

Правила исследования биоэквивалентности лекарств

А.В. Соколов

Кафедра клинической фармакологии с лабораторией фармакокинетики РГМУ, г. Москва

Известно, что большая часть продаваемых в нашей стране лекарств являются не оригинальными препаратами, а их хорошо или плохо воспроизводимыми аналогами. Такие копии лекарственных препаратов называются дженериками (от англ. — Generic). Крупные фармацевтические фирмы в разработку новых лекарств вкладывают огромные средства — сотни миллионов долларов. Это одна из причин высокой стоимости препаратов. Существуют компании, специализирующиеся на выпуске воспроизводимых по лицензии (так же отнюдь не дешевых) средств, соблюдая в точности регламент производства, контроль за которым осуществляется под надзором фирм-разработчиков. Однако, есть большое количество фармацевтических производств, выпускающих лекарственные препараты без покупки дорогостоящей лицензии, а, следовательно, не всегда способных гарантировать качество препаратов.

Чтобы оказать оптимальное терапевтическое действие, активная субстанция должна быть доставлена в место своего действия в эффективной концентрации в течение желаемого периода. Проникновение лекарства в организм или, иначе говоря, биодоступность активной субстанции должна быть известна и воспроизводима. Особенно это касается случаев, когда одна лекарственная форма продукта заменяется другой. Оценка биоэквивалентности (или фармакокинетической эквивалентности) лекарственных средств (ЛС) в настоящее время считается одним из основных видов медико-биологического контроля качества дженериков — ЛС, содержащих одно и то же лекарственное вещество в одинаковой дозе и в той же лекарственной форме, что и оригинальное ЛС.

Для того чтобы врач, назначающий лекарство пациенту, был бы уверен в эффективности и адекватности препарата ему необходимо иметь на руках какое-либо свидетельство или сертификат качества данного препарата. Если идет речь об оригинальном препарате, к тому же разработанным хорошо известной фармацевтической компанией, то тогда достаточно прочитать аннотацию, прилагаемую к каждой упаковке препарата или заглянуть в любой солидный медицинский справочник, которые издаются сейчас в достаточном количестве. В большинстве же случаев врачу приходится назначать не оригинальный препарат, а его воспроизводимый аналог. Если идет речь о препаратах, производящихся фирмами различных стран по лицензии известных фармацевтических компаний, тогда можно вполне положиться на тот контроль качества, который осуществляется или может осуществляться фирмами-разработчиками оригинальных лекарств. В этом случае фирма-разработчик гарантирует качество препарата, производимого по ее лицензии. Однако стоимость таких препаратов практически равна или незначительно отличается от стоимости оригинальных лекарств. Мы же часто встречаемся в продаже с препа-

ратами, имеющими одинаковые международные непатентованные названия, но обладающие часто не одинаковой терапевтической эффективностью. Это объясняется тем, что технологический уровень производства в некоторых странах, импортирующих нам лекарства, оставляет желать лучшего.

В состав лекарственной формы помимо основного действующего вещества — лекарственной субстанции входят различные ингредиенты (наполнители, полимерные пленки, сахара и т.п.), замена которых изменяет некоторые фармакокинетические параметры при приеме данного препарата. Кроме того, лекарственная форма препарата так же может иметь свое значение для достижения того или иного фармакологического эффекта. Это не говоря уже о том, что изменение технологии производства (изменение условий прессования, влажности и т.п.) практически наверняка несет за собой изменение свойств (как правило, ухудшение) и качества препарата. В подобных случаях проведение обычных контрольных операций (исследования на растворимость, распадаемость, количественное соответствие и т.д.) не может дать никакой дополнительной информации об эффективности исследуемого препарата. Проведение полномасштабных клинических испытаний, конечно же, может дать ответы на все возможные вопросы по соответствию сравниваемых лекарств, однако стоимость и длительность подобных исследований таковы, что практически исключена возможность их проведения. Во всем мире, и наша страна не является исключением, в подобных случаях проводятся исследования по биоэквивалентности дженериков. Исследования биоэквивалентности позволяют сделать обоснованные заключения о качестве сравниваемых препаратов по значительно меньшему объему первичной информации и в более сжатые сроки, чем при проведении полномасштабных клинических испытаний (от момента постановки задачи, составления программы исследования по биоэквивалентности

до получения окончательных результатов, оформленных в виде отчета установленной формы, проходит примерно месяц). Стоимость подобных исследований хотя и довольно высока, но не идет ни в какое сравнение со стоимостью проведения полномасштабных клинических испытаний. Финансирование таких исследований осуществляет, как правило, либо фирма-изготовитель препарата, либо компания, решившая зарегистрировать данный препарат с целью дальнейшей продажи.

Что такое биоэквивалентность? Прежде, чем рассматривать последовательность проведения подобных исследований, необходимо определиться с некоторыми основными вопросами употребляемой терминологии. Что такое биоэквивалентность лекарств? Какие основные параметры препаратов сравниваются? На основании каких математических и статистических выводов принимается решение о биоэквивалентности препаратов? Кто участвует в проведении подобных исследований? Кто является объектом подобных исследований? Какие основные документы необходимы для проведения таких исследований? Какие методы применяются в данных исследованиях? Наконец, кто проводит такие исследования?

