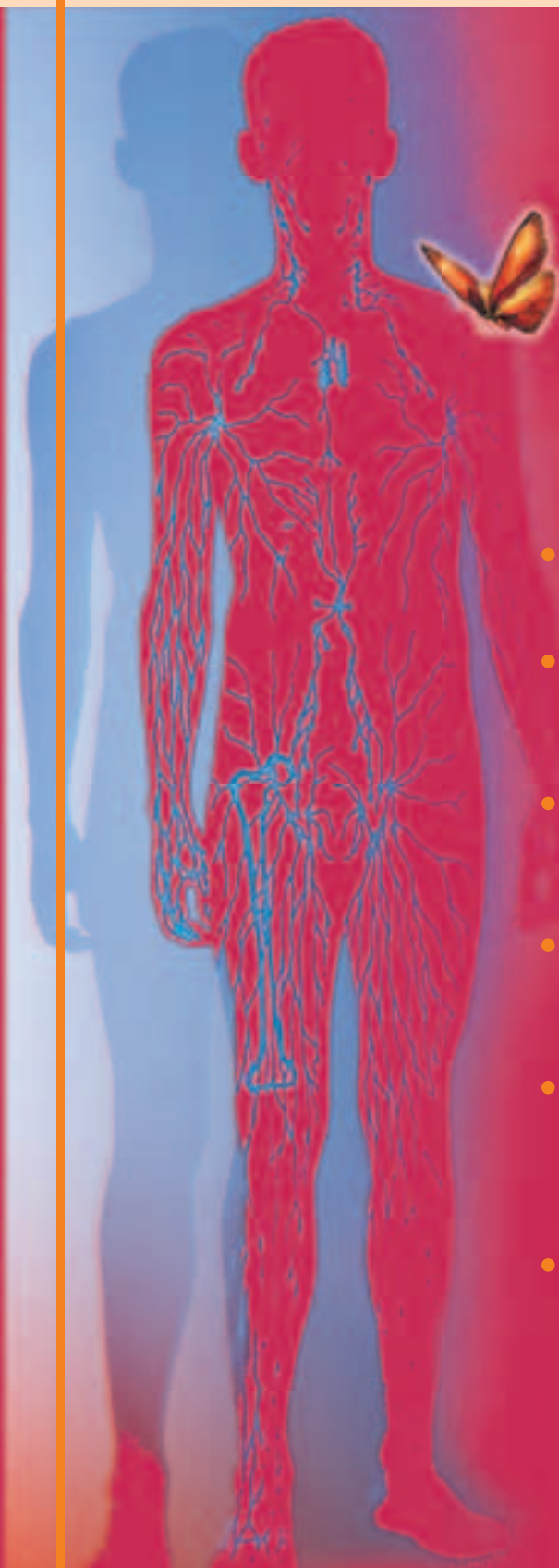


ФАРМАКОКИНЕТИКА И ДИНАМИКА



- Особенности фармакокинетики антисмысловых олигонуклеотидных препаратов _____ 3
- Исследования биозквивалентности таблетированных форм рисперидона, оланзапина и кветиапина у здоровых добровольцев _____ 14
- ВЭЖХ определение, фармакокинетика и относительная биодоступность левофлоксацина производства ООО «ОЗОН», Россия _____ 23
- Биозквивалентность биспролола, таблетки покрытые оболочкой 10 мг АО «Химфарм», Республики Казахстан _____ 27
- Изучение фармакокинетики трёх лекарственных форм препарата для регенеративной генной терапии повреждений поверхностных тканей человека различной этиологии _____ 35
- Экскреция соединения VMA-99-82 — нового производного аденина, обладающего противовирусной активностью _____ 40

№1. 2013

ФАРМАКОКИНЕТИКА И ФАРМАКОДИНАМИКА

№1
2013



Главный редактор Жердев Владимир Павлович

д.м.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, Москва

Зам. главного редактора Фирсов Александр Алексеевич

член-корр. РАМН, д.б.н., профессор, Москва

Ответственный секретарь Литвин Александр Алексеевич

д.б.н., Москва

Редакционная коллегия

Белоліпецкая

Вера Геннадиевна
к.б.н., Москва

Белоусов Юрий Борисович

член-корр. РАМН, д.м.н.,
профессор, Москва

Бондарева

Ирина Борисовна
д.б.н., Москва

Воронина

Татьяна Александровна
заслуженный деятель науки
РФ, д.м.н., профессор, Москва

Ковалёв Георгий Иванович

д.м.н., профессор, Москва

Кулмагамбетов

Ильяс Райханович

д.м.н., профессор, академик
НАН, Казахстан, Алматы

Мирзоян Рубен Симонович

заслуженный деятель науки
РФ, д.м.н., профессор, Москва

Насонов

Александр Сергеевич

к.б.н., Москва

Раменская

Галина Владиславовна

д.ф.н., профессор, Москва

Сариев Абрек Куангалиевич

д.м.н., профессор, Москва

Соколов

Андрей Владимирович

д.б.н., Москва

Спасов

Александр Алексеевич

академик РАМН, д.м.н.,
профессор, Волгоград

Стародубцев

Алексей Константинович

д.м.н., профессор, Москва

Сычёв

Дмитрий Александрович

д.м.н., профессор, Москва

Тюрников

Иван Николаевич

член-корр. РАМН, д.м.н.,

профессор, Волгоград

Чистяков

Виктор Владимирович

д.ф.н., профессор, Москва

Выпускающая группа

Белоусов

Дмитрий Юрьевич

Ответственный за выпуск

журнала,

генеральный директор

ООО «Издательство ОКИ»

+7 (910) 449-22-73

+7 (926) 568-17-35

e-mail: clinvest@mail.ru

сайт: www.izdat-oki.ru

Дизайн, верстка:

Design2pro.ru

Афанасьева

Елена Владимировна

Финансовый директор

ООО «Издательство ОКИ»,

подписка

+7 (916) 986-04-65

e-mail: eva88@list.ru

Подписано в печать 12.10.2013 г.

Типография: Издательское бюро «Филигрань». Тираж 1000 экз.

Адрес редакции: 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

ФГБУ «НИИ фармакологии имени В.В. Зависова» РАМН

Тел./факс: +7 (495) 601-21-57; e-mail: clinvest@mail.ru

Журнал «Фармакокинетика и Фармакодинамика» является приложением к журналу «Качественная клиническая практика». Журнал «Качественная клиническая практика» зарегистрирован Комитетом РФ по печати 28.05.2001 г. Свидетельство о регистрации средства массовой информации ПИ №77-9142. Авторские материалы не обязательно отражают точку зрения редакции. Редакция не несет ответственности за достоверность информации, содержащейся в рекламных материалах.

Сайты

www.PharmacoKinetics.ru

www.ClinVest.ru

www.Clinical-Pharmacy.ru

Журналы

Фармакокинетика и Фармакодинамика

Качественная клиническая практика

Клиническая фармация

WEB-порталы

www.HealthEconomics.ru

www.Market-Access-Solutions.ru

www.Izdat-Oki.ru

Центр фармакоэкономических исследований

Market Access Solutions

Издательство ОКИ

СОДЕРЖАНИЕ

От главного редактора

(Жердев В.П.) 2

Актуальный обзор

Особенности фармакокинетики антисмысловых
олигонуклеотидных препаратов

(Хаитов М.Р., Смирнов В.В.) 3

Исследования биоэквивалентности

Исследования биоэквивалентности таблетированных форм
рисперидона, оланзапина и кветиапина
у здоровых добровольцев

(Писарев В.В., Уляшова М.М., Вдовина К.А., Тусейко Н.И.) 14

ВЭЖХ определение, фармакокинетика и относительная
биодоступность левофлоксацина производства ООО
«ОЗОН», Россия

(Кондратенко С.Н., Стародубцев А.К., Сенник Е.А., Дралова О.В.,
Кудинова С.Н.) 23

Биоэквивалентность бисопролола, таблетки покрытые
оболочкой 10 мг АО «Химфарм», Республики Казахстан

(Будач Я.М., Курилов О.Э., Сариев А.К., Абаимов Д.А.,
Ширяева М.В., Стырова Е.Ю., Алтынбеков С.А.,
Джолдыгулов Г.А., Серяков В.Н., Алтынбеков К.С.) 27

Исследования фармакокинетики

Изучение фармакокинетики трёх лекарственных
форм препарата для регенеративной генной терапии
повреждений поверхностных тканей человека
различной этиологии

(Духовлинов И.В., Аль-Шехадат Р.И., Орлов А.И.) 35

Экскреция соединения VMA-99-82 — нового производного
аденина, обладающего противовирусной активностью

(Смирнова Л.А., Сучков Е.А., Рябуха А.Ф., Кузнецов К.А.,
Озеров А.А., Караваев А.В.) 40

СОДЕРЖАНИЕ



Уважаемые читатели!

Недавно состоялось заседание Круглого стола по поправкам к Федеральному закону «Об обращении лекарственных средств» в части взаимозаменяемости лекарственных препаратов. В заседании принимали участие представители РАМН, МЗ РФ и ФГБУНЦЭСМП МЗ РФ. С сообщениями выступили член-корр. РАМН А.А. Фирсов, проф. В.П. Жердев, член-корр. РАМН Т.А. Гуськова, академик РАН и РАМН С.Б. Середенин и другие. Обсуждались проблемы, связанные с проведением исследований эквивалентности лекарственных препаратов и экспертизой результатов этих исследований.

Одной из важных тем, затронутых на заседании, стало неудовлетворительное положение с экспертизой документации по препаратам, представляемым на государственную регистрацию. В связи с этим была отмечена необходимость восстановления Фармакокинетической и Токсикологической комиссий, а также специализированных комиссий по группам лекарственных препаратов, которые следует сформировать из числа ведущих специалистов соответствующего профиля, не являющихся штатными сотрудниками Экспертного учреждения. В письме, направленном в МЗ РФ, были предложены соответствующие поправки в Федеральный закон, которые будут способствовать кардинальному улучшению нынешнего состояния дел с регистрацией лекарственных препаратов. Однако реакции на это письмо со стороны МЗ РФ до сих пор не последовало.

Серьёзную озабоченность специалистов вызывают и нелепые предложения решать проблему взаимозаменяемости лекарственных препаратов путём оценки их терапевтической эквивалентности. Такая оценка воспринимается чуть ли не как альтернатива оценке фармакокинетической эквивалентности (биоэквивалентности), хотя ни порядок проведения исследований терапевтической эквивалентности, ни анализ их результатов (в частности, статистические подходы к оценке терапевтической эквивалентности) до сих пор никак не регламентированы, а широкомасштабные клинические испытания генерических препаратов не могут иметь коммерческой перспективы. Подобные предложения не только ничем не обоснованы, но контрпродуктивны, поскольку способны привести к резкому удорожанию и замедлению процесса регистрации лекарственных средств.

Попытки подмены строго регламентированных исследований биоэквивалентности ничем не регламентируемой оценкой терапевтической эквивалентности косвенно отразились и на порядке проведения доклинических испытаний генерических препаратов. До недавнего времени оценка их качества базировалась как на токсикологических, так и на фармакокинетических исследованиях, в частности оценке относительной биодоступности препаратов. Именно по результатам фармакокинетических исследований удавалось объективно оценить целесообразность проведения клинических исследований (в том числе биоэквивалентности препаратов). К сожалению, как неоднократно отмечалось на заседании Круглого стола, этот аспект оценки качества воспроизведённых препаратов вообще выпал из поля зрения разработчиков Закона «Об обращении лекарственных средств», несмотря на существующие «Методические рекомендации по проведению доклинических исследований фармакокинетики лекарственных средств», в которых чётко определены все этапы проведения такого рода исследований, дающих объективную оценку качества воспроизведённых и оригинальных лекарственных препаратов.

