

Исследование биоэквивалентности рилузола с использованием УЭЖХ–МС/МС метода

*Подпружников Ю. В.¹, Сабко В. Е.¹, Юрченко В. В.¹, Кравец Н. Н.¹,
Рыбьянова Л. П.¹, Зупанец И. А.², Безуглая Н. П.²*

¹ — Биоаналитическая лаборатория «Клифарм», Украина

² — Национальный фармацевтический университет, Украина

Резюме

Проведено сравнительное фармакокинетическое исследование препаратов Боризол®, таблетки 50 мг, производства ЗАО НПЦ «Борщаговский ХФЗ» и Рилутек®, таблетки 50 мг, фирмы «Aventis». Полученные результаты доказали биоэквивалентность сравниваемых препаратов. Исследование проведено с использованием оригинального метода количественного определения рилузола в плазме, основанного на сочетании обращённо-фазной ультраэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-селективным детектированием (УЭЖХ–МС/МС). Метод отличается простотой пробоподготовки и экспрессностью. Валидация разработанного метода подтвердила соответствие его характеристик (селективность, нижний предел количественного определения, правильность, точность, возврат, стабильность) установленным требованиям.

Ключевые слова: рилузол, Боризол, Рилутек, биоэквивалентность, фармакокинетика, ультраэффективная жидкостная хроматография с МС/МС детектированием, боковой амиотрофический склероз, орфанные препараты, редкое заболевание

Введение

Рилузол, 2-амино-6- (трифторметокси) бензотиазол — единственное лекарственное средство на сегодня, которое одобрено FDA США для лечения бокового амиотрофического склероза. Этот препарат также получил высокую оценку ведущих российских и украинских специалистов [1, 2]. В Украине зарегистрирован и применяется в медицинской практике оригинальный препарат рилузола Рилутек®, таблетки 50 мг, фирмы «Aventis» (Франция). Генерическая копия указанного препарата, Боризол®, таблетки 50 мг производства ЗАО НПЦ «Борщаговский химико-фармацевтический завод», полученная из субстанции того же украинского производителя, проходит процедуру регистрации в Украине. Обеспечение практического здравоохранения орфанными препаратами является крайне важным, но, к сожалению, как отмечается в [3], процесс вывода на рынок таких препаратов в ЕС по сей день является неоправданно долгим. Не лучше ситуация с выводом на рынок орфанных препаратов и в странах СНГ. При ограниченных ресурсах особенно важно иметь в медикаментозном арсенале генерические лекарственные средства, биоэквивалентность которых оригинальным доказана проведением исследований в соответствии с современными регуляторными требованиями [4–6].

Первые исследования, доказывающие эффективность рилузола, описаны в [7]. Исследования фармакокинетики рилузола, проведённые на здоровых добровольцах и больных боковым амиотрофическим склерозом, описаны, соответственно, в [8–9]. В первом исследовании принимали участие 12 здоровых добровольцев, второе исследование было проведено на 100 больных в рамках III фазы клинических испытаний препарата. Оба исследования показали высокую межсубъектную вариабельность фармакокинетических (ФК) параметров препарата, детально проанализированную в [10].

В качестве аналитических методов при проведении фармакокинетических исследований рилузола главным образом использовали высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) с УФ-детектированием [8–11]. При определении рилузола в тканях и биологических жидкостях животных в исследованиях [12, 13] также был использован метод ВЭЖХ с УФ-детектированием. Применение метода ВЭЖХ с тандемным масс-селективным детектированием (ВЭЖХ–МС/МС) для количественного определения рилузола в плазме крови было описано лишь в 2010 году в [14]. При этом при пробоподготовке авторы использовали трудоёмкую и продолжительную процедуру жидкость-жидкостной экстракции с дальнейшим упариванием экстракта досуха и последующим

перерастворением остатка. Выбранные авторами условия хроматографии вызывают сомнения в их воспроизводимости, поскольку аналит и внутренний стандарт не удерживаются на колонке, а выходят в «мёртвом объёме».

Таким образом, исследование биоэквивалентности препарата «Боризол», таблетки 50 мг по отношению к оригинальному препарату «Рилутек», таблетки, 50 мг, выполненное с использованием простого и экспрессного метода, основанного на осаждении белков плазмы органическим растворителем с последующим анализом надосадочной жидкости новейшим методом ультраэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемным масс-селективным детектированием (УЭЖХ–МС/МС), безусловно, является актуальным.

Экспериментальная часть

Реактивы, растворители и материалы

Стандартный образец рилузола (РИЛ), 99,05%, препарата Боризол®, таблетки 50 мг, производства ЗАО НПЦ «Борщаговский химико-фармацевтический завод», серия 61008 и препарата Рилутек®, таблетки 50 мг, фирмы «Aventis», серия 7CH3C, были предоставлены ЗАО НПЦ «Борщаговский химико-фармацевтический завод», Украина.

Трифлорметоксианилин (ТФМА), 99,05%, производства фирмы Changzhou Friendship (Китай), серия 030410, использовали как внутренний стандарт.

Использовали метанол (99,9%) и ацетонитрил (99,9%) квалификации «для ВЭЖХ» производства фирмы LAB-SCAN, изопропанол (99,8%) квалификации «для ВЭЖХ» производства фирмы CHROMASOLV, кислоту муравьиную (98–100%) квалификации «чда» фирмы Riedel-de-Haen. Воду очищенную получали на установке «Elix-35» (фирма Millipore, USA), финишную очистку воды проводили на установке «Milli-Q Gradient» (фирма Millipore, USA).

