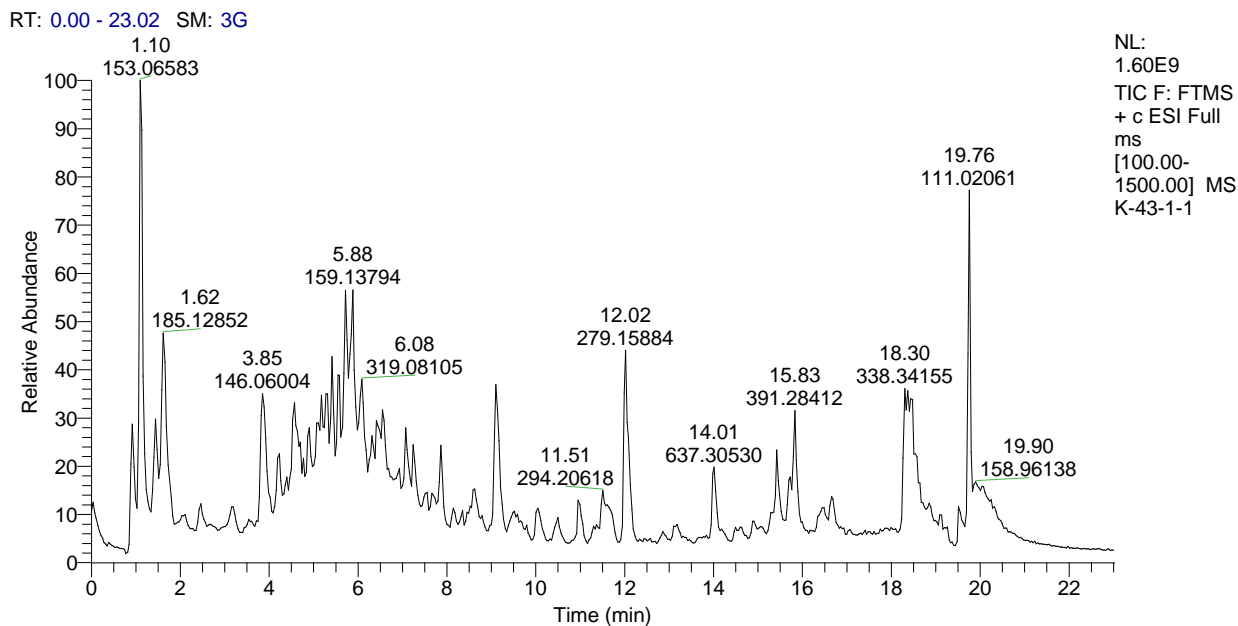


Рисунок 1 – Масс-хроматограмма образца мочи с маркировкой 8-1-1 – полное ионное сканирование

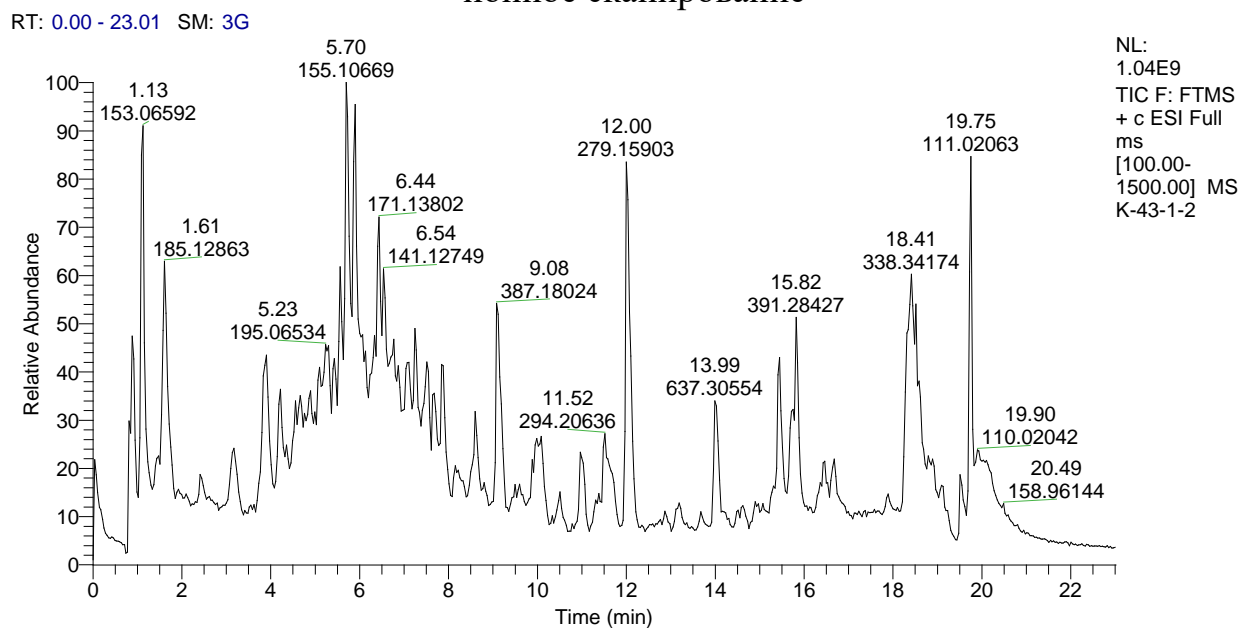
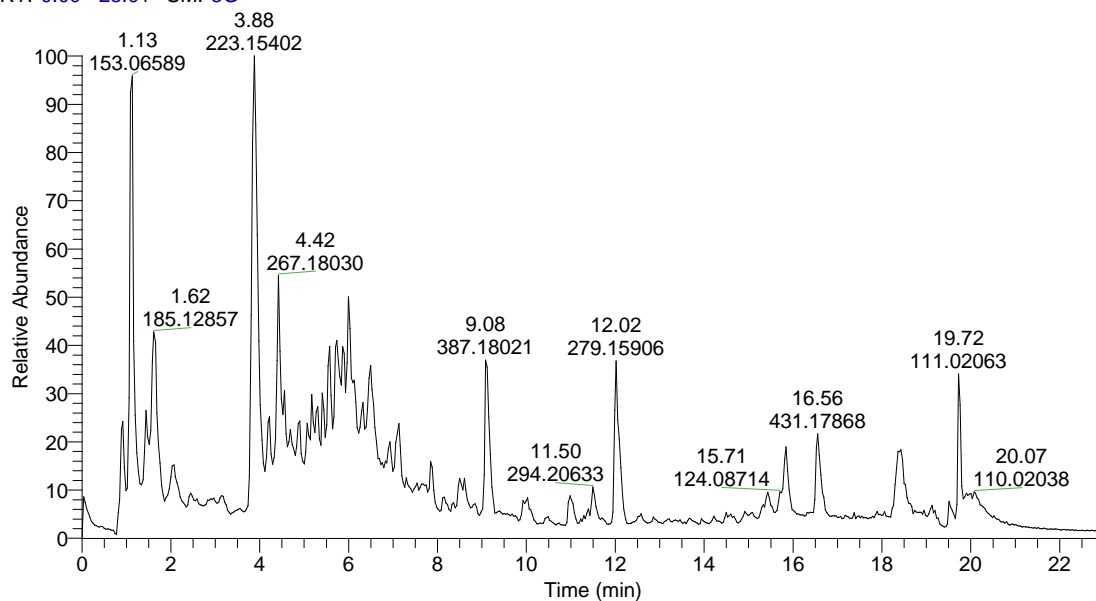


Рисунок 2 – Масс-хроматограмма образца мочи с маркировкой 8-1-2 – полное ионное сканирование

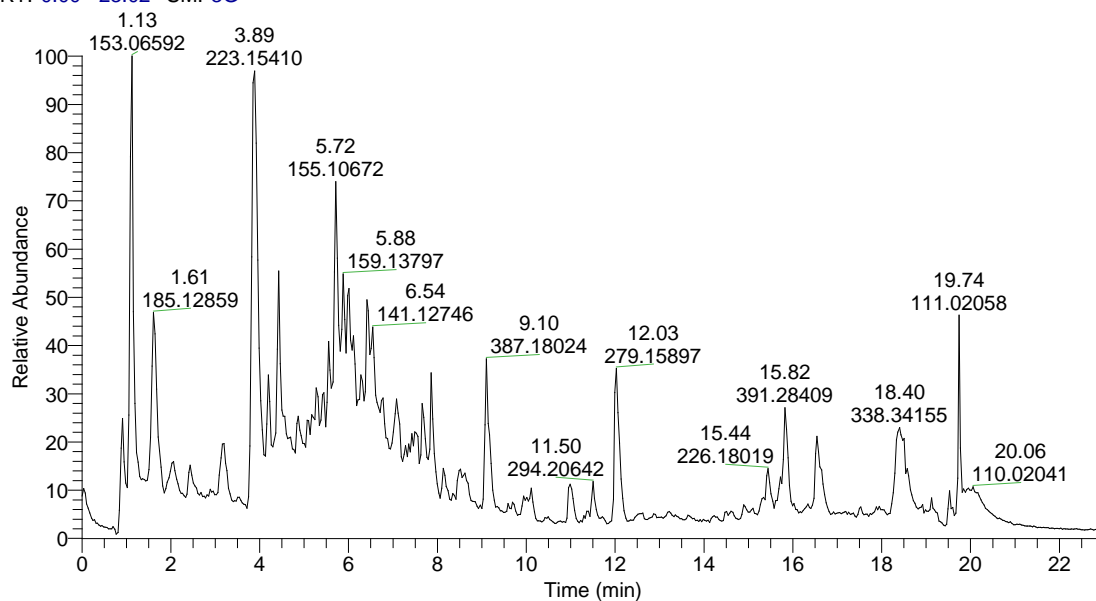
RT: 0.00 - 23.01 SM: 3G



NL:  
2.47E9  
TIC F: FTMS  
+ c ESI Full  
ms  
[100.00-  
1500.00] MS  
K-43-2-1

Рисунок 3 – Масс-хроматограмма образца мочи с маркировкой 8-2-1 – полное ионное сканирование

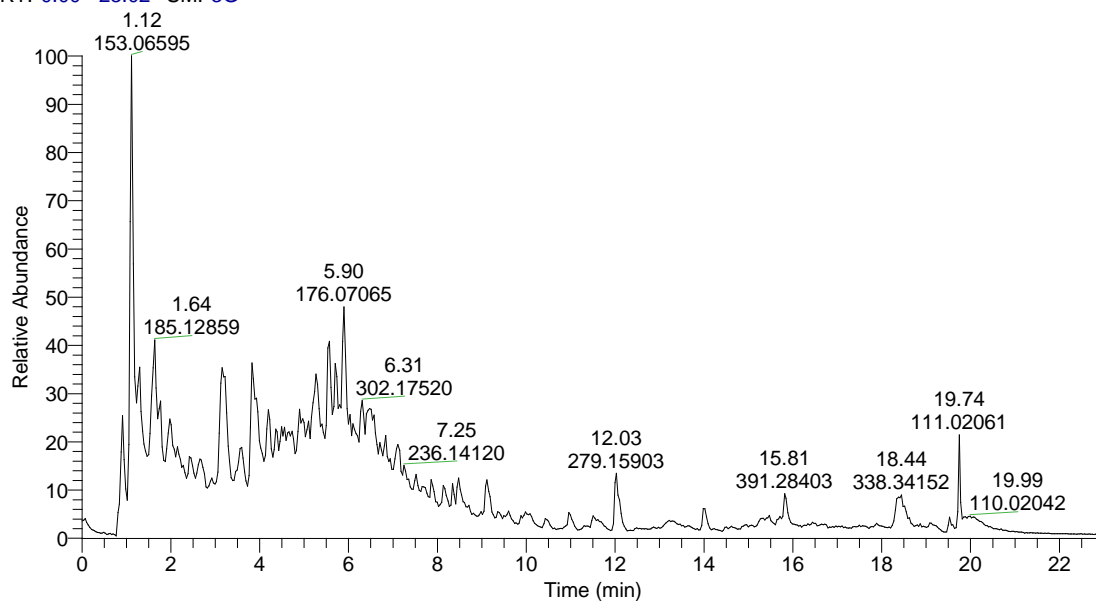
RT: 0.00 - 23.02 SM: 3G



NL:  
2.18E9  
TIC F: FTMS  
+ c ESI Full  
ms  
[100.00-  
1500.00] MS  
K-43-2-2

Рисунок 4 – Масс-хроматограмма образца мочи с маркировкой 8-2-2 – полное ионное сканирование

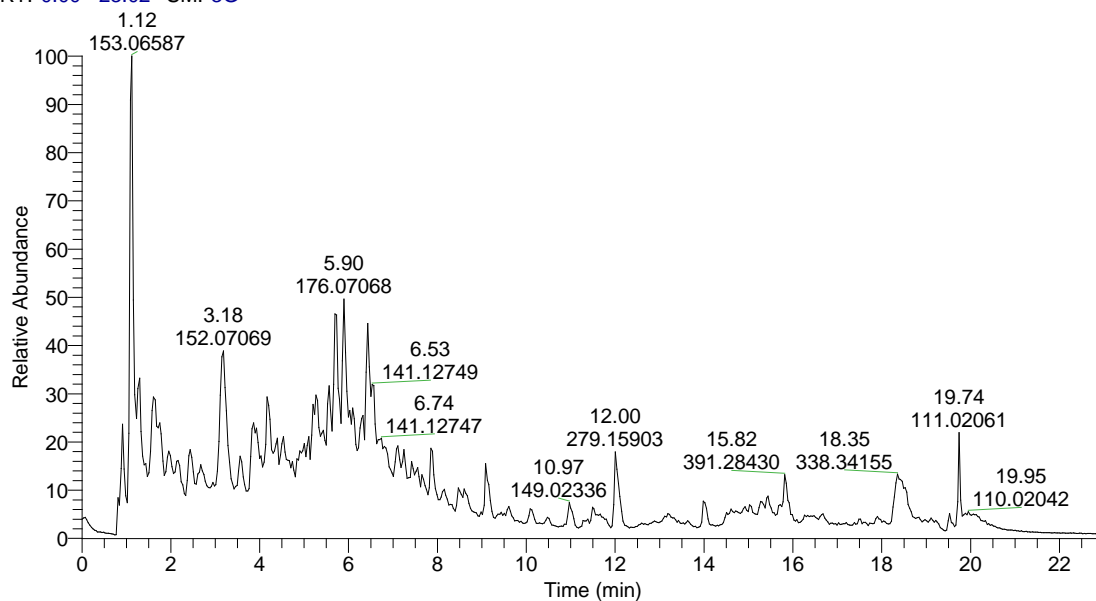
RT: 0.00 - 23.02 SM: 3G



NL:  
5.04E9  
TIC F: FTMS  
+ c ESI Full  
ms  
[100.00-  
1500.00] MS  
K-43-3-1

Рисунок 5 – Масс-хроматограмма образца мочи с маркировкой 8-3-1 – полное ионное сканирование

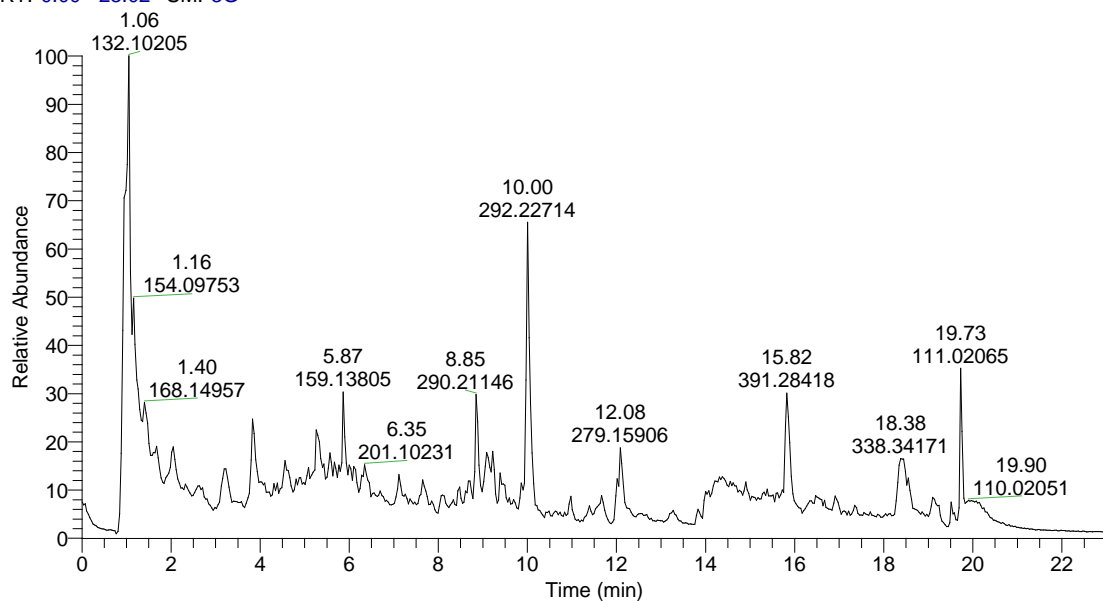
RT: 0.00 - 23.02 SM: 3G



NL:  
4.27E9  
TIC F: FTMS  
+ c ESI Full  
ms  
[100.00-  
1500.00] MS  
K-43-3-2

Рисунок 6 – Масс-хроматограмма образца мочи с маркировкой 8-3-2 – полное ионное сканирование

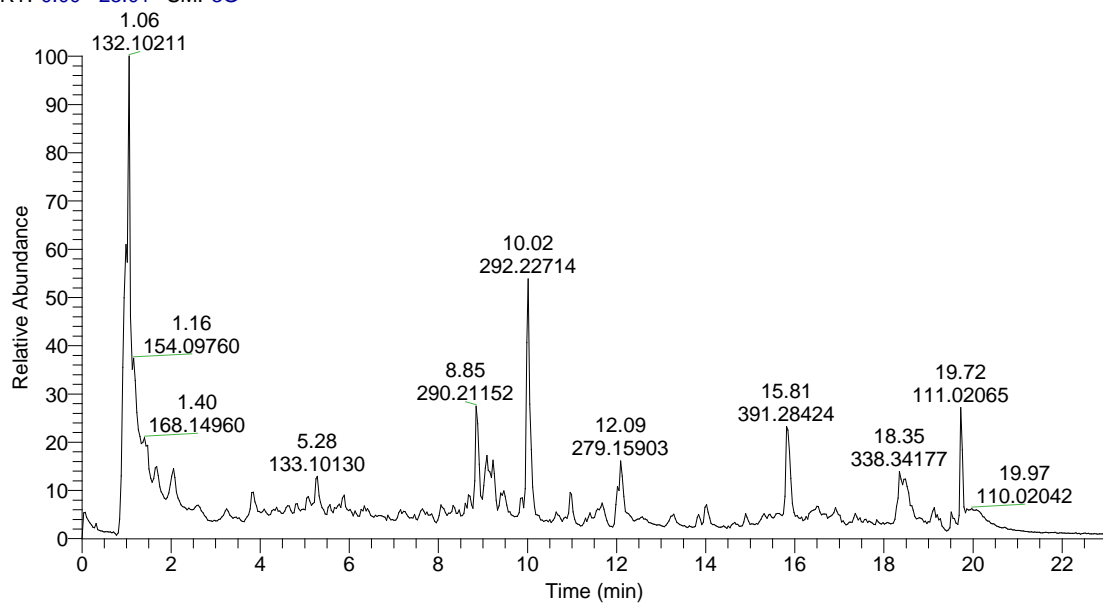
RT: 0.00 - 23.02 SM: 3G



NL:  
2.73E9  
TIC F: FTMS  
+ c ESI Full  
ms  
[100.00-  
1500.00] MS  
Mec-1-1

Рисунок 7 – Масс-хроматограмма образца мочи с маркировкой 1-1-1 – полное ионное сканирование

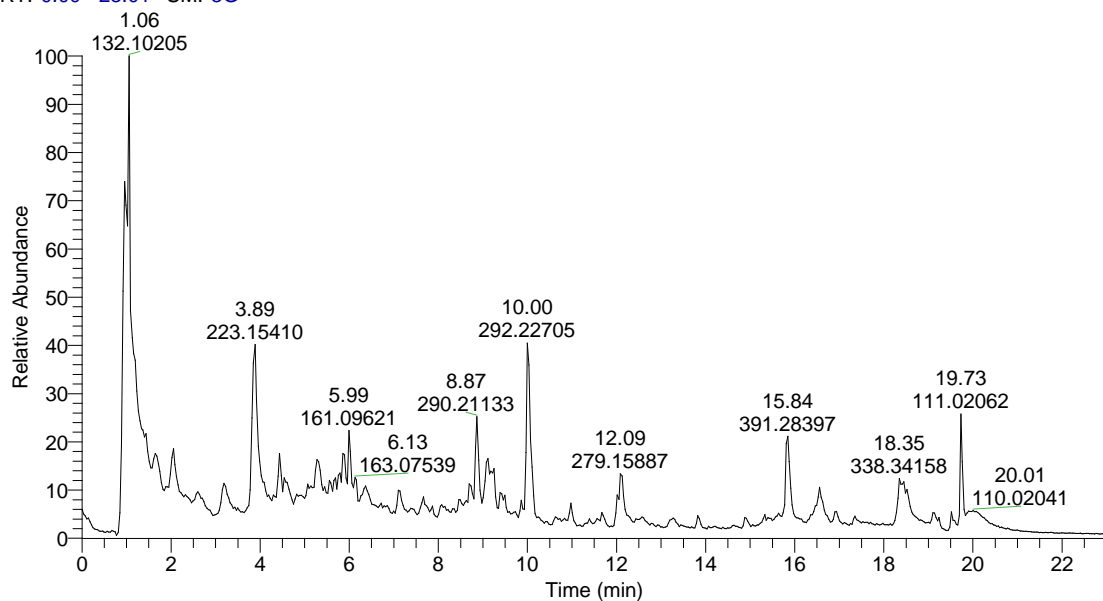
RT: 0.00 - 23.01 SM: 3G



NL:  
3.51E9  
TIC F: FTMS  
+ c ESI Full  
ms  
[100.00-  
1500.00] MS  
Mec-1-2

Рисунок 8 – Масс-хроматограмма образца мочи с маркировкой 1-1-2 – полное ионное сканирование

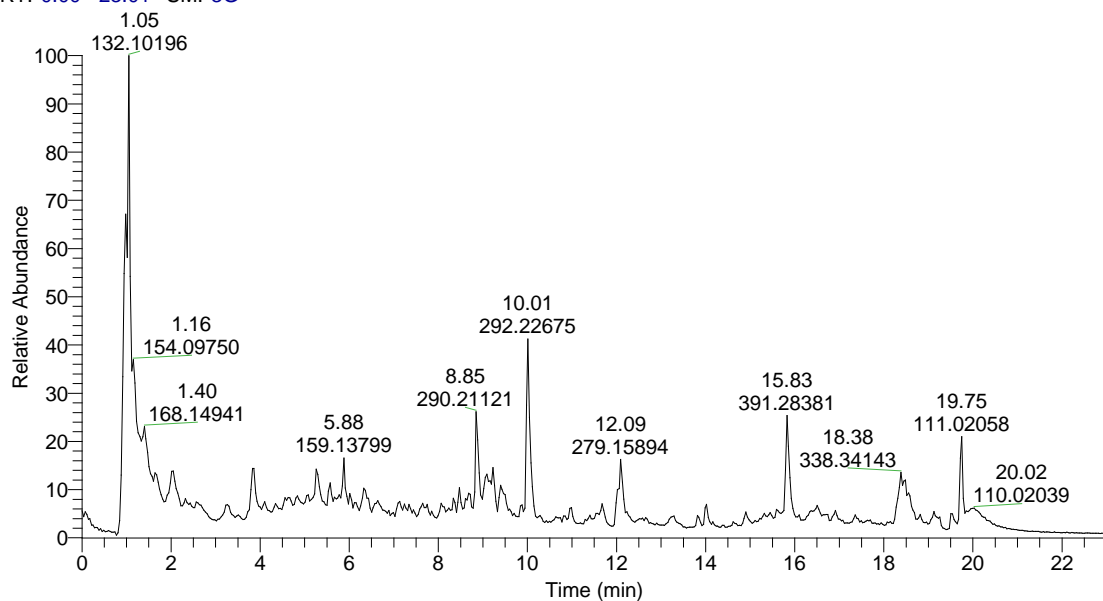
RT: 0.00 - 23.01 SM: 3G



NL:  
3.79E9  
TIC F: FTMS  
+ c ESI Full  
ms  
[100.00-  
1500.00] MS  
Mec-2-1