Участники Круглого стола отметили назревшую необходимость организации выборочного контроля качества генерических препаратов, поступающих в аптечную сеть, в контексте их биоэквивалентности оригинальным лекарственным средствам.

Уважаемые читатели, ждём Ваших отзывов и предложений по обсуждаемым вопросам.

*Главный редактор
Жердев Владимир Павлович*

Особенности фармакокинетики антисмысловых олигонуклеотидных препаратов

Хаитов М.Р., Смирнов В.В.

ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, г. Москва

Резюме

В обзоре рассмотрены фармакокинетические особенности различных антисмысловых олигонуклеотидных препаратов. Проведено сравнение фармакокинетики препаратов первого и второго поколения. А так же рассмотрено влияние на фармакокинетику химической модификации молекулы.

Ключевые слова: антисмысловые олигонуклеотиды, фосфотиоатные олигодеоксинуклеотиды, фармакокинетика

Pharmacokinetics of antisense oligonucleotide drugs

Khaitov M.R., Smirnov V.V.

FGBI «Institute of Immunology» FMBA of Russia, Moscow

Summary

This review covers the pharmacokinetic characteristics of the various antisense oligonucleotide drugs. A comparison of the pharmacokinetics of drugs first and second generation. As well as the influence on the pharmacokinetics of the chemical modification of the molecule.

Keywords: antisense oligonucleotides, phosphorothioate oligodeoxynucleotides, pharmacokinetics

Введение

Фармакокинетические свойства антисмысловых олигонуклеотидов (АСО) становятся наиболее понятными при рассмотрении их физических и химических свойств. Такие параметры как заряд, молекулярная масса и амфипатическая природа фосфотиоатных АСО оказывают заметное влияние на их фармакокинетику. Особенно значимое влияние на фармакокинетические свойства АСО оказывает химическая структура, в частности фосфотиоатная группа и 2'-метоксиэтил (МОЭ).

Всасывание, распределение, метаболизм, и выведение фосфотиоатных олигодеоксинуклеотидов (ОДН) первого поколения были тщательно изучены на лабораторных животных и в клинических исследованиях [1, 16, 18, 19, 20, 23, 28, 37, 38, 39, 40, 58]. Особенности фармакокинетики препаратов фосфотиоатных АСО заключаются в следующем: введенные парентерально фосфотиоатные ОДН быстро оказываются в плазме крови, где они связываются с гидрофильными участками белков плазмы и таким образом избегают гломерулярной фильтрации. Эти гидрофильные участки отличны от других гидрофильных участков, с которыми связываются липофильные препараты, и, таким образом, конкуренция за связывание с белками плазмы для АСО невелика. Кинетика в плазме характеризуется короткой фазой распределения (порядка нескольких часов), а затем наступает фаза выведения препарата с

периодом его полувыведения, составляющим дни или недели. Начальная фаза распределения обязательно включает связывание АСО с белками и распределение этих комплексов по тканям печени, почек, лимфатических узлов, костного мозга и селезенки, которые являются местами наиболее активного связывания и накопления АСО. Совершенно очевидно, что фаза выведения АСО вследствие начального связывания с белками, определяется начальным этапом его распределения. Вследствие возможного насыщения белков, площадь под фармакокинетической кривой (AUC) увеличивается с увеличением дозы, так как АСО уже не связываются с белками после их насыщения, а попадают в свободном виде в кровоток. После связывания АСО попадают в клетки по градиенту концентрации из внеклеточного пространства через клеточную мембрану во внутриклеточное пространство, вероятно, с помощью белка-переносчика. АСО в клетках связываются с доступными мишенями, но главным образом АСО в клетках, вероятнее всего, связываются с внутриклеточными белками. В клетке убиквитарные нуклеазы, но не ферменты цитохрома P450, метаболизируют препараты АСО. Поскольку ферменты цитохрома P450 обычно метаболизируют низкомолекулярные препараты, АСО не конкурируют в метаболических процессах с обычными низкомолекулярными соединениями, снижая риск развития лекарственных взаимодействий. Выведение АСО с мочой в конечном счете является ре-

зультатом метаболизма в тканях и установления равновесия метаболитов и нативного вещества вне тканей и в системном кровотоке. Эти процессы у лабораторных животных и человека очень сходны, в силу чего не удаётся выявить межвидовую корреляцию между лабораторными животными и человеком.

В настоящее время конфигурация «второго поколения» АСО, чьей особенностью являются МОЭ группы в положении 2'-нуклеотидов на 3'- и 5'-концах наиболее широко используется в клинических исследованиях. Эта конфигурация представляет собой более совершенную структуру по сравнению с немодифицированными фосфотиоатными ОДН, являющимися антисмысловыми препаратами первого поколения. Это обусловлено её повышенной эффективностью, уменьшенной токсичностью и повышенным периодом полувыведения. Многие факторы, связанные с переходом от первого ко второму поколению АСО, имеют непосредственное отношение к улучшению их фармакокинетики.

Особенности химического строения АСО

Фосфотиоатный скелет

Самые ранние попытки создать препараты с антисмысловой активностью были связаны с использованием немодифицированной ДНК, которая, к сожалению, была очень восприимчива к разрушению нуклеазой. Как оказалось, убиквитарные нуклеазы расщепляют фосфодиэстеразные связи нативной ДНК, в результате чего период полувыведения немодифицированных АСО составлял минуты. Такая быстрая деградация была основной особенностью фармакокинетического профиля немодифицированных антисмысловых ДНК. Изменение фосфодиэфирного скелета ДНК на фосфотиоатный резко изменило фармакокинетический профиль АСО. В этих препаратах фосфотиоатная структура заменяет в фосфодиэфирных связях один атом серы на один немостиковый атом кислорода. Такая структура повышает устойчивость АСО к нуклеазам и, как следствие, улучшает их кинетические свойства.

Фосфотиоатная хиральность

Как показали исследования, тиатион диэфирного скелета АСО не только повышает его устойчивость к нуклеазам, но и способствует возникновению хиральности, то есть возможности существования стереоизомеров, по каждой фосфотиоатной связи, что приводит к тому, что в любой 20-мер АСО существуют 219 Sp или Rp стереоизомеров [14, 15]. Комбинация резистентности к нуклеазам и повышение связывания с белками сильно влияет на фармакокинетику АСО. Повышение стабильности фосфотиоатных АСО приводит к тому, что период полувыведения препарата из плазмы увеличивается до 30-60 минут в сравнении с периодом полувыведения фосфодиэфирных АСО, составляющим 1-2 минуты.

Устойчивость к нуклеазам и хиральность из-за замены фосфодиэфирных на фосфотиоатные связи заслу-

живают обсуждения, потому что физические свойства связанные с этой структурной особенностью важны как для первого-, так и для второго поколений АСО. Устойчивость к нуклеазам фосфотиоатных АСО возникает из-за близости серы на немостиковом кислороде в активном участке экзонуклеазы к иону металла. Эта близость может вызывать смещение иона металла из активного участка. Данный эффект был продемонстрирован на модели 3'-5' экзонуклеазы ДНК-полимеразы. Рентгеновские кристаллографические данные подтверждают эту гипотезу о смещении иона металла. Очевидные различия в чувствительности стереоизомеров к экзонуклеазной активности ДНК-полимеразы согласуются с предложенной конформацией фосфотиоатных стереоизомеров ОДН в активном участке. Вполне вероятно, что хиральность фосфотиоатных связей может помешать другим нуклеазам таким же образом, то есть смещением иона металла, хотя различные экзонуклеазы могут показывать различные предпочтения связей Rp и Sp в зависимости от природы активного центра фермента.

В альтернативе, сера может просто занимать место кислорода в диэфирных связях. Различия в способности серы брать на себя отрицательный заряд, по сравнению с кислородом, позволяют прогнозировать изменения активного центра. Это изменение, скорее всего, происходит из-за гидролиза фосфодиэфирных связей, и может осуществляться через формирование переходного пятивалентного фосфора с двумя отрицательно заряженными атомами кислорода. Замена одного из экваториальных атомов кислорода серой будет иметь отрицательные последствия на активность ферментов: (1) снижается связывание воды, которая стабилизирует местный отрицательный заряд на атомах, что приводит к трудностям для получения второго отрицательного заряда серы; и (2) снижение связывания Mg^{2+} с серой. Существует доказательство для последнего эффекта в исследованиях уровня расщепления рибозимами диастереомерных фосфотиоатных включений, когда добавление Mg^{2+} ингибирует расщепляющие эффекты фосфотиоатных рибозимов [51]. Кроме того, было показано, что существует некоторое снижение активности нуклеаз на участках скелета, находящихся дальше от фосфотиоатных связей, что даёт возможность предположить передачу эффекта хиральности [54]. Этот феномен лучше всего объясняется изменениями в расположении молекул воды вокруг фосфотиоатного скелета по сравнению с фосфодиэфирным [60].

Стереоспецифические воздействия на активность нуклеаз заметно влияют на фармакокинетику фосфотиоатных АСО и это наиболее наглядно проявляется в скорости метаболизма фосфотиоатных АСО первого поколения в плазме крови. Скорость полного выведения АСО из плазмы уменьшается, предполагая замедление метаболизма. Эти изменения в скорости не могут быть объяснены исходя только из кинетики первого порядка, но их можно объяснить различиями в восприимчивости связей Rp и Sp.

Стереоспецифические различия в экзонуклеазной активности для АСО второго поколения менее важны. Это обусловлено тем, что АСО второго поколения имеют 2'-модификации на 3'- и 5'-концах, которые предотвращают их расщепление экзонуклеазой. С помощью эндонуклеазы, выделенной из возбудителя *Serratia marcescens*, были изучены эффекты хиральности фосфоротиоатных связей [35]. Сайт воздействия эндонуклеазы так же, как экзонуклеазы — это один из немоستيновых кислородов для гидролиза фосфодиэфирных связей. В диастереомере сера локализуется в непосредственной близости от Mg^{2+} , вследствие чего уменьшается активность фермента, в то время как в диастереомере Rp — нет. Поскольку эндонуклеаза *Serratia* имеет значительные сходства с некоторыми эндонуклеазами млекопитающих, следует предположить, что этот механизм может быть широко применим. Каким образом стереохимические особенности фосфоротиоатных связей влияют на действие других эндонуклеаз — не известно. Однако если предположить, что реакция развивается по схеме, аналогичной эндонуклеазе *Serratia*, можно думать, что активный участок будет содержать ион металла (вероятно, Mg^{2+}) и сера будет влиять на действие нуклеаз, когда она будет ориентирована на ион металла. Если эндонуклеазы чувствительны к хиральности, это могло бы иметь важные последствия для развития проблемы создания эффективных препаратов второго поколения. Как и влияние хиральности на препараты первого поколения, так и хиральное воздействие на метаболизм препаратов второго поколения может привести к замедлению их метаболизма. Так, например, можно предположить, что быстро метаболизирующиеся стереоизомеры будут выборочно разрушаться, оставляя функционирующими только медленно метаболизирующиеся изомеры.

Связывание АСО с белками

Было установлено, что в сравнении с АСО с фосфодиэфирным скелетом, на фармакокинетику фосфотиоатных структур оказывает существенное влияние их связывание с белками. Химической основой повышения связывания с белками является повышенная липофильность фосфотиоатных связей по сравнению с фосфодиэфирными. Поскольку молекулярные взаимодействия с водой определяются формой и функцией макромолекул в водном растворе [60], то даже небольшие изменения в липофильности скелета по всей длине АСО могут иметь последствия для взаимодействия олигомера с водой и макромолекулами, такими как белки.

В первом приближении, фосфотиоатные ОДН связываются с клеточными белками более беспорядочно, чем фосфодиэфирные ОДН [5, 6]. Почему фосфотиоатные АСО лучше связываются с белками до конца не выяснено. Возможные объяснения предполагают повышение липофильности и комплексообразование с ионами металлов.