Все другие используемые реактивы были аналитической квалификации. Человеческая плазма, свободная от лекарственных препаратов, полученная от здоровых добровольцев, с сертификатами качества на каждую серию, была предоставлена ОАО «Биофарма», Украина. Плазму хранили при температуре не выше минус 30 °С до использования.

Приборы и методы

УЭЖХ–МС/МС анализ был проведён с использованием хроматографа «Waters Acquity UPLC®» на колонке «Waters ACQUITY UPLC® BEH C18» (50 мм × 2.1 мм, размер зерна 1.7 мкм) (Милфорд, США) в комбинации с тандемным квадрупольным

масс-селективным детектором «Quattro microTM API» (Micromass, Манчестер, Англия), оснащённым электроспрей-интерфейсом. Для контроля оборудования и обработки хроматографических данных использовалось программное обеспечение MassLynx 4.1.

Хроматографирование проводили при 40 °С при скорости подвижной фазы 0,4 мл/мин. Стартовая подвижная фаза содержала 60% элюента А (ацетонитрил — вода — кислота муравьиная в соотношении объёмов 10: 90: 0,2) и 40% элюента В (ацетонитрил — кислота муравьиная в соотношении 100: 0,2). В течение 0,7 мин применяли линейный градиент до соотношения 27:73 элюента А к В. Затем подвижная фаза немедленно приводилась к 100% содержанию элюента В и удерживалась в таком состоянии до 1,2 мин, после чего немедленно устанавливались стартовые условия подвижной фазы. Температура автосамплера была 10 °С, объём вводимой пробы — 15 мкл.

Детектирование проводили в режиме регистрации положительных ионов. Параметры детектора составляли: температура источника 140 °С, напряжение на капилляре 3200 В, температура десольватации 500 °С, расход газа десольватации (азот, 99,5%) 550 л/час, давление инертного газа для получения дочерних ионов (аргон, 99,99%) 3.5 мкБар.

Детектирование образующихся ионов было проведено в режиме MRM (multiple reaction monitoring mode) с использованием ионных переходов с m/z 234.96 → 138.0 для РИЛ и 178.0 → 92.08 для ТФМА. Энергия соударения составляла 45 эВ и 30 эВ, напряжение на конусе — 36 эВ и 16 эВ для РИЛ и ТФМА, соответственно. Параметры MRM-метода были определены с помощью опции автоматической оптимизации прибора.

Приготовление образцов

Приготовление стандартных калибровочных и QC растворов. Стандартный образец около 10 мг РИЛ или 4 мг ТФМА точно взвешивали, помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяли в метаноле при использовании ультразвуковой бани, доводили объём раствора указанным растворителем до метки и тщательно перемешивали (основной раствор).

Растворы РИЛ для приготовления калибровочных растворов готовили методом соответствующего разбавления основного раствора, используя в качестве растворителя водный раствор, содержащий 0,1% муравьиной кислоты и 20% ацетонитрила (AcN). При этом получали растворы с концентрациями РИЛ 20; 60; 200; 500; 1500; 3000; 6000 нг/мл.

Растворы РИЛ для приготовления QC-образцов готовили из основного раствора стандартного образца аналогично приготовлению ка-

либровочных растворов, при этом получали растворы с концентрациями аналита 60 нг/мл, 3000 нг/мл и 5000 нг/мл.

Раствор ТФМА готовили путём разбавления основного раствора, используя в качестве растворителя 1% раствор кислоты муравьиной в метаноле, при этом получали раствор с концентрацией ТФМА 20000 нг/мл. Растворы хранили при температуре от +2 до +7 °С.

Калибровочные растворы и растворы контроля качества (QC-образцы) готовили на плазме, прибавляя к 200 мкл blankовой плазмы, помещённой в пробирки Эппендорф (1,5 мл), по 20 мкл соответствующего раствора РИЛ и ТФМА. Содержимое перемешивали на мешалке Vortex Genius 3 в течение 20 с и далее проводили подготовку пробы, как это указано ниже в разделе «приготовление биообразцов», начиная с прибавления 500 мкл 1% раствора кислоты муравьиной в AcN.

Приготовление биообразцов. В пробирку Эппендорф (1,5 мл) помещали 200 мкл биообразца (аликвоты плазмы крови добровольца), прибавляли 20 мкл раствора ТФМА и перемешивали содержимое на мешалке Vortex 20 с. К полученному раствору прибавляли 500 мкл 1% раствора муравьиной кислоты в AcN и содержимое вновь перемешивали на Vortex. Пробирки помещали в предварительно охлаждённую до 10 °С центрифугу (Sigma 3K30C) и центрифугировали при 20000 об./мин в течение 10 мин. По 300 мкл надосадочной жидкости из каждой пробирки переносили в вials, содержащие по 300 мкл 0,1% раствора муравьиной кислоты в воде, перемешивали их содержимое на мешалке Vortex и передавали на этап хроматографирования.

Валидация метода. Была проведена полная валидация разработанного метода определения РИЛ в соответствии с требованиями руководства [15]. Валидация включала следующие параметры: селективность, нижний предел количественного определения, калибровочная кривая, внутрипрогонная и межпрогонная точность и правильность, возврат (степень извлечения), стабильность.

Для определения селективности использовали модельные биообразцы на 3-х сериях blankовой плазмы, в которую вводили РИЛ в количестве, соответствующем НПКО (2 нг/мл в пересчёте на содержание в плазме), и ТФМА, получая концентрацию последнего 2000 нг/мл в пересчёте на плазму. Растворы из модельных биообразцов и образцов blankовой плазмы без введения дополнительных ингредиентов, приготовленные так, как описано выше, хроматографировали и сравнивали площади пиков на соответствующих хроматограммах.