Рисунок 9 – Масс-хроматограмма образца мочи с маркировкой 1-2-1 – полное ионное сканирование

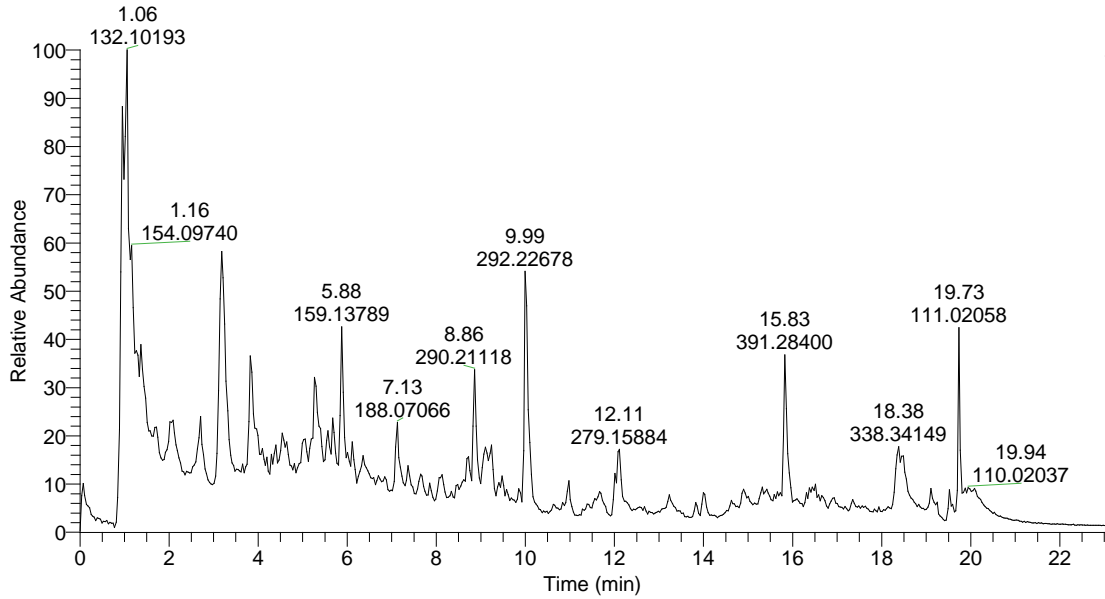
RT: 0.00 - 23.01 SM: 3G



NL:  
3.70E9  
TIC F: FTMS  
+ c ESI Full  
ms  
[100.00-  
1500.00] MS  
Mec-2-2

Рисунок 10 – Масс-хроматограмма образца мочи с маркировкой 1-2-2 – полное ионное сканирование

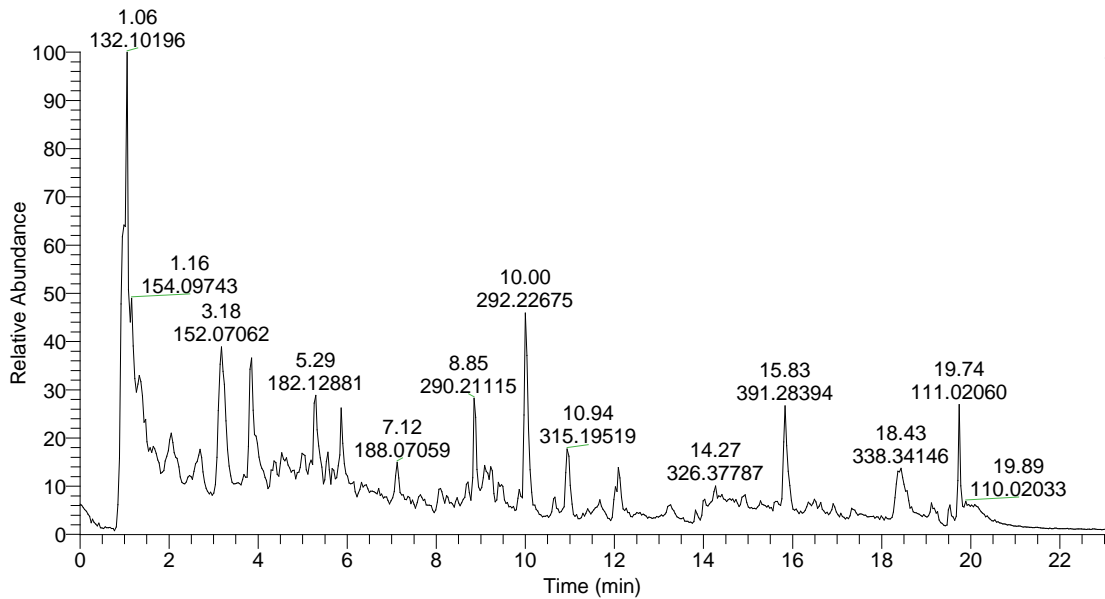
RT: 0.00 - 23.02 SM: 3G



NL:  
2.47E9  
TIC F: FTMS  
+ c ESI Full  
ms  
[100.00-  
1500.00] MS  
Mec-3-1

Рисунок 11 – Масс-хроматограмма образца мочи с маркировкой 1-3-1 – полное ионное сканирование

RT: 0.00 - 23.02 SM: 3G



NL:  
3.52E9  
TIC F: FTMS  
+ c ESI Full  
ms  
[100.00-  
1500.00] MS  
Mec-3-2

Рисунок 12 – Масс-хроматограмма образца мочи с маркировкой 1-3-2 – полное ионное сканирование

**Метаболит 18.**

Для обнаружения данного метаболита в пробах мочи необходимо использование методов, позволяющих выявлять структурное сходство исследуемого стандарта и метаболита в биопробе. Целесообразно для этих целей использовать метод высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией, которая позволяет сравнивать два вещества по таким параметрам как время удерживания и характеристичные ионные переходы. А использование масс-спектрометрии высокого разрешения позволит повысить чувствительность используемого метода.

Хроматографическое разделение осуществляли в режиме обращенно-фазового градиентного элюирования. В качестве элюентов были выбраны 0,1 %-ный раствор муравьиной кислоты в смеси ацетонитрил/вода в соотношении 5 : 95 (об.) (элюент А) и 0,1 % раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (элюент В). В качестве неподвижной фазы применяли сорбент на основе силикагеля, модифицированный группами С18 (Hypersil Gold aQ) с полярными функциональными группами. Время выхода 401 составляет 13,91 мин.

Исходя из вышесказанного для обнаружения метаболитов б-дезметильного аналога мецигестона методом тандемной масс-спектрометрии высокого разрешения необходимо изучить фрагментацию синтезированного стандарта.

В нашей работе мы использовали ионизацию электрораспылением (ИЭР). На рисунках 13 и 14 приведены масс-хроматограмма и масс-спектр раствора 18 с концентрацией 100 мкг/мл, полученный при ИЭР. В режиме регистрации положительно заряженных ионов 18 образует протонированную молекулу  $[M+H]^+$  с  $m/z$  371,2945.

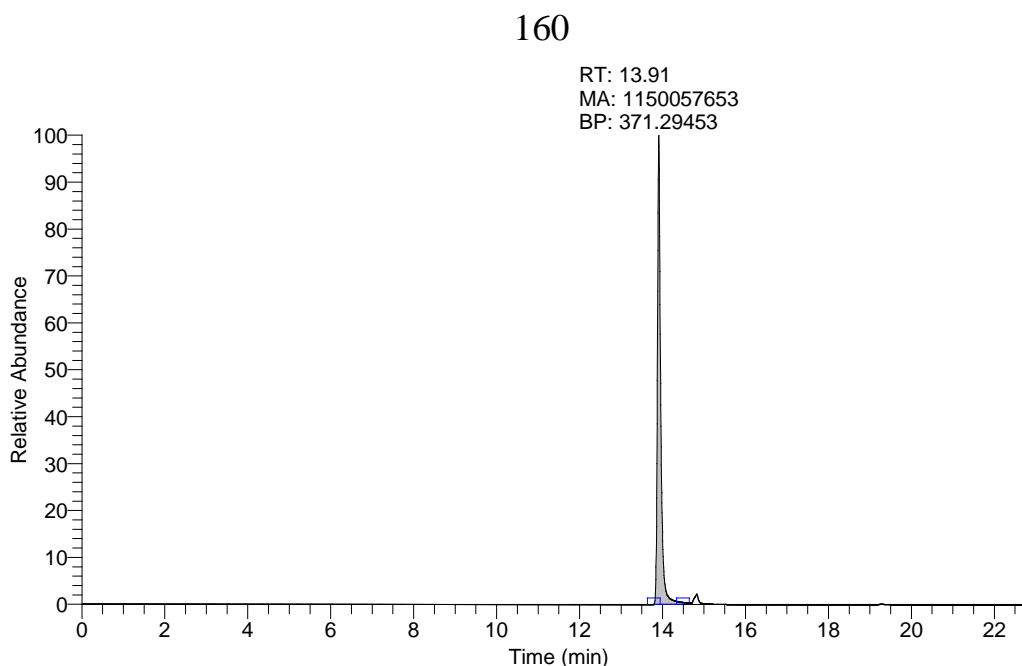


Рисунок 13 – Масс-хроматограмма стандартного раствора 18 с концентрацией 100 мкг/мл по выделенному иону с  $m/z$  371.2945

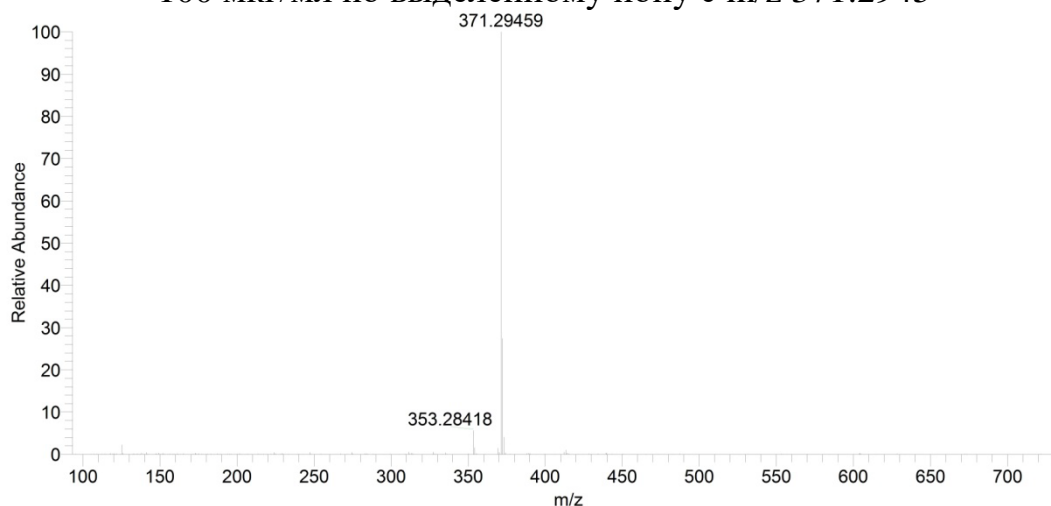


Рисунок 14 – Масс-спектр соединения с  $m/z$  371,2945 в режиме сканирования положительно заряженных ионов

На следующем этапе работы исследовали диссоциацию иона с  $m/z$  371,2945 для выбора характеристичных ионных переходов, которые в дальнейшем будут использоваться для идентификации предполагаемых метаболитов в биопробах в режиме МС/МС.

Полученный фрагментный масс-спектр приведен на рисунке 15.



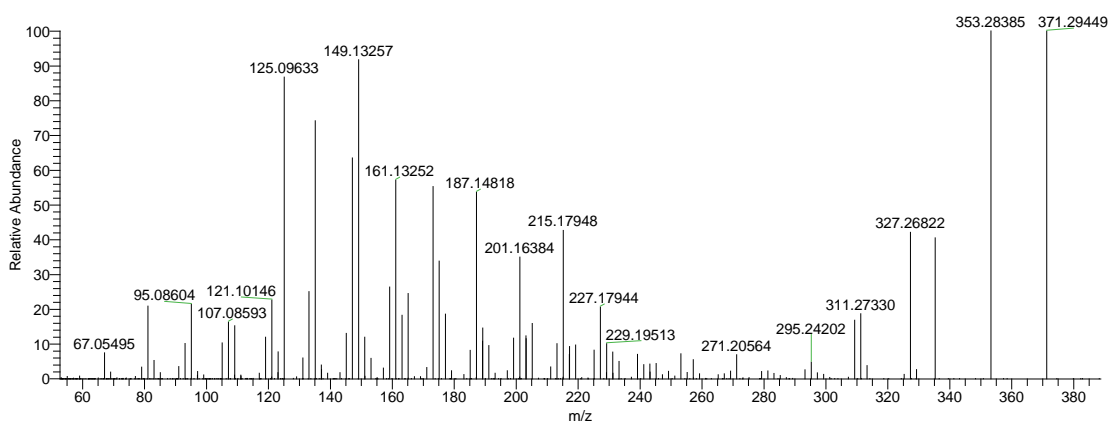


Рисунок 15 – МС/МС-спектры пика, соответствующего 18, в режиме регистрации положительно заряженных ионов при энергии фрагментации – 40 В.

В качестве характеристичных ионных переходов выбирали пики с максимальной интенсивностью, соответствующие как отщеплению боковых заместителей, так и структурным перегруппировкам.

Для рассмотрения возможных фрагментных ионов экспериментальные результаты сопоставляли с расчётными, полученными с помощью программы HighChem Mass Frontier версии 7.0.

Таким образом, выбрали ионный переход с  $m/z$  371.2945  $\rightarrow$  353,2839, энергия соударений – 40 В.

Предполагаемые механизмы образования данных фрагментных ионов приведены на рисунках 16-17.

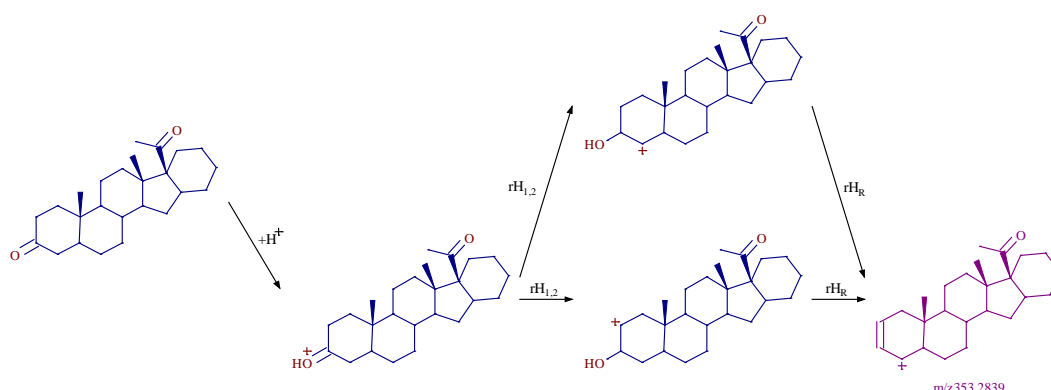


Рисунок 16 – Механизм образования фрагментного иона с  $m/z$  353.2839

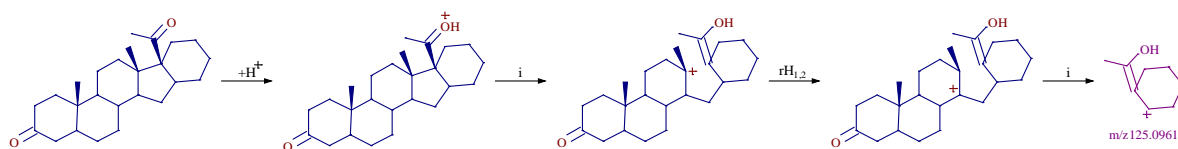


Рисунок 17 – Механизм образования фрагментного иона с  $m/z$  125.0961

Используя выбранные выше параметры проводили анализ мочи крыс, экспонированных 8. В результате проведенных исследований данный метаболит был обнаружен в пробах собранных в период с 2 до 6 часов и с 6 до 24 часов. Время выхода совпадает со стандартом. Детектирование проводили в 2 сегментах: в режиме полного ионного сканирования и регистрации выбранных ионных переходов. На рисунке 18 приведена соответствующая масс-хроматограмма.

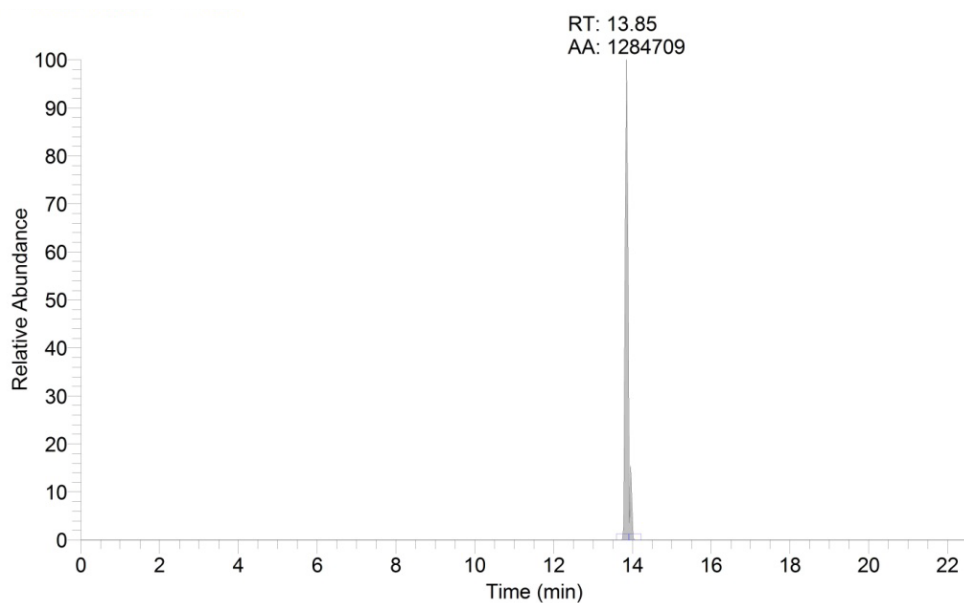


Рисунок 18 – Масс-хроматограмма образца мочи с маркировкой 8-2-1 – детектирование по выбранному ионному переходу 371.2945 → 353,2839, 125,0963

Градуировочную зависимость строили в диапазоне от 1 до 1000 нг/мл. (рис. 19)

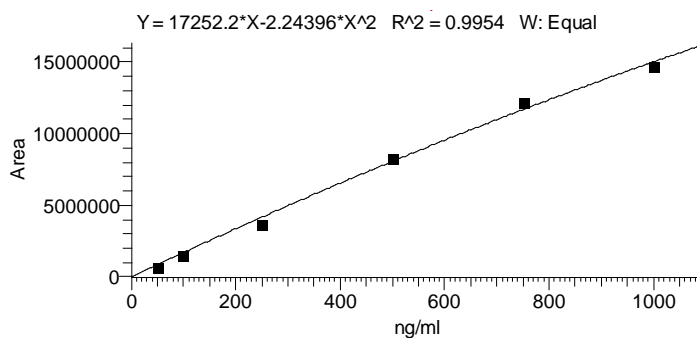


Рисунок 19 – Калибровочный график соединения 18

Найденное значение концентрации метаболита 8 составляет 1,5 и 1,2 нг в пробах собранных в период с 2 до 6 часов и с 6 до 24 часов, соответственно.

### Метаболит 17.

Для метаболита мецигестона шифр 17 хроматографическое разделение осуществляли при тех же условиях. Время выхода 17 составляет 14,37 мин. Для обнаружения этого метаболита мецигестона методом tandemной масс-спектрометрии высокого разрешения проводили изучение фрагментации синтезированного стандарта.

На рисунках 20 и 21 приведены масс-хроматограмма и масс-спектр раствора 17 с концентрацией 100 мкг/мл, полученный при ИЭР. В режиме регистрации положительно заряженных ионов 17 образует протонированную молекулу  $[M+H]^+$  с  $m/z$  385,3103.

RT: 0.00 - 23.00 SM: 11G

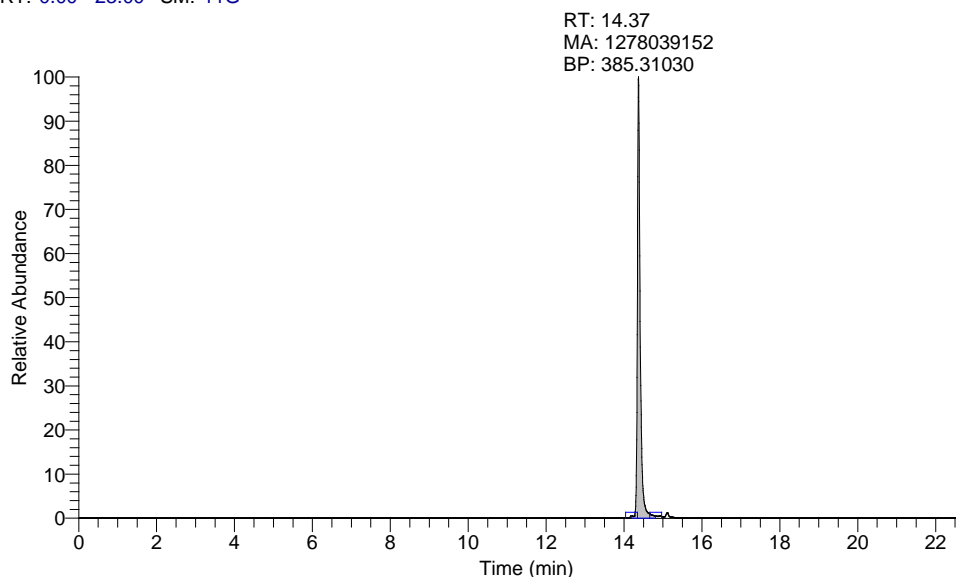


Рисунок 20 – Масс-хроматограмма стандартного раствора 17 с концентрацией 100 мкг/мл по выделенному иону с  $m/z$  385.3103

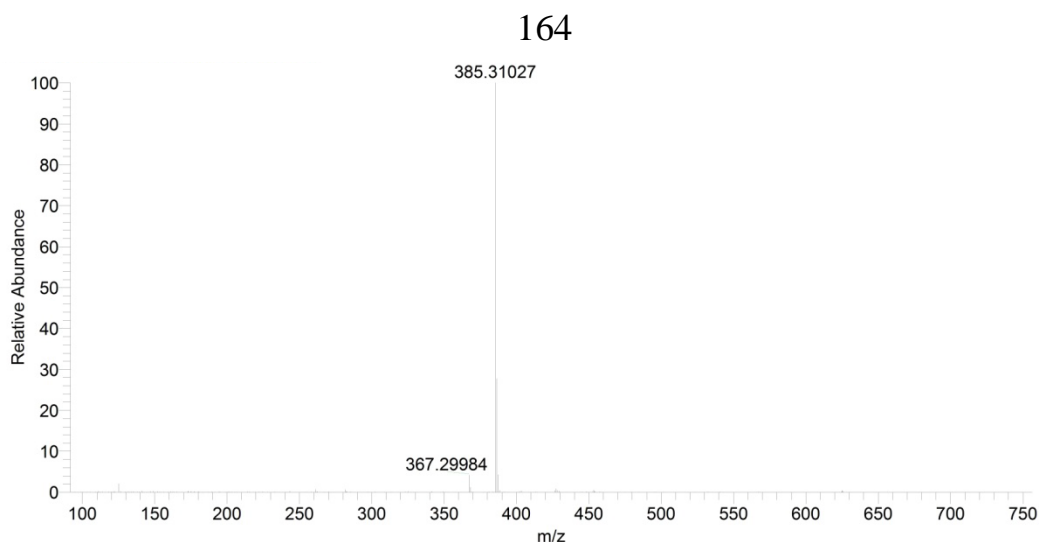


Рисунок 21 – Масс-спектр соединения с  $m/z$  385.3103 в режиме сканирования положительно заряженных ионов

На следующем этапе работы исследовали диссоциацию иона с  $m/z$  385.3103 для выбора характеристичных ионных переходов, которые в дальнейшем будут использоваться для идентификации предполагаемых метаболитов в биопробах в режиме МС/МС.