Важность связывания с белками плазмы для фармакологии, фармакокинетики и токсикологии фосфотиоатных АСО (как первого, так и второго поколений) сложно переоценить. На микромолярном уровне концентраций более чем 90% фосфотиоатных ОДН связываются в плазме. Есть особые отличия в проценте и силе связывания с белками, так же как качественные отличия в связывании АСО с особыми белками у разных видов. Связывание фосфотиоатных АСО с циркулирующими белками удерживает эти соединения от фильтрации в почечных клубочках и выведения с мочой. В случае насыщения, например при введении большой дозы АСО, выведение с мочой АСО полной длины усиливается. Вследствие видовых различий, насыщение у различных видов определяется разными концентрациями АСО. Например, белки плазмы мышей имеют меньшее сродство к АСО, по сравнению с таковыми крыс или человека. Поэтому эффект насыщения процесса связывания АСО с белками плазмы у мышей происходит при более низких концентрациях, по сравнению с другими видами. Видовые различия в связывании плазмы с белками являются существенным фактором отличия в межвидовой фармакокинетике.

Устойчивость к нуклеазам и связывание с белками, которые характерны для АСО с фосфотиоатными связями, изменяют и фармакокинетику терапии с применением АСО. Дополнительные химические структуры, характерные для второго поколения создаваемых препаратов, вносят и другие изменения в их фармакокинетику.

Метоксиэтильные производные АСО

АСО второго поколения были разработаны для улучшения некоторых характеристик ОДН первого поколения. Так фосфотиоатные структуры, добавленные к группам МОЭ в позиции 2', повышают их устойчивость к нуклеазам и изменяют эффективность связывания с белками.

Устойчивость МОЭ к нуклеазам

Было показано, что структура МОЭ влияет на устойчивость АСО к нуклеазам. В то время как фосфотиоатные структуры уменьшают активность экзонуклеазы, структура в позиции 2' практически исключает экзонуклеазную активность. Устойчивость к нуклеазам может быть результатом (1) замещения в позиции 2' водорода на МОЭ, (2) стерических эффектов МОЭ или (3) образования жёсткой водной оболочки вокруг скелета АСО [57]. Какими бы не были причины устойчивости к нуклеазам, наличие группы МОЭ делает изменённые в позиции 2' АСО практически невосприимчивыми к воздействию циркулирующих и к большинству клеточных нуклеаз. Центральный участок скелета АСО, состоящий из деоксифосфотиоатов, далеко не так устойчив к опосредованному нуклеазой расщеплению. Различия АСО первого и второго поколений в участках, подверженных метаболизму, определяют и различия метаболических моделей.

При оценке моделей метаболизма с помощью капиллярного гель-электрофореза (КГЭ) или путём жидкостной хроматографии/масс спектрометрии (ЖХ/МС), не было обнаружено метаболитов, которые были бы короче на один нуклеотид. Больше всего было обнаружено метаболитов, расщеплённых в дезокси участке (предположительно эндонуклеазами), дальнейший путь метаболизма заключается в уменьшении размеров продуктов расщепления. Устойчивость к экзонуклеазам и медленный метаболизм под влиянием действующих эндонуклеаз приводит к образованию соединений, характеризующихся большим периодом полувыведения.

Связывание МОЭ с белками

Экспериментальными исследованиями доказано, что фосфотиоатные АСО со структурами 2'-МОЭ имеют меньшее сродство к белкам плазмы, в сравнении с немодифицированными фосфотиоатными АСО. Например, при добавлении пяти структур МОЭ к 3'-концам фосфотиоатных ОДН первого поколения, константы диссоциации для альбуминов повышаются от примерно 18 до примерно 40 мкМ. При этом, в полностью замещённой МОЭ структуре АСО только слегка снижается сродство к белкам плазмы [17, 22]. Почему увеличение количества структур МОЭ в олигонуклеотиде не влияет на дальнейшее уменьшение сродства к белкам плазмы не ясно, но может быть это связано с особенностями вторичной структуры АСО.

Уменьшение сродства к белкам, связанное со структурами МОЭ, можно обосновать некоторыми физическими свойствами. Вероятно наиболее значительным физическим фактором, который отличает модифицированные МОЭ АСО от немодифицированных — это наличие молекулярной оболочки воды, которая возникает из-за боковой цепи МОЭ [57]. Заместители МОЭ в углеводородном скелете «хелатируют» молекулы воды (и, возможно, ионы металлов), образуя водную оболочку, и уменьшая потенциальный контакт между «липкими» молекулами серы и плазменными или клеточными белками. Степень связывания АСО с белками обратно коррелирует с их выведением с мочой. Введение фосфотиоатных связей и заместителей 2'-МОЭ изменяет связывание с белками и в результате изменяет свойства АСО.

Всасывание, распределение, метаболизм и выведение АСО

Всасывание

Парентеральный путь введения АСО

Исследованиями установлено, что вследствие молекулярной массы (около 7000 Д) и отрицательных зарядов АСО, всасывание этих препаратов из ЖКТ ограничено. Именно поэтому, обычно применяется парентеральный путь их введения. Подкожные,

внутривенные инфузии или интравитриальные инъекции используются для введения препаратов первого поколения. Меньшая провоспалительная активность АСО второго поколения делает их более подходящими для подкожного введения. Фармакокинетика этих препаратов в плазме при подкожных инъекциях и внутривенных инфузиях сравнима. Исследования на лабораторных животных показывают, что, в конечном счёте, распределение АСО так же сопоставимо по различным органам, за исключением места введения и лимфатических узлов.

После подкожного введения, АСО как первого, так и второго поколения всасываются быстро из места введения в системный кровоток. В клинических исследованиях после подкожного введения АСО второго поколения время достижения максимальной концентрации (T_{max}), находится в пределах от 1,5 до 4,7 часа в диапазоне доз от 25 до 200 мг при постоянном объёме 1 мл [50]. Биодоступность подкожной дозы лежит в пределах от 36 до 82% от введенной дозы. Доклинические [48] и клинические исследования [50] предполагают, что биодоступность АСО повышается в зависимости от концентрации.

Кинетика АСО в месте введения может повлиять на местный ответ, также как на их системную кинетику и на распределение. Уменьшение концентрации АСО в месте введения гипотетически уменьшает местный ответ на инъекцию. Одним из подходов к снижению концентрации АСО в месте введения является разведение раствора и, как следствие, повышение площади поверхности всасывания из подкожного депо. Теоретически, разведение растворов и большая площадь поверхности всасывания должны уменьшить местную концентрацию и снизить местные реакции. Этих же эффектов можно было бы ожидать и при повышении системного всасывания. Поэтому изменения дозы и объёма можно рассматривать как потенциальные переменные величины. Однако даже на сегодняшний день подкожные инъекции с низкими объёмами и относительно высокими концентрациями демонстрируют высокую биодоступность применяемого материала.

Местное введение АСО

Изучение различных приёмов введения АСО демонстрирует, что их аэрозольные формы, ректальное введение и интравитриальные инъекции используются как средства местного введения. Для лечения лёгочных заболеваний возможно создавать относительно высокие концентрации АСО в лёгких используя аэрозоли [56].

Кинетика ОДН первого поколения была изучена на мышах. Установлено, что кинетика таких препаратов дозозависима, клиренс — лёгочный с периодом полувыведения около 2 часов. В отличие от этого, исследования модифицированных МОЭ АСО второго

поколения, показывают, что период их полувыведения составляет более 4 дней. Так же как и для другого местного лечения, преимущество ингаляций заключается в возможности создать высокие местные концентрации в тканях, которые обычно не накапливают применяемых веществ. В лёгких АСО обычно не накапливаются после парентерального введения. Местное введение так же редко вызывает системные эффекты. Например, при введении АСО обезьянам в дозе 0,1 мг/кг с помощью ингаляций (по три дозы в течение 1 недели) концентрация препарата в лёгких составляла примерно 1 мкг/г. Но у этих же обезьян, концентрация в печени и почках составила примерно 5% от концентрации в лёгких, свидетельствуя о существенно меньшем системном эффекте [65, 66].

Данные литературы свидетельствуют о том, что ректальное введение АСО с успехом используется для лечения язвенных колитов. В отличие от ингаляций, где могут использоваться небольшие количества вводимого вещества, применяемая для лечения клизма может содержать до 240 мг вещества (alicaforfen) первого поколения. В данном случае эпителий прямой кишки подвергается воздействию вводимого вещества, однако из-за плохой проницаемости сильно заряженных ОДН, наблюдается минимальное всасывание препарата, как и общий системный эффект. Расчёты показывают, что концентрация АСО в эпителии кишечника через 12 часов после введения составляет 20 мкг/г. Биодоступность у человека лежит в пределах от 0,03 до 2,14% и максимальная концентрация АСО, определяемая в плазме, составляет только 0,126 мкг/мл [44]. Отсутствие значительного системного всасывания и высокая местная концентрация лечебного препарата положительно сказываются на лечении.

Проведено исследование интравитреальных инъекций препаратов АСО как первого, так и второго поколений. В данном случае вещества вводятся в глаз в очень малых количествах. Вследствие изоляции места введения, системные эффекты препарата снижаются в ещё большей степени. В глазу, в стекловидное тело и сетчатку АСО поступают с разной скоростью: в стекловидное тело быстрее по сравнению с сетчаткой. И местный метаболизм, и диффузия из глаза способствуют выведению препарата. Как уже отмечалось, из-за небольших количеств системный эффект вводимого препарата оказывается минимальным. Однако, при этом механизм системного распределения сходен с большинством других препаратов.

Энтеральное введение АСО

Отмеченная стабильность АСО второго поколения к нуклеазам обеспечивает стабильность препарата в кишечнике, что делает возможным его дальнейшее всасывание. Тем не менее, размер молекулы и заряды АСО ограничивают всасывание препарата. После всасывания из кишечника, кинетика АСО подобна та-

ковой при его парентеральном введении. Хотя печень является одним из главных мест накопления АСО, эффект первого прохождения через печень не является важным фактором, влияющим на кинетику препарата АСО [44, 55].

Распределение АСО в организме

Роль перфузионного и тканевого сродства

Распределение АСО и других препаратов зависит от проницаемости, интенсивности кровоснабжения, связывания с белками плазмы, тканей и клеток. Показано, что распределение в тканях фосфотиоатных АСО первого и второго поколения с их множественными отрицательными зарядами и их связыванием с белками в наименьшей степени зависит от кровоснабжения, и гораздо более зависит от факторов, влияющих на их транспорт внутрь клетки.

Внутреннее распределение из плазмы в ткани относительно быстрое, период полувыведения составляет 30-90 минут после в/в введения. Период полувыведения АСО после подкожного введения больше, чем после в/в. Это отличие происходит из-за времени, необходимого для всасывания, а не из-за других отличий фармакокинетики [21, 24, 37, 48].

Изучение кинетики препаратов первого и второго поколения отметило её небольшие отличия. Большая стабильность к нуклеазам АСО второго поколения компенсируется меньшим их связыванием с белками. Наряду с этим, фармакокинетические профили препаратов 1-го и 2-го поколения сходны или почти неотличимы, если сумму нативного АСО и его метаболитов (общие АСО) первого поколения сравнивать с интактным препаратом второго поколения (ISIS 13650). В противном случае, более быстрое разрушение АСО экзонуклеазами укорачивало бы период полувыведения препаратов первого поколения в сравнении со вторыми. Распределение препаратов обоих поколений дозозависимо [48].