Для определения нижнего предела количественного определения использовали 5 модельных биообразцов, приготовленных на blankовой плазме, с введённой концентрацией РИЛ, равной 2 нг/мл в пересчёте на плазму. Хроматографировали полученные растворы и растворы blankовой плазмы, обработанные, как указано в разделе «Приготовление биообразцов».

Для определения параметра «Калибровочная кривая» использовали 7 калибровочных растворов с концентрациями РИЛ 20; 60; 200; 500; 1500; 3000; 6000 нг/мл в пересчёте на плазму. Каждый раствор содержал 2000 нг/мл ТФМА в пересчёте на плазму.

Для оценки параметров «Точность» и «Правильность» готовили по 5 модельных биообразцов для каждой из 3-х концентраций РИЛ в пересчёте на плазму: 6; 300 и 500 нг/мл. Эксперимент проводили в три разных рабочих дня. Внутрипрогонная и межпрогонная точность была рассчитана по формуле:

$$R.S.D. = (S.D./M) (100), \text{ где}$$

M — средняя экспериментально определённая концентрация

S.D. — стандартное отклонение *M*

Правильность была определена как относительная ошибка, её рассчитывали с использованием формулы:

$$RE = (E - T) (100/T), \text{ где}$$

E — экспериментально определённая концентрация

T — номинальная концентрация

Для оценки степени извлечения были приготовлены по 3 модельных биообразца, содержащие РИЛ на каждом из 3-х концентрационных уровней: низком, среднем и высоком, и ТФМА с концентрацией 2000 нг/мл в пересчёте на плазму. Сравнивали площади пиков в хроматограммах растворов, приготовленных в соответствии с методикой, и растворов, полученных внесением растворов аналитов в обработанную blankовую плазму после экстракции.

В соответствии с регуляторными требованиями было проведено тестирование всех видов стабильности, предусмотренных для биоаналитических методик [15]: кратковременная стабильность, стабильность при замораживании-оттаивании, пост-препаративная стабильность, долговременная температурная стабильность, стабильность основных растворов РИЛ и ТФМА. Все модельные биообразцы для исследования стабильности

были приготовлены на бланковой плазме с внесением в неё соответствующего количества растворов РИЛ и ТФМА. Кратковременная стабильность была исследована при размораживании образцов и их выдерживании при комнатной температуре в течение 4-х часов, после чего образцы были проанализированы. Было проведено 3 цикла замораживания-оттаивания образцов для двух разных уровней концентраций РИЛ, после чего был проведён количественный анализ.

Долговременную стабильность проверяли после хранения в течение 175 суток при температуре не выше минус 70 °С модельных образцов, содержащих РИЛ в номинальных концентрациях 6 и 400 нг/мл. Стабильность хроматографируемых растворов в автосамплере была изучена после хранения в течение 26 часов, стабильность основных растворов РИЛ и ТФМА — после хранения в течение 5 месяцев и 23 суток, соответственно.

Исследование биоэквивалентности. Клиническое исследование по изучению биоэквивалентности препаратов «Боризол» и «Рилутек» (таблетки 50 мг), содержащих рилузол, было проведено в строгом соответствии с требованиями протокола, этическими принципами Хельсинской декларации, требованиями GCP и GLP. В данное исследование было включено 26 здоровых добровольцев обоего пола (10 женщин, что составило 38,5% и 16 мужчин, соответственно 61,5%). Средний возраст добровольцев — $32,3 \pm 1,87$ лет.

Дизайн исследования: сравнительное, рандомизированное, перекрёстное с двумя периодами и двумя последовательностями исследование по изучению биоэквивалентности при введении добровольцам натошак однократной дозы каждого из сравниваемых препаратов, с «ослеплением» аналитического этапа исследования и статистической обработки результатов. Все добровольцы получали однократно натошак препарат в дозе 50 мг (1 таблетка) в каждый период исследования.

У каждого из добровольцев было отобрано по 15 проб крови в каждом из периодов исследования. Пробы отбирали в пластиковые вакуумные пробирки, объёмом 9 мл, обработанные гепарином лития. Отбор проб крови производили согласно следующему графику — 0 ч (до приёма препарата), через 15 мин; 30 мин; 1 ч; 1 ч 30 мин; 2 ч; 3 ч; 4 ч; 6 ч; 8 ч; 12 ч; 15 ч; 24 ч; 30 и 36 часов после приёма препарата. Пробы не более чем через 2 минуты после отбора крови помещали в центрифугу. Центрифугирование проводили в течение 5 минут при 3000 g. Плазму делили на 2 аликвоты (1-я — для анализа, 2-я — контрольная) по 1,6 мл каждая, которые помещали в отдельные предварительно промаркированные криоконтейнеры (тубы). Плазма и в клинической базе, и в биоаналитической лаборатории хранилась при температуре не выше минус 70 °С.

Промежуток времени между забором крови и помещением плазмы в морозильную камеру не превышал 12 мин.

Образцы для анализа (общее количество 780 образцов) были переданы с клинической базы в биоаналитическую лабораторию «Клифарм» в криобоксах в замороженном виде во вторичных криоконтейнерах, заполненных «сухим льдом» (твёрдым диоксидом углерода).

Дизайном исследования было предусмотрено «ослепление» биообразцов для биоаналитической лаборатории: маркировка биообразцов содержала код препарата — буквы «А» или «В», при этом какой из препаратов является тестовым, а какой референтным, информацию при проведении анализа и обработке его результатов лаборатория не имела.

С использованием разработанного УЭЖХ-МС/МС метода в биообразцах было проведено количественное определение РИЛ.