Эквивалентность лекарственных препаратов можно рассматривать с различных точек зрения. Считается, что лекарство терапевтически эквивалентно другому лекарству, если оно содержит ту же активную субстанцию и, будучи введено тем же субъектам, показывает одинаковую эффективность и токсичность, что и продукт, эффективность и токсичность которого были ранее установлены. Лекарственные продукты являются фармацевтическими эквивалентами, если они содержат одинаковое количество одной и той же активной субстанции в тех же дозировках. Фармацевтическая эквивалентность необязательно подразумевает биоэквивалентность, так как различия в сопутствующих веществах или технологии производства могут привести, например, к значительно более быстрому всасыванию или элиминации активного вещества. Иногда путают понятия биоэквивалентность и биодоступность, поэтому имеет смысл определиться в этих терминах. Два лекарственных вещества считаются биоэквивалентными, если различия в их биодоступности после введения в одной и той же молярной дозе не превышают заранее установленные пределы. Под биодоступностью понимается степень и скорость поступления активной субстанции из лекарственной формы в системный кровоток.

Как проводятся исследования по биоэквивалентности. Комиссией по клинической фармакологии и этическим аспектам Фармакологического Государственного Комитета России разработаны методические указания по проведению качественных клинических исследований по биоэквивалентности лекарств, основные положения которых, мы хотели бы привести в данной работе.

После того, как фирма — производитель изъявила желание зарегистрировать лекарственный препарат Фармакологический государственный комитет (ФГК) Минздрава России принимает решение о необходимости проведения исследований по биоэквивалентности представленного препарата в сравнении с уже зарегистрированным и хорошо известным препаратом в одной и той же дозе на здоровых добровольцах или, в некоторых случаях, больных, которым показано исследуемое ЛС (онкологические, ВИЧ инфицированные, наркоманы и т.п.). Заказчик обеспечивает финансирование проводимого исследования (оплата добровольцев, исследователей, страхового полиса).

Такие исследования проводятся в лицензированных фармакокинетических лабораториях или центрах, технически серьезно оснащенных и обладающих хорошо подготовленным научным персоналом, владеющим современными методами анализа лекарств в биологических объектах, в лечебных учреждениях наделенных лицензией на работу со здоровыми добровольцами. Как правило, исследование проводится на 12 здоровых добровольцах. В случаях, когда получаемые фармакокинетические параметры имеют большой межиндивидуальный разброс, количество добровольцев может быть увеличено до 18 или 24 человек. В качестве здоровых добровольцев могут привлекаться лица обоего пола в возрасте от 18 до 55 лет. Масса тела добровольцев не должна отклоняться более чем на 20% от идеальной массы тела для данного пола, возраста и роста. Запрещено проведение исследований биоэквивалентности у несовершеннолетних, беременных и кормящих женщин, у лиц, страдающих хроническими заболеваниями сердечно-сосудистой и нейроэндокринной системы, печени, почек, у лиц, страдающих аллергическими заболеваниями, наркоманией, алкоголизмом (кроме тех случаев, когда исследуемый препарат показан именно данной группе больных).

Что должны знать добровольцы? Каждый доброволец должен знать цель проведения исследований, их длительность, к какой фармакологической группе относится препарат, пути введения препарата и дозу, механизм его действия, показания к применению, возможные нежелательные эффекты, условия отбора и количество отбираемой крови, ограничение в диете во время исследований, условия страхования. Информация, полученная каждым добровольцем в ходе исследования, не должна быть предана огласке. Все это формулируется в информированном согласии, которое подписывает доброволец. Далее на каждого добровольца заводится индивидуальная карта, где указывается все его паспортные данные, номера телефонов, медицинский анамнез. Перед проведением исследования проводится диспансеризация добровольцев, в ходе которой проводятся: врачебный осмотр, клинический анализ крови и мочи, биохимический анализ крови, анализ крови на ВИЧ, сифилис, вирусный гепатит, для женщин — тест на беременность. Клинический блок,

где проводятся подобные исследования, должен включать палаты для проживания добровольцев, процедурную, столовую, комнату отдыха, душевую и туалет. В ходе исследования добровольцы должны получать стандартное, доброкачественное, сбалансированное питание, в котором исключена жирная и жареная пища и напитки, содержащие кофеин. Каждый доброволец перед проведением исследования должен быть застрахован. Страхование производится любой уполномоченной страховой компанией, имеющей соответствующую лицензию. В страховом полюсе должны быть оговорены практически все возможные нежелательные последствия, которые могут возникнуть при проведении подобных исследований. Стоимость страхового полюса и страхового вознаграждения в страховом случае заранее согласовывается между страховой компанией, фирмой-спонсором и добровольцем. Страховой полюс оплачивается фирмой-спонсором, или заказчиком проведения подобного исследования до начала исследования.