Полученный фрагментный масс-спектр приведен на рисунке 22.

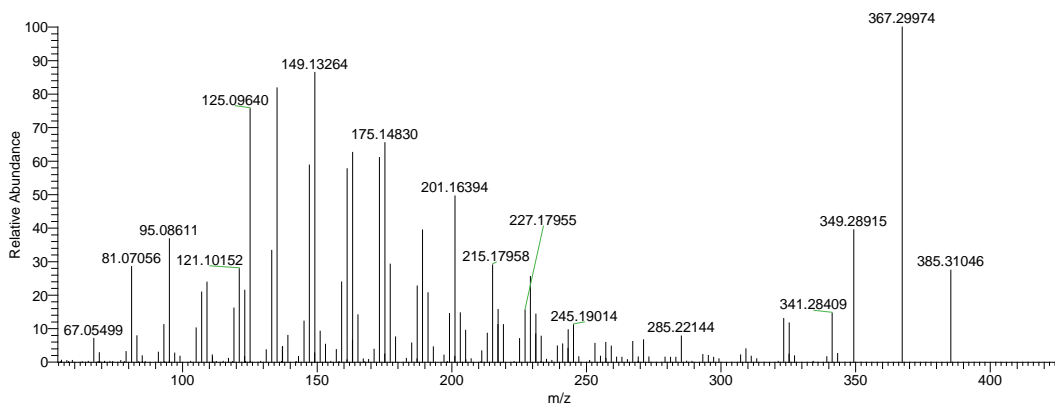


Рисунок 22 – МС/МС-спектры пика, соответствующего 805, в режиме регистрации положительно заряженных ионов при энергии фрагментации – 40 В

В качестве характеристичных ионных переходов выбирали пики с максимальной интенсивностью, соответствующие как отщеплению боковых заместителей, так и структурным перегруппировкам.

Для рассмотрения возможных фрагментных ионов экспериментальные результаты сопоставляли с расчётными, полученными с помощью программы HighChem Mass Frontier версии 7.0.

Таким образом, выбрали ионный переход с  $m/z$  385.3103  $\rightarrow$  367,2995 и 125,0961, энергия соударений – 40 В.

Предполагаемые механизмы образования данных фрагментных ионов приведены на рисунках 23-24.

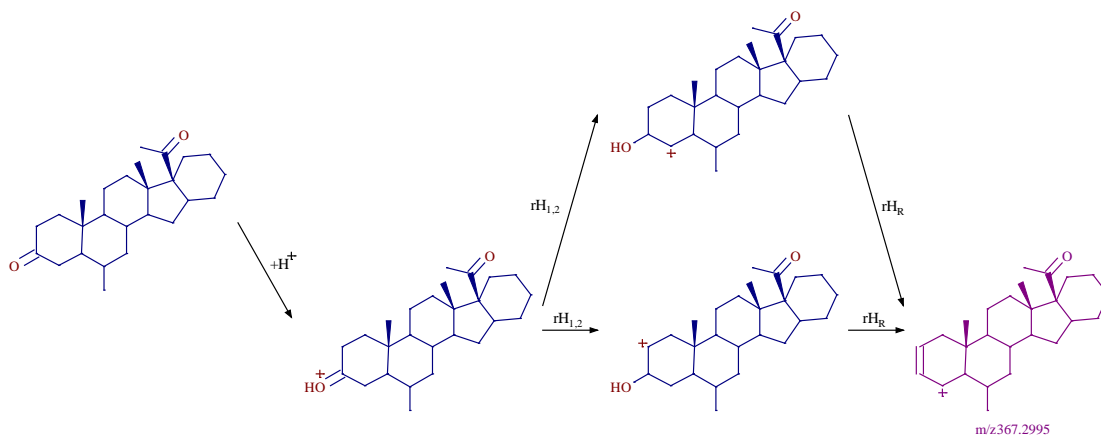


Рисунок 23 – Механизм образования фрагментного иона с  $m/z$  367,2995

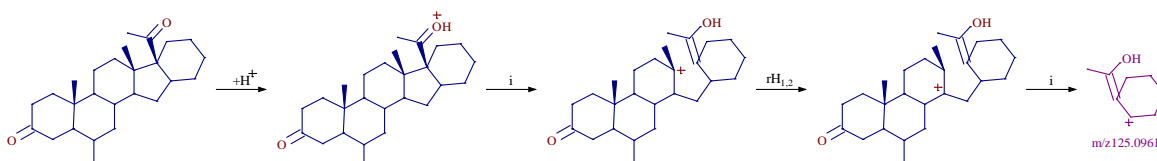


Рисунок 24 – Механизм образования фрагментного иона с  $m/z$  125.0961

Используя выбранные выше параметры проводили анализ мочи крыс, экспонированных мецигестоном. В результате проведенных исследований данный метаболит был обнаружен в пробах собранных в период первых двух часов. Время выхода совпадает со стандартом. Детектирование проводили в 2 сегментах: в режиме полного ионного сканирования и регистрации выбранных ионных переходов. На рисунке 25 приведена соответствующая масс-хроматограмма.

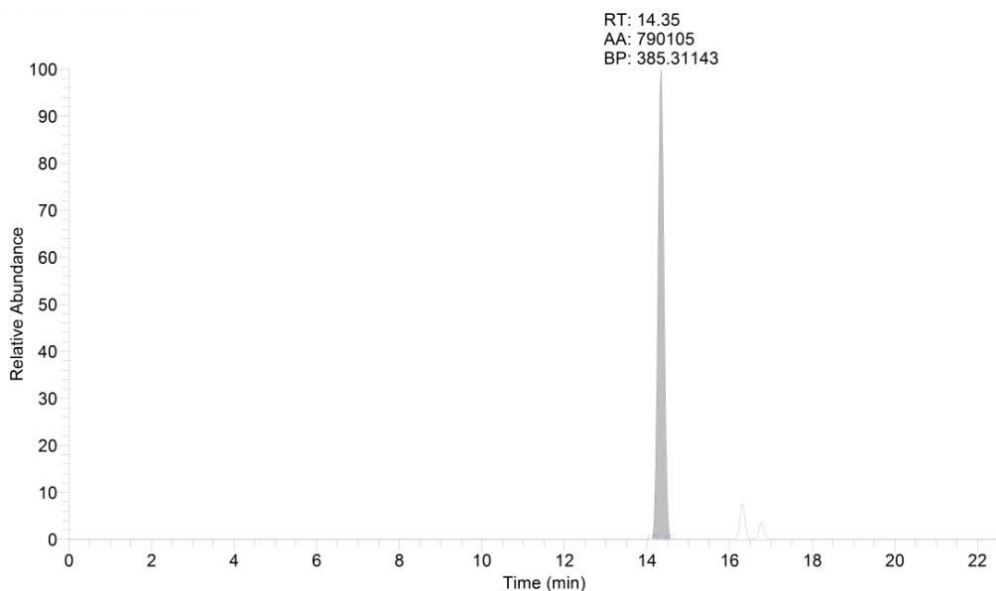


Рисунок 25 – Масс-хроматограмма образца мочи с маркировкой 1-1-1 – детектирование по выбранному ионному переходу 385.3103 → 367,2995, 125,0961

Градуировочную зависимость строили в диапазоне от 1 до 1000 нг/мл. (рис. 26)

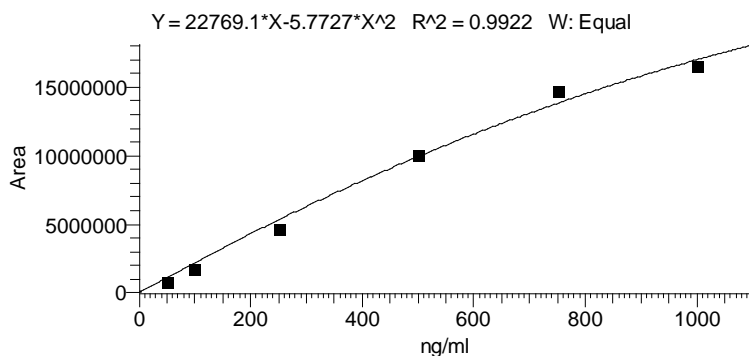


Рисунок 26 – Калибровочный график соединения 17

Найденное значение концентрации метаболита 17 составляет 0,825 нг в пробе мочи собранной в первые 2 часа после введения.

### Метаболит 22.

Для метаболита мецигестона шифр 22 хроматографическое разделение осуществляли при тех же условиях. Время выхода 22 составляет 15,02 мин. Для обнаружения этого метаболита мецигестона методом tandemной масс-спектрометрии высокого разрешения проводили изучение фрагментации синтезированного стандарта.

На рисунках 27 и 28 приведены масс-хроматограмма и масс-спектр раствора 22 с концентрацией 100 мкг/мл, полученный при ИЭР. В режиме регистрации положительно заряженных ионов 22 образует протонированную молекулу  $[M+H]^+$  с  $m/z$  385,30984.

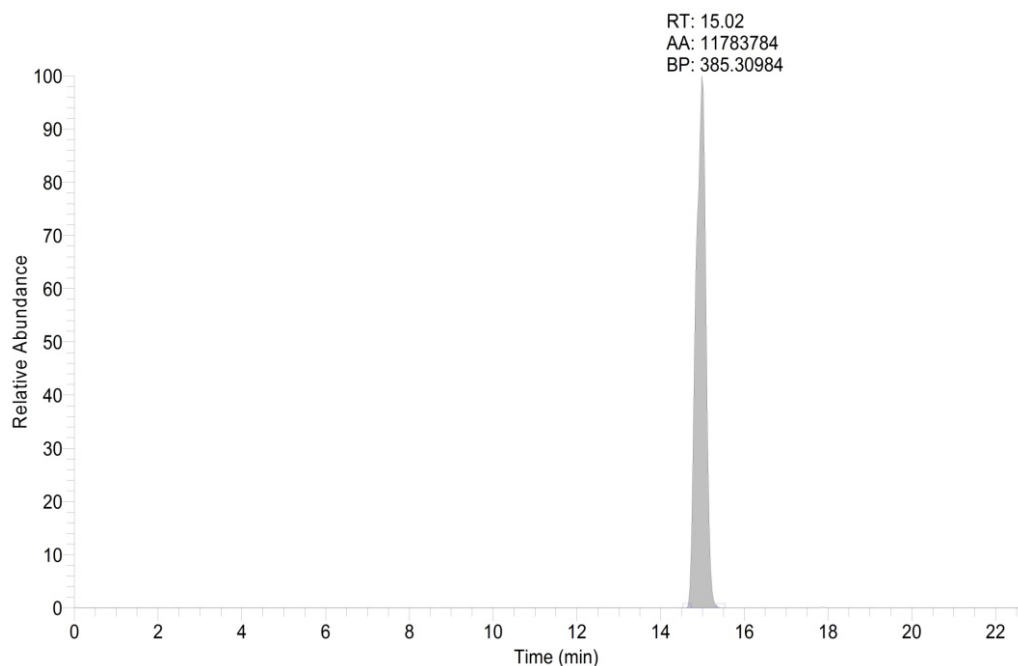


Рисунок 27 – Масс-хроматограмма стандартного раствора 22 с концентрацией 100 мкг/мл по выделенному иону с  $m/z$  385.3098

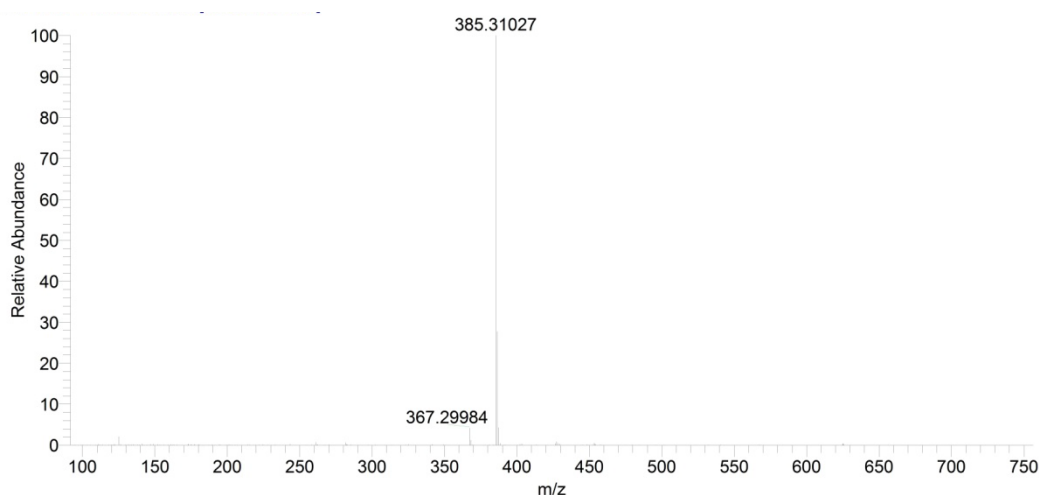


Рисунок 28 – Масс-спектр соединения с  $m/z$  385.3103 в режиме сканирования положительно заряженных ионов

На следующем этапе работы исследовали диссоциацию иона с  $m/z$  385.3103 для выбора характеристичных ионных переходов, которые в

дальнейшем будут использоваться для идентификации предполагаемых метаболитов в биопробах в режиме МС/МС.

Полученный фрагментный масс-спектр приведен на рисунке 29.

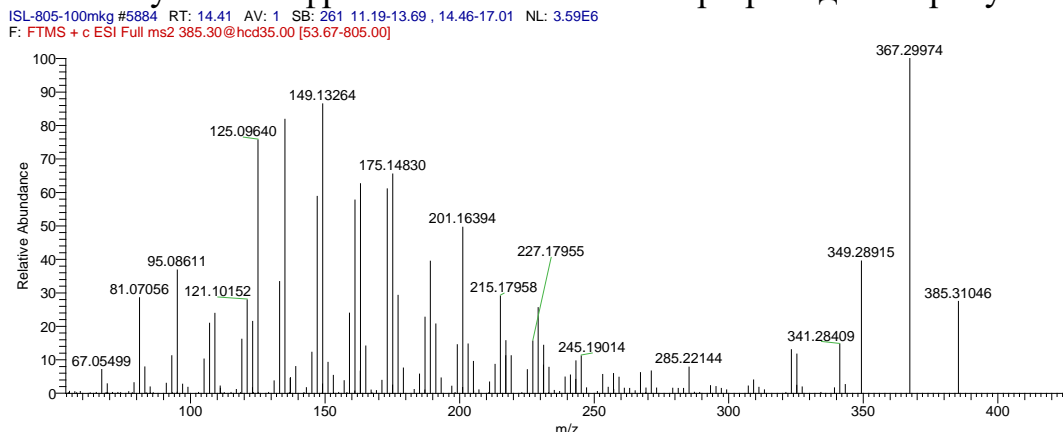


Рисунок 29 – МС/МС-спектры пика, соответствующего 22, в режиме регистрации положительно заряженных ионов при энергии фрагментации – 40 В

Механизм фрагментации данного соединения аналогичен 17. Используя выбранные выше параметры проводили анализ мочи крыс, экспонированных мецигестомом. В результате проведенных исследований данный метаболит был обнаружен в пробах собранных в период с начала введения до 2 часов и с второго по шестой час. Время выхода совпадает со стандартом. Детектирование проводили в 2 сегментах: в режиме полного ионного сканирования и регистрации выбранных ионных переходов. На рисунке 30 приведена соответствующая масс-хроматограмма.



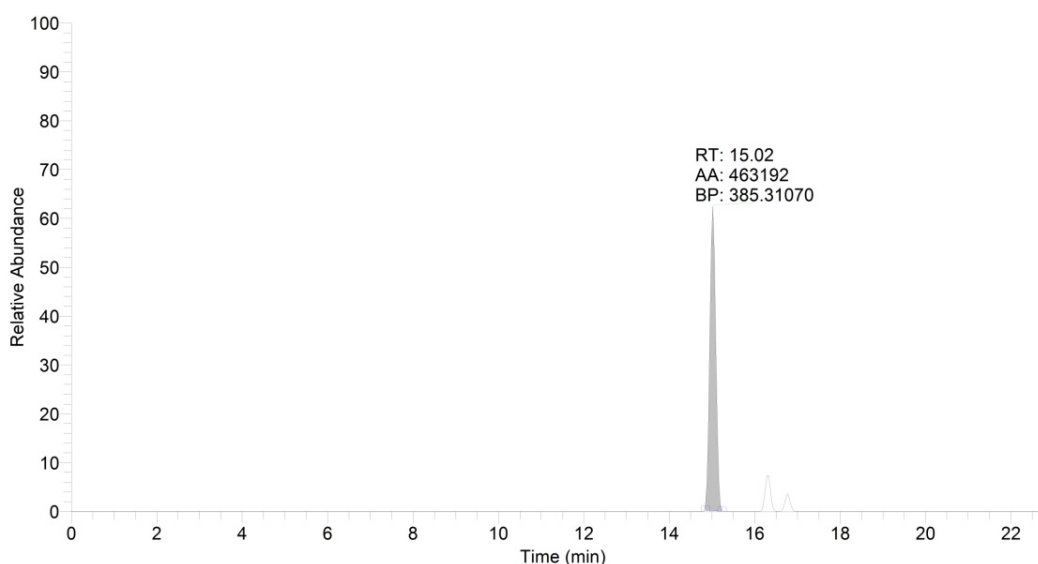


Рисунок 30 – Масс-хроматограмма образца мочи с маркировкой 1-1-1– детектирование по выбранному ионному переходу 385.3103 → 367,2995, 125,0961

Градуировочную зависимость строили в диапазоне от 1 до 1000 нг/мл. (рис. 31)

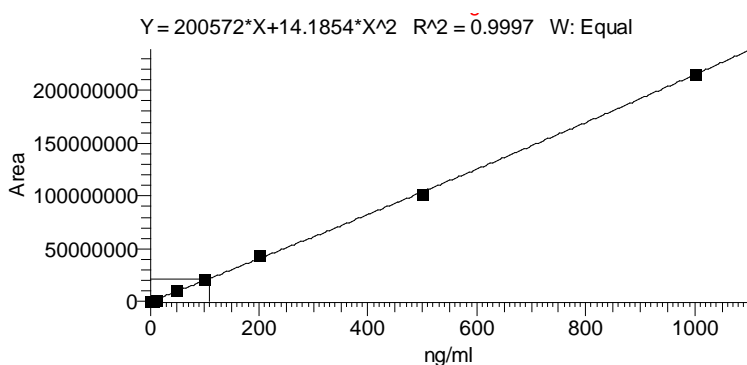


Рисунок 31 – Калибровочный график соединения 22

Найденное значение концентрации метаболита 22 составляет 0,77 и 0,36 нг в пробах собранных в период с начала введения до 2 часов и с второго по шестой час соответственно.

### Метаболит 14а.

Для метаболита мецигестона шифр 14а хроматографическое разделение осуществляли при тех же условиях. Время выхода 2а составляет 15,51 мин. Для обнаружения метаболитов мецигестона методом tandemной масс-спектрометрии высокого разрешения необходимо было изучить фрагментацию синтезированного стандарта. На рисунках 32 и 33 приведены масс-хроматограмма и масс-спектр раствора 14а с концентрацией 100 мкг/мл,

полученный при ИЭР. В режиме регистрации положительно заряженных ионов 14a образует протонированную молекулу  $[M+H]^+$  с  $m/z$  387,3257.

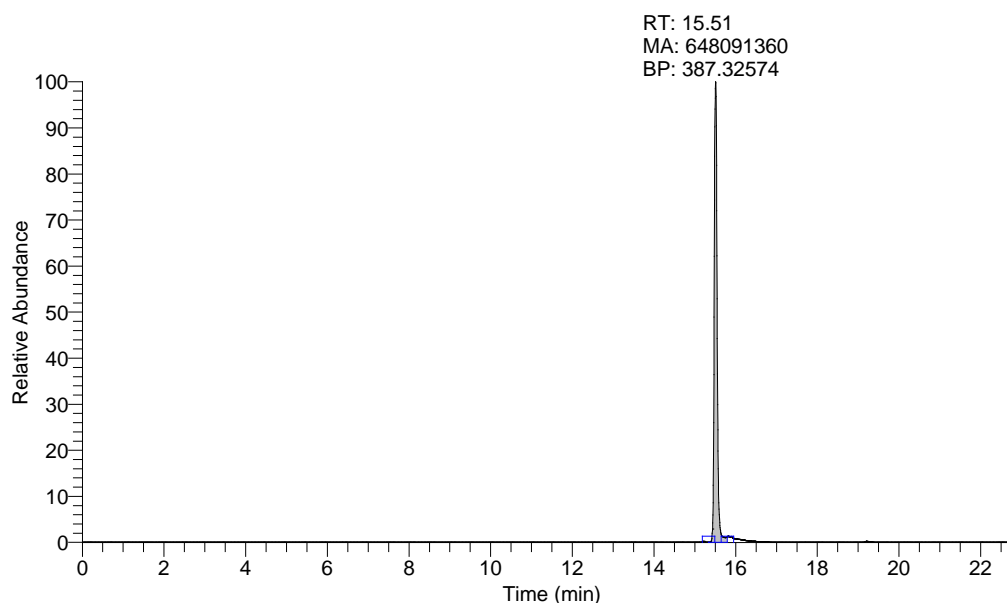


Рисунок 32 – Масс-хроматограмма стандартного раствора 14a с концентрацией 100 мкг/мл по выделенному иону с  $m/z$  387,3257

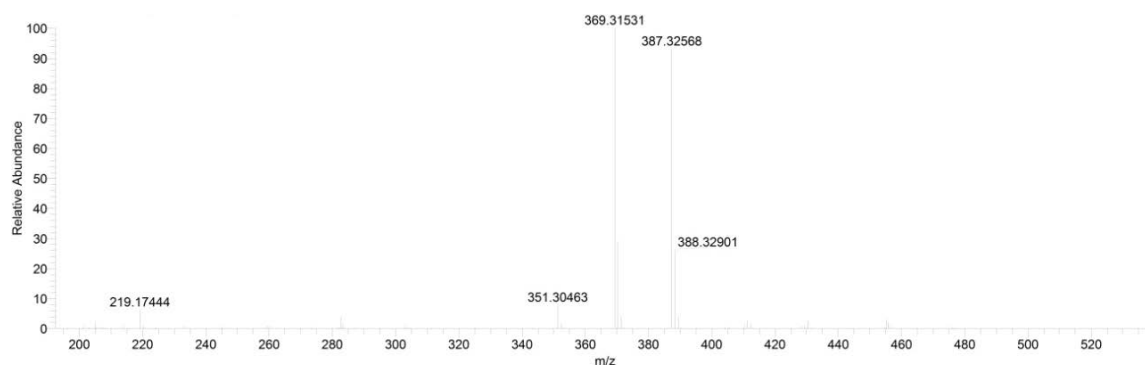


Рисунок 33 – Масс-спектр соединения с  $m/z$  387,3257 в режиме сканирования положительно заряженных ионов

На следующем этапе работы исследовали диссоциацию иона с  $m/z$  387,3257 для выбора характеристичных ионных переходов, которые в дальнейшем будут использоваться для идентификации предполагаемых метаболитов в биопробах в режиме МС/МС.