По полученным результатам были построены фармакокинетические профили для каждого добровольца в обоих периодах. Фактические значения фармакокинетических параметров $C_{\max}$ и $T_{\max}$ были определены из первичных данных рутинного анализа с применением элементарной статистики.

Последующую статистическую обработку фармакокинетических (ФК) данных проводили с использованием программы Win-Nonlin версии 5.2 (Pharsight, Mountain View, CA, USA) способом внемоделного расчёта с прямой статистической обработкой по методу «NCA Model 200». Значения площадей под фармакокинетическими кривыми AUC_{0-36} были вычислены с использованием метода линейных трапеций. Площадь под кривой при экстраполяции её до бесконечности ($AUC_{0-\infty}$) была вычислена с использованием указанного программного продукта. Константа элиминации K_{el} была определена путём линейной регрессии после логарифмического преобразования данных, был определён также период полувыведения ($t_{1/2}$).

Вывод о биоэквивалентности был сделан с использованием подхода, основанного на 90% доверительных интервалах для отношения средних значений параметров $C_{\max}$ и AUC_{0-t} для препарата А и препарата В, оценённых при выполнении процедуры статистического анализа. Препараты считали биоэквивалентными, если 90% доверительный интервал для отношения их средних значений $C_{\max}$ и AUC_{0-t} находился в пределах 0,80–1,25 (80–125%).

Результаты и их обсуждение

Разработка биоаналитической методики. В биоаналитических методиках чувствительность, точность и правильность количественного определения аналита подвержены большому влиянию случайных и систематических факторов. Такое

влияние наблюдается как в процессе пробоподготовки (экстракция, упаривание, сорбция и десорбция и др.) и хроматографирования, так и на этапе масс-селективного детектирования. В последнем случае кроме обычных погрешностей, критическим фактором становится дрейф чувствительности масс-детектора. Для компенсации описанных факторов при проведении фармакокинетических исследований в раствор биообразца обычно вводят внутренний стандарт (ВС) перед началом количественного анализа. Это позволяет увеличить правильность и точность методик, добиться соблюдения критериев приемлемости при валидации метода и дальнейшем рутинном анализе [15]. В связи с этим, очень важным является правильный выбор внутреннего стандарта.

ВС, используемый в УЭЖХ–МС/МС (или ВЭЖХ–МС/МС) количественном анализе по отношению к аналиту должен иметь близкие физико-химические свойства (липофильность, растворимость, кислотно-основные свойства), подобное хроматографическое поведение, близкую молекулярную массу. Специфическим требованием к ВС, используемым в фармакокинетических исследованиях, является отсутствие его в бланковой биоматрице (отсутствие на эндогенном уровне).

Перечисленные требования идеально выполняются, если в качестве ВС используются дейтерированные или меченые изотопами других элементов аналиты. К сожалению, зачастую осуществить это достаточно трудно, т.к. коммерчески доступный ассортимент таких веществ очень мал.

Следующими по полноте соответствия вышеперечисленным требованиям можно рекомендовать в качестве ВС изомеры аналитов. Однако здесь есть опасение, что даже «суперселективный» tandemный масс-селективный детектор не обеспечит необходимой селективности определения ВС и аналита на стадии образования их дочерних ионов.

Нами в качестве ВС для количественного определения РИЛ в плазме крови был выбран ТФМА.

Как видно из структурных формул аналита и ВС, приведённых на рис. 1, они достаточно схожи, и можно ожидать от них сходного хроматографического поведения.

Известные до проведения нашего исследования методы пробоподготовки при определении рилузола в биологических матрицах гораздо более длительны и трудоёмки. В [13] при пробоподготовке проводят экстракцию этилацетатом с дальнейшим упариванием досуха в токе азота и перерастворением остатка в подвижной фазе. В работе [14] для выделения рилузола из плазмы использовали экстракцию *трет*-бутилметилловым эфиром, с дальнейшим упариванием супернатанта досуха в токе азота и перерастворением его в смеси 0,1% кислота муравьиная — AcN (10:90). Для выделения рилузола из плазмы и нервной ткани мышей в работе [12] использовали предварительную экстракцию на картридже C_8 с дальнейшим элюированием и определением методом ВЭЖХ.

Для осаждения белков и других веществ, мешающих количественному определению РИЛ, нами был использован ацетонитрил, содержащий 1% кислоты муравьиной. Как показали наши исследования, при этом достигается необходимая селективность и чувствительность методики. После центрифугирования аликвоту супернатанта отбирают и разбавляют таким же количеством 0,1% раствора муравьиной кислоты в воде для приближения состава растворителя пробы к стартовому составу элюента при градиентном элюировании. Указанный метод пробоподготовки, впервые предложенный нами для определения рилузола в плазме, существенно отличается от ранее описанных простотой и экспрессностью.