Кто проводит исследования по биоэквивалентности? Исследователь должен иметь определенную теоретическую и практическую подготовку, достаточный опыт работы для четкого выполнения своих обязанностей по правильному проведению исследования. Желательно, чтобы он имел сертификат об окончании специальных курсов. Исследователь должен быть хорошо знаком со всеми информационными материалами по исследуемому ЛС. В бригаду исследователей включают врачей-клиницистов и медицинских сестер, контролирующих состояние здоровья добровольцев, соблюдение режима, установку катетеров, отбор образцов крови и ее предварительную обработку, химика-аналитика и лаборантов, осуществляющих разработку и проведение анализа образцов крови на содержание препарата, специалиста — фармакокинетику, производящего расчет фармакокинетических параметров и составляющего окончательный отчет о проведенном исследовании, математика, который проводит статистическую обработку полученных данных. Медицинское обслуживание исследуемых добровольцев проводится врачом-исследователем, который отвечает за все медицинские вопросы, возникающие в плановом или экстренном порядке у исследуемого (добровольца) в течение всего периода исследования. Во время исследования врач-исследователь следит за тем, чтобы испытуемому оказывалась необходимая диагностическая и лечебная помощь в случае развития любых нежелательных явлений.

Врач-исследователь обязан соблюдать все права испытуемого, который принимает участие в проводимом исследовании. Наличие блока интенсивной терапии является обязательным требованием к проведению исследований биоэквивалентности на добровольцах.

Как проводятся исследования по биоэквивалентности? Исследования биоэквивалентности проводятся в соответствии с программой, которая представляется в

комиссию по клинической фармакологии и этическим аспектам ФГК. После одобрения комиссией программа утверждается ФГК. В программе должны быть отражены место проведения испытаний, сведения об исследуемых препаратах, сведения об испытуемых, их число, план рандомизации, дозы и режимы дозирования препаратов, биоматериал, в котором предполагается определять концентрацию, схему отбора проб, сведения об аналитическом методе, основные фармакокинетические параметры, методы расчета фармакокинетических параметров и статистической обработки полученных данных. Исследование по биоэквивалентности дженерика и препарата сравнения проводится в одинаковых дозировках. Если для регистрации заявлено несколько лекарственных форм одного препарата, исследование биоэквивалентности проводится для каждой заявленной формы.

Интервал времени между приемом исследуемого препарата и препарата сравнения (период «отмывки») зависит от длительности циркуляции лекарственного вещества в организме, определяется периодом полувыведения ($T_{1/2}$), и должен составлять не менее $6 T_{1/2}$. Биологическим материалом, используемым для определения концентрации ЛВ, может быть плазма, сыворотка или цельная кровь. Кровь забирается из локтевой (обычно) вены через кубитальный катетер. Пробирки для отбора проб должны иметь соответствующую маркировку с указанием шифра испытуемого, номера пробы и название препарата. Периодичность отбора проб у испытуемого определяется формой кривой «концентрация ЛВ — время» препарата сравнения. Временной отбор проб должен обеспечивать получение нескольких точек для каждого фрагмента фармакокинетической кривой — не менее 3 — для фазы первоначального возрастания концентрации, 4–5 точек на максимуме всасывания и не менее 3-х на фазе ее снижения.

Общая продолжительность наблюдения за концентрацией лекарственного средства в системном кровотоке при однократном его приеме должна составлять не менее 4-х периодов полувыведения изучаемого лекарственного вещества.

Длительность наблюдения считается приемлемой, если для усредненного фармакокинетического профиля величина площади под кривой «концентрация — время» в пределах от нуля до момента отбора последней пробы составляет не менее 80% от площади в пределах от нуля до бесконечности.

При высокой степени пресистемной элиминации лекарственного средства, либо если оно не обнаруживается в крови, целесообразно определить концентрацию основного метаболита. При изучении биоэквивалентности лекарственного средства, являющегося пролекарством, необходимо определять только концентрацию активного метаболита.

Методы определения лекарств в биологических объектах. Современное состояние уровня фармакокинетических исследований во многом основывается на

применении самых совершенных методов определения концентраций лекарственных препаратов в биологическом объектах. Правильный выбор метода определения концентрации во многом определяет успешное решение всей задачи исследования. Для определения концентрации ЛВ в плазме, сыворотке или цельной крови могут быть использованы различные физико-химические, иммунологические, микробиологические и др. методы, отвечающие современным требованиям: избирательность, высокая чувствительность, точность, воспроизводимость. Целесообразно использовать те методы определения концентрации лекарственных средств, которые были применены создателями при описании кинетических параметров оригинального лекарственного средства и опубликованы в соответствующей литературе. Если предлагается другая методика, необходимо обосновать ее применение и представить метрологические характеристики.

Существует большое число самых разнообразных методов определения концентрации ЛВ в биологических объектах: микробиологические, спектрофотометрические, поляриметрические, иммунологические (радиоиммунные, иммуноэнзимные и др.), радиоизотопные, хроматографические и т.п. методы, основанные на различных физико-химических свойствах исследуемых веществ. Все названные методы достаточно хорошо описаны в мировой литературе и широко применяются при проведении фармакокинетических исследований. Безусловно, каждый метод определения концентрации обладает определенными достоинствами и недостатками. По требованиям, предъявляемым к определению концентрации ЛВ, можно выделить несколько наиболее распространенных методов.