Полученный фрагментный масс-спектр приведен на рисунке 34.

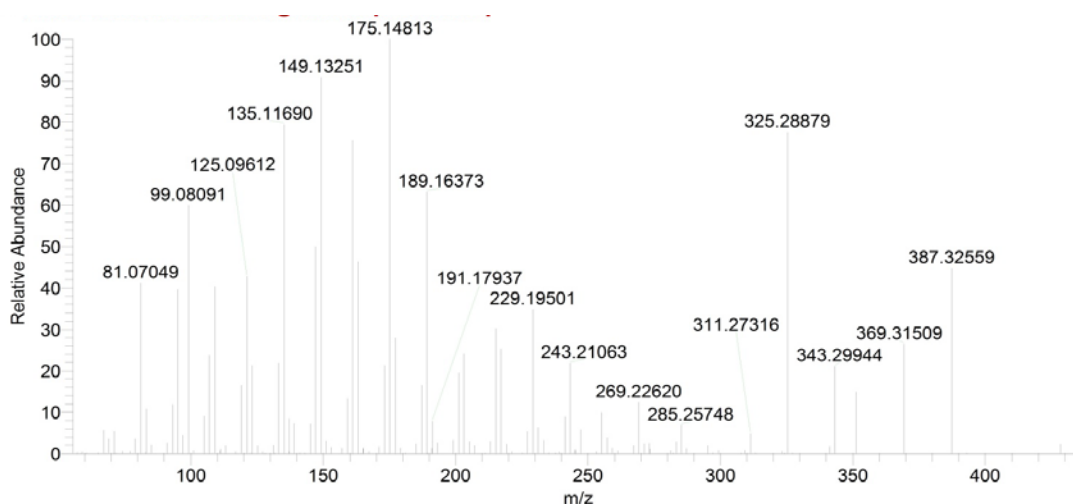


Рисунок 34 – MS/MS-спектры пика, соответствующего 14а, в режиме регистрации положительно заряженных ионов при энергии фрагментации – 40 В

В качестве характеристичных ионных переходов выбирали пики с максимальной интенсивностью, соответствующие как отщеплению боковых заместителей, так и структурным перегруппировкам.

Для рассмотрения возможных фрагментных ионов экспериментальные результаты сопоставляли с расчётными, полученными с помощью программы HighChem Mass Frontier версии 7.0.

Таким образом, выбрали ионный переход с  $m/z$  387,3257  $\rightarrow$  325,28879, 125,0961, энергия соударений – 40 В.

Предполагаемые механизмы образования данных фрагментных ионов приведены на рисунках 35-36.

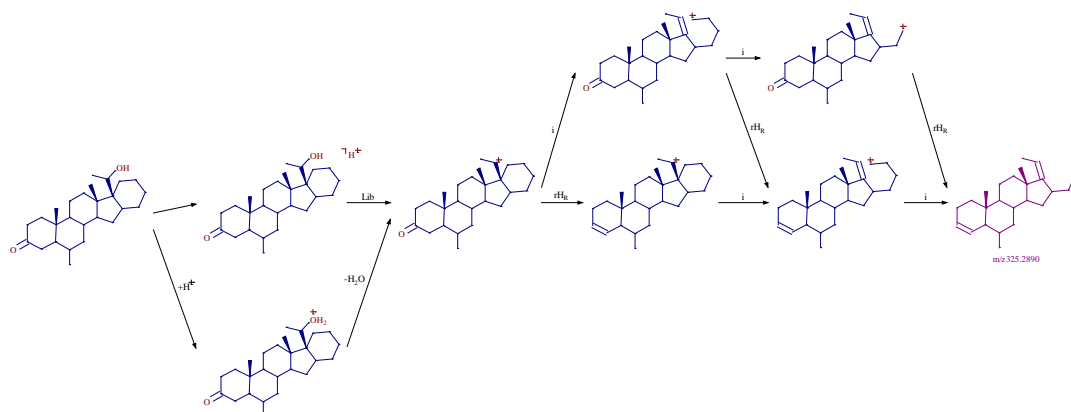


Рисунок 35 – Механизм образования фрагментного иона с  $m/z$  325,28879

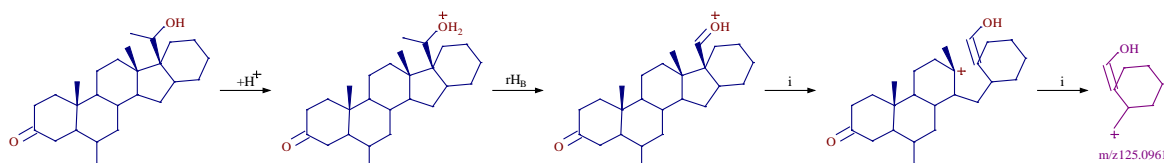


Рисунок 36 – Механизм образования фрагментного иона с  $m/z$  125.0961

Используя выбранные выше параметры проводили анализ мочи крыс, экспонированных мецигестоном. В результате проведенных исследований данный метаболит был обнаружен в пробах мочи собранной с 2-го по 6-ой час и с 6-го по 24-ый часа после введения. Время выхода совпадает со стандартом. Детектирование проводили в 2 сегментах: в режиме полного ионного сканирования и регистрации выбранных ионных переходов.

На рисунке 37 приведена соответствующая масс-хроматограмма.

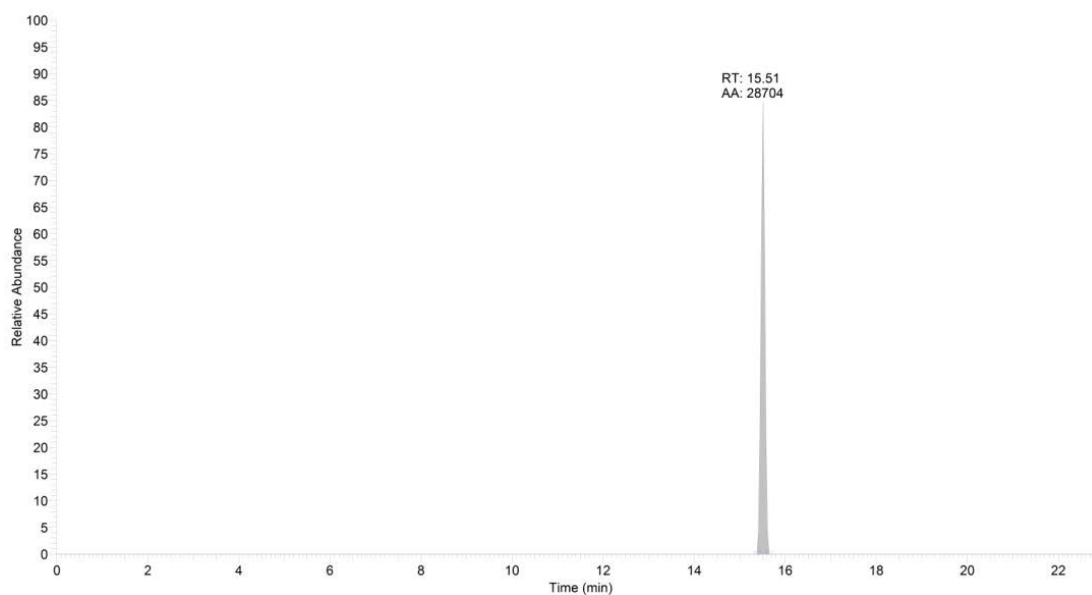


Рисунок 37 – Масс-хроматограмма образца мочи с маркировкой 1-2-1 – детектирование по выбранному ионному переходу  $387,3257 \rightarrow 325,28879, 125,0961$

Градуировочную зависимость строили в диапазоне от 1 до 1000 нг/мл. (рис. 38)

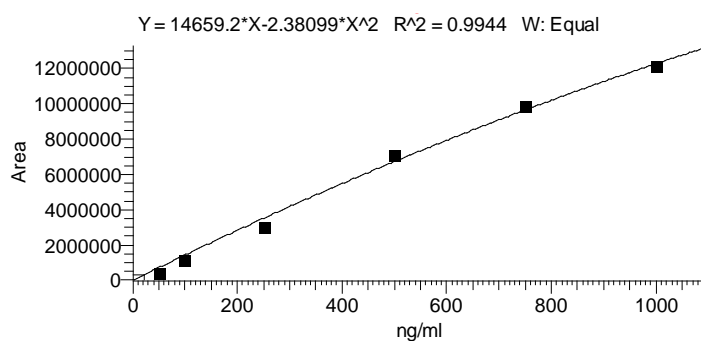


Рисунок 38 – Калибровочный график соединения 14а

Найденное значение концентрации метаболита 2а составляет 0,58 и 0,17 нг в пробах мочи собранной с 2-го по 6-ой час и с 6-го по 24-ый часа после введения соответственно

### Метаболит 14b.

Для метаболита мецигестона шифр 14b хроматографическое разделение осуществляли при тех же условиях. Время выхода 14b составляет 15,21 мин. Для обнаружения метаболитов мецигестона методом tandemной масс-спектрометрии высокого разрешения необходимо изучить фрагментацию синтезированного стандарта.

В нашей работе мы использовали ионизацию электрораспылением (ИЭР). На рисунках 39 и 40 приведены масс-хроматограмма и масс-спектр раствора 14b с концентрацией 100 мкг/мл, полученный при ИЭР. В режиме регистрации положительно заряженных ионов 14b образует протонированную молекулу  $[M+H]^+$  с  $m/z$  387,3257.

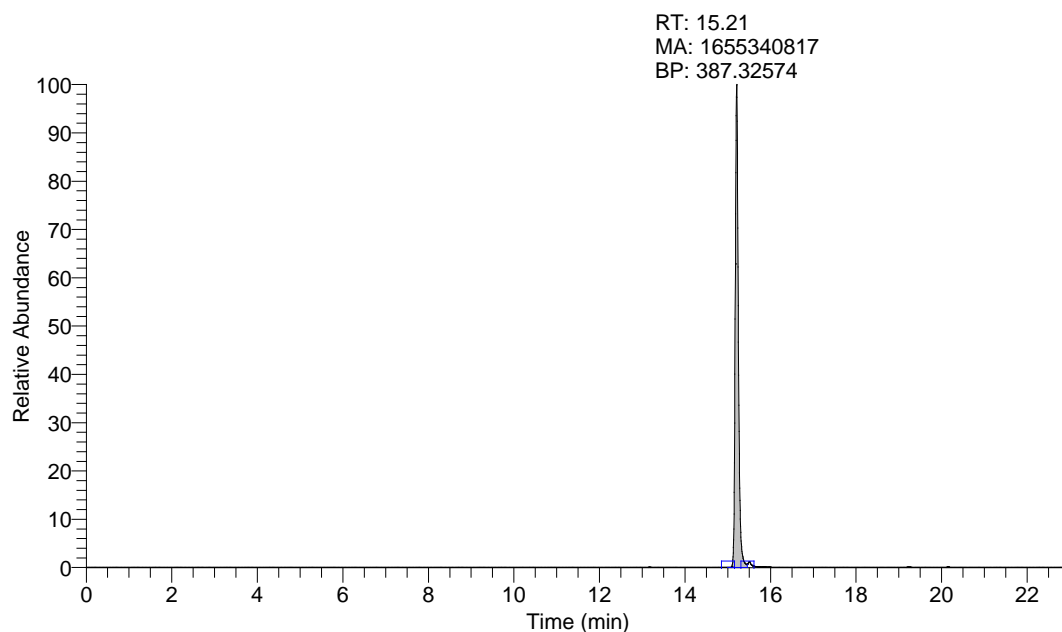


Рисунок 39 – Масс-хроматограмма стандартного раствора 14b с концентрацией 100 мкг/мл по выделенному иону с  $m/z$  387,3257

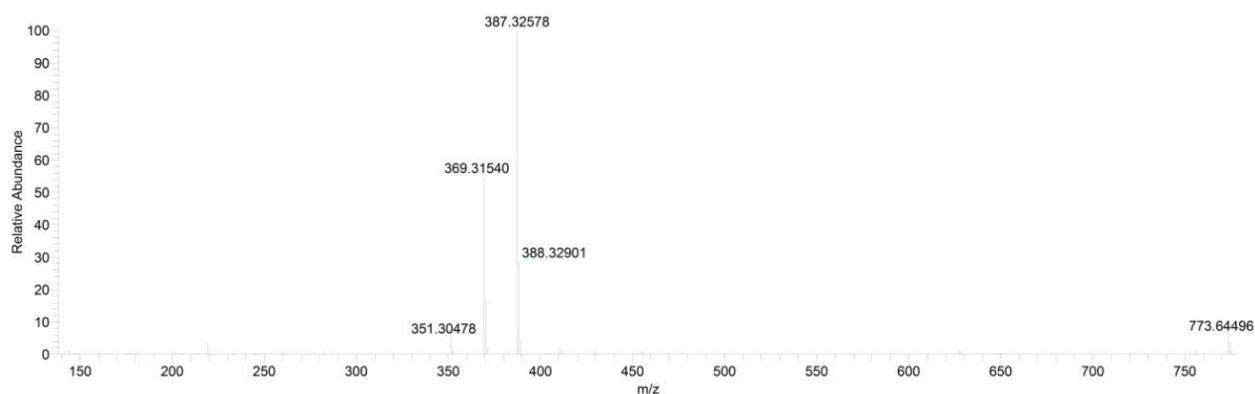


Рисунок 40 – Масс-спектр соединения с  $m/z$  387,3257 в режиме сканирования положительно заряженных ионов

На следующем этапе работы исследовали диссоциацию иона с  $m/z$  387,3257 для выбора характеристичных ионных переходов, которые в дальнейшем будут использоваться для идентификации предполагаемых метаболитов в биопробах в режиме MS/MS.

Полученный фрагментный масс-спектр приведен на рисунке 41.

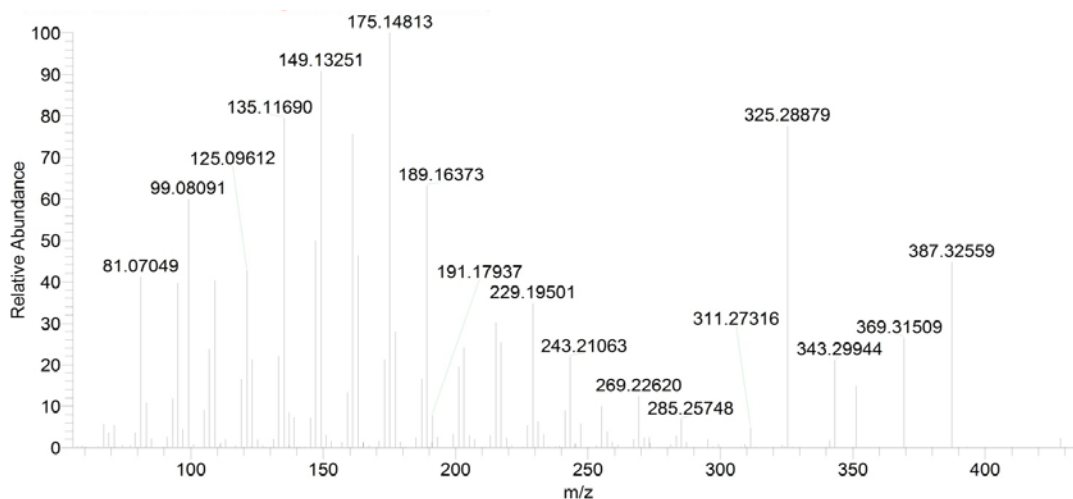


Рисунок 41 – MS/MS-спектры пика, соответствующего 14b, в режиме регистрации положительно заряженных ионов при энергии фрагментации – 40 В

Механизм фрагментации данного соединения аналогичен 14а. Используя выбранные выше параметры проводили анализ мочи крыс, экспонированных мецигестоном. В результате проведенных исследований данный метаболит был обнаружен в пробе мочи собранной с второго по шестой час после введения. Время выхода совпадает со стандартом. Детектирование проводили в 2 сегментах: в режиме полного ионного сканирования и регистрации выбранных ионных переходов.

На рисунке 42 приведена соответствующая масс-хроматограмма.

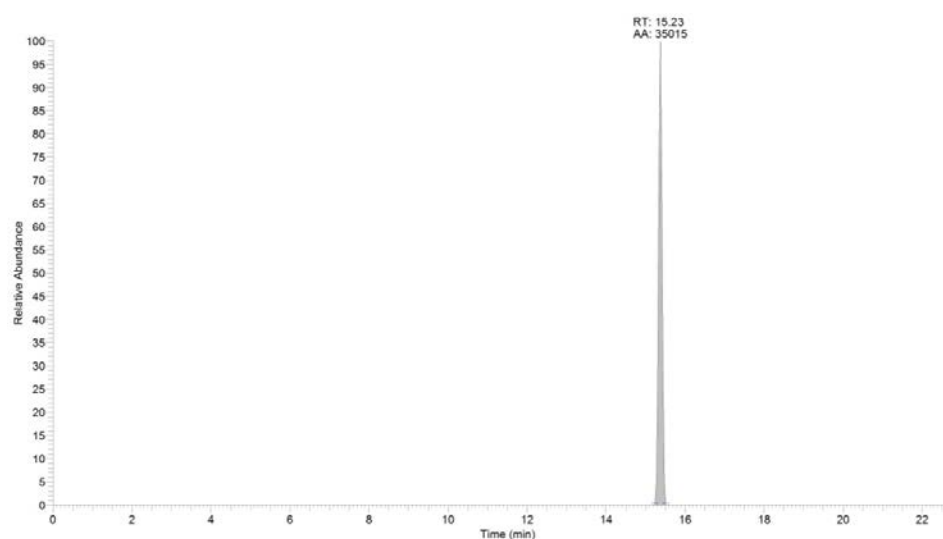


Рисунок 42 – Масс-хроматограмма образца мочи с маркировкой 1-2- 1 – детектирование по выбранному ионному переходу 387,3257 → 325,28879, 125,0961

Градуировочную зависимость строили в диапазоне от 1 до 1000 нг/мл. (рис. 43)

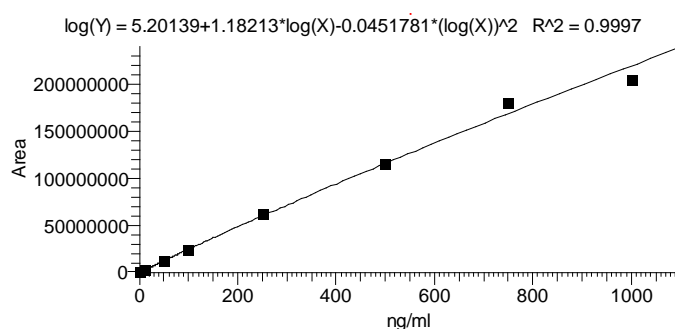


Рисунок 43 – Калибровочный график соединения 14b

Найденное значение концентрации метаболита 14b составляет 0,32 нг в пробе мочи собранной с второго пошестой час после введения.

### Метаболит 16а.

Для метаболита мецигестона шифр 16а хроматографическое разделение осуществляли при тех же условиях. Время выхода 16а составляет 16,47 мин. Для обнаружения метаболитов мецигестона методом tandemной масс-спектрометрии высокого разрешения необходимо изучить фрагментацию синтезированного стандарта. На рисунках 44 и 45 приведены масс-хроматограмма и масс-спектр раствора 16а с концентрацией 100 мкг/мл, полученный при ИЭР. Вследствие нестабильности связей гидроксильных групп в положениях 3 и 20 данное соединение не образует протонированной молекулы, поскольку уже в источнике ионизации происходит их отщепление. В связи с этим в качестве предшественника выбран ион  $[M-2H_2O+H]^+$  с  $m/z$  353,3203 как наиболее интенсивный. В масс-спектре также присутствует ион, соответствующий отщеплению одной из гидроксильных групп, однако его интенсивность значительно ниже, и использовать его в качестве предшественника нецелесообразно.



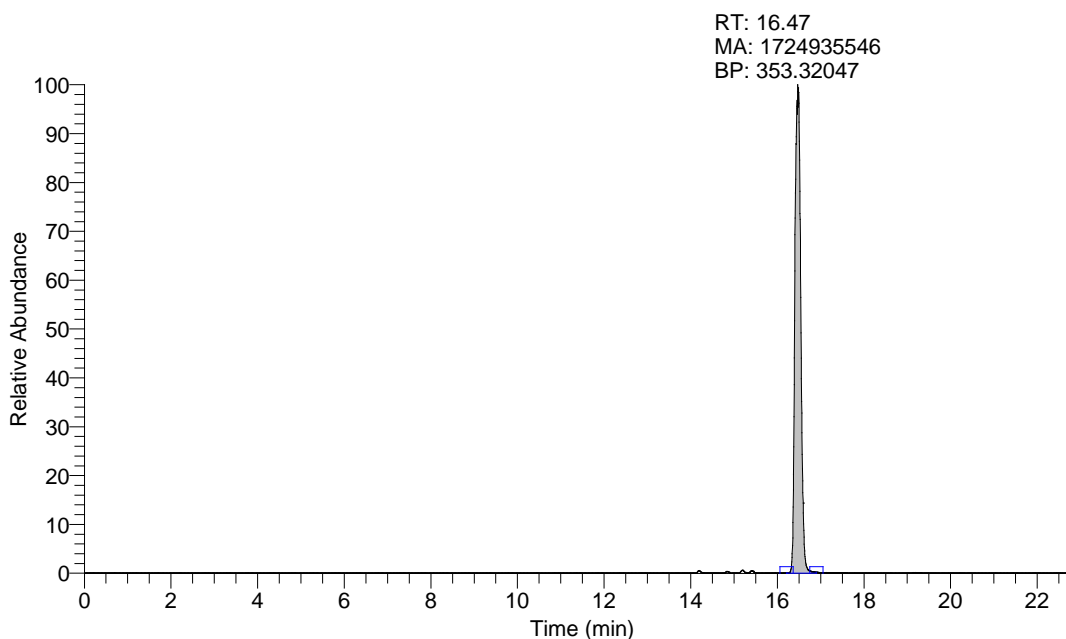


Рисунок 44 – Масс-хроматограмма стандартного раствора 16а с концентрацией 100 мкг/мл по выделенному иону с  $m/z$  353,32047

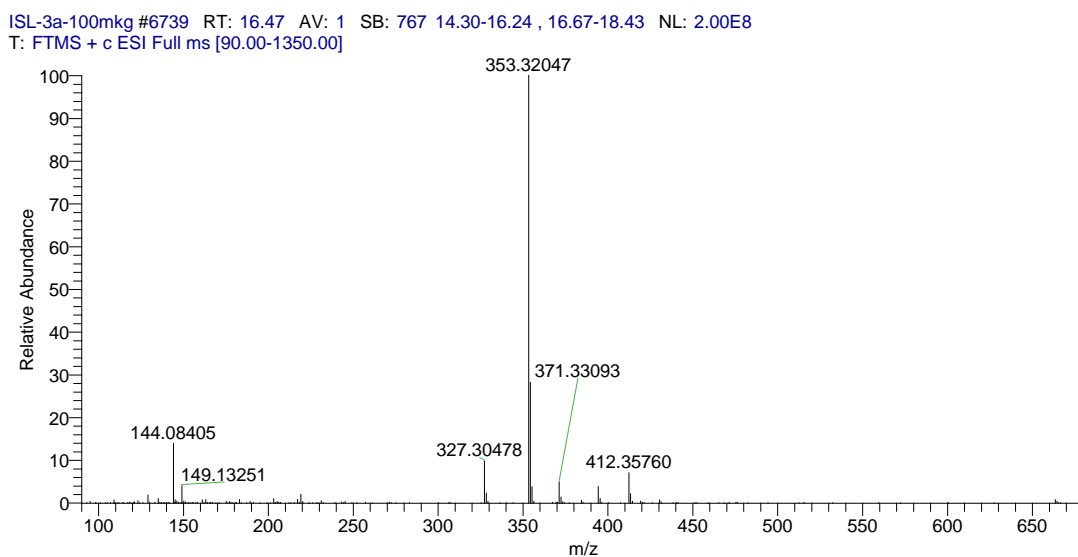


Рисунок 45 – Масс-спектр соединения с  $m/z$  353,32047 в режиме сканирования положительно заряженных ионов

На следующем этапе работы исследовали диссоциацию иона с  $m/z$  353,32047 для выбора характеристичных ионных переходов, которые в дальнейшем будут использоваться для идентификации предполагаемых метаболитов в биопробах в режиме MS/MS.