Как отмечалось выше, после всасывания из места инъекции или кишечника АСО связываются с белками плазмы. Два белка плазмы, которые точно связываются с фосфотиоатными АСО — это альбумин и альфа-2-макроглобулин. Другой распространённый белок, кислый гликопротеин не связывает АСО [59]. Связывание с белками очень важно для распределения АСО в ткани-мишени. Химические структуры, уменьшающие связывание приводят к заметному снижению концентрации препарата в тканях, повышают степень его фильтрации через почечные клубочки и выведения с мочой. Это явление можно наблюдать при использовании АСО с диэфирными связями в скелете препарата или при наличии структуры МОЭ. Уменьшение сродства диэфиров и МОЭ-структур (или и то, и то) к белкам позволяет более свободно циркулировать АСО в кровотоке, приводя к интенсификации его выведения с мочой [24, 26].

Во всех исследованиях с парентерально введенными АСО первого и второго поколения, мы не наблюдали линейного клиренса АСО из плазмы. Клиренс уменьшался с увеличением дозы препарата, и, следовательно, его биодоступность была большей, чем можно было предположить исходя из введенной дозы [27, 28, 36, 46, 48, 50, 64]. Поскольку начальный клиренс обусловлен распределением АСО в тканях и при этом наблюдалось поглощение препарата тканями, можно предположить возможность их насыщения АСО. Изучение процесса насыщения в результате введений АСО может проводиться с использованием фагоцитов печени. Когда связывание АСО с клетками Купфера достигнет насыщения, начнется уменьшение сродства. Последующее введение АСО мышам улучшает распределение АСО по не фагоцитарным клеткам печени, и в результате улучшается фармакологическая активность в гепатоцитах в сравнении с контролем. И, наоборот, при концентрации в плазме ниже 1 мкг/мл АСО активнее связываются с клетками Купфера, и меньше накапливаются в гепатоцитах.

Исследование процесса связывания АСО с белками плазмы показало, что этот эффект сопровождается быстрым распределением комплекса в тканях по поверхности клеток. Хотя точные механизмы клеточного связывания не установлены, можно предположить, что АСО связываются с белками плазмы или с клеточными белками, пока есть свободные участки связывания. Затем связанные АСО распределяются по градиенту концентрации через клеточную мембрану путём обмена внеклеточного белка на внутриклеточный.

Таким образом, движущей силой попадания АСО в клетки является градиент концентраций. Было описано челночное движение АСО между цитоплазмой и ядром [33, 34, 43]. В целом, является очевидным, что связывание с белками облегчает движение АСО через барьеры, которые обычно тормозят движение гидрофильных сильно заряженных молекул. Данный челночный механизм движения через мембраны остаётся гипотезой для АСО, но ранее он был описан для металлоорганических соединений [52]. Транспорт АСО из внеклеточного матрикса во внутриклеточное пространство был визуализирован на печени мышей при помощи иммуногистохимических методов [9] и на почках крыс с помощью витальной микроскопии с флуоресцентной меткой для АСО второго поколения (S. Henry, B. Molitoris).

Идентичность белков, контролирующих транспорт АСО из внеклеточного во внутриклеточное пространство не известна, однако считается, что связывание комплекса белок-АСО с клеткой осуществляется при помощи фагоцитарного рецептора [4]. Поскольку высоким сродством к АСО обладают фагоциты, такие как клетки Купфера, тканевые макрофаги и клетки проксимальных канальцев, можно думать о возможности нахождения таких рецепторов на их клеточной поверхности [9].

Тем не менее, клеточное распределение и фармакодинамика АСО у трансгенных мышей, лишённых фаго-

цитарного рецептора SR-A I/II не отличались от таковых показателей контрольных сингенных животных [7]. Таким образом, этот рецептор, известный как «рецептор для уборки мусора» (Scavenger receptor), по-видимому, не ответственен за поглощение комплекса печенью и почками. Роль других акцепторных структур, участвующих в процессах эндоцитоза комплекса АСО-белок, не изучена.

Мембранные белки, функционирующие как переносчики, присутствуют во всех организмах [25]. Основными переносчиками лекарственных средств являются: ABC (ATP-binding cassette transporters) и SLC (solute carrier family). Известно, что скорость переноса веществ через биологические мембраны с помощью процессов, опосредованных транспортёрами, характеризуется насыщаемостью. Описано несколько членов семейства SLC с известными функциями, в основном для переноса нуклеозидов, нуклеозид-сахаров и фосфат-сахаров. Есть мнение, что будущие исследования, скорее всего, будут касаться процессов межмембранного транспорта АСО.

Ясно, что помимо указанных выше отличий в накоплении создаваемых конструкций разными органами и тканями и зависимости клиренса и распределения таких соединений от их дозы, на распределение АСО в тканях оказывают влияние транспортные системы, особенности кровотока особей, возможное время нахождения препарата в организме и, наконец, насыщаемость тканей АСО. Несмотря на существенную роль указанных факторов в процессах тканевого распределения АСО, считается, что начальное связывание АСО с поверхностью клетки является одним из определяющих факторов в анализируемых механизмах. Такое заключение основывается на том, что печень и почки являются начальными участками связывания АСО с некоторым дополнительным накоплением в первые 24 часа после введения АСО [47]. При изучении параметров распределения АСО в печени и почках показано фракционное повышение концентрации препарата в органах в течение первых 24 часов. Это происходит в период клеточного и субклеточного перераспределения АСО [29], но предположительно, первичные органы распределения должны накапливать больше вещества с течением времени [45, 46, 48] из-за большего сродства этих органов к АСО. Белки, ответственные за это сродство могут содержать гепариноподобные участки связывания ламинина и фибриногена, и фактор роста фибробластов (FGF, Fibroblast growth factor) [2, 3, 30, 42]. Ранее взаимодействие АСО с клеткой может быть обусловлено связыванием этих белков, но природа этих белков, как отмечалось выше, изучена мало.

Рассматривая значимость сочетания специфических участков связывания АСО с клетками в распределении препарата в организме, следует отметить и такой важный фактор, как различное кровоснабжение разных органов, возможность которого влиять на различное распределение фосфотиоатных АСО очевидна. По данным разных авторов, работа с десятками серий веществ как первого,

так и второго поколений свидетельствует об их сходном распределении, и заметно подобном распределении у особей различных видов. Почки, печень, лимфатические узлы, селезёнка и костный мозг — это органы, накапливающие самое большое количество АСО и их метаболитов. То, что лёгкие и сердце не накапливают АСО, свидетельствует о том, что для объяснения выраженного накопления АСО в печени и почках недостаточно только одного объяснения об их хорошем кровоснабжении. Например, участки с наилучшим кровообращением в почках — это клубочки, а они не являются участками, содержащими большее количество АСО. Напротив, в проксимальных канальцах кровообращение менее активно. Однако клетки проксимальных канальцев характеризуются большим количеством активно фагоцитирующих клеток, накапливают свободные АСО, а так же АСО, связанные с белками, которые обычно реабсорбируются в проксимальных канальцах [49]. В результате почечная кора и эпителий проксимальных канальцев содержат самую высокую концентрацию фосфотиоатных АСО, как первого, так и второго поколения.

Следует отметить также, что кровоснабжение (мл/г ткани) печени составляет примерно 20% от почечного. 4-5-кратные различия в перфузии между почками и печенью не приводят к 4-5-кратным различиям в концентрации АСО в этих органах. Окончатые капилляры увеличивают площадь соприкосновения АСО с кровотоком и, следовательно, это может компенсировать недостаточную перфузию печени относительно почек.

Связывание АСО с белками плазмы при распределении

Хотя насыщение клеток АСО в конечном счёте влияет на их распределение в органах, связывание АСО с белками плазмы может изменять распределение в почках и печени в различных сериях. Существуют посерийные различия в связывании с белками. При снижении связывания АСО с белками плазмы происходит уменьшение их накопления в печени и повышение их накопления в почках. И, наоборот, при более высоком связывании, концентрация АСО в свободном виде в кровотоке будет находиться в меньшем количестве, меньше накапливаться в почках и больше в других органах. Существует обратная зависимость между степенью связывания АСО с белком и накоплением их в почках крыс и обезьян после повторяющегося внутривенного и подкожного введения.

Связывание с белками может быть использовано как критерий выбора АСО для клинических исследований. К настоящему времени, определение связывания с белками — это эмпирический процесс без возможности предсказать, какая серия будет связываться с белками больше или меньше.

Распределение АСО по другим органам

Независимо от последовательности распределения фосфотиоатных АСО первого и второго поколения, наблюдается характерная картина локализации этих препаратов в почках и печени, а также в селезёнке и лимфати-

ческих узлах, кости и в цитоплазме адипоцитов [10-12]. Накопление АСО в лимфоидной ткани можно объяснить отчасти фагоцитарной активностью гистиоцитов и других мононуклеарных клеток. Возможно, визуализировать АСО в фаголизосомах гистиоцитов и тканях макрофагов при помощи гематоксилинового окрашивания. Показано, что АСО подвергаются эндоцитозу, локализуются в эндосомах и сохраняются в пределах этих структур. Концентрация АСО в фаголизосомах часто такова, что её возможно определить методом окрашивания гематоксилином (почти как ядерную ДНК). АСО в фаголизосомах вероятно составляет большую часть АСО, накопленных в селезёнке и лимфоидных органах. Кроме того, фагоцитарно активные клетки костей и костного мозга накапливают АСО в этих тканях, что подтверждается наличием базофильных гранул в их клетках.

Мышцы (как скелетные, так и сердечные) не содержат значительного количества АСО. Тем не менее, внимательное изучение мышц с использованием иммуногистохимических или автордиографических методов показывает содержание АСО в фаголизосомах макрофагов стромы мышц и это накопление может частично отразиться и на измерении концентрации АСО в мышцах и сердце.

Накопление АСО в цитоплазме адипоцитов значимо с терапевтической точки зрения. Особенно потому, что в отличие от большинства накапливаемых в адипоцитах веществ, АСО гидрофильны. Иммуногистохимические методы ясно показывают, что АСО находятся в цитоплазматической фракции адипоцитов, при этом АСО почти нет в жировой вакуоли. Интенсивность окрашивания указывает на значительное накопление вещества в цитоплазме. Например, у обезьян после 13 недель лечения препаратом ISIS 113715 в дозе 10 мг/кг/неделя концентрация в печени составила $301 \pm 88,1$ мкг/г, но только $37,3 \pm 14,4$ мкг/г в жировой ткани у тех же животных.

Учитывая, что нежировой компонент составляет 10% от общей жировой массы, коррекция концентрации АСО с учётом этого показателя свидетельствует о сопоставимости его концентрации с таковой в печени. Значительные концентрации АСО в адипоцитах показывают, что их можно использовать для лечения генетических заболеваний клеток этого типа: источников гормонов и цитокинов. Так, установлено, что фармакологически активные концентрации АСО регистрируются в адипоцитах мышей при введении препарата ISIS 113715 в дозе 25 мг/кг дважды в неделю и снижают экспрессию гена-мишени *PTP-1B* как в печени, так и в адипоцитах [68]. Аналогичные наблюдения были сделаны у обезьян, получавших АСО ISIS 113715. Поскольку биопсию подкожного жира можно провести в клинических условиях и так как активные АСО накапливаются в жире, то можно использовать жир для биопсии и непосредственного измерения фармакологических эффектов (снижение мРНК) и тканевой концентрации препарата в тканях человека.

Метаболизм

Фосфотиоатные АСО распределяются и в другие ткани. Иммуногистохимические исследования показывают, что эндотелиальные клетки накапливают АСО в концентрациях, значительных для уменьшения уровня мРНК, делая их потенциальной мишенью для фармакологического воздействия [9, 4]. В некоторых тканях их концентрации не достаточно велики для фармакологического эффекта. Например, зрелые лимфоциты не накапливают АСО, а антисмысловая активность проявляется Т-клетками ограниченно.