Первенство здесь занимают различные иммунологические методы, к безусловным достоинствам которых можно отнести еще и относительную простоту проведения непосредственных измерений. Данные методы основаны на взаимодействии специфических белковых антител (антисывороток) с анализируемым веществом, выступающего в роли антигена. Чем больше концентрация вещества-антигена, тем больше образуется комплекса антиген-антитело. Для количественного анализа процесса этого комплексобразования применяют два подхода: с предварительным отделением комплекса (гетерогенные методы) или без его отделения (гомогенные методы). В том и другом случае необходимо определить, сколько вещества-антигена оказалось связанным с антителом. Для этого используют общий принцип. Пробу биологической жидкости с неизвестной концентрацией анализируемого вещества добавляют к сыворотке, в которой белок-антитело связан в комплекс с тем же веществом (чаще с его модификацией), но так или иначе меченным. Вещество из анализируемой пробы вытесняет из комплекса меченый аналог тем больше, чем выше концентрация вещества в пробе. Определив, сколько меченого аналога оказалось вытеснено, можно рассчитать искомый уро-

вень вещества в пробе. Иммунологические методы различаются по видам метки в меченом аналоге анализируемого вещества: радиоактивная метка, свободно-радикальная метка, флюоресцентная метка, энзимная и т.д. Явными преимуществами иммунологических методов является высокая чувствительность определения (10^{-11} г), хорошая селективность, простота проведения анализа, относительно малый объем образца крови для проведения анализа (50–100 мкл), экспрессность. Особенно важно отметить применение таких методов при определении малых количеств вещества. Так, например, при исследовании биоэквивалентности такого широко применяемого препарата как эналаприл возможно применение только двух способов анализа — радиоиммунного и хромато-масс-спектрометрического, так как максимальная концентрация препарата в крови даже после приема внутрь 20 мг составляет всего несколько десятков пикограмм на мл крови. К недостаткам этих методов можно отнести следующее: относительно высокую стоимость определения, необходимость специфического оборудования и, главное, далеко не для всех лекарств существуют соответствующие наборы реактивов.

Для исследования концентрации лекарств применяются различные микробиологические методы анализа. В первую очередь такие методы применяются при исследовании ЛВ, обладающих антибактериальной или противогрибковой активностью. Микробиологические методы основаны на способности антибактериальных препаратов вызывать гибель микроорганизмов или задерживать их рост. Обычно используют три микробиологических метода: метод диффузии в агар, метод серийных разведений и турбидиметрический метод. Метод диффузии в агар является наиболее широко применяемым методом для определения антибиотиков. Этот метод основан на сравнении интенсивности подавления роста тест-микроба препаратом в исследуемой биологической жидкости при известной концентрации препарата. В основу метода положена способность ряда антибактериальных препаратов диффундировать в агаровую среду и образовывать зоны, в которых не растут микроорганизмы. Скорость и величина диффузии препаратов в агаровую среду зависит от многих факторов (состав и pH среды, природа исследуемого лекарства, времени и температуры инкубации и др.), в связи с чем для каждого препарата подбирают наиболее оптимальные условия для максимальной диффузии препарата в агаровую среду. Исследование активности антибиотиков проводят в чашках Петри, в которые разливают растопленную на водяной бане агаризированную питательную среду с внесенным в нее тест-микробом. Растворы стандарта вносят с помощью капельницы в полые цилиндры, расставленные на поверхности агаризированной среды, или вырезанные в толще среды лунки. Применяют также диски из фильтровальной бумаги, которые пропитаны раствором препарата и испытуемой жидкости и помещают на

поверхность агара. После 16-18-часовой инкубации при 37°C измеряют зоны задержки роста тест-микроба с помощью циркуля, миллиметровой линейки или с помощью специальных приборов. Метод диффузии в агар отличается простотой выполнения, достаточной чувствительностью. К недостаткам метода можно отнести длительность проведения и сравнительно малую точность определения. Такими же достоинствами и недостатками отличаются и другие микробиологические методы. Так метод серийных разведений наряду с достаточно высокой чувствительностью также имеет большую длительность проведения эксперимента, а, кроме того, наличие в сыворотке веществ, задерживающих рост микроорганизмов, может исказить результаты анализа. Помимо сказанного, подобные методы не позволяют определять концентрацию метаболитов.

Метод хромато-масс-спектрометрии для фармакокинетических исследований является одним из самых избирательных и чувствительных. Однако этот метод является одним из самых дорогих по стоимости оборудования. Данный метод совмещает газовую или жидкостную хроматографию и масс-спектрометрию, которая используется для детектирования веществ, выходящих из хроматографической колонки. Масс-спектрометрия — это метод исследования веществ, подвергнутых ионизации, с последующим разделением образовавшихся ионов по их массам и регистрацией количества ионов каждой массы. Для ионизации молекул используются различные способы: электронный удар, фотоионизация, химическая ионизация и др. Образовавшиеся из исследуемых молекул ионы разделяются по массам в магнитном поле при сканировании его напряженности. Ионы различной массы регистрируются по отдельности и интенсивность сигнала, соответствующего данной массе, пропорциональна количеству ионов с этой массой. Масс-спектр, таким образом, представляет собой группу полос, каждая из которых соответствует массе каждого из образовавшихся ионов, а высота полосы соответствует количеству ионов данной массы. В современных ГХ/МС — системах можно одновременно детектировать несколько характерных фрагментов анализируемых соединений. Таким образом, масс-фрагментография является высокоизбирательным и высокочувствительным методом анализа — его чувствительность достигает 10^{-12} г вещества в образце, вводимым в систему.