Для хроматографического определения использовалась обращённо-фазная колонка «Waters ACQUITY UPLC® ВЕН C18». Хроматографирование проводили в градиентном режиме, что позволило получить вполне симметричные пики аналита и ВС. Время удерживания аналита составило

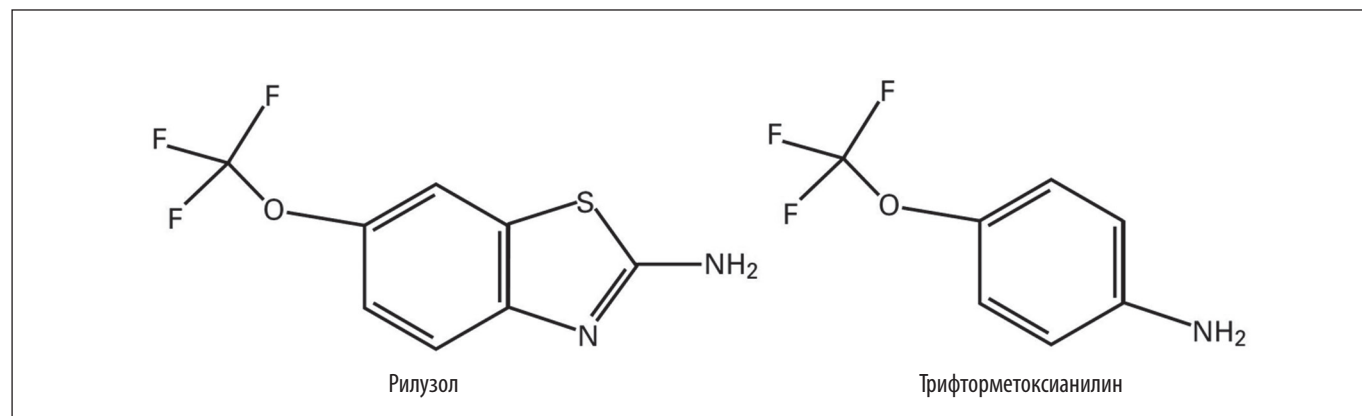


Рис. 1. Химические структуры рилузола и трифторметоксианилина

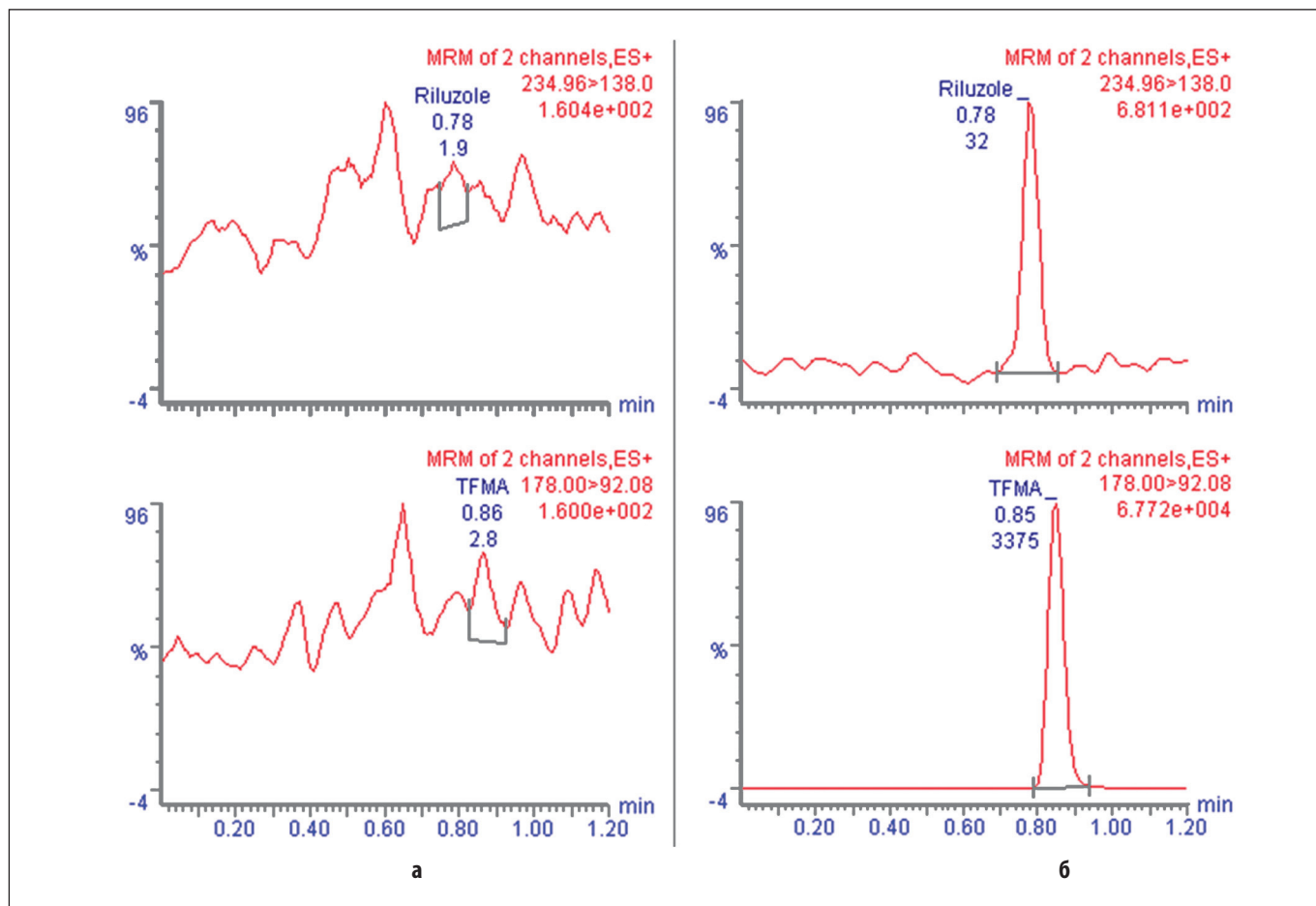


Рис. 2. Хромотограммы растворов бланковой плазмы (а) и бланковой плазмы с введёнными в неё 2 нг/мл рилузола (НПКО) и 2000 нг/мл внутреннего стандарта трифторметоксианилина (TFMA) (б)

0,79 мин, ВС — 0,85 мин. Время регистрации данных составляло 1,2 мин. С учётом времени отбора пробы время, необходимое для записи одной хромотограммы, не превышало 2 мин.