Полученный фрагментный масс-спектр приведен на рисунке 46.

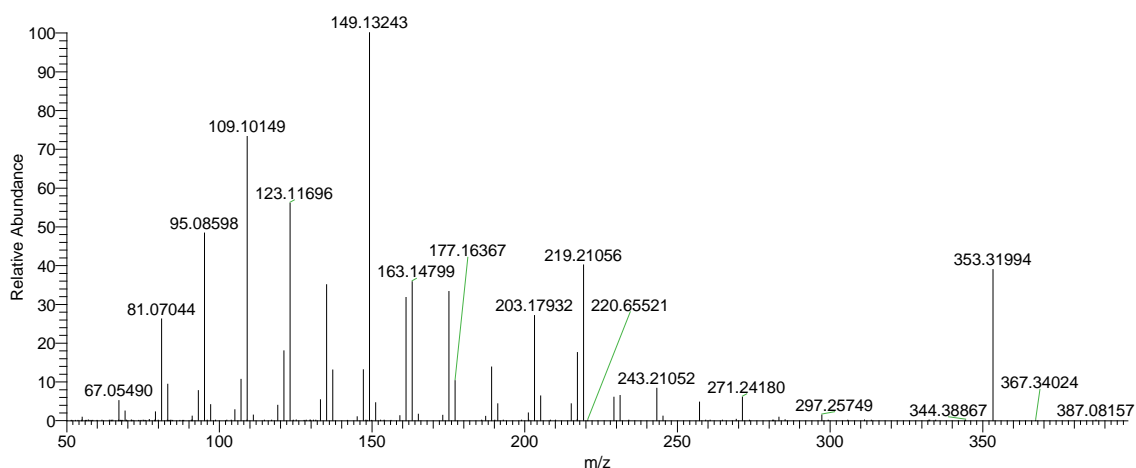


Рисунок 46 – МС/МС-спектры пика, соответствующего 16а, в режиме регистрации положительно заряженных ионов при энергии фрагментации – 40 В

В качестве характеристичных ионных переходов выбирали пики с максимальной интенсивностью, соответствующие как отщеплению боковых заместителей, так и структурным перегруппировкам.

Для рассмотрения возможных фрагментных ионов экспериментальные результаты сопоставляли с расчётными, полученными с помощью программы HighChem Mass Frontier версии 7.0.

Таким образом, выбрали ионный переход с  $m/z$  353,32047  $\rightarrow$  123,1169, 109,10149, энергия соударений – 40 В.

Предполагаемые механизмы образования данных фрагментных ионов приведены на рисунках 47 и 48.

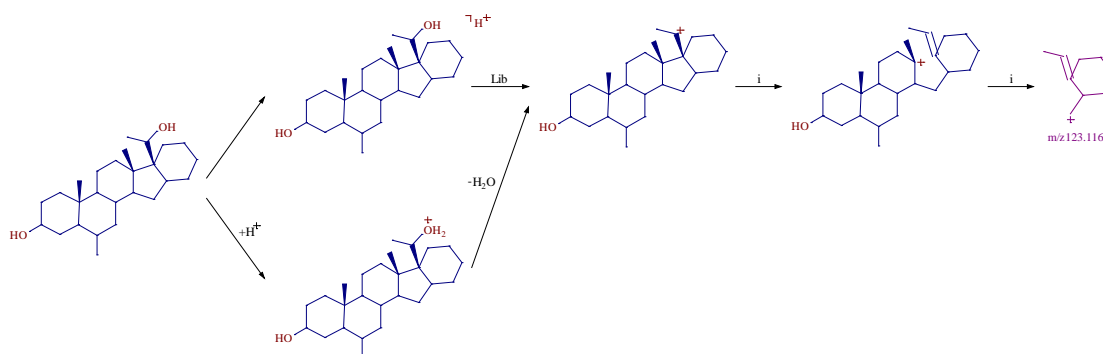


Рисунок 47 – Механизм образования фрагментного иона с  $m/z$  123,1169

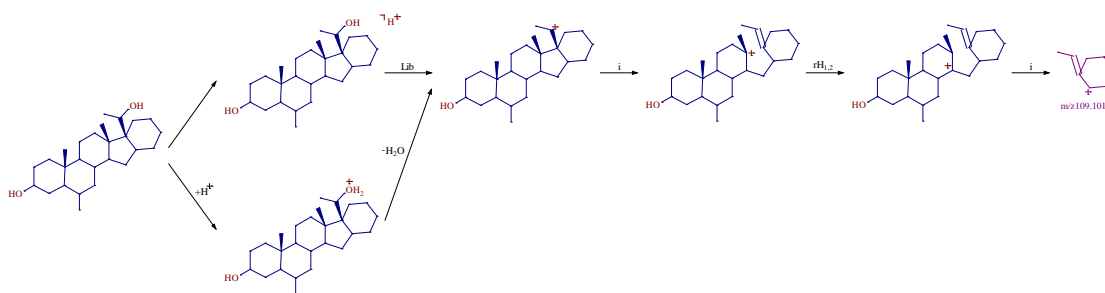


Рисунок 48 – Механизм образования фрагментного иона с  $m/z$  109,10149

Используя выбранные выше параметры проводили анализ мочи крыс, экспонированных мецигестоном. В результате проведенных исследований данный метаболит был обнаружен в пробах мочи собранной с второго по шестой час и с шестого по 24-ый. Время выхода совпадает со стандартом. Детектирование проводили в 2 сегментах: в режиме полного ионного сканирования и регистрации выбранных ионных переходов.

На рисунке 49 приведена соответствующая масс-хроматограмма.

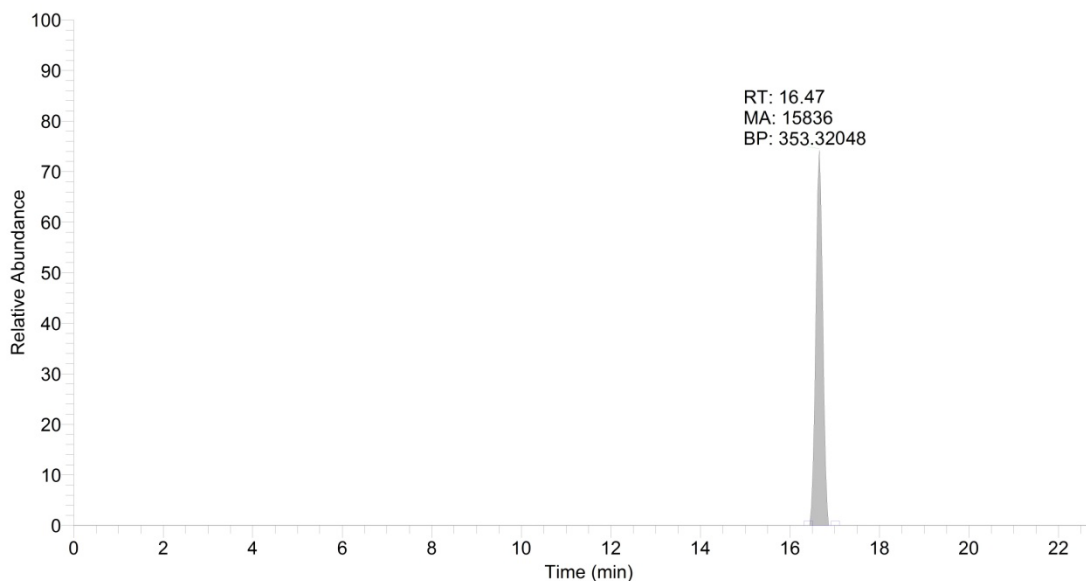


Рисунок 49 – Масс-хроматограмма образца мочи с маркировкой 1-2-1 – детектирование по выбранному ионному переходу 353,32047 → 123,1169; 109,10149

Градуировочную зависимость строили в диапазоне от 1 до 1000 нг/мл. (рис.

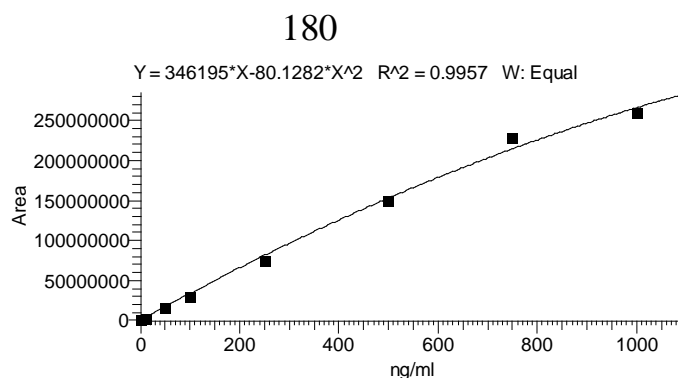


Рисунок 50 – Калибровочный график соединения 16а

Найденное значение концентрации метаболита 16а составляет 0,14 и 0,13 нг в пробах мочи собранной с второго по шестой час и с шестого по 24-ый соответственно.

### Метаболит 16b

Для метаболита мецигестона шифр 16b хроматографическое разделение осуществляли при тех же условиях. Время выхода 16b составляет 15.39 мин. Для обнаружения метаболитов мецигестона методом tandemной масс-спектрометрии высокого разрешения необходимо изучить фрагментацию синтезированного стандарта. На рисунках 51 и 52 приведены масс-хроматограмма и масс-спектр раствора 16b с концентрацией 100 мкг/мл, полученный при ИЭР. Как и в случае 16а вследствие нестабильности связей гидроксильных групп в положениях 3 и 20 данное соединение не образует протонированной молекулы, поскольку уже в источнике ионизации происходит их отщепление. В связи с этим в качестве предшественника выбран ион  $[M-2H_2O+H]^+$  с  $m/z$  353,3203 как наиболее интенсивный. В масс-спектре также присутствует ион, соответствующий отщеплению одной из гидроксильных групп, однако его интенсивность значительно ниже, и использовать его в качестве предшественника нецелесообразно.

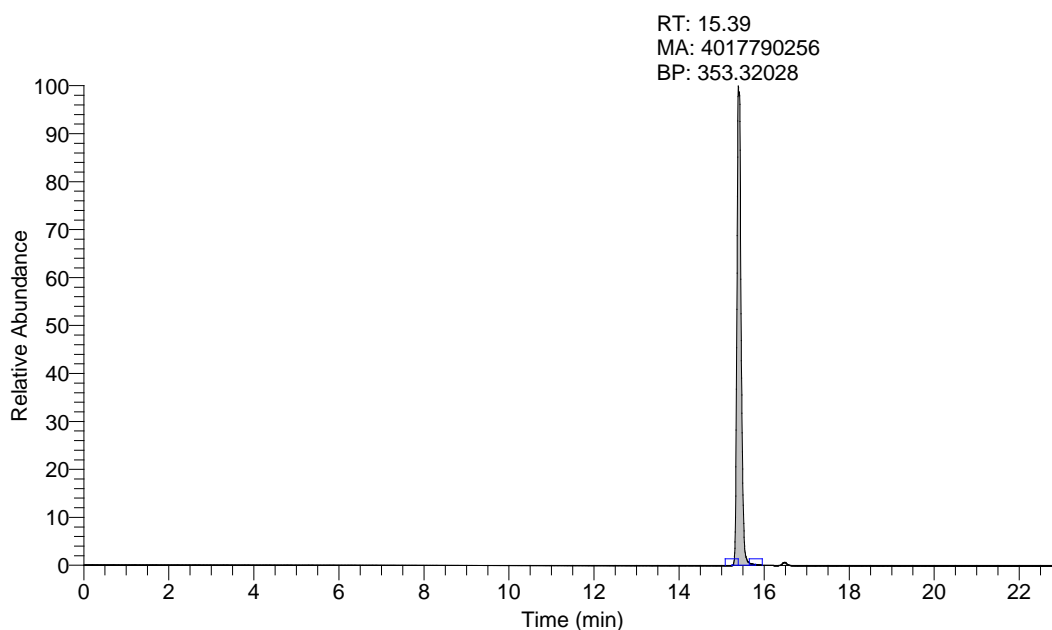


Рисунок 51 – Масс-хроматограмма стандартного раствора 16b с концентрацией 100 мкг/мл по выделенному иону с  $m/z$  353,32028

ISL-3b-100mkg #6313 RT: 15.43 AV: 1 SB: 768 14.30-16.24 , 16.67-18.43 NL: 5.11E8  
T: FTMS + c ESI Full ms [90.00-1350.00]

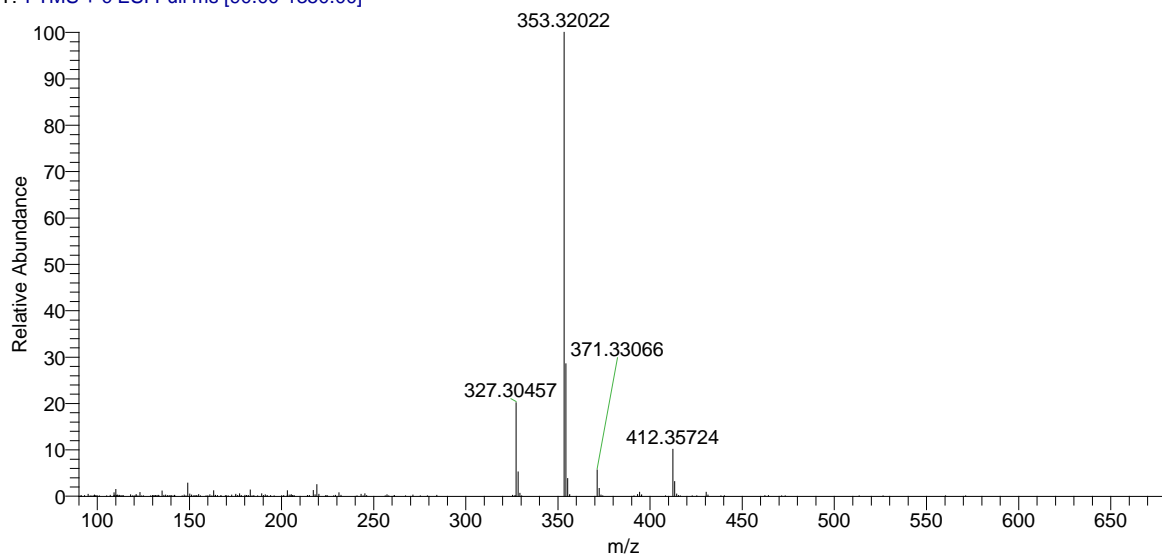


Рисунок 52 – Масс-спектр соединения с  $m/z$  353,32028 в режиме сканирования положительно заряженных ионов

На следующем этапе работы исследовали диссоциацию иона с  $m/z$  353,32028 для выбора характеристичных ионных переходов, которые в дальнейшем будут использоваться для идентификации предполагаемых метаболитов в биопробах в режиме MS/MS.

Полученный фрагментный масс-спектр приведен на рисунке 53.

ISL-3b-100mkg-ms2 #6381-6422 RT: 15.33-15.43 AV: 5 NL: 2.28E7  
 F: FTMS + c ESI Full ms2 353.30@hcd35.00 [50.00-740.00]

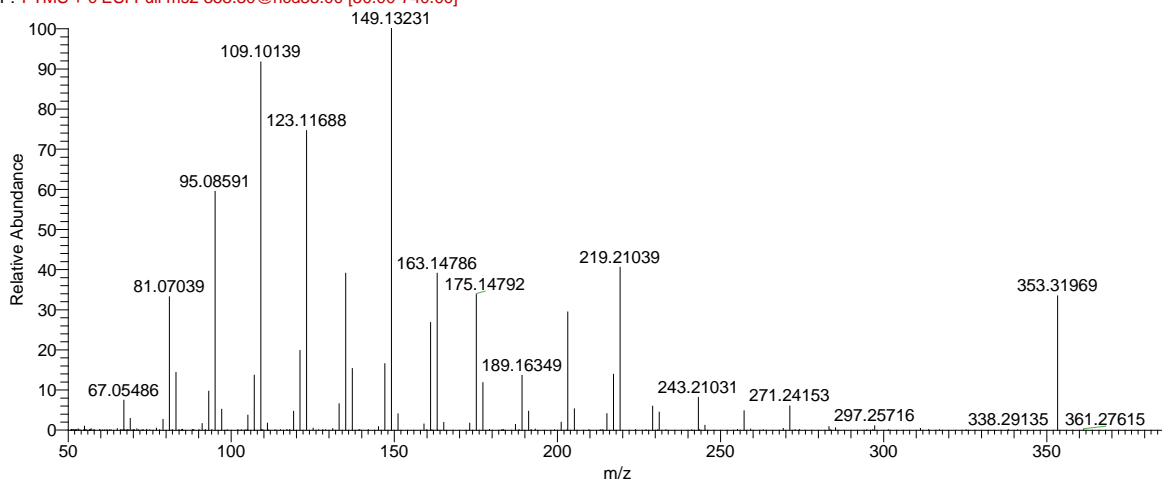


Рисунок 53 – МС/МС-спектры пика, соответствующего 16b, в режиме регистрации положительно заряженных ионов при энергии фрагментации – 40 В

Механизм фрагментации данного соединения аналогичен 16a. Используя выбранные выше параметры проводили анализ мочи крыс, экспонированных мецигестоном. В результате проведенных исследований данный метаболит не был обнаружен в полученных пробах.

### Соединение №8.

Для дезметильного аналога мецигестона шифр **8** хроматографическое разделение осуществляли при тех же условиях. Время выхода **8** составляет 13,45 мин. Для обнаружения этого метаболита мецигестона методом tandemной масс-спектрометрии высокого разрешения проводили изучение фрагментации синтезированного стандарта.

На рисунках 54 и 55 приведены масс-хроматограмма и масс-спектр раствора **8** с концентрацией 100 мкг/мл, полученный при ИЭР. В режиме регистрации положительно заряженных ионов **8** образует протонированную молекулу  $[M+H]^+$  с  $m/z$  369,27917.

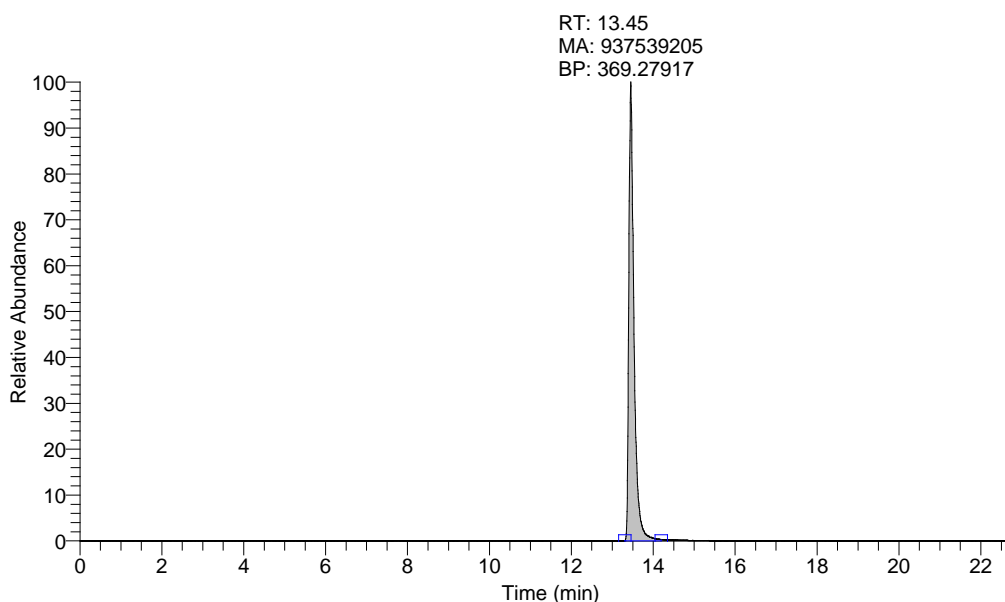


Рисунок 54 – Масс-хроматограмма стандартного раствора **8** с концентрацией 100 мкг/мл по выделенному иону с  $m/z$  369,27917

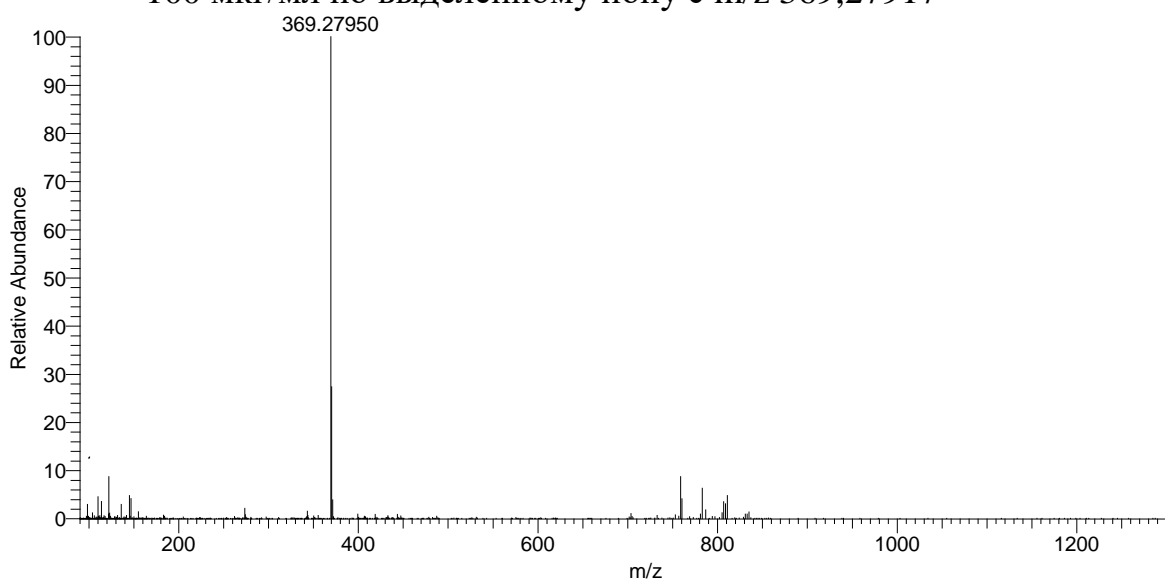


Рисунок 55 – Масс-спектр соединения с  $m/z$  369,27917 в режиме сканирования положительно заряженных ионов

На следующем этапе работы исследовали диссоциацию иона с  $m/z$  369,27917 для выбора характеристичных ионных переходов, которые в дальнейшем будут использоваться для идентификации предполагаемых метаболитов в биопробах в режиме МС/МС.