Костные клетки, особенно фагоцитарно активные остеобласты, могут накапливать АСО и этот эффект может быть использован в терапевтических целях. Кроме того, клетки островков поджелудочной железы также накапливают АСО. АСО как первого, так и второго поколения являются сильно заряженными гидрофильными молекулами, которые не проникают через гемато-энцефалический или гемато-тестикулярный барьеры. Однако, как и в мышцах, в интерстициальном участке яичек локализуются макрофаги, содержащие обнаруживаемые АСО. Яичники не отделены барьером, вследствие этого АСО можно количественно измерить в яичниках и визуализировать иммуногистохимическими методами в строме.

Ограниченное распределение АСО из плазмы крови в клетки мозга и кардиомиоциты делает эти ткани маловероятными мишенями антисмыслового вмешательства, несмотря на то, что селективное ингибирование или экспрессия некоторых белков ионных каналов в головном мозге и мышцах могут быть терапевтически полезны. Тем не менее, ограниченное распределение АСО в этих тканях можно рассматривать как преимущество. Отсутствие значительных концентраций АСО в мозге и сердце уменьшает риск поражения центральной нервной системы (ЦНС) и снижает проявление нежелательных сердечных эффектов. Как отмечалось ранее, прямое введение в структуры ЦНС, в частности, в головной мозг, с помощью интратекальной, внутрижелудочковой инфузии или инъекции вызывает распределение АСО в пределах центральной нервной системы и может быть полезно терапевтически [8, 32].

При беременности плод достаточно хорошо защищен от воздействия антисмысловых препаратов. Изучение трансплацентарной кинетики АСО не выявило его накопления в плоде, отмечен низкий уровень АСО у грызунов в плаценте [13, 31, 53]. Эти результаты были последовательно воспроизведены при исследовании тератогенности различных АСО второго поколения на мышах, крысах и кроликах. Плацента, несмотря на высокую перфузию, не является органом с высоким накоплением АСО [31, 53, 62].

В целом, представленные факты показывают, что распределение АСО является одним из ключевых факторов, который определяет выраженность активности АСО. Отличия в распределении АСО, как представляется, связаны в значительной степени с тропностью тканей для этих препаратов и, в меньшей степени, с перфузией.

Антисмысловые препараты первого и второго поколения метаболизируются нуклеазами, а не системами оксидаз типа цитохрома Р450, с помощью которого метаболизируются обычные липофильные низкомолекулярные препараты. АСО не являются ни субстратом изоферментов цитохрома Р450, и не индуцируют или ингибируют его активность в клинически значимых концентрациях. Опосредованное экзонуклеазами расщепление АСО, которое является основным путём метаболизма и клиренса фосфотиоатных ОДН первого поколения, вторично для АСО второго поколения. Ограничивают экзонуклеазную активность два фрагмента: один МОЭ на 3'-конце и другой МОЭ на 5'-конце.

Ферменты, ответственные за метаболизм АСО

Специфические ферменты, метаболизирующие АСО второго поколения не известны. Нуклеазы являются повсеместно распределёнными и есть возможность определить расщеплённые метаболиты АСО в большинстве тканей. Печеночный и почечный гомогенаты — оба способны метаболизировать АСО второго поколения *in vitro* без добавления экзогенных источников энергии, таких как никотинамидадениндинуклеотидфосфат (NADPH) или аденозин-5-трифосфат (АТФ). Начальное расщепление приводит к образованию двух продуктов, каждый из которых характеризуется защищённым МОЭ концом 5' и 3'. Эти метаболиты не связываются с белками, и, таким образом, выводятся из тканей. Поскольку метаболиты удаляются быстрее, чем они образуются, накопление метаболитов в тканях практически не происходит. Таким образом, не представляется возможным использовать определение количества метаболитов в ткани, как индекса метаболизма АСО в тканях.

Поскольку скорость выведения АСО из тканей зависит от их метаболизма, то различия в метаболизме АСО в различных тканях могут быть оценены на основе периода полувыведения этих препаратов из характеризующихся тканей. На основе данных для четырёх АСО второго поколения, заключено, что поведение членов этого класса сходно, однако прослеживаются небольшие различия в периоде их полувыведения из печени и почек обезьян, получавших препарат в течение 4-13 недель. Показано, что период полувыведения препаратов АСО ISIS 104838 и 112989 из печени и почек весьма сходен. Эти данные дают возможность предположить, что для некоторых серий АСО не существует значительных различий в скорости метаболизма в различных органах. Однако различия в тканевом периоде полувыведения выявлены для препаратов ISIS 107248, 113715, а также 301012. Обнаруженные различия в скорости метаболизма препаратов АСО в печени и почках показывают, что в разных тканях могут быть различия в скорости метаболизма, или имеет место более сложная кинетика для некоторых серий препарата, или полученные результаты просто отража-

ют небольшое количество образцов, взятых в течение ограниченного времени.

Детальное исследование процесса выведения АСО второго поколения показывает наличие разных темпов их выведения из различных типов клеток печени [63, 67]. Поскольку некоторые типы клеток, такие как клетки проксимальных канальцев коркового слоя почки, как правило, содержат АСО в фаголизосомах, этот тип поглощения, вероятно, определяет различия в метаболических скоростях препарата в разных тканях. Кроме того, вполне вероятно, что специфические последовательности в строении скелета АСО могут характеризоваться различной чувствительностью к расщеплению эндонуклеазами.

Бактериальные экзонуклеазы проявляют высокую степень специфичности к последовательности нуклеотидов в скелете АСО предположительно для защиты от вирусов. Большая часть активности нуклеаз в клетках млекопитающих связана с механизмами транскрипции и репарации ДНК, и, таким образом, видовая специфичность млекопитающих может отличаться от таковых бактериальных эндонуклеаз. Не известно, одинаково ли ответственны за катаболизм этих синтетических АСО процессы репликации и действие ферментов, связанных с явлением репарации. При высоких концентрациях оцДНК [61], АСО могут эффективно конкурировать с природным субстратом. Множество ферментов семейства нуклеаз способны катаболизировать АСО. Определение специфических ферментов, участвующих в метаболизме АСО не критично для развития антисмысловых препаратов, но, более глубокое понимание метаболических путей будет полезно для развития новых технологий.

Метаболиты АСО

Различия в метаболизме АСО первого и второго поколений весьма очевидны при сравнении метаболического профиля с КГЭ. Когда образцы ткани или мочи анализируются в детекторе LC/MS, характер метаболических процессов становится более ясным [24]. Как правило, фосфоротиоатные ОДН первого поколения метаболизируются в каскад метаболитов АСО, каждый из которых отличается на один нуклеотид в результате однонуклеотидных расщеплений экзонуклеазой. Так, после введения 20-мер, то есть состоящего из 20 нуклеотидов, ОДН первого поколения плазма и ткани содержат семейства последовательно сокращенных АСО, начиная с 19-мер и далее вплоть до короткого АСО.

Исходное расщепление в метаболизме АСО второго поколения, опосредованное эндонуклеазами, приводит к образованию двух АСО, один с 3'-концом МОЭ и другой с 5'-концом МОЭ. Расщепление продуктов с незащищенными концами, может проводиться либо 5'-экзонуклеазой или 3'-экзонуклеазой. Результаты комбинированной эндо- и экзонуклеазной активности — это каскад цепочечно сокращенных продуктов расщепления, многие, если не все, из которых могут быть выявлены в моче, собранной у обследуемых животных

или людей. Моча животных, принимавших препарат, или пациентов, лечившихся АСО второго поколения, может содержать метаболиты, которые варьируются от двух возможных 15-мер до двух возможных МОЭ 5-мер и множественных комбинаций каждого из промежуточных метаболитов [24].

Метаболиты короче, чем длина концов МОЭ будут присутствовать в тканях, если концы МОЭ сами являются субстратами для нуклеаз. Эти метаболиты обычно не определяются при масс-спектральном анализе, что наводит на мысль, что как правило, нет мононуклеотидов МОЭ, выделяющихся в процессе метаболизма. Тем не менее, некоторые исключения из этого обобщения имеют место. Для ограниченного числа последовательностей нуклеотидов, наблюдаются однонуклеотидные обрезки АСО второго поколения в тканях и плазме — либо КГЭ или LC/MS: метаболиты, по-видимому, были результатом экзонуклеазного расщепления. Эти метаболиты могут наблюдаться в начальном распределении. Предполагается, что они быстро появляются в плазме крови. МОЭ-мононуклеотиды, которые образуются в процессе метаболизма, не являются субстратами для фосфорилирования, и таким образом, вряд ли будут включены в нуклеотидтрифосфаты и, в конечном счете, в эндогенные нуклеотиды. МОЭ-мононуклеотиды не ингибируют ферменты, ответственные за синтез ДНК. Таким образом, МОЭ-мононуклеотиды, если они образовались, не должны встраиваться в эндогенные нуклеотиды.

Центральная часть дезоксинуклеотидов АСО второго поколения подлежит экзонуклеазному расщеплению, что приводит к высвобождению одного нуклеотида. Монодезоксинуклеотиды, которые получают путём экзонуклеазного расщепления, идентичны эндогенным нуклеотидам, за исключением тиофосфатной группы, которая может теоретически присутствовать. Тем не менее, тиофосфатная группа лабильна к окислению и к утрате серы, что делает группу концевой фосфата идентичной эндогенным нуклеотидам. Поэтому, в отличие от МОЭ-мононуклеотидов, любой высвобожденный дезоксинуклеотид будет естественно включён во внутриклеточное депо эндогенных нуклеотидов. Нуклеотиды, которые сохраняют тиофосфатные группы, будут субстратами для добавления одной или двух фосфатных групп, в результате чего получают смешанные тиофосфатные ди- или трифосфаты нуклеотида. Фосфорилирование возможно, но присутствие альфа тиофосфата делает реакции термодинамически неблагоприятными [41].

Заключение

Очевидна актуальность исследования фармакокинетики данных и схожих с описанными препаратами, а так же создание моделей на различных видах животных для полного понимания процессов протекающих в организме после приема препаратов. В России так же ведутся исследования подобных препаратов.