Малые затраты времени на хромотографию позволили каждый исследуемый образец хромотографировать дважды, улучшив тем самым метрологические характеристики метода. Результат определения концентрации РИЛ рассчитывали для среднего значения отклика двух параллельных инъекций. Значительное уменьшение времени хромотографирования в методе УЭЖХ по сравнению с традиционной ВЭЖХ является неоспоримым преимуществом нового метода. Особенно существенно это при проведении фармакокинетических исследований.

Были установлены оптимальные параметры для МС/МС детектирования РИЛ и ТФМА в выбранных хромотографических условиях. Хромотограммы растворов из бланковой плазмы без введения в неё аналита и ВС, а также с введёнными в неё указанными веществами, приведены на рис. 2.

Как видно из рис. 2, РИЛ и ТФМА не мешают компоненты плазмы, при этом приведённая

хромотограмма отвечает содержанию аналита на уровне нижнего предела количественного определения (2 нг/мл в плазме).

В данном исследовании было проанализировано 780 биообразцов, что составляло 13 аналитических прогонов. В каждом из прогонов готовили 7 калибровочных, 6 QC-растворов, по 1 раствору Z-образца и бланка, таким образом, общее количество образцов при рутинном анализе, не считая этапов разработки и валидации метода, составило 975.

Валидация методики

Селективность. Были исследованы образцы бланковой плазмы из 3-х разных источников. На каждой из этих видов плазмы было приготовлено по 2 бланковых образца, а также по 2 модельных биообразца, содержащих РИЛ с концентрацией 2 нг/мл и внутренний стандарт с концентрацией 2000 нг/мл.

Средние отношения площади пика «шума» к площади пика аналита (РИЛ) для 3-х исследованных образцов плазмы составили 14,9, 8,7

и 11,5%, соответственно, что удовлетворяет установленному критерию (< 20%).

Калибровочная кривая и нижний предел количественного определения. Калибровочная кривая была построена по приготовленным на blank-овой плазме 7 калибровочным растворам СО РИЛ в диапазоне концентраций 2–600 нг/мл в пересчёте на плазму. Результаты измерений blank-овых растворов и растворов нуль-образцов не принимались во внимание при расчёте параметров регрессионного уравнения. Наиболее адекватно калибровочная кривая описывается уравнением первого порядка с весовой функцией $1/x$ (т.е., $1/\text{концентрация}$).

Коэффициенты регрессионного уравнения калибровочной прямой $Y = a \cdot X + b$ имели значение: $a = 0,0030419$, $b = 0,00132343$;

Коэффициент корреляции имел значение: $r = 0,999$.

Отклонения найденных значений концентраций от введённых удовлетворяли критериям приемлемости [15].

Нами было провалидировано значение нижнего предела количественного определения 2 нг/мл. Для этого были проанализированы 5 независимых модельных биообразцов с указанной концентрацией и 5 blank-овых биообразцов. Среднее соотношение сигнал/шум составило 9,2, концентрация РИЛ была найдена с правильностью 1,6% и точностью 8,6%, что удовлетворяет требованиям FDA — не более 20% [15].

Правильность, точность. Определения, выполненные на 5 модельных биообразцах на каждом из 3-х выбранных уровней концентраций QC-образцов показало, что правильность, а также

внутридневная и междневная точность (табл. 1), удовлетворяют критериям приемлемости — не более 15% [15].

Степень извлечения (recovery). Было установлено, что степень извлечения РИЛ из плазмы составляет: 106,8% для концентрации 6 нг/мл, 96,4% для концентрации 300 нг/мл и 95,8% для концентрации 500 нг/мл. Таким образом, среднее значение степени извлечения РИЛ составило 99,7%. Среднее значение степени извлечения ТФМА составило 93,5%.

Изучение стабильности. Было проведено тестирование всех видов стабильности, предусмотренных для биоаналитических методик [15].

Результаты тестирования показали их соответствие установленным критериям приемлемости [15]. Было подтверждено, что модельные биообразцы стабильны в течение 175 суток хранения при температуре не выше минус 70 °С. Срок хранения реальных биообразцов до проведения анализа составлял 171 сут.

Исследование фармакокинетики

На рис. 3 приведены усреднённые фармакокинетические кривые 26 добровольцев после введения тестового и референтного препаратов перорально. Как видно из рис. 3, препарат Боризол®, таблетки 50 мг, производства ЗАО НПЦ «Борщевский химико-фармацевтический завод» даёт сходный фармакокинетический профиль с препаратом Рилутек®, таблетки 50 мг, производства фирмы «Aventis».

В данном исследовании не зарегистрировано ни одной побочной реакции или побочного яв-

Таблица 1

Внутридневные и междневные точность и правильность методики количественного определения рилулоза в плазме

		Введено рилулоза (нг/мл)	Найдено рилулоза (нг/мл)	RSD (%)	RE (%)
Внутридневные	День 1, n=5	5.969	6.496	3.7%	8.8
		298.5	302.7	3.8%	1.4
		497.4	465.5	2.7%	–6.4
	День 2, n=5	5.969	6.323	5.0%	5.9
		298.5	328.9	3.1%	10.2
		497.4	515.1	3.6%	3.5
	День 3, n=5	5.969	6.408	6.6%	7.4
		298.5	300.3	4.3%	0.6
		497.4	455.7	6.2%	–8.4
Междневные	3 дня, n=15	5.969	6.409	5.0%	7.4
		298.5	310.6	5.5%	4.1
		497.4	478.7	6.9%	–3.8