Полученный фрагментный масс-спектр приведен на рисунке 56.

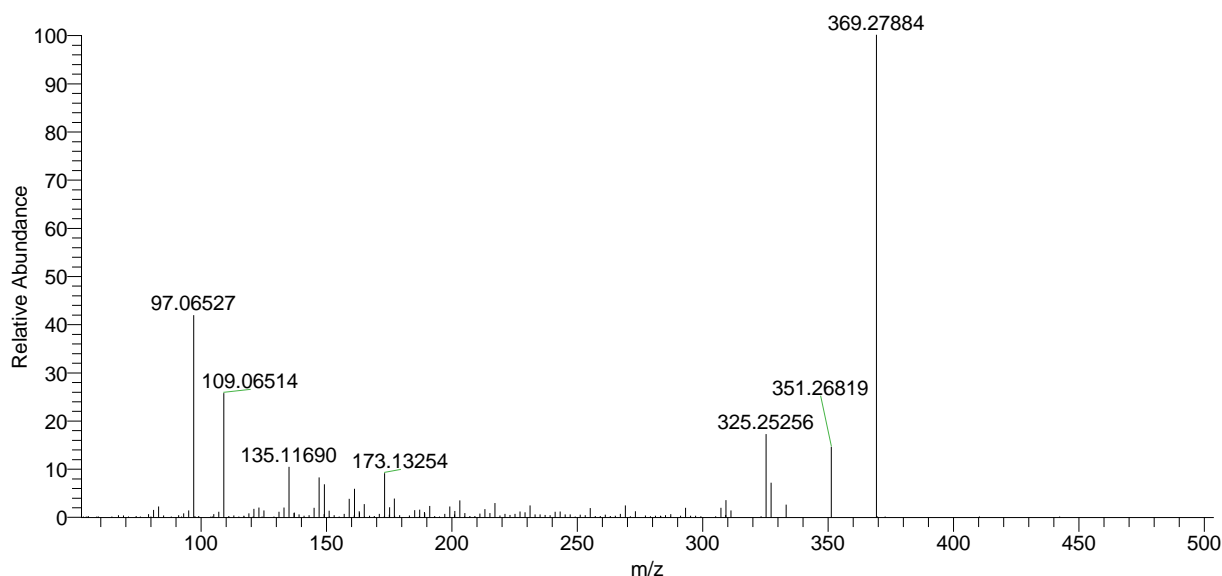


Рисунок 56 – МС/МС-спектры пика, соответствующего **8**, в режиме регистрации положительно заряженных ионов при энергии фрагментации – 40 В

В качестве характеристичных ионных переходов выбирали пики с максимальной интенсивностью, соответствующие как отщеплению боковых заместителей, так и структурным перегруппировкам. Таким образом, выбрали ионный переход с  $m/z$  369,27917  $\rightarrow$  351,26819, 109,06514 и 97,06527, энергия соударений – 40 В. Используя выбранные параметры проводили анализ мочи крыс, экспонированных 6-дезметильным аналогом мецигестона. В результате проведенных исследований данный метаболит не был обнаружен в полученных пробах мочи.

### Соединение №1.

Для дезметильного аналога мецигестона шифр **1** хроматографическое разделение осуществляли при тех же условиях. Время выхода **1** составляет 13,45 мин. Для обнаружения этого метаболита мецигестона методом tandemной масс-спектрометрии высокого разрешения проводили изучение фрагментации синтезированного стандарта.

На рисунках 57 и 58 приведены масс-хроматограмма и масс-спектр раствора **1** с концентрацией 100 мкг/мл, полученный при ИЭР. В режиме регистрации положительно заряженных ионов **1** образует протонированную молекулу  $[M+H]^+$  с  $m/z$  383,29416.



185

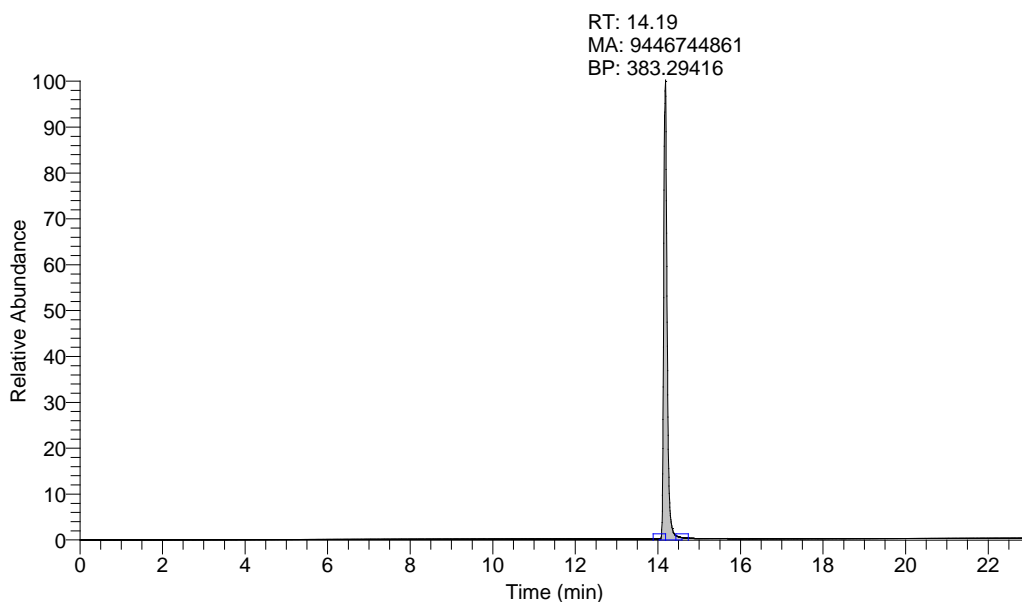


Рисунок 57 – Масс-хроматограмма стандартного раствора **1** с концентрацией 100 мкг/мл по выделенному иону с  $m/z$  383,29416

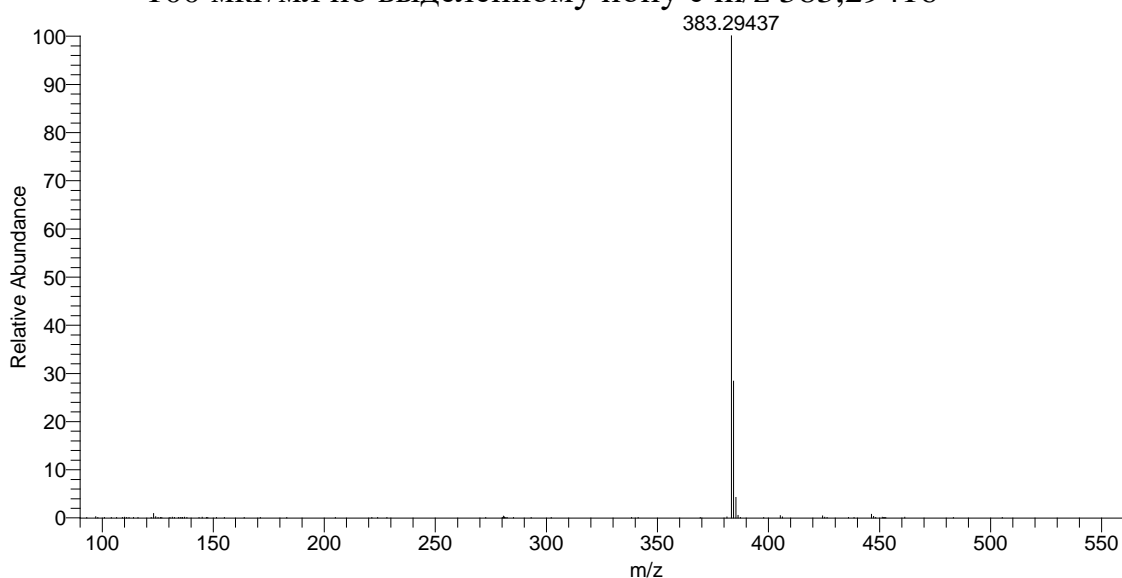


Рисунок 58 – Масс-спектр соединения с  $m/z$  383,29416 в режиме сканирования положительно заряженных ионов

На следующем этапе работы исследовали диссоциацию иона с  $m/z$  383,29416 для выбора характеристичных ионных переходов, которые в дальнейшем будут использоваться для идентификации предполагаемых метаболитов в биопробах в режиме МС/МС.

Полученный фрагментный масс-спектр приведен на рисунке 59.

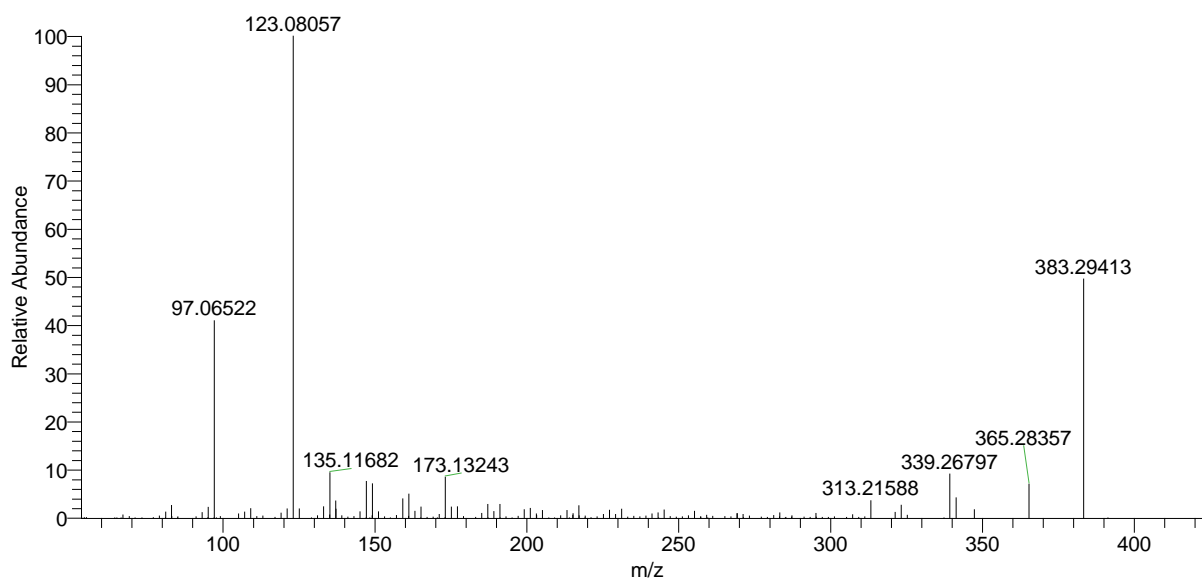


Рисунок 59 – МС/МС-спектры пика, соответствующего 8, в режиме регистрации положительно заряженных ионов при энергии фрагментации – 40 В

В качестве характеристичных ионных переходов выбрали пики с максимальной интенсивностью, соответствующие как отщеплению боковых заместителей, так и структурным перегруппировкам. Таким образом, выбрали ионный переход с  $m/z$  383,29416  $\rightarrow$  365,28357, 339,26797 и 123,08057, энергия соударений – 40 В. Используя выбранные параметры проводили анализ мочи крыс, экспонированных 6-дезметильным аналогом мецигестона. В результате проведенных исследований данный метаболит не был обнаружен в полученных пробах мочи.

### Метаболит 19.

Для метаболита мецигестона шифр 19 хроматографическое разделение осуществляли при тех же условиях. Время выхода 19 составляет 14,65 мин. Для обнаружения метаболитов мецигестона методом тандемной масс-спектрометрии высокого разрешения необходимо изучить фрагментацию синтезированного стандарта. На рисунках 60 и 61 приведены масс-хроматограмма и масс-спектр раствора 19 с концентрацией 100 мкг/мл, полученный при ИЭР. Вследствие нестабильности связей гидроксильных групп данное соединение не образует протонированной молекулы, поскольку уже в источнике ионизации происходит

их отщепление. В связи с этим в качестве предшественника выбран ион с  $m/z$  339,30463 как наиболее интенсивный.

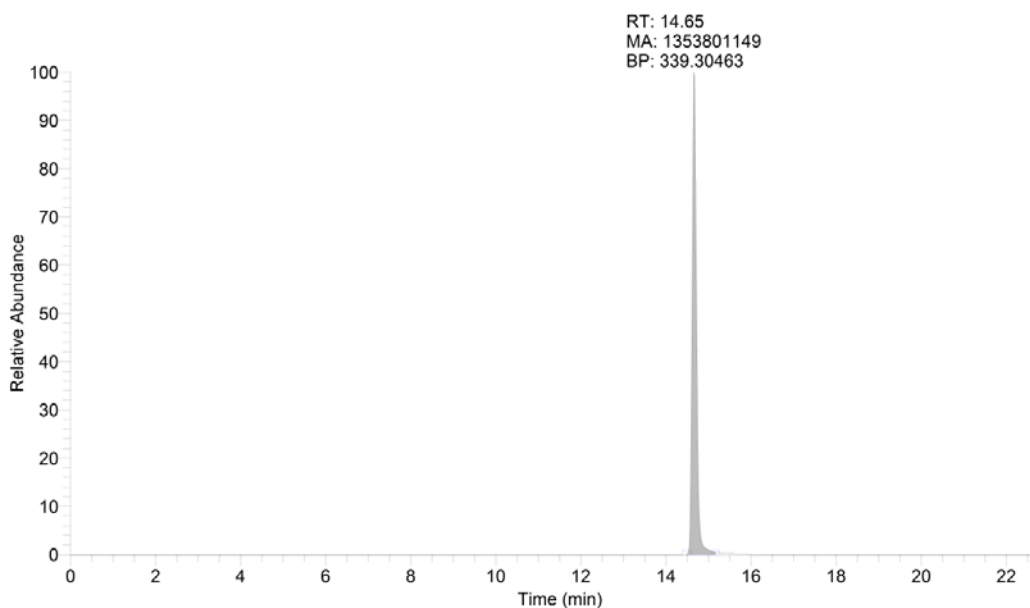


Рисунок 60 – Масс-хроматограмма стандартного раствора 19 с концентрацией 100 мкг/мл по выделенному иону с  $m/z$  339,30463

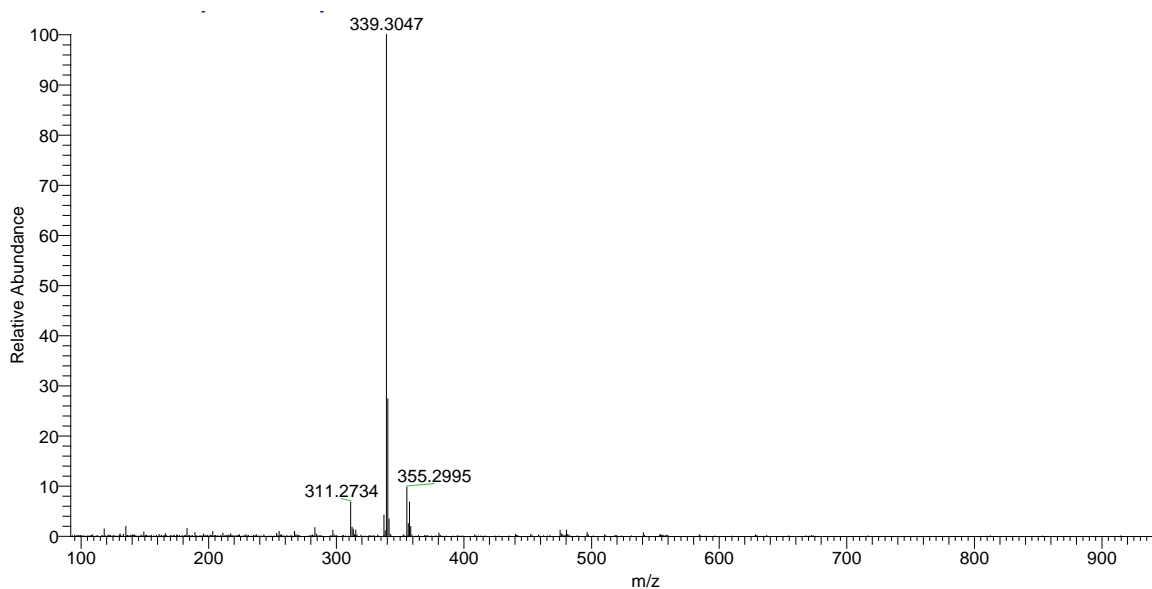


Рисунок 61 – Масс-спектр соединения с  $m/z$  339,30463 в режиме сканирования положительно заряженных ионов

На следующем этапе работы исследовали диссоциацию иона с  $m/z$  339,30463 для выбора характеристичных ионных переходов, которые в

дальнейшем будут использоваться для идентификации предполагаемых метаболитов в биопробах в режиме МС/МС.

Полученный фрагментный масс-спектр приведен на рисунке 62.

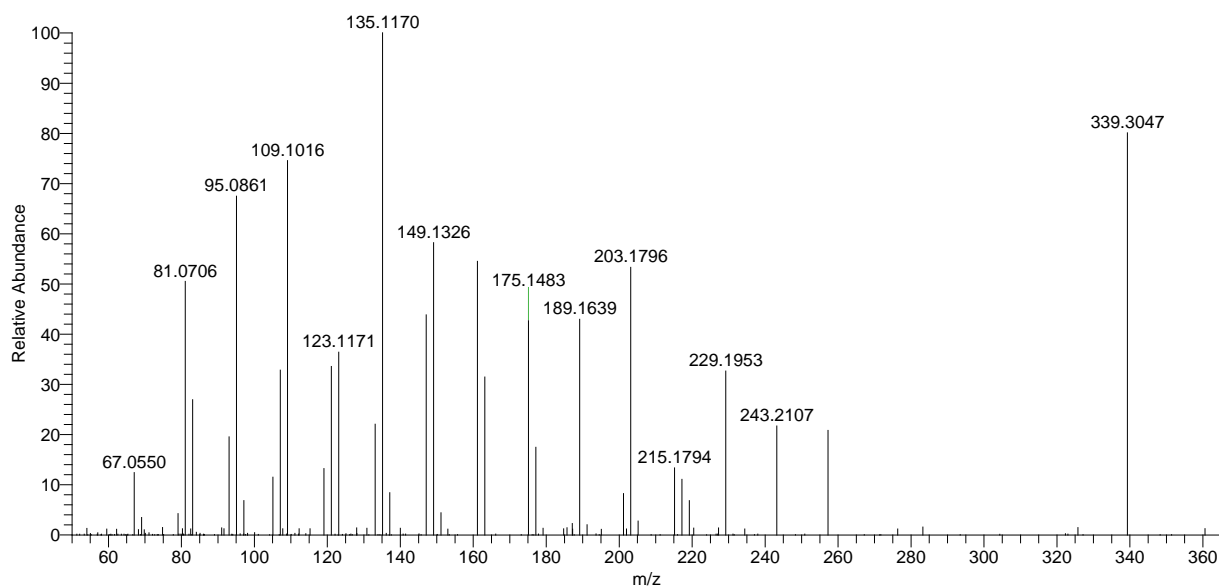


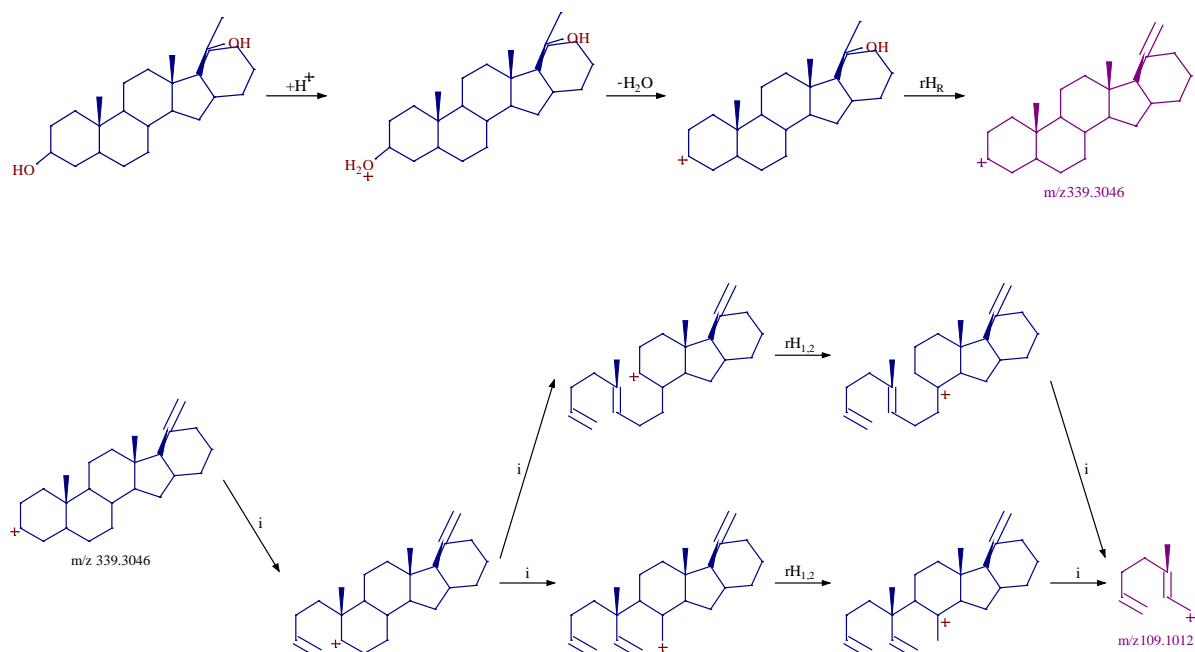
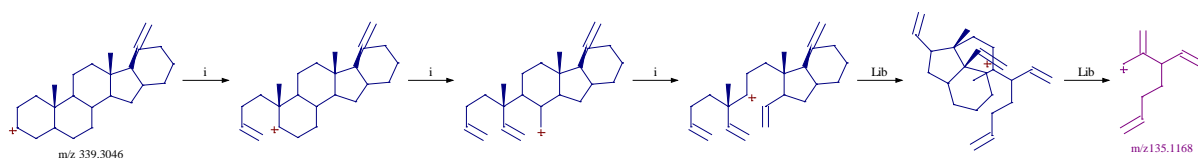
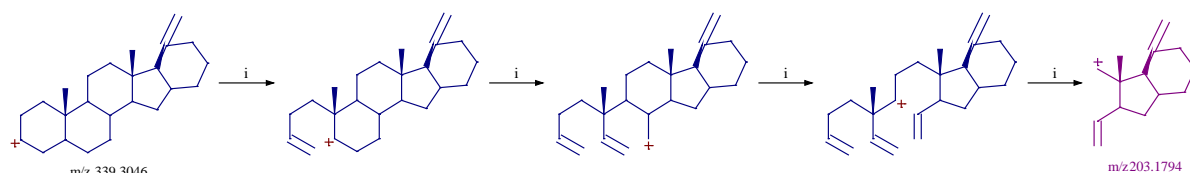
Рисунок 62 – МС/МС-спектры пика, соответствующего 19, в режиме регистрации положительно заряженных ионов при энергии фрагментации – 40 В

В качестве характеристичных ионных переходов выбирали пики с максимальной интенсивностью, соответствующие как отщеплению боковых заместителей, так и структурным перегруппировкам.

Для рассмотрения возможных фрагментных ионов экспериментальные результаты сопоставляли с расчётными, полученными с помощью программы HighChem Mass Frontier версии 7.0.

Таким образом, выбрали ионный переход с  $m/z$  339,30463  $\rightarrow$  135,1170, 109,1016 и 203,1796 энергия соударений – 40 В.