Литература

1. Adjei A.A., Dy G.K., Erlichman C. et al. A phase I trial of ISIS 2503, an antisense inhibitor of H-ras, in combination with gemcitabine in patients with advanced cancer. // Clin. Cancer Res. 2003. Vol. 9, №1. P. 115.
2. Benimetskaya L., Loike J.D., Loike G. et al. Mac-1 (CD11b/CD18) is an ODN-binding protein. // Nat. Med. 1997. Vol. 3, №4. P. 414.
3. Benimetskaya L., Tonkinson J.L., Koziolkiewicz M. et al. Binding of phosphorothioate ODNs to basic fibroblast growth factor, recombinant soluble CD4, laminin and fibronectin in P-chirality independent. // Nucl. Acids Res. 1995. Vol. 23, №21. P. 4239.
4. Bijsterbosch M.K., Manoharan M., Rump E.T. et al. In vitro fate of phosphorothioate antisense ODNs: predominant uptake by scavenger receptors on endothelial cells. // Nucl. Acids Res. 1997. Vol. 25, №16. P. 3290.
5. Bijsterbosch M.K., Rump E.T., De Vruet R.L. et al. Modulation of plasma protein binding and in vitro liver cell uptake of phosphorothioate ODNs by cholesterol conjugation. // Nucl. Acids Res. 2000. Vol. 28, № 14. P. 2717.
6. Brown D.A., Kang S.H., Gryaznov S.M. et al. Effect of phosphorothioate modification of ODNs on specific protein binding. // J. Biol. Chem. 1994. Vol. 269, №43. P. 26801.
7. Butler M., Crooke R.M., Graham M.J. et al. Phosphorothioate ODNs distribute similarly in class A scavenger receptor knockout and wild-type mice. // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2000. Vol. 292, №2. P. 489.
8. Butler M., Hayes C.S., Chappell A., Murray S.F., Yaksh T.L., Hua X.Y. Spinal distribution and metabolism of 2'-O-(2-methoxyethyl)-modified ASOs after intrathecal administration in rats. // Neuroscience. 2005. Vol. 131, №3. P. 705.
9. Butler M., Stecker K., Bennett C.F. Cellular distribution of phosphorothioate ODNs in normal rodent tissues. // Lab. Invest. 1997. Vol. 77, №4. P. 379.
10. Cossum P.A., Sasmor H., Dellinger D. et al. Disposition of the 14C-labeled phosphorothioate ASO ISIS 2105 after intravenous administration to rats. // J. Pharmacol. Exp. Ther. 1993. Vol. 267, №3. P. 1181.
11. Cossum P.A., Troung L., Owens S.R. et al. Pharmacokinetics of a 14C-labeled phosphorothioate ASO, ISIS 2105, after intradermal administration to rats. // J. Pharmacol. Exp. Ther. 1994. Vol. 269, №1. P. 89.
12. Crooke S.T., Graham M.J., Zuckerman J.E. et al. Pharmacokinetic properties of several novel ASO analogs in mice. // J. Pharmacol. Exp. Ther. 1996. Vol. 277, №2. P. 923.
13. Driver S.E., Robinson G.S., Flanagan J., Shen W., Smith L.E.H., Thomas D.W., Roberts P.C. ASO-based inhibition of embryonic gene expression. // Nat. Biotechnol. 1999. Vol. 17. P. 1184.
14. Eckstein F. Phosphorothioate ODNs: what is their origin and what is unique about them? // Antisense Nucl. Acid Drug Dev. 2000. Vol. 10, №2. P. 117.
15. Gaus H.J., Owens S.R., Winniman M., Cooper S., Cummins L.L. On-line HPLC electrospray mass spectrometry of phosphorothioate ASO metabolites. // Anal. Chem. 1997. Vol. 69, №3. P. 313.
16. Geary R.S. Current assessment of PK/PD relationships for antisense therapeutics. // World Congress of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Nice, France, 2002.
17. Geary R.S., Bradley J.D., Watanabe T. et al. Lack of pharmacokinetic interaction for ISIS 113715, a 2'-O-methoxyethyl modified antisense oligonucleotide targeting protein tyrosine phosphatase 1B messenger RNA, with oral antidiabetic compounds metformin, glipizide or rosiglitazone. // Clin. Pharmacokinet. 2006. Vol. 45, №8. P. 789.
18. Geary R.S., Leeds J.M., Fitchett J. et al. Pharmacokinetics and metabolism in mice of a phosphorothioate ASO antisense inhibitor of C-raf-1 kinase expression. // Drug Metab. Dispos. 1997. Vol. 25, №11. P. 1272.
19. Geary R.S., Leeds J.M., Henry S.P., Monteith D.K., Levin A.A. Antisense oligonucleotide inhibitors for the treatment of cancer: 1. Pharmacokinetic properties of phosphorothioate ODNs. // Anticancer Drug Des. 1997. Vol. 12, №5. P. 383.
20. Geary R.S., Leeds J.M., Shanahan W. et al. Sequence independent plasma and tissue pharmacokinetics for 3 antisense phosphorothioate ASOs: mouse to man. // in American Association of Pharmaceutical Scientists, Pharm. Research, Plenum Press, Seattle, Washington. 1996. P. S.
21. Geary R.S., Teng C.L., Truong L. et al. First pass hepatic extraction of a partially modified chimeric antisense oligonucleotides in Beagle dogs. // in Annual Meeting of the American Association of Pharmaceutical Scientists, Indianapolis, IN, 2000. P. 216.
22. Geary R.S., Ushiro-Watanabe T., Truong L. et al. Pharmacokinetic properties of 2'-O-(2-methoxyethyl)-modified ASO analogs in rats. // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2001. Vol. 296, №3. P. 890.
23. Geary R.S., Yu R.Z., Levin A.A. Pharmacokinetics of phosphorothioate antisense ODNs. // Curr. Opin. Invest. Drugs. 2001. Vol. 2, №4. P. 562.
24. Geary R.S., Yu R.Z., Watanabe T. et al. Pharmacokinetics of a tumor necrosis factor-alpha phosphorothioate 2'-O-(2-methoxyethyl) modified antisense oligonucleotides: comparison across species. // Drug Metab. Dispos. 2003. Vol. 31, №11. P. 1419.
25. Giacomini K.M., Sugiyama Y. Membrane transporters and drug response, in Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 11th ed., Brunton, L.L., ed., McGraw-Hill, New York, 2006. P. 41.
26. Gleave M., Chi K.N. Knock-down of the cytoprotective gene, clusterin, to enhance hormone and chemosensitivity in prostate and other cancers. // Ann. NY Acad. Sci. 2005. Vol. 1058. P. 1.
27. Gleave M., Miyake H. Use of antisense oligonucleotides targeting the cytoprotective gene, clusterin, to enhance androgen- and chemo-sensitivity in prostate cancer. // World J. Urol. 23. 2005. №1. P. 38.
28. Glover J.M., Leeds J.M., Mant T.G. et al. Phase I safety and pharmacokinetic profile of an intercellular adhesion molecule-1 antisense ODN (ISIS 2302). // J. Pharmacol. Exp. Ther. 1997. Vol. 282, №3. P. 1173.
29. Graham M.J., Crooke S.T., Monteith D.K. et al. In vitro distribution and metabolism of a phosphorothioate ASO within rat liver after intravenous administration. // J. Pharmacol. Exp. Ther. 1998. Vol. 286, №1. P. 447.
30. Guvakova M.A., Yakubov L.A., Vlodavsky I., Tonkinson J.L., Stein C.A. Phosphorothioate ODNs bind to basic fibroblast growth factor, inhibit its binding to cell surface receptors, and remove it from low affinity binding sites on extracellular matrix. // J. Biol. Chem. 1995. Vol. 270. P. 2620.
31. Henry S.P., Denny K.H., Templin M.V., Yu R.Z., Levin A.A. Effects of human and murine antisense oligonucleotide inhibitors of ICAM-1 on reproductive performance, fetal development, and post-natal development in mice. // Birth Defects Res. B Dev. Reprod. Toxicol. 2004. Vol. 71, №6. P. 359.
32. Hua X.Y., Moore A., Malkmus S. et al. Inhibition of spinal protein kinase C alpha expression by an antisense oligonucleotide attenuates morphine infusion-induced tolerance. // Neuroscience. 2002. Vol. 113, №1. P. 99.
33. Jackson J.K., Gleave M.E., Gleave J., Burt H.M. The inhibition of angiogenesis by antisense oligonucleotides to clusterin. // Angiogenesis. 2005. Vol. 8, №3. P. 229.
34. Kastelein J.J.P., Wedel M.K., Baker B.F. et al. Potent reduction of apolipoprotein B and Low-density lipoprotein cholesterol by short-term administration of an antisense inhibitor of apolipoprotein B. // Circulation. 2006. Vol. 114, №16. P. 1729.

35. Koziolkiewicz M., Krakowiak A., Kwinkowski M., Boczkowska M., Stec W.J. Stereodifferentiation — the effect of P chirality of oligo(nucleoside phosphorothioates) on the activity of bacterial RNase H. // Nucl. Acids Res. 1995. Vol.23, №24. P. 5000.
36. Leeds J.M., Geary R.S. Pharmacokinetic properties of phosphorothioate ASOs in humans, in *Antisense Research and Applications*, 1st ed., Crooke, S. T., ed., Springer, Heidelberg, 1998. P. 217.
37. Leeds J.M., Henry S.P., Geary R.S., Burckin T.A., Levin A.A. Comparison of the pharmacokinetics of subcutaneous and intravenous administration of a phosphorothioate oligodeoxynucleotide in cynomolgus monkeys. // *Antisense Nucl. Acid Drug Dev.* 2000. Vol.10, №6. P. 435.
38. Levin A.A. A review of issues in the pharmacokinetics and toxicology of phosphorothioate antisense oligonucleotides. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1999. Vol.1489, №1. P. 69.
39. Levin A.A., Geary R.S., Leeds J.M. et al. The pharmacokinetics and toxicity of phosphorothioate ASOs, in *Biotechnology and Safety Assessment*, 2nd ed., Thomas, J. A., ed., Taylor & Francis, Philadelphia, PA, 1998. P. 151.
40. Levin A.A., Henry S.P., Bennett C.F. et al. Preclinical development of antisense therapeutics, in *Novel Therapeutics from Modern Biotechnology: From Laboratory to Human Testing*, 1st ed., Oxender D.L. and Post L.E., eds., Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, 1998. P. 131.
41. Levin A.A., Henry S.P., Monteith D., Templin M. Toxicity of antisense oligonucleotides. // in *Antisense Drug Technology*, Crooke, S. T., ed., Marcel Dekker, New York, 2001. P. 201.
42. Loke S.L., Stein C.A., Zhang X.H. et al. Characterization of ASO transport into living cells. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989. Vol. 86. P. 3474.
43. Lorenz P., Misteli T., Baker B.F., Bennett C.F., Spector D.L. Nucleocytoplasmic shuttling: a novel in vitro property of antisense phosphorothioate ODNs. // *Nucl. Acids Res.* 2000. Vol. 28, №2. P. 582.
44. Miner P.B., Geary R.S., Matson J. et al. Bioavailability and therapeutic activity of alicaforsen (ISIS 2302) administered as a rectal retention enema to subjects with active ulcerative colitis. // *Ailment Pharmacol. Ther.* 2006. Vol. 23, №10. P. 1427.
45. Mou T.C., Gray D.M. The high binding affinity of phosphorothioate-modified oligomers for Ff gene 5 protein is moderated by the addition of C-5 propyne or 2'-O-methyl modifications. // *Nucl. Acids Res.* 2002. Vol. 30, №3. P. 749.
46. Nicklin P.L., Craig S.J., Phillips J.A. Pharmacokinetic properties of phosphorothioates in animals—absorption, distribution, metabolism and elimination, in *Antisense Research and Applications*, 1st ed., Crooke, S. T., ed., Springer, Berlin, 1998. P. 141.
47. Peng B., Andrews J., Nestorov I. et al. Tissue distribution and physiologically based pharmacokinetics of antisense phosphorothioate ASO ISIS 1082 in rat. // *Antisense Nucl. Acid Drug Dev.* 2001. Vol. 11, №1. P. 15.
48. Phillips J.A., Craig S.J., Bayley D. et al. Pharmacokinetics, metabolism and elimination of a 20-mer phosphorothioate ODN (CGP 69846A) after intravenous and subcutaneous administration. // *Biochem. Pharmacol.* 1997. Vol. 54, №6. P. 657.
49. Sawai K., Mahato R.I., Oka Y., Takakura Y., Hashida M. Disposition of ASOs in isolated perfused rat kidney: involvement of scavenger receptors in their renal uptake. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1996. Vol. 279, №1. P. 284.
50. Sewell L.K., Geary R.S., Baker B.F. et al. Phase I trial of ISIS 104838, a 2'-methoxyethyl modified antisense oligonucleotides targeting tumor necrosis factor- α . // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2002. Vol. 303, №3. P. 1334.
51. Slim G., Gait M.J. Configurationally defined phosphorothioate-containing oligoribonucleotides in the study of the mechanism of cleavage of hammerhead ribozymes. // *Nucl. Acids Res.* 1991. Vol. 19, №6. P. 1183.
52. Snyder R.M., Mirabelli C.K., Crooke S.T. Cellular association, intracellular distribution, and efflux of auranofin via sequential ligand exchange reactions. // *Biochem. Pharmacol.* 1986. Vol. 35, №6. P. 923.
53. Soucy N.V., Riley J.P., Templin M.V. et al. Maternal and fetal distribution of a phosphorothioate ASO in rats after intravenous infusion. // *Birth Defects Res. B Dev. Reprod. Toxicol.* 2006. Vol. 77, №1. P. 22.
54. Spitzer S., Eckstein F. Inhibition of deoxyribonucleases by phosphorothioate groups in oligodeoxyribonucleotides. // *Nucl. Acids Res.* 1988. Vol. 16, №24. P. 11691.
55. Stavchansky S., Geary R.S., Cho M. Pharmacokinetics and hepatic first pass effect of an antisense oligonucleotide (ISIS 2302) in rats. // in *Annual Meeting of the American Association of Pharmaceutical Scientists*, Indianapolis, IN, 2000. P. 216.
56. Templin M.V., Levin A.A., Graham M.J. et al. Pharmacokinetic and toxicity profile of a phosphorothioate ASO following inhalation delivery to lung in mice. // *Antisense Nucl. Acid Drug Dev.* 2000. Vol. 10, №5. P. 359.
57. Teplova M., Minasov G., Tereshko V. et al. Crystal structure and improved antisense properties of 2'-O-(2-methoxyethyl)-RNA. // *Nat. Struct. Biol.* 1999. Vol.6, №6. P.535.
58. Villalona-Calero M.A., Ritch P., Figueroa J.A. et al. A phase I/II study of LY900003, an antisense inhibitor of protein kinase C- α , in combination with cisplatin and gemcitabine in patients with advanced non-small cell lung cancer. // *Clin. Cancer Res.* 2004. Vol. 10, №18 Pt 1. P. 6086.
59. Watanabe T.A., Geary R.S., Levin A.A. Plasma protein binding of an antisense oligonucleotide targeting human ICAM-1 (ISIS 2302). // *ASOs.* 2006. Vol. 16, №2. P. 169.
60. White A.P., Reeves K.K., Snyder E. et al. Hydration of single-stranded phosphodiester and phosphorothioate oligodeoxyribonucleotides. // *Nucl. Acids Res.* 1996. Vol. 24, №16. P. 3261.
61. Wilson D.M. 3rd, Ape1 abasic endonuclease activity is regulated by magnesium and potassium concentrations and is robust on alternative DNA structures. // *J. Mol. Biol.* 2005. Vol. 345, №5. P. 1003.
62. Yu D., Kandimalla E.R., Roskey A. et al. Stereo-enriched phosphorothioate ODNs: synthesis, biophysical and biological properties. // *Bioorg. Med. Chem.* 2000. Vol.8, №1. P. 275.
63. Yu R.Z., Baer B., Chappel A. et al. Development of an ultrasensitive noncompetitive hybridization-ligation enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of phosphorothioate ODN in plasma. // *Anal. Biochem.* 2002. Vol. 304, №1. P. 19.
64. Yu R.Z., Geary R.S., Leeds J.M. et al. Comparison of pharmacokinetics and tissue disposition of an antisense phosphorothioate ASO targeting human Ha-ras mRNA in mouse and monkey. // *J. Pharm. Sci.* 2001. Vol. 90, №2. P. 182.
65. Yu R.Z., Geary R.S., Levin A.A. Application of novel quantitative bioanalytical methods for pharmacokinetic and pharmacodynamic/pharmacodynamic assessments of antisense oligonucleotides. // *Curr. Opin. Drug Discov. Dev.* 2004. Vol. 7, №2. P. 195.
66. Yu R.Z., Kim T.W., Hong A. et al. Cross species pharmacokinetic comparison from mouse to man of a second generation antisense oligonucleotide ISIS 301012, targeting human apolipoprotein B-100. // *Drug Metab. Dispos.* 2007. Vol. 35. P. 460.
67. Yu R.Z., Zhang H., Geary R.S. et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of an antisense phosphorothioate ASO targeting Fas mRNA in mice. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2001. Vol. 296, №2. P. 388.
68. Zinker B.A., Rondinone C.M., Trevillyan J.M. et al. PTP1B antisense oligonucleotide lowers PTP1B protein, normalizes blood glucose, and improves insulin sensitivity in diabetic mice. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. Vol. 99, №17. P. 1137.