В настоящее время наибольшее распространение получили хроматографические методы определения концентрации ЛП и, безусловно, наиболее применимым в таких исследованиях является метод высокоэффективной жидкостной хроматографии — ВЭЖХ. Причины этого заложены в высокой чувствительности, селективности и относительной простотой применения, наличия приборов последних поколений, обладающих высокой чувствительностью, полностью автоматизированных, управляемых современными компьютерными программами. Принципы, заложенные в основу

хроматографического анализа в 1903 г. М.С. Цветом практически не претерпели особых изменений. В основе метода лежит различная сорбционная способность каждого химического вещества на том или ином сорбенте (веществе с большой адсорбционной емкостью). Продвигаемая носителем (элюентом) вдоль слоя сорбента смесь веществ из-за разной величины адсорбционных свойств в одних и тех же условиях подвергается разделению (подобно разделению по температурам кипения, которое происходит при перегонке). При этом сорбент может быть в виде тонкого слоя на пластинке, а элюент продвигаться вдоль пластинки за счет капиллярных сил. В этом случае мы имеем дело с тонкослойной хроматографией (ТСХ). Сорбент может быть упакован в достаточно тонкую стеклянную или металлическую трубку (колонку), а анализируемая смесь — продвигаться вдоль колонки потоком инертного газа (газ-носитель) с определенной скоростью и тогда метод будет называться газовой хроматографией. В некоторых случаях колонка представляет из себя очень длинный (до 100 и более метров) капилляр диаметром 0,25 мм изготовленный из стекла или металла, на стенки которого нанесен очень тонкий, почти мономолекулярный слой высококипящей неподвижной фазы. Такие хроматографические колонки обладают очень высокой эффективностью, а метод с их использованием называется капиллярной газовой хроматографией. Если в качестве элюента выбран какой-либо растворитель с малой вязкостью или смесь растворителей, продвигающихся вдоль колонки с помощью насоса высокого давления, тогда метод будет называться методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). После проведения хроматографического разделения необходимо обработать полученные данные, определить, что мы получили в результате анализа и в каком количестве, т.е. провести качественный и количественный анализ. Такой анализ проводится с помощью приборов, называемых детекторами, а запись полученного сигнала осуществляется в виде цифровой или аналоговой форме либо с помощью компьютера, либо самописцев. В конечном результате мы получаем хроматограмму — картину разделения, где каждому разделенному веществу соответствует индивидуальный пик.

За последние два десятилетия опубликовано множество монографий, руководств и статей, посвященных теории и практике этого метода анализа. Это объясняется большими преимуществами метода ВЭЖХ по сравнению с другими методами анализа:

При использовании метода ВЭЖХ отсутствуют ограничения по термоустойчивости анализируемых образцов, присущих таким методам как ГЖХ, ГХ-МС.

Применение данного метода позволяет работать с водными растворами, что существенно сокращает общее время анализа и упрощает процесс подготовки биологических проб.

В большинстве случаев отпадает необходимость

проведения дериватизации анализируемого вещества.

Практически все известные детектирующие системы неdestructивны, что позволяет работать в микро-репаративном режиме, а это особенно важно при изучении метаболизма лекарственных средств.

Хроматографические колонки, применяемые в настоящее время, обладают хорошей эффективностью, не уступающей колонкам, используемым в газовой хроматографии.

Детектирующая аппаратура по чувствительности определения во многих случаях приближается к таким сверхчувствительным приборам, как хромато-масс-спектрометр.

Наибольшее распространение при проведении фармакокинетических исследований получили такие варианты применения ВЭЖХ как обратно-фазная, ион-парная хроматография. Данные варианты ВЭЖХ обладают несомненными преимуществами перед другими классическими вариантами жидкостной хроматографии. К ним относятся большая универсальность метода в отношении очень большого числа ЛВ, возможность анализировать непосредственно водные биологические методы или свести процесс подготовки проб к простому осаждению белков. При применении обратно-фазной ВЭЖХ исследователь получает высокую воспроизводимость метода.

ВЭЖХ — достаточно универсальный метод анализа (практически 80-90% всех применяемых в настоящее время лекарств можно определять с помощью этого метода).

От того, каким методом предстоит воспользоваться, зависит многое, например, способ подготовки биологических проб. Анализ лекарственных препаратов в цельной крови не всегда дает необходимый результат, так как для многих препаратов отмечено накопление их в форменных элементах, а использование суммарной концентрации препарата в крови может дать искаженные в конечном итоге результаты. Известно, что у взрослого человека объем жидкой части крови без форменных элементов (плазмы) составляет примерно 3 л. После отделения фибриногена — белка, ответственного за свертывание крови и некоторых других белков, образующих форменные элементы, остается сыворотка крови, которая отличается от плазмы только отсутствием фибриногена. В сыворотке крови помимо минеральных солей, белков, липидов находится много эндогенных низкомолекулярных соединений, которые могут мешать проведению анализа: гормоны, кортикостероиды, биогенные амины, креатинин, мочевиная кислота и др. Многие лекарства связываются с белками сыворотки крови (например, хинидин — более чем на 90%), однако, следует иметь в виду, что основные фармакокинетические процессы определяются свободной (несвязанной) фракцией препарата в крови. Это особенно важно при проведении анализов, дающих результаты по суммарной концентрации препарата. При подготовке пробы для последующего анализа

очень важно стандартизировать все проводимые операции. Только при соблюдении этого условия можно получить воспроизводимые результаты.