Предполагаемые механизмы образования данных фрагментных ионов приведены на рисунках 63,64 и 65.

Рисунок 63 – Механизм образования фрагментного иона с  $m/z$  109,1016Рисунок 64 – Механизм образования фрагментного иона с  $m/z$  135,1170Рисунок 65 – Механизм образования фрагментного иона с  $m/z$  203,1796

Используя выбранные выше параметры проводили анализ мочи крыс, экспонированных мецигестоном. В качестве характеристичных ионных переходов выбирали пики с максимальной интенсивностью, соответствующие как отщеплению боковых заместителей, так и структурным перегруппировкам. Таким образом, выбрали ионный переход с  $m/z$  339,30463  $\rightarrow$  135,1170, 109,1016 и 203,1796, энергия соударений – 40 В. Используя выбранные параметры проводили анализ мочи крыс, экспонированных 6-дезметильным аналогом мецигестона. В результате проведенных исследований данный метаболит не был обнаружен в полученных пробах мочи.

**Метаболит 20.**

Для метаболита мецигестона шифр 20 хроматографическое разделение осуществляли при тех же условиях. Время выхода 20 составляет 15,45 мин. Для обнаружения этого метаболита мецигестона методом tandemной масс-спектрометрии высокого разрешения проводили изучение фрагментации синтезированного стандарта.

На рисунках 66 и 67 приведены масс-хроматограмма и масс-спектр раствора 20 с концентрацией 100 мкг/мл, полученный при ИЭР. В режиме регистрации положительно заряженных ионов 4 образует протонированную молекулу  $[M+H]^+$  с  $m/z$  387,32538.

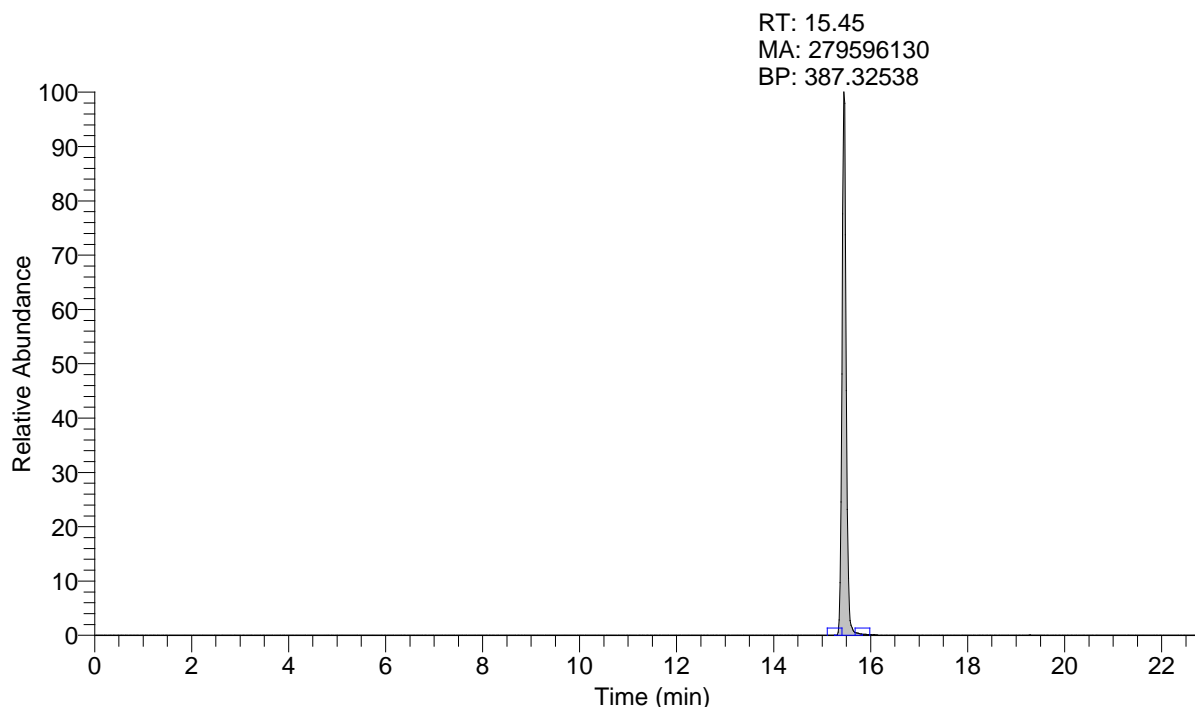


Рисунок 66 – Масс-хроматограмма стандартного раствора 20 с концентрацией 100 мкг/мл по выделенному иону с  $m/z$  387,32538

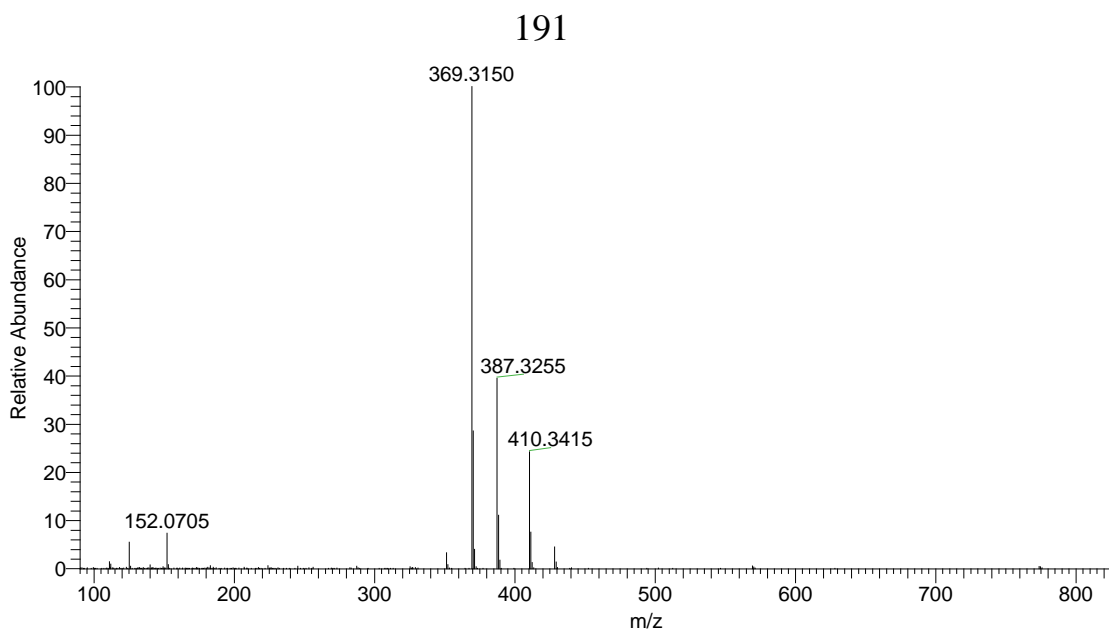


Рисунок 67 – Масс-спектр соединения с  $m/z$  387,32538 в режиме сканирования положительно заряженных ионов

На следующем этапе работы исследовали диссоциацию иона с  $m/z$  387,32538 для выбора характеристичных ионных переходов, которые в дальнейшем будут использоваться для идентификации предполагаемых метаболитов в биопробах в режиме МС/МС.

Полученный фрагментный масс-спектр приведен на рисунке 68.

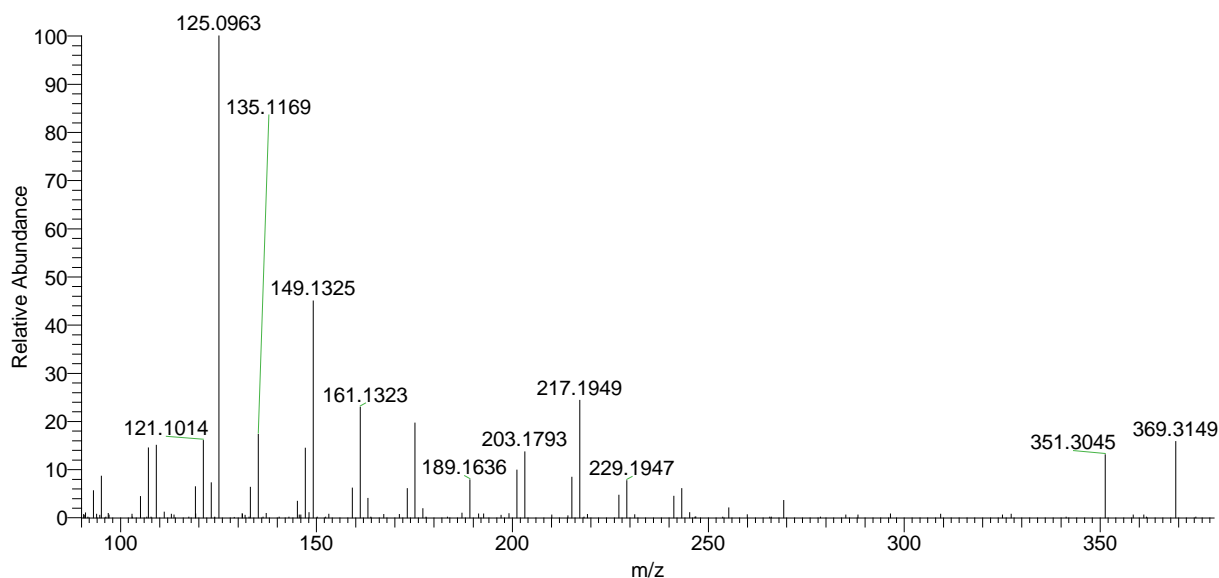


Рисунок 68 – МС/МС-спектры пика, соответствующего 20, в режиме регистрации положительно заряженных ионов при энергии фрагментации – 40

В качестве характеристичных ионных переходов выбирали пики с максимальной интенсивностью, соответствующие как отщеплению боковых заместителей, так и структурным перегруппировкам.

Для рассмотрения возможных фрагментных ионов экспериментальные результаты сопоставляли с расчётными, полученными с помощью программы HighChem Mass Frontier версии 7.0.

Таким образом, выбрали ионный переход с  $m/z$  387,32538  $\rightarrow$  369,3149, 351,3045 и 125,0963, энергия соударений – 40 В.

Предполагаемые механизмы образования данных фрагментных ионов приведены на рисунках 69-71.

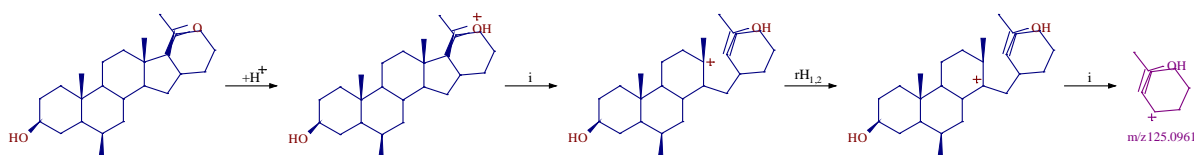


Рисунок 69 – Механизм образования фрагментного иона с  $m/z$  125,0963

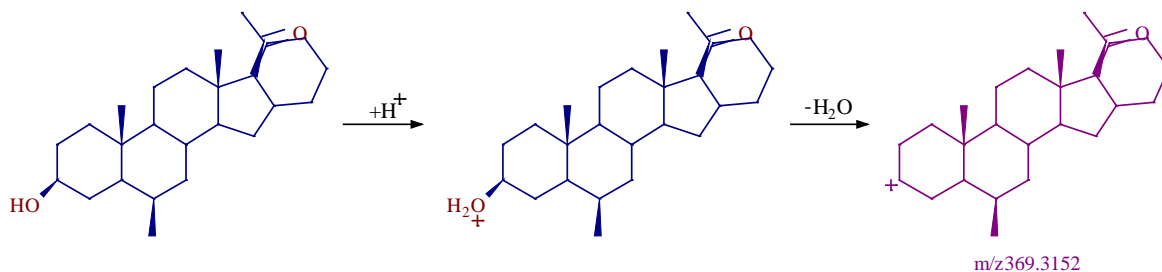


Рисунок 70 – Механизм образования фрагментного иона с  $m/z$  369,3149



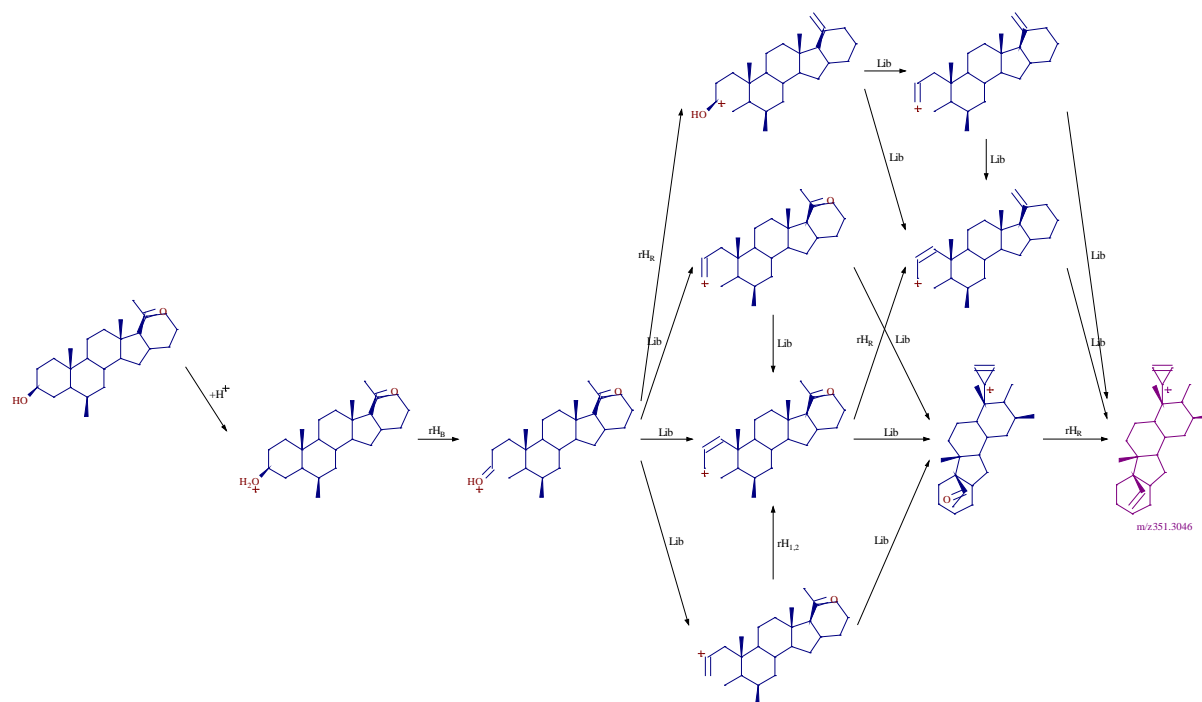


Рисунок 71 – Механизм образования фрагментного иона с  $m/z$  351,3045

Используя выбранные выше параметры проводили анализ мочи крыс, экспонированных мецигестеном. В результате проведенных исследований данный метаболит был обнаружен во всех пробах собранных в период 24 часов. Время выхода совпадает со стандартом. Детектирование проводили в 2 сегментах: в режиме полного ионного сканирования и регистрации выбранных ионных переходов. На рисунке 72 приведена соответствующая масс-хроматограмма.

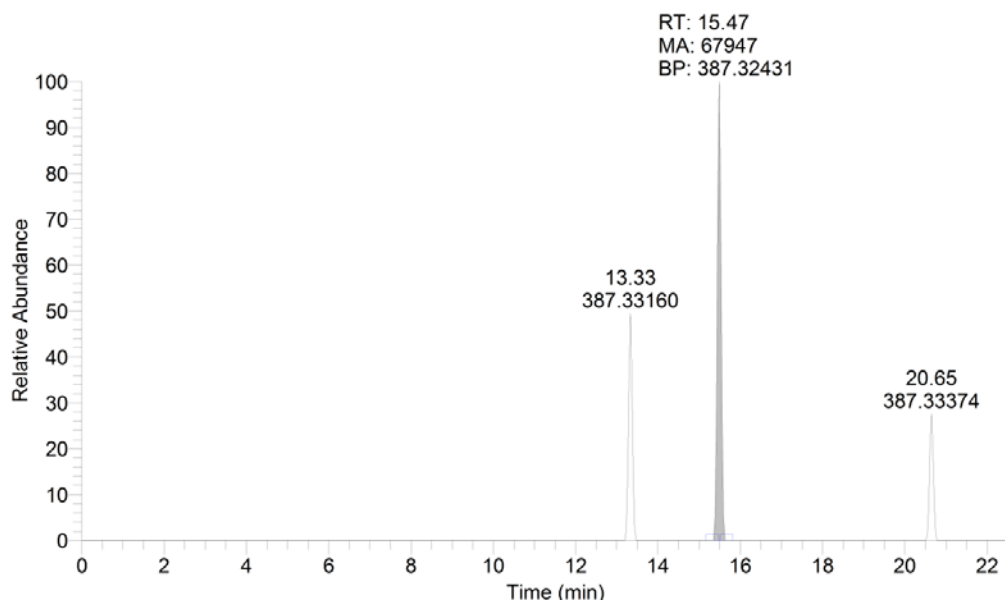


Рисунок 72 – Масс-хроматограмма образца мочи с маркировкой 1-1-1 – детектирование по выбранному ионному переходу 387,32538 → 369,3149, 351,3045 и 125,0963

Градуировочную зависимость строили в диапазоне от 1 до 1000 нг/мл. (рис. 73)

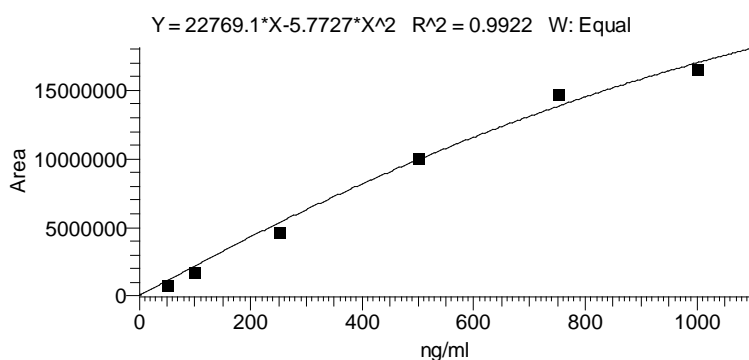


Рисунок 73 – Калибровочный график соединения 20

Найденное значение концентрации метаболита 20 составляет 0,15, 0,143, 0,178 нг в пробах мочи собранной в первые 2 часа, с 2 до 6 часов и с 6 до 24 часов после введения соответственно.

### Метаболит 21.

Для метаболита 6-дезметильного аналога мецигестона шифр 21 хроматографическое разделение осуществляли при тех же условиях. Время выхода 9 составляет 15,17 мин. Для обнаружения этого метаболита мецигестона методом тандемной масс-спектрометрии высокого разрешения проводили изучение фрагментации синтезированного стандарта.

На рисунках 74 и 75 приведены масс-хроматограмма и масс-спектр раствора 21 с концентрацией 100 мкг/мл, полученный при ИЭР. В режиме регистрации положительно заряженных ионов 21 образует протонированную молекулу  $[M+H]^+$  с  $m/z$  373.30945.

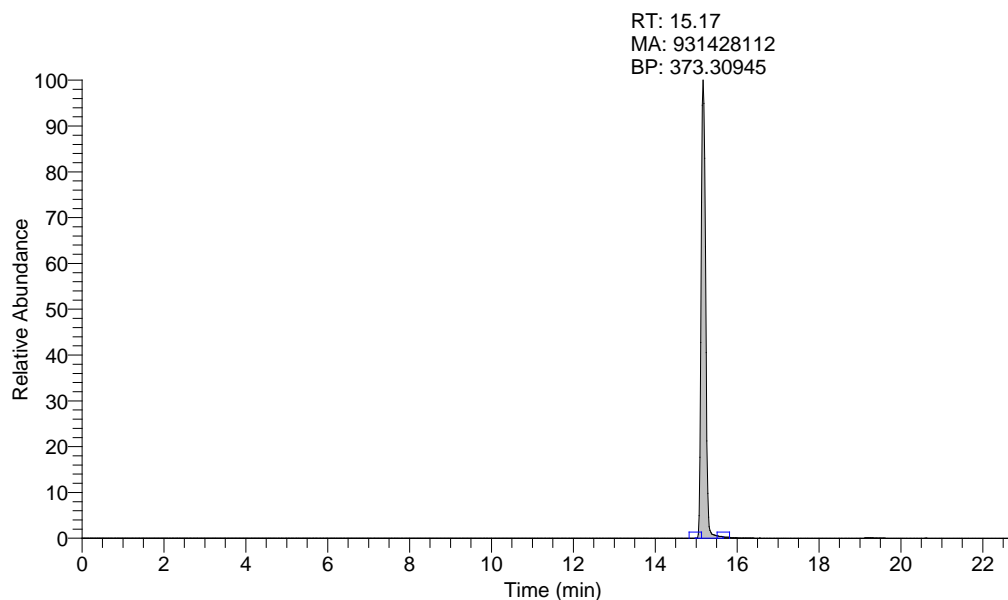


Рисунок 74 – Масс-хроматограмма стандартного раствора 21 с концентрацией 100 мкг/мл по выделенному иону с  $m/z$  373.30945

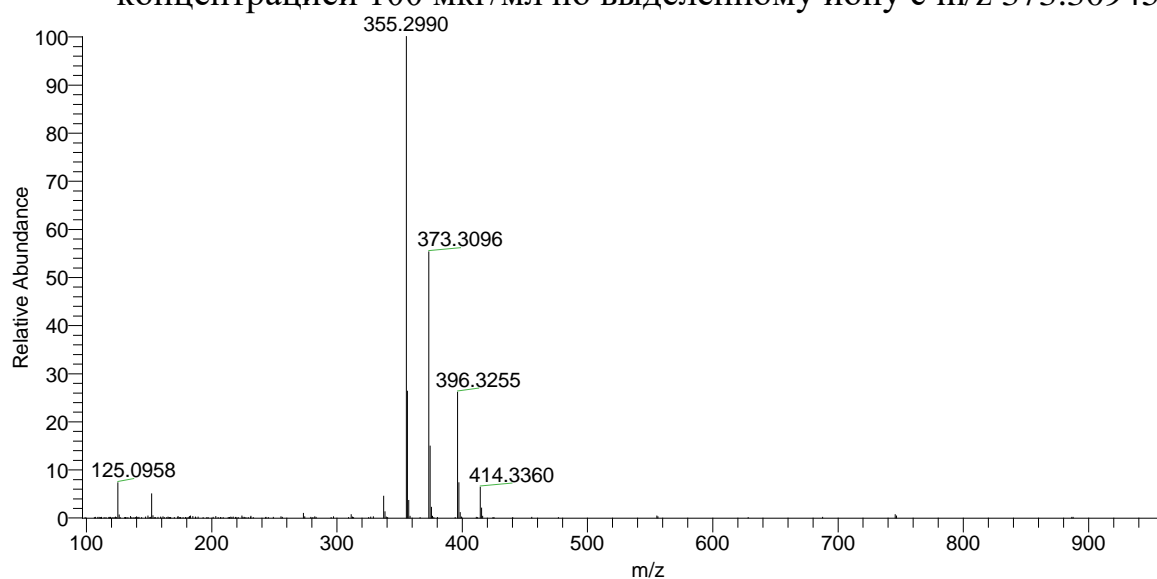


Рисунок 75 – Масс-спектр соединения с  $m/z$  373.30945 в режиме сканирования положительно заряженных ионов

На следующем этапе работы исследовали диссоциацию иона с  $m/z$  373.30945 для выбора характеристичных ионных переходов, которые в дальнейшем будут использоваться для идентификации предполагаемых метаболитов в биопробах в режиме МС/МС.