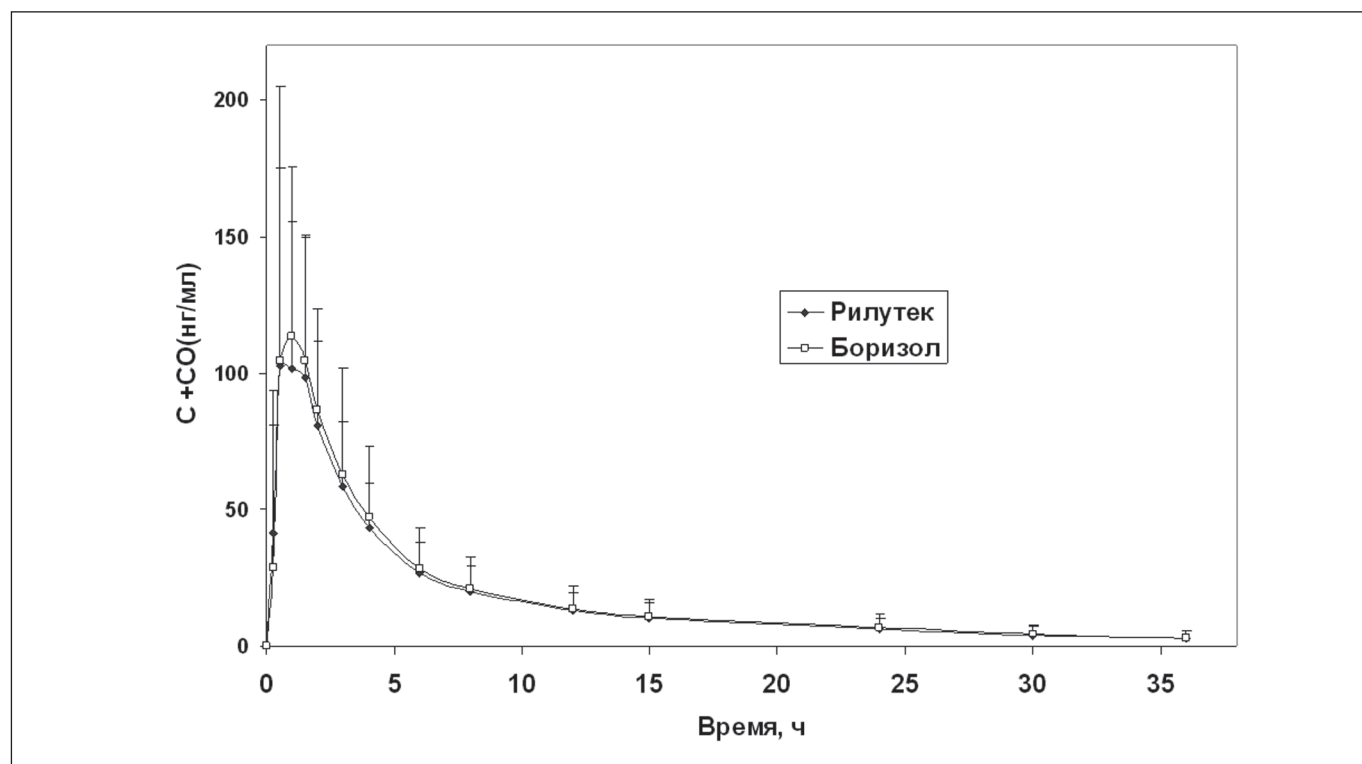


Рис. 3. Усреднённые профили «концентрации и их стандартные отклонения — время» после однократного перорального приёма препаратов 26 здоровыми добровольцами

ления, относящегося к категории серьёзных. Оба препарата сопоставимы по профилю переносимости.

Статистическую обработку проводили с использованием алгоритма ANOVA (программное обеспечение Win-Nonlin professional software version 5.2). Основные фармакокинетические параметры и их стандартные отклонения приведены в табл. 2.

Таблица 2

Средние фармакокинетические параметры рилузола и их стандартные отклонения для 26 добровольцев после однократного перорального введения тестового и референтного препаратов (таблетки 50 мг)

Параметр	Боризол®	Рилутек®
$C_{\max}$ (нг/мл)	151,0±90,1	138,0±64,2
$t_{\max}$ (h)	1,13±0,59	0,95±0,66
AUC_{0-t} (ч·нг/мл)	668,8±334,8	630,2±273,1
$AUC_{0-\infty}$ (ч·нг/мл)	737,7±369,2	699,0±318,4
$AUC_{0-t} / AUC_{0-\infty}$ (%)	90,65±3,11	90,53±4,36
K_{el} (ч ⁻¹)	0,061±0,013	0,069±0,026
$t_{1/2}$ (ч)	11,78±2,44	11,22±3,77

После однократного приёма натошак (после 12-часового голодания) тестового препарата Боризол®, таблетки 50 мг и референтного препарата Рилутек®, таблетки 50 мг, максимальный уровень кривой «концентрация—время» достигался, соответственно, через 1,13 ч и 0,95 ч. Средние значе-

ния максимальной концентрации ($C_{\max}$) рилузола составили 151,0 нг/мл и 138,0 нг/мл для тестового и референтного препаратов, соответственно. При этом необходимо отметить достаточно высокую межсубъектную вариабельность для обоих препаратов. Средние значения площади под фармакокинетической кривой AUC_{0-t} составили для Боризола — 668,8 и для Рилутека — 630,17 ч·нг/мл. Экстраполированная $AUC_{0-\infty}$ для тестового и референтного препаратов составили, соответственно, 737,7 и 699,0 ч·нг/мл (в обоих случаях процентное отношение AUC_{0-t} к $AUC_{0-\infty}$ было больше 90% (90,65% и 90,53%). Константы элиминации, как и другие ФК-параметры, для тестового и референтного препаратов статистически не различались и составили — 0,061 и 0,069, соответственно. Период полувыведения ($t_{1/2}$) препаратов составил — 11,78 ч для Боризола и 11,22 ч для Рилутека.