В основном процесс подготовки проб для анализа сводится к следующим процедурам:

Получение сыворотки крови.

Извлечению препарата в удобной для анализа форме (одно- или многократная экстракция препарата с помощью различных экстрагентов, твердофазная экстракция или простое осаждение белков тем или иным реактивом). В последнем случае необходимо помнить, что при осаждении белков сыворотки крови происходит разбавление образца, что влияет на чувствительность выбранного метода анализа.

Сохранение образца в виде сывороточных экстрактов, упаренных образцов после экстракции, надосадочной жидкости или супернатанта после осаждения или просто сыворотки крови.

Следует помнить, что при проведении фармакокинетических исследований некоторые препараты могут довольно быстро подвергаться биотрансформации (окислению, гидролизу и т.п.) Исходя из этого, каждый исследователь определяет минимальные и максимальные сроки проведения анализа, которые указываются в программе исследования. Особенно отмечаются сроки и температура хранения образцов до анализа. В процессе разработки аналитического метода следует рассмотреть и по возможности исключить (или стандартизировать) все возможные варианты потерь вещества при проведении основных и вспомогательных операций, чтобы избежать ошибок в анализе.

Очень часто выбор метода анализа лекарственного препарата зависит от наличия той или иной аппаратуры в распоряжении исследователя. Требования, предъявляемые к выбираемому методу анализа можно сформулировать следующим образом: метод анализа должен быть чувствительным для получения надежных результатов, воспроизводимым, дешевым и достаточно экспрессным. Процесс подготовки проб для анализа не должен занимать много времени и должен быть относительно простым и воспроизводимым. Метод анализа должен обладать большой производительностью, так как в большинстве случаев идет речь о проведении сотен единичных анализов за короткое время. Определившись с вышеуказанными требованиями, исследователь, исходя из химической структуры, выбирает оптимальный вариант. Например, анализируемое вещество интенсивно поглощает ультрафиолетовый свет на длине волны 272 нм, обладает молекулярным весом от 120 до 350, имеет нейтральную реакцию и водорастворимо. В таком случае вполне подходит вариант обратно-фазной ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектором, настроенным на длину волны поглощения 272 нм, с предварительным осаждением белков сыворотки крови метиловым спиртом, взятом в соотношении 3:1 и последующим анализом надосадочной жидкости на обратно-фазной хроматографической колонке при со-

ответственно выбранных условиях хроматографирования. Однако, всегда следует помнить, что стоимость аппаратуры, расходных материалов довольно высока (например, стоимость хроматографической колонки может достигать несколько сотен долларов). Поэтому необходимо предусматривать дополнительные защитные меры для продления срока эксплуатации колонок. К таким мерам относятся установка дополнительных металлокерамических фильтров, предколонок, использования в качестве элюентов нейтральных или слабых кислотных растворов (щелочная среда способствует быстрому гидролизу связей химически «пришитых» на поверхность сорбента на подвижных фаз и тем самым — быстрому выходу из строя хроматографической колонки). Подобные защитные меры приводят к некоторому ухудшению качества разделения, снижают эффективность работы колонки, что необходимо учитывать при разработке метода анализа.

Значительно более качественные результаты можно получить при применении различных экстракционных процедур. В некоторых случаях возможно применять твердофазную экстракцию. В настоящее время выпускается довольно большой спектр так называемых экстракционных патронов или картриджей для проведения подобных процедур, которые сводятся в таких случаях к посадке анализируемого раствора на патрон и смыванию активного вещества точным объемом заранее подобранного растворителя. При этом большинство эндогенных веществ, которые могли бы помешать хроматографическому разделению остается на сорбционном слое патрона. Вполне сохраняют свою актуальность и традиционные экстракционные процедуры, сводящиеся к подбору экстрагента, встряхивания на различных типах миксерах, разделению фаз с помощью центрифугирования, отбору аликвоты органического слоя, упариванию досуха в токе инертного газа при относительно невысокой температуре, смыву сухого остатка в ограниченном количестве подходящего растворителя и вводу полученного раствора в хроматографическую колонку. При таком подходе практически исключается попадание в колонку остаточных белков, прочих механических примесей и обеспечивается дополнительная очистка исследуемого препарата. Однако, возникает возможность образования дополнительных потерь анализируемого вещества, трудно поддающихся учету. Существенно сократить потери можно, если применять концентрирующую реэкстракцию. При этом содержащееся в экстрагенте вещество прямо без потерь переводится в водную фазу и после разделения фаз непосредственно отбирается микрошприцом и вводится в колонку. Нами подобный метод был разработан при анализе теофиллина. Примерно такие же процедуры подготовки проб проводятся если был избран газ-хроматографический или масс-спектрометрический методы анализа. Единственным отличием здесь является то, что в этих случаях нельзя применять водосодержащие и некоторые другие растворители на пос-

ледней стадии.