Полученный фрагментный масс-спектр приведен на рисунке 76.

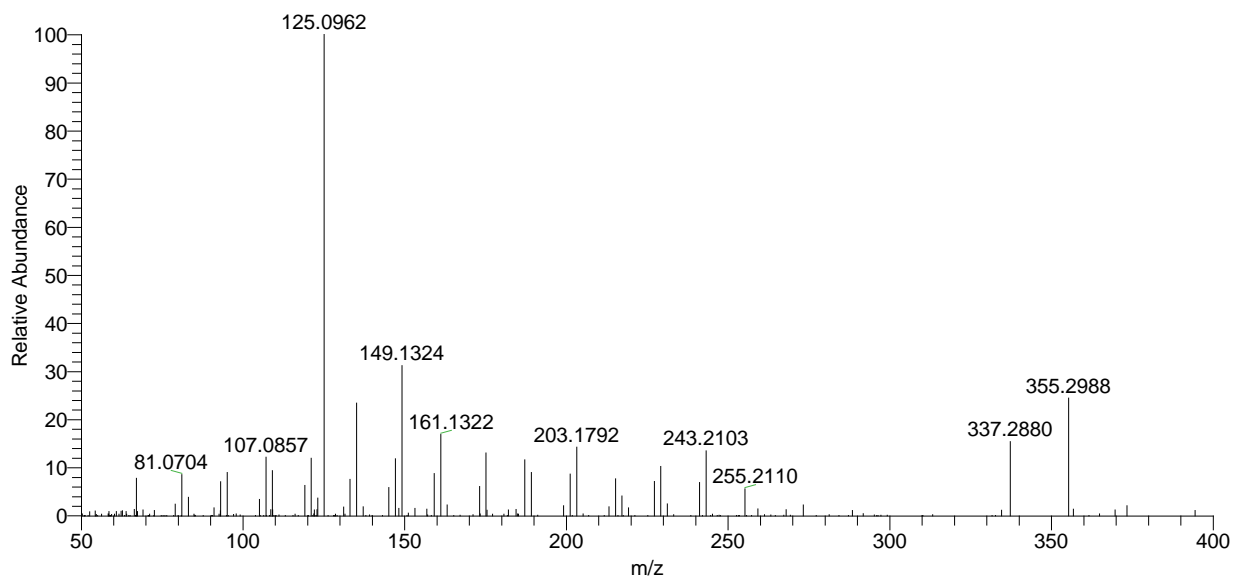


Рисунок 76 – МС/МС-спектры пика, соответствующего 21, в режиме регистрации положительно заряженных ионов при энергии фрагментации – 40 В

В качестве характеристичных ионных переходов выбирали пики с максимальной интенсивностью, соответствующие как отщеплению боковых заместителей, так и структурным перегруппировкам.

Для рассмотрения возможных фрагментных ионов экспериментальные результаты сопоставляли с расчётными, полученными с помощью программы HighChem Mass Frontier версии 7.0.

Таким образом, выбрали ионный переход с  $m/z$  373.30945  $\rightarrow$  355,2988, 337,2880 и 125,0962, энергия соударений – 40 В.

Предполагаемые механизмы образования данных фрагментных ионов приведены на рисунках 77-79.

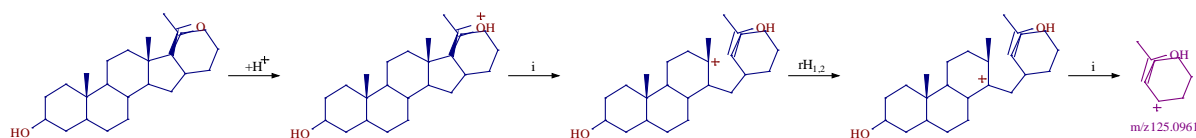


Рисунок 77 – Механизм образования фрагментного иона с  $m/z$  125,0962

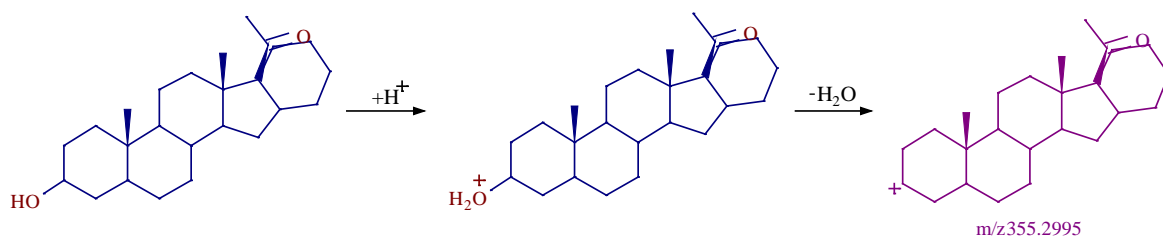


Рисунок 78 – Механизм образования фрагментного иона с  $m/z$  355,2988

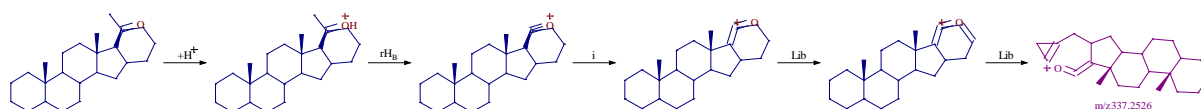


Рисунок 79 – Механизм образования фрагментного иона с  $m/z$  337,2880

Используя выбранные выше параметры проводили анализ мочи крыс, экспонированных б-дезметильным аналогом мецигестона. В результате проведенных исследований данный метаболит был обнаружен во всех пробах собранных в период 24 часов. Время выхода совпадает со стандартом. Детектирование проводили в 2 сегментах: в режиме полного ионного сканирования и регистрации выбранных ионных переходов. На рисунке 80 приведена соответствующая масс-хроматограмма.

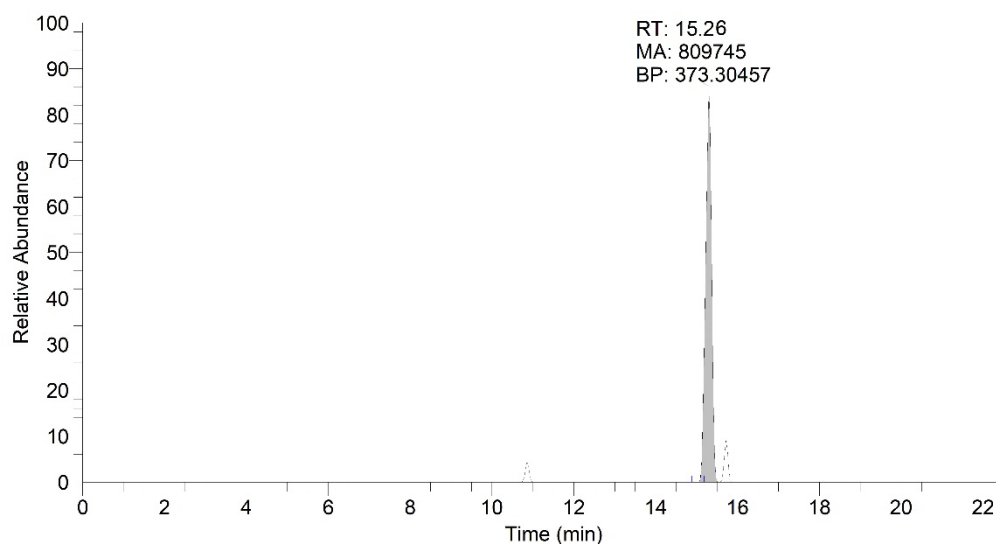


Рисунок 80 – Масс-хроматограмма образца мочи с маркировкой 8-1-1 – детектирование по выбранному ионному переходу  $373.30945 \rightarrow 355,2988$ ,  $337,2880$  и  $125,0962$

Градуировочную зависимость строили в диапазоне от 1 до 1000 нг/мл. (рис. 81)

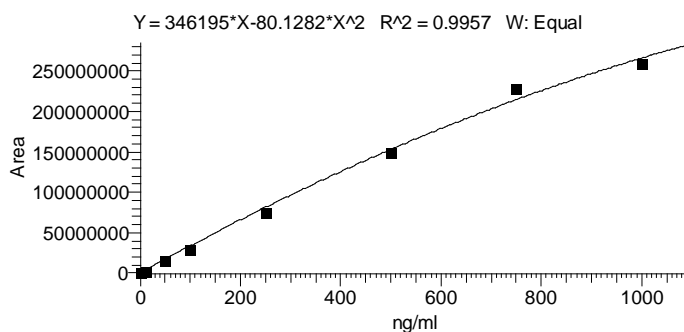


Рисунок 81 – Калибровочный график соединения 21

Найденное значение концентрации метаболита 21 составляет 0,138, 0,264, 0,11 нг в пробах мочи собранной в первые 2 часа, с 2 до 6 часов и с 6 до 24 часов после введения соответственно.

### Метаболит 13.

Для метаболита 6-дезметильного аналога мецигестона шифр 13 хроматографическое разделение осуществляли при тех же условиях. Время выхода 13 составляет 14,63 мин. Для обнаружения этого метаболита мецигестона методом тандемной масс-спектрометрии высокого разрешения проводили изучение фрагментации синтезированного стандарта.

На рисунках 82 и 83 приведены масс-хроматограмма и масс-спектр раствора 13 с концентрацией 100 мкг/мл, полученный при ИЭР. В режиме регистрации положительно заряженных ионов 21 образует протонированную молекулу  $[M+H]^+$  с  $m/z$  371,29410.

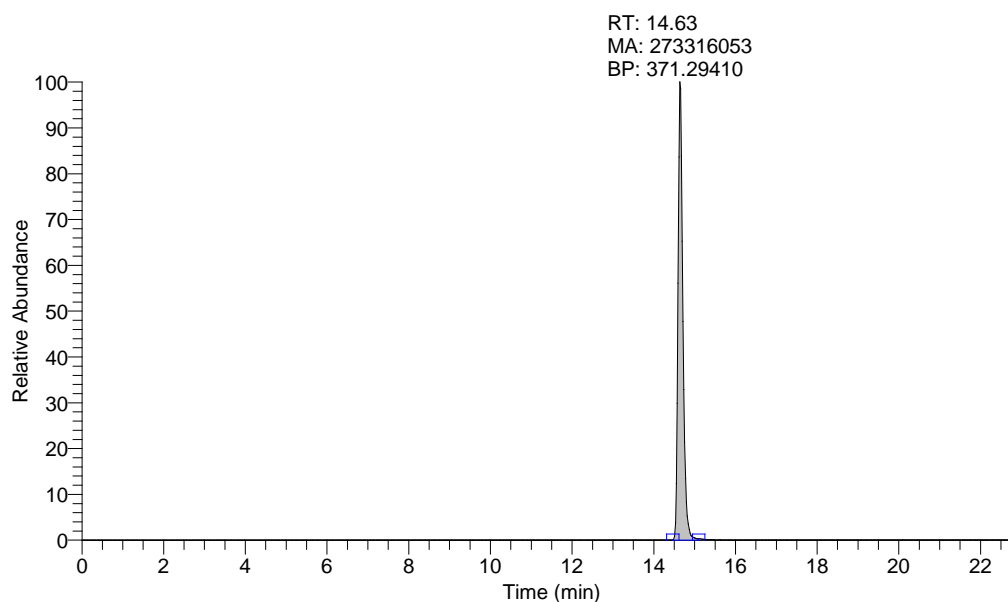


Рисунок 82 – Масс-хроматограмма стандартного раствора 13 с концентрацией 100 мкг/мл по выделенному иону с  $m/z$  371,29410

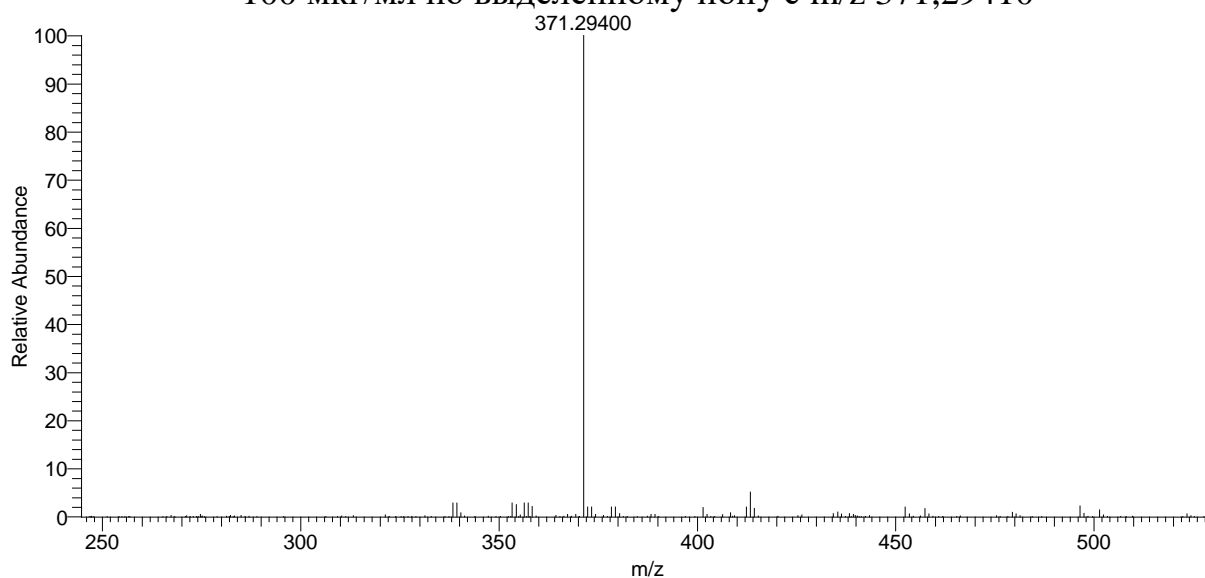


Рисунок 83 – Масс-спектр соединения с  $m/z$  371,29410 в режиме сканирования положительно заряженных ионов

На следующем этапе работы исследовали диссоциацию иона с  $m/z$  371,29410 для выбора характеристичных ионных переходов, которые в дальнейшем будут использоваться для идентификации предполагаемых метаболитов в биопробах в режиме МС/МС.

Полученный фрагментный масс-спектр приведен на рисунке 84.

K-100-01mg #2044-2096 RT: 14.53-14.82 AV: 8 SB: 123 12.22-14.42, 15.16-18.15 NL: 2.96E5  
 F: FTMS + c ESI Full ms2 371.29@hcd35.00 [51.67-775.00]

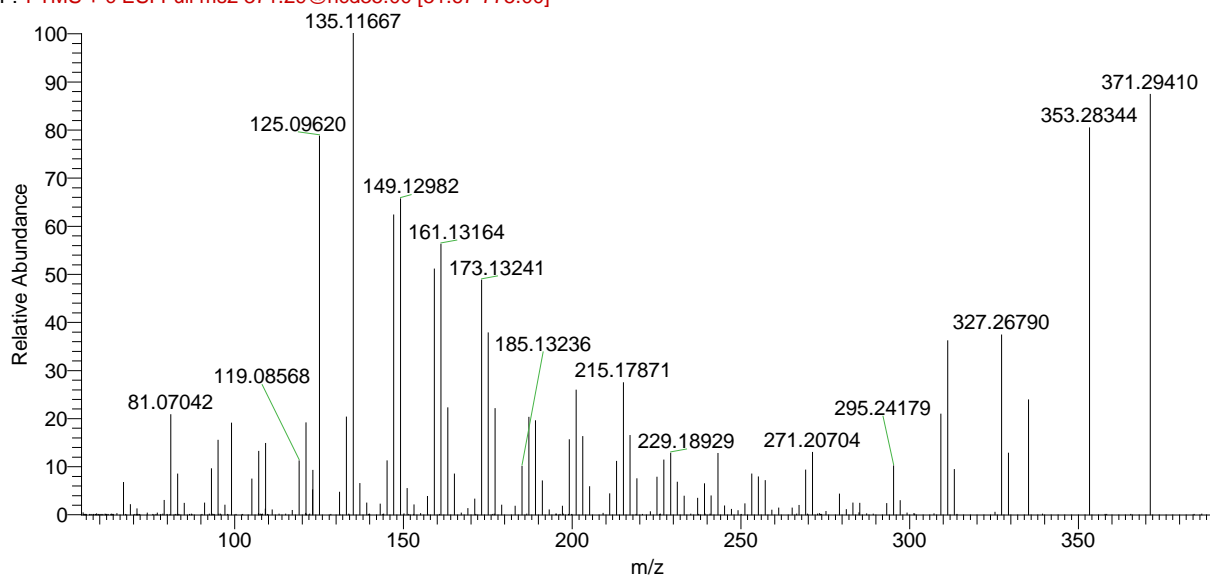


Рисунок 84 – MS/MS-спектры пика, соответствующего 13, в режиме регистрации положительно заряженных ионов при энергии фрагментации – 40 В

В качестве характеристичных ионных переходов выбрали пики с максимальной интенсивностью, соответствующие как отщеплению боковых заместителей, так и структурным перегруппировкам.

Для рассмотрения возможных фрагментных ионов экспериментальные результаты сопоставляли с расчётными, полученными с помощью программы HighChem Mass Frontier версии 7.0.

Таким образом, выбрали ионный переход с  $m/z$  371,29410  $\rightarrow$  353,28344, 125,0962 и 149,12982, энергия соударений – 40 В.

Предполагаемые механизмы образования данных фрагментных ионов приведены на рисунках 85-86.

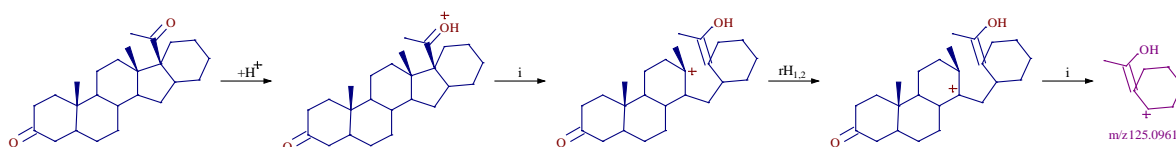


Рисунок 85 – Механизм образования фрагментного иона с  $m/z$  125,0962



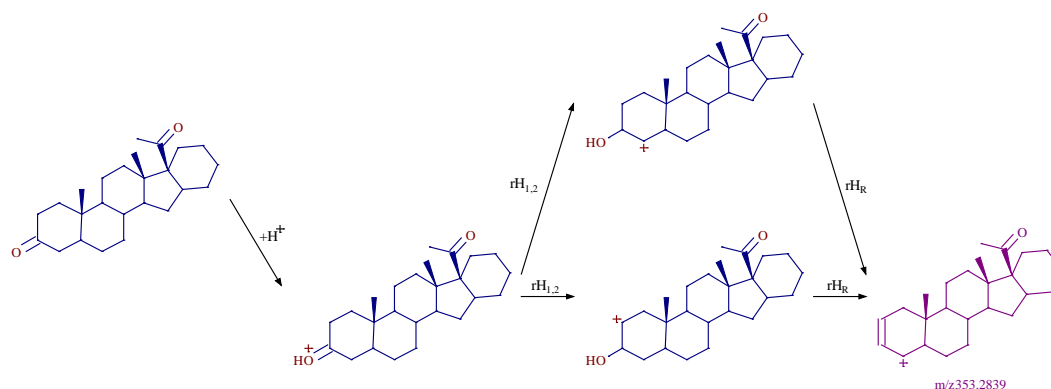


Рисунок 86 – Механизм образования фрагментного иона с  $m/z$  353,28344

Используя выбранные выше параметры проводили анализ мочи крыс, экспонированных 6-дезметильным аналогом мецигестона. В результате проведенных исследований данный метаболит был обнаружен во всех пробах собранных в период 24 часов. Время выхода совпадает со стандартом. Детектирование проводили в 2 сегментах: в режиме полного ионного сканирования и регистрации выбранных ионных переходов. На рисунке 87 приведена соответствующая масс-хроматограмма.

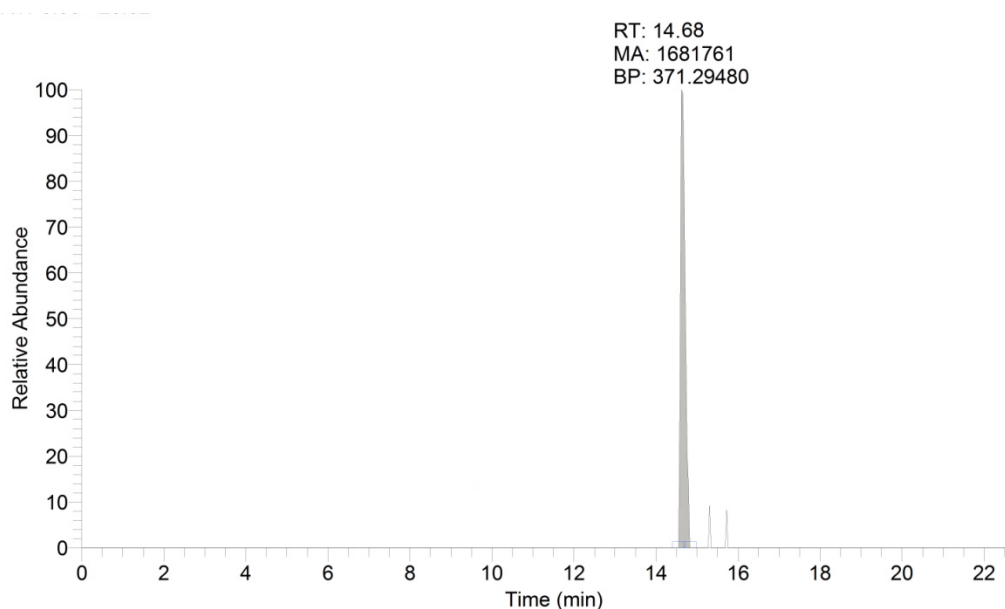


Рисунок 87 – Масс-хроматограмма образца мочи с маркировкой 8-1-1 – детектирование по выбранному ионному переходу 373.30945  $\rightarrow$  355,2988, 337,2880 и 125,0962

Градуировочную зависимость строили в диапазоне от 1 до 1000 нг/мл. (рис. 88)

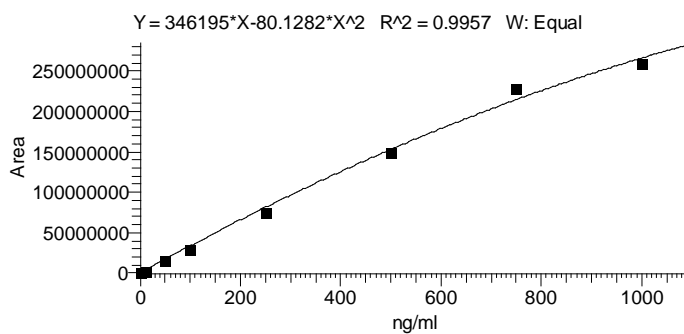


Рисунок 88 – Калибровочный график соединения 13

Найденное значение концентрации метаболита 13 составляет 0,166 нг в пробе мочи собранной с 2 до 6 часов после введения.



Результаты, полученные в рамках диссертационной работы на соискание ученой степени кандидата химических наук Назарова А.К. по теме «Синтез 6 $\alpha$ -метил-16 $\alpha$ -17 $\alpha$ -циклогексанпрогестерона (мецигестона), его метаболитов и разработка лекарственной формы мецигестона с повышенной биологической доступностью», используются в практической деятельности ООО "Изварино Фарма" при разработке новых лекарственных препаратов и их внедрении в промышленное производство.

Директор по разработке и развитию инновационных фармацевтических препаратов ООО «Изварино Фарма» \_\_\_\_\_ Хазанова Е.С.