В табл. 3 приведены данные по оценке биоэквивалентности изучаемых препаратов. Как видно из этих данных, отношение средних максимальных концентраций тестового и референтного препаратов составляет 109,4% при относительном доверительном интервале 91,43–119,9%, аналогичное отношение средних площадей — 106,1% при их вариабельности 97,19–114,9%, что соответствует критериям приемлемости (80–125%). Таким образом, на основании проведенного исследования можно сделать вывод о том, что препарат Боризол®, таблетки 50 мг, произ-

Таблица 3

Результаты изучения биоэквивалентности препаратов Боризол® (А) и Рилутек® (В)

Препарат	$C_{\max}$, нг/мл	$\frac{C_{\max A}}{C_{\max B}}$, %	$\Delta C_{\max}$, %	AUC_{0-t}	$\frac{AUC_{0-t} A}{AUC_{0-t} B}$, %	ΔAUC_{0-t} , %
Боризол®	151,0	109,4	91,43–119,9	668,8	106,1	97,19–114,9
Рилутек®	138,0			630,2		

водства ЗАО НПЦ «Борщаговский ХФЗ» биоэквивалентен препарату Рилутек®, таблетки 50 мг, производства «Aventis» при введении перорально натошак однократной дозы здоровым добровольцам.

Выводы

Проведено сравнительное фармакокинетическое исследование генерического препарата Боризол®, таблетки 50 мг, производства ЗАО НПЦ «Борщаговский ХФЗ» и оригинального препарата Рилутек®, таблетки 50 мг, фирмы «Aventis», кото-

рое подтвердило биоэквивалентность сравниваемых препаратов.

Для проведения исследования был разработан и провалидирован в соответствии с установленными международными требованиями оригинальный метод определения рилузона в плазме крови. Метод отличается простотой и экспрессностью, поскольку он основан на одностадийной преципитации белков плазмы органическим растворителем с последующим анализом супернатанта новейшим методом ультраэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с tandemным масс-селективным детектированием.

Литература

- Боковой амиотрофический склероз / под ред. И. А. Завалишина. М.: ГЭОТАР, Медиа, 2009. 272 с.
- Данилов Н. Н. Фармакотерапия при боковом амиотрофическом склерозе. Український медичний часопис. 2004. Т. IX/X, 5. С. 61–66.
- Joppi R., Bertele V., Garattini S. Orphan drug development is progressing too slowly. Br J Clin Pharmacol 2006. Vol 61 (3). P. 355–360.
- CPMP/EWP/QWP/1401/98 Note for guidance on the investigation of bioavailability and bioequivalence. Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP), The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products — Evaluation of Medicines in Human Use; 2001.
- Guidance for Industry Bioequivalence guidance. U. S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Veterinary Medicine (CVM); November 8, 2006.
- Multisource (generic) pharmaceutical products: guidelines on registration requirements to establish interchangeability. WHO Technical Report Series, No. 937, Annex 7. WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. Fortieth report. Geneva, World Health Organization; 2006.
- Wagner M. L., Landis B. E. Riluzole: a new agent for amyotrophic lateral sclerosis. Ann Pharmacother. 1997. Vol. 31 (6), P. 738–744.
- Le Liboux A., Lefebvre P., Le Roux Y., Truffinet P., Aubeneau M., Kirkesseli S., et al. Single- and multiple-dose pharmacokinetics of riluzole in white subjects. J Clin Pharmacol 1997; Vol. 37 (9). P. 820–827.
- Bruno R., Vivier N., Montay G., Le Liboux A., Powe L. K., Delumeau J. C., et al. Population pharmacokinetics of riluzole in patients with amyotrophic lateral sclerosis. Clin Pharmacol Ther 1997. Vol. 62 (5). P. 518–526.
- Groeneveld G. J., van Kan H. J. M., Tora o J. S., Veldink J. H., Guchelaar H. — J., Wokke J. H. J., et al. Inter- and intraindividual variability of riluzole serum concentration in patients with ALS. J Neurol Sci 2001. 191. P. 121–125.
- van Kan H. J. M., Spieksma M., Groeneveld G. J., Tora o J. S., van den Berg L. H., Guchelaar H. J. A validated HPLC assay to monitor riluzole plasma or serum concentrations in patients with amyotrophic lateral sclerosis. Biomed Chromatogr 2004. Vol. 18 (9). P. 723–6.
- Colovic M., Zennaro E., Caccia S. Liquid chromatographic assay for riluzole in mouse plasma and central nervous system tissues. J Chromatogr. B 2004. Vol. 803. P. 305–309.
- Maltese A., Maugeri F., Drago F., Bucolo C. Simple determination of riluzole in rat brain by high-performance liquid chromatography and spectrophotometric detection. J Chromatogr. B 2005. Vol. 817. P. 331–334.
- Chandu B. R., Nama S., Kanala K., Challa B. R., Shaik R. P., Khagga M. Quantitative estimation of riluzole in human plasma by LC-ESI-MS/MS and its application to a bioequivalence study. Anal Bioanal Chem 2010. Vol. 398. P. 1367–1374.
- Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, U. S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration Centre for Drug Evaluation and Research (CDER), Centre for Veterinary Medicine (CVM); May 2001.