Принятые обозначения. При проведении исследований биозквивалентности обычно употребляются следующие обозначения:

- C — концентрация лекарственного вещества;
- $C_{\max}$ — максимальная концентрация лекарственного вещества;
- $C_{\min}$ — минимальная концентрация лекарственного вещества;
- C_{ss} — концентрация лекарственного вещества при равновесных условиях;
- C_t — концентрация лекарственного вещества в последней пробе;
- $T_{\max}$ — время достижения максимальной концентрации лекарственного вещества;
- t — длительность наблюдения за концентрацией лекарственного вещества;
- $T_{1/2}$ — время полувыведения лекарственного вещества;
- k_{el} — константа скорости элиминации лекарственного вещества;
- τ — интервал дозирования при многократном приеме (введении) лекарственного средства;
- AUC — площадь под кривой «концентрация лекарственного вещества — время»;
- AUC_{0-t} — площадь под кривой «концентрация лекарственного вещества — время» в интервале времени от 0 до времени последнего забора пробы;
- $AUC_{0-\infty}$ — площадь под кривой «концентрация лекарственного вещества — время» в интервале времени от 0 до бесконечности;
- MRT — среднее время удержания препарата в организме;
- T — исследуемый препарат (тест-препарат);
- R — препарат сравнения (референс-препарат);
- f — относительная степень всасывания (относительная биодоступность) лекарственного вещества, определяемая отношением $AUC_{\infty T}/AUC_{\infty R}$ в случае однократного введения препаратов или отношением $AUC_{t,T}/AUC_{t,R}$ в случае многократного введения;
- f — относительная степень всасывания ЛС, определяемая отношением $AUC_{t,T}/AUC_{t,R}$;
- f' — отношение $C_{\max,T}/C_{\max,R}$;
- CV_{res} — внутригрупповой коэффициент вариации;
- σ^2 — внутригрупповая (остаточная) дисперсия.

Оценка биодоступности лекарственного вещества или его основного биологически активного метаболита (если изученные препараты представляют собой пролекарства) основывается на сравнении значений фармакокинетических параметров, полученных в результате анализа кривых «концентрация (C) — время (t)» для исследуемого препарата и препарата сравнения. Значения параметров $C_{\max}$ и $T_{\max}$ обычно оцениваются внесистемными методами (наибольшее из измеренных значений концентрации соответствует $C_{\max}$ и соответствующее время наблюдаемого макси-

муна — $T_{\max}$). Величину AUC_{0-t} рассчитывают при помощи метода обычных или логарифмических трапеций. Значения $AUC_{0-\infty}$ определяют по формуле: $AUC_{0-\infty} = AUC_{0-t} + AUC_{t-\infty}$, при этом $AUC_{t-\infty} = C_t / K_{el}$, где C_t и K_{el} — значения концентрации лекарственного вещества в последней пробе и константы скорости элиминации, соответственно. Для вычисления последней конечный (моноэкспоненциальный) участок фармакокинетической кривой описывают с помощью нелинейного регрессионного анализа или уравнением прямой линии в координатах $\ln C - t$, используя метод линейной регрессии. При достаточной длительности наблюдения, когда $AUC_{0-t} > 80\% AUC_{0-\infty}$, для оценки полноты всасывания исследуемого препарата следует использовать значения AUC_{0-t} , а при условии, что $AUC_{0-t} < 80\% AUC_{0-\infty}$ — значения $AUC_{0-\infty}$. Последующий анализ фармакокинетических данных предусматривает вычисление индивидуальных значений AUC_{0-t} или $AUC_{0-\infty}$ (оценку отношений AUC , оценку средней относительной степени всасывания в процентах $f = AUC_{0-t,T} / AUC_{0-t,R}$ или $AUC_{0-\infty,T} / AUC_{0-\infty,R}$) и индивидуальных значений отношений $C_{\max}$, оценку среднего отношения $f^* = C_{\max,T} / C_{\max,R}$. Биоэквивалентность проверяется по AUC_{0-t} или $AUC_{0-\infty}$, а также $C_{\max}$ — для любых лекарственных форм, параметрам $C_{\max} / AUC_{0-t}$ или $C_{\max} / AUC_{0-\infty}$ — для обычных форм, и параметру $(C_{\max} - C_{\min}) / C_{ss}$ — для форм пролонгированного действия (интегральная средняя концентрация $C_{ss} = AUC_{0-\tau} / \tau$, где τ — период наблюдения).

Роль математической статистики. Законы статистики играют большую роль в проведении любых клинических исследований. Особенно эти законы должны соблюдаться при проведении исследований биоэквивалентности лекарств. Это касается буквально любого вышерассмотренного раздела. Так, например, большую роль играет статистика при обосновании количества испытуемых добровольцев. Наш опыт проведения подобных исследований позволяет это утверждать. Несколько лет назад, когда регламент проведения исследований по биоэквивалентности лекарств не был окончательно разработан в нашей стране, мы проводили исследования ципрофлоксацина, производившегося одной зарубежной фирмой. Проведенное на 6 добровольцах исследование показало, что исследуемый препарат по основным фармакокинетическим показателям хорошо согласуется с препаратом сравнения. Однако значительный межиндивидуальный разброс полученных данных не позволил статистически достоверно утверждать, что представленные лекарственные формы биоэквивалентны. Поэтому по решению ФГК нам пришлось провести дополнительное исследование еще на 6 добровольцах.