Исследования биоэквивалентности таблетированных форм рисперидона, оланзапина и кветиапина у здоровых добровольцев

Писарев В.В.¹, Уляшова М.М.¹, Вдовина К.А., Тисейко Н.И.²

¹ — Научно-производственный центр Пробиотек, Москва, Россия

² — ЗАО «Северная звезда», Москва, Россия

Резюме

В данной статье представлены результаты трёх исследований биоэквивалентности таблетированных форм атипичных нейролептиков РИСПЕРИДОН, ОЛАНЗАПИН и КВЕТИАПИН производства ЗАО «Северная звезда», Россия и соответствующих им оригинальных препаратов рисперидона, оланзапина и кветиапина. Исследования были проведены путём определения концентраций рисперидона, оланзапина и кветиапина в плазме крови здоровых добровольцев после однократного приёма сравниваемых препаратов внутрь натощак по открытой рандомизированной перекрёстной схеме в два этапа с двумя последовательностями приёма препаратов. Образцы плазмы крови добровольцев анализировались валидированными методами высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. Для анализируемых препаратов рассчитаны следующие фармакокинетические параметры: C_{max} , AUC_{0-t} , $AUC_{0-\infty}$, C_{max}/AUC_{0-t} , TS_{max} , k_{el} , $T_{1/2}$, 90%-ные доверительные интервалы для отношений логарифмически преобразованных значений AUC_{0-t} , C_{max} и C_{max}/AUC_{0-t} в исследовании препаратов рисперидона составили, соответственно, 91,39—112,98%; 91,12—105,02% и 88,69—104,50%, в исследовании препаратов оланзапина 89,32—121,29%; 95,79—114,68% и 87,11—116,42% и в исследовании препаратов кветиапина 93,24—115,84%; 90,03—120,80% и 92,96—108,33%. По результатам исследований был сделан вывод о биоэквивалентности сравниваемых препаратов рисперидона, оланзапина и кветиапина.

Ключевые слова: рисперидон, оланзапин, кветиапин, фармакокинетика, биоэквивалентность.

Bioequivalence study of tablet forms of risperidone, olanzapine and quetiapine in healthy volunteers

Pisarev V.V.¹, Ulyashova M.M.¹, Vdovin K.A., Tiseyko N.I.²

¹ — Research and Production Center Probiotek, Moscow, Russia

² — JSC «Northern Star», Moscow, Russia

Summary

This article presents the results of three studies of bioequivalence tablet forms of atypical antipsychotics risperidone, olanzapine, and quetiapine produced by JSC «Northern Star», Russia and the corresponding original drugs risperidone, olanzapine and quetiapine. Studies have been done by determining the concentrations of risperidone, olanzapine and quetiapine in the blood plasma of healthy volunteers after a single dose compared drugs inside an empty stomach open randomized crossover design in two stages, with two sequences medication. Plasma samples were analyzed by validated volunteers using HPLC with mass spectrometric detection. Analyzed for drugs following pharmacokinetic parameters were calculated: C_{max} , AUC_{0-t} , $AUC_{0-\infty}$, C_{max}/AUC_{0-t} , TS_{max} , k_{el} , $T_{1/2}$, 90% confidence intervals relations for log-transformed values of AUC_{0-t} , C_{max} and C_{max}/AUC_{0-t} study drugs risperidone were respectively 91,39-112,98%, 91,12-105,02%, 88,69-104,50% and the study drugs olanzapine 89,32-121,29%, 95,79-114,68%, 87,11-116,42% and in the study drugs quetiapine 93,24-115,84%, 90,03-120,80% and 92,96-108,33%. According to studies, it was concluded bioequivalence compared drugs risperidone, olanzapine and quetiapine.

Keywords: risperidone, olanzapine, quetiapine, pharmacokinetics, bioequivalence.

Введение

Резкое увеличение расходов на здравоохранение в последние годы поставило новую задачу — выбор способа лечения, который оптимально сочетает в себе клиническую эффективность, безопасность и стоимость. Высококачественные воспроизведенные

лекарственные препараты (дженерики) представляют собой надёжную и недорогую альтернативу оригинальным лекарственным препаратам. Основным видом медико-биологического контроля качества воспроизведенных препаратов является оценка биоэквивалентности. Данный тип исследований позволяет сделать обоснованные заключения о качестве

сравниваемых препаратов по относительно меньшему объёму первичной информации и в более сжатые сроки, чем при проведении клинических исследований [1].

В настоящее время объём реализации дженериков на фармацевтическом рынке Российской Федерации, как и во многих других странах мира, количественно превосходит долю оригинальных препаратов [2]. Существующая тенденция справедлива и в отношении психотропных препаратов, среди которых лидирующее положение занимают нейролептики. Появление нового поколения антипсихотических препаратов — атипичных нейролептиков, также называемых антипсихотическими препаратами второго поколения, определило переход к новым стандартам переносимости и безопасности для препаратов этой группы. Обладая сравнимыми с типичными нейролептиками показателями терапевтической эффективности, атипичные антипсихотические препараты являются предпочтительными на всех этапах фармакотерапии (основном, поддерживающем и профилактическом) благодаря значительно более низким показателям развития клинически значимых побочных эффектов [3].

В данной статье представлены результаты трёх исследований биоэквивалентности таблетированных форм атипичных нейролептиков РИСПЕРИДОН, ОЛАНЗАПИН и КВЕТИАПИН производства ЗАО «Северная звезда», Россия и соответствующих им оригинальных препаратов рисперидона, оланзапина и кветиапина.

Материалы и методы

Данные клинические исследования проводились в соответствии с этическими принципами Хельсинкской Декларации Всемирной Медицинской Ассоциации (Сеул, 2008 г.), трехсторонним соглашением по Надлежащей Клинической Практике (ICH GCP) и регламентировались действующим законодательством РФ [4-5]. Соответствующие протоколы исследований одобрены Министерством здравоохранения Российской Федерации.

Исследуемые лекарственные препараты

Все исследуемые лекарственные препараты (Т) были предоставлены Спонсором исследований — компанией ЗАО «Северная звезда» (Россия):

- РИСПЕРИДОН таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 4 мг производства ЗАО «Северная звезда», Россия (серия 11009);
- ОЛАНЗАПИН таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 10 мг производства ЗАО «Северная звезда», Россия (серия 10910);
- КВЕТИАПИН таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 25 мг производства ЗАО «Северная звезда», Россия (серия 11111).

- В качестве препаратов сравнения (R) использовались оригинальные препараты рисперидона, оланзапина и кветиапина;
- РИСПОЛЕПТ таблетки, покрытые оболочкой, 4 мг производства «Янссен Фармацевтика Н.В.», Бельгия (серия 9JL3300);
- ЗИПРЕКСА® таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 10 мг производства Эли Лилли энд Компани Лимитед, Великобритания (серия A722587);
- СЕРОКВЕЛЬ таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 25 мг производства АстраЗенека ЮК Лтд, Великобритания (серия HV962).

Дизайн исследований

Данные исследования проведены по открытой рандомизированной перекрёстной схеме в два этапа, с двумя последовательностями приёма исследуемого препарата и препарата сравнения, натошак, в условиях клинического центра на 18 (для препаратов рисперидона и оланзапина) или 24 (для препаратов кветиапина) здоровых добровольцах в возрасте от 18 до 45 лет, включенных в исследование после подписания информированного согласия и проведения медицинского обследования. Скрининговое обследование включало получение демографических данных, данных медицинского и медикаментозного анамнеза, проведение физикального осмотра, включающего измерение роста и массы тела, основных жизненных показателей (артериального давления, частоты сердечных сокращений, температуры тела), регистрацию ЭКГ в 12 отведениях, общие анализы крови и мочи, биохимический анализ крови с определением концентраций глюкозы, общего билирубина, креатинина, активности печёночных aminотрансфераз (АЛТ, АСТ) и щелочной фосфатазы (ЩФ), серологическое исследование крови на ВИЧ, сифилис, вирусные гепатиты В и С, анализ мочи на злоупотребление лекарствами и приём наркотиков, для женщин — тест на беременность. Вопрос о включении добровольца в исследование решался на основе собранной информации с учетом критериев включения и исключения.