Более подробно применяемые статистические методы обсуждаются в статье Бондаревой И.Б. «Статистический анализ данных исследований биоэквивалентности лекарственных средств».

Как выглядит окончательный отчет? После окончания исследования составляется окончательный отчет, где должны быть представлены:

- программа проведения испытаний, утвержденная Фармакологическим государственным комитетом;
- демографические и антропометрические (и клинические, если испытания проведены у больных) данные об испытуемых;
- номера серий и названия фирм-изготовителей изученных препаратов — генерического и препарата сравнения, данные о сроке их годности;
- способ введения и дозы препаратов;
- план рандомизации;
- методика отбора биоматериала и его предварительной обработки, условия хранения проб;
- описание аналитического метода, включающее метрологические характеристики и демонстрационные хроматограммы, если использованы хроматографические методы;
- описание процедур фармакокинетического анализа и оценки биоэквивалентности с указанием использованных программных средств;
- результаты определения содержания лекарственного вещества в биопробах, соответствующие средние значения и величины стандартных отклонений;
- индивидуальные фармакокинетические профили и карты добровольцев;
- усредненные фармакокинетические профили;
- индивидуальные значения параметров фармакокинетики, соответствующие средние значения и величины стандартных отклонений;
- результаты дисперсионного анализа параметров фармакокинетики, используемых для оценки биоэквивалентности;
- при проведении исследования на пациентах, указывается пол, возраст, жалобы, анамнез заболевания, диагноз, характер поражения внутренних органов и их функциональное состояние на момент включения их в группу исследуемых.

Контроль за проведением исследований биоэквивалентности лекарств. При проведении исследований по биоэквивалентности допускается проведение инспектирования данных исследований. Целью инспектирования исследований по биоэквивалентности является защита прав добровольцев и обеспечение качества проводимого исследования в соответствии с утвержденным протоколом. В связи с этим, инспектор осуществляет контроль:

- качества проводимых методов исследования;
- регистрации всех необходимых показателей (в соответствии с протоколом);
- объективного ведения документации;
- за характером, тяжестью и частотой развития побочных эффектов;
- за своевременностью, качеством оказания меди-

цинской помощи, направленной на купирование побочных реакций.

Проведение инспектирования исследования по биоэквивалентности осуществляют эксперты комиссии по клинической фармакологии НЦ ЭГКЛС МЗ РФ. При выявлении серьезных нарушений Инспектор имеет право поставить вопрос перед ФГК МЗ РФ о приостановлении или прекращении действия выданной лицензии на проведение исследований по биоэквивалентности. Справедливости ради надо отметить, что в случае если на заседание комиссии предоставляются неполные или недостоверные данные о проведении исследований биоэквивалентности, проведенные не только у нас, но и в другой стране, комиссия вправе поставить вопрос о проведении повторных исследований.

Результаты оценки биоэквивалентности препаратов рассматриваются экспертами Комиссии по клинической фармакологии НЦ ЭГКЛС МЗ РФ. Соответствующее заключение затем выносится на согласование ФГК МЗ РФ и утверждается в Департаменте МЗ РФ.

Заключение. Итак, исследования биоэквивалентности очередного дженерика проведены. Отчет о проведенном испытании успешно прошел все необходимые формальности. Лекарство оказалось на прилавках аптек. Фирма-производитель своевременно провела рекламную кампанию, большое количество ознакомительных семинаров, на которых выступили известные специалисты. Что же дальше? Врачи и фармацевты не только в регионах, но и работающие в столичных по-

ликлиниках и аптеках по-прежнему не имеет никакой документированной информации о предлагаемых препаратах. Было бы очень хорошо, если бы в нашем отечестве выпускалась соответствующая справочная литература, в которой бы описывались если не все результаты проведенного исследования, то хотя бы основные фармакокинетические параметры предлагаемого лекарственного средства, как это делается во многих развитых странах. Причем совсем было бы хорошо, если бы эти данные давались в сравнении с аналогичными данными уже известных препаратов. Тогда бы каждый врач выписывал бы тот или иной препарат основываясь на фармакокинетическом и фармакоэкономическом подходе. Кроме этого вполне возможно, что в этом случае не было бы необходимости регистрировать под ряд десятки препаратов с почти одинаковыми свойствами, а достаточно было бы ограничиться тремя лучшими по фармакокинетическим и фармакоэкономическим параметрам лекарствами. Конкурентная борьба между фирмами, выпускающими дженерики увеличилась бы, а значит выиграл бы наш отечественный потребитель. Поскольку таких изданий в настоящее время не выпускается и в ближайшем обозримом будущем не предвидится, то при появлении представителя фирмы, выпускающей дженерик, фармацевт или врач должен и обязан проверить соответствуют ли предлагаемые к реализации препараты действующему в России законодательству, прошел ли данный препарат регистрацию в ФГК, проводились ли соответствующие испытания и есть ли в наличии отчетная документация по этим испытаниям.