Исследование состояло из двух равнозначных этапов. Перед приёмом препарата на I этапе исследования добровольцы распределялись на две группы случайным образом, согласно схеме рандомизации. До приёма препарата на каждом этапе исследования проводился физикальный осмотр; измерение основных жизненных показателей (АД, ЧСС, температура тела), тест на беременность (для женщин), тест на запах алкоголя. На I этапе исследования добровольцы, вошедшие в 1 группу, принимали исследуемый препарат; добровольцы 2 группы — препарат сравнения. На II этапе исследования (через 7 дней для препаратов рисперидона и кветиапина и через 14 дней для препаратов оланзапина) добровольцы 1 группы

принимали препарат сравнения; добровольцы 2 группы — исследуемый препарат.

После приёма исследуемых препаратов добровольцы находились под постоянным медицинским наблюдением, включающим измерение ЧСС, АД и температуры тела, физикальный осмотр, регистрацию ЭКГ в 12 отведениях и оценка нежелательных явлений и сопутствующей терапии. Все клинически значимые отклонения определяемых параметров безопасности от диапазона нормальных значений регистрировались как нежелательные явления.

Отбор образцов крови на каждом этапе исследования осуществлялся до приёма препаратов и через 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 5,0; 8,0; 12,0; 24,0 и 48,0 ч после приёма препаратов рисперидона, через 1,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 10,0; 12,0; 24,0; 48,0; 96,0 и 144,0 ч после приёма препаратов оланзапина и через 0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 5,0; 8,0; 12,0; 24,0 и 36,0 ч после приёма препаратов кветиапина. При этом в течение 24 ч добровольцы находились в клиническом центре, далее для отбора образцов крови добровольцы посещали клинический центр амбулаторно. Отбор образцов крови производили из локтевой вены стандартным лицензированным оборудованием — в течение первых 12 ч путём катетеризации локтевой вены, далее одноразовыми шприцами. Образцы помещали в гепаринизированные вакутейнеры и выдерживали 5-10 минут до момента центрифугирования. После центрифугирования (2500 об/мин в течение 10 мин) отделенную плазму помещали в маркированные пластиковые флаконы. До момента анализа все образцы хранились при температуре -50°C.

Определение концентраций рисперидона, оланзапина и кветиапина в плазме крови добровольцев

Концентрации рисперидона, оланзапина и кветиапина в образцах плазмы крови добровольцев определяли на базе биоаналитической лаборатории Научно-производственного центра Пробиотек с использованием валидированных методов высокоэффективной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии согласно принципам GLP.

Анализ рисперидона проводили на хроматографе Agilent 1100, соединённом с масс-спектрометром Agilent 1946C. Детектирование проводили по основному иону m/z 411.2. Для выделения рисперидона из плазмы к образцу объёмом 250 мкл добавляли 1000 мкл ацетонитрила, смешивали и далее центрифугировали при 13000 об/мин. Надосадочную жидкость объёмом 1000 мкл упаривали досуха в токе воздуха при 50°C, сухой осадок растворяли в 250 мкл воды, пригодной для ВЭЖХ, и 20 мкл вводили в хроматограф. Степень извлечения рисперидона из плазмы крови составила 81,0%. Для хроматографического разделения была использована хроматографическая колонка Zorbax SB C18, 7,5x4,6 мм, 3,5 мкм в градиентном режиме элюирования со скоростью потока

подвижной фазы 0,5 мл/мин и температурой разделения 50°C. В качестве подвижной фазы использовали 0,1М формиат аммония и метанол. Время удерживания рисперидона составило 5,6 мин. Обработку результатов осуществляли с помощью программного продукта Chemstation A10.02. Калибровочная кривая имела линейную зависимость в диапазоне 1,50 — 50,00 нг/мл. Предел обнаружения рисперидона составил 1,50 нг/мл.

Анализ оланзапина проводили на хроматографе Agilent 1100, соединённом с tandemным масс-спектрометром AppliedBioSystems API 4000. Детектирование проводили по основному иону m/z 313.2 и дочернему иону m/z 256.2. Для выделения оланзапина из плазмы к образцу объёмом 250 мкл добавляли 1000 мкл ацетонитрила, смешивали и далее центрифугировали при 13000 об/мин. Надосадочную жидкость объёмом 1000 мкл упаривали досуха в токе азота при 50°C, сухой осадок растворяли в 250 мкл раствора 0,1% муравьиной кислоты в воде и 3 мкл вводили в хроматограф. Степень извлечения оланзапина из плазмы крови составила 76,8%. Для хроматографического разделения была использована хроматографическая колонка HyperSil Gold, C8, 150x2,1 мм, 5 мкм в градиентном режиме элюирования со скоростью потока подвижной фазы 0,5 мл/мин и температурой разделения 50°C. В качестве подвижной фазы использовали 0,1% муравьиную кислоту и ацетонитрил. Время удерживания оланзапина составило 2,5 мин. Обработку результатов осуществляли с помощью программного продукта Analyst 1.5. Калибровочная кривая имела квадратичную зависимость в диапазоне 0,50 — 50,00 нг/мл. Предел обнаружения оланзапина составил 0,50 нг/мл.

Анализ кветиапина проводили на хроматографе Agilent 1100, соединённом с масс-спектрометром Agilent 1946C. Детектирование проводили по основному иону m/z 384,5. Для выделения кветиапина из плазмы к образцу объёмом 250 мкл добавляли 25 мкл водного раствора аммиака и 1,5 мл этилацетата, перемешивали и далее центрифугировали при 12000 об/мин. Надосадочную жидкость объёмом 1000 мкл упаривали досуха в токе азота при 40°C, сухой остаток растворяли в 50 мкл 15% ацетонитрила в 0,1% растворе муравьиной кислоты и 10 мкл вводили в хроматограф для анализа. Степень извлечения кветиапина из плазмы крови составила 62,5%. Для хроматографического разделения была использована хроматографическая колонка Luna, C18, 150x2,0 мм, 5 мкм в градиентном режиме элюирования со скоростью потока подвижной фазы 0,5 мл/мин и температурой разделения 45°C. В качестве подвижной фазы использовали 0,1М раствор муравьиной кислоты и ацетонитрил. Время удерживания кветиапина составило 3,8 мин. Обработку результатов осуществляли с помощью программного продукта Chemstation A10.02. Калибровочная кривая имела линейную

зависимость в диапазоне 1,00—200,00 нг/мл. Предел обнаружения кветиапина составил 1,0 нг/мл.

Расчёт фармакокинетических параметров и статистическая обработка полученных результатов

Расчёт фармакокинетических параметров, построение фармакокинетических кривых и статистический анализ данных осуществлялись с использованием пакетов программ SPSS Statistics 19.0 и Microsoft Excel 2007.

Для каждого добровольца по результатам определения концентрации активного вещества в плазме крови после приёма исследуемого препарата и препарата сравнения рассчитывались следующие фармакокинетические параметры: $C_{\max}$ (максимальное измеренное значение концентрации вещества в плазме крови добровольца); $TC_{\max}$ (время достижения $C_{\max}$); k_{el} (константа скорости элиминации, которая оценивается по угловому коэффициенту конечного моноэкспоненциального участка фармакокинетической кривой, описанного с помощью нелинейного регрессионного анализа); $T_{1/2}$ (период полувыведения; рассчитанный как натуральный логарифм (ln) (2)/ k_{el}); AUC_{0-t} (площадь под фармакокинетической кривой, начиная с нулевого значения времени (момент приёма препарата), до времени отбора последнего образца крови, рассчитывалась по методу трапеций); $AUC_{0-\infty}$ (площадь под фармакокинетической кривой, начиная с нулевого значения времени до бесконечности, рассчитанная как $AUC_{0-\infty} = AUC_{0-t} + C_t/k_{el}$, где C_t — это последняя измеренная концентрация вещества в плазме крови); $AUC_{0-t}/AUC_{0-\infty}$ (отношение значений AUC_{0-t} к $AUC_{0-\infty}$, выражаемое в процентах, определяется как индикатор адекватности времени отбора образцов крови); $C_{\max}/AUC_{0-t}$ (относительная скорость всасывания). Последующий анализ фармакокинетических данных предусматривал вычисление относительных биодоступностей рisperидона, оланзапина и кветиапина после приёма исследуемого препарата по сравнению с приёмом препарата сравнения $f' = AUC_{0-t}(T)/AUC_{0-t}(R)$, а также вычисление отношений $f'' = C_{\max}(T)/C_{\max}(R)$ для каждого препарата.

Для всех фармакокинетических параметров рассчитывались следующие параметры дескриптивной статистики: среднее арифметическое значение ($\bar{x}$), стандартное отклонение среднего (SD), среднее геометрическое значение (G), коэффициент вариации (CV), медиана (Median), максимальное (Max) и минимальное (Min) значения.

После проведения логарифмического преобразования значения основных фармакокинетических параметров AUC_{0-t} , $C_{\max}$ и $C_{\max}/AUC_{0-t}$ анализировались с помощью дисперсионного анализа (ANOVA). Для обычной рандомизированной перекрёстной схемы статистическая модель дисперсионного анализа включала следующие факторы, вносящие вклад в

наблюдаемую вариацию данных: последовательность приёма препаратов, этапы (периоды) исследования, препараты, добровольцы (внутри последовательности). Дисперсионный анализ применялся для проверки гипотез о статистической значимости вклада каждого из указанных факторов в наблюдаемую вариабельность. Полученная с помощью дисперсионного анализа оценка остаточной вариации использовалась при расчёте 90%-ного доверительного интервала для отношений средних значений соответствующего параметра.

Вывод о биоэквивалентности сравниваемых препаратов рisperидона, оланзапина и кветиапина был сделан с использованием подхода, основанного на оценке 90%-ных доверительных интервалов для отношений средних значений логарифмически преобразованных фармакокинетических параметров AUC_{0-t} , $C_{\max}$ и $C_{\max}/AUC_{0-t}$. Сравниваемые препараты считались биоэквивалентными, если границы оцененного 90% доверительного интервала для AUC_{0-t} находились в пределах 80—125%. Для показателей $C_{\max}$ и $C_{\max}/AUC_{0-t}$, характеризующихся большей вариабельностью, эти пределы составляли 75—133% [1].

Результаты и их обсуждение

Фармакокинетические параметры и оценка биоэквивалентности сравниваемых препаратов

На рис. 1-3 представлены усреднённые фармакокинетические кривые рisperидона, оланзапина и кветиапина в плазме крови добровольцев в линейных координатах. Как видно из сравниваемых кривых, характер зависимостей «концентрация — время» рisperидона, оланзапина и кветиапина для сравниваемых препаратов практически не отличается.

На основании полученных фармакокинетических кривых для каждого добровольца были рассчитаны индивидуальные фармакокинетические параметры рisperидона, оланзапина и кветиапина, необходимые для оценки биоэквивалентности сравниваемых препаратов: $C_{\max}$, AUC_{0-t} и $C_{\max}/AUC_{0-t}$. Для получения дополнительной информации также были рассчитаны AUC_{0-t} , $TC_{\max}$, k_{el} , $T_{1/2}$. Средние значения рассчитанных фармакокинетических параметров и другие характеристики дескриптивной статистики представлены в табл. 1. Сравнительный анализ полученных данных показал, что исследуемые препараты рisperидона, оланзапина и кветиапина производства ЗАО «Северная звезда» и соответствующие им оригинальные препараты статистически достоверно не различаются по основным фармакокинетическим параметрам, а разброс индивидуальных значений идентичен для двух препаратов.

Средние значения ($\pm$ стандартное отклонение) относительных биодоступностей (f') рisperидона, оланзапина и кветиапина после приёма исследуе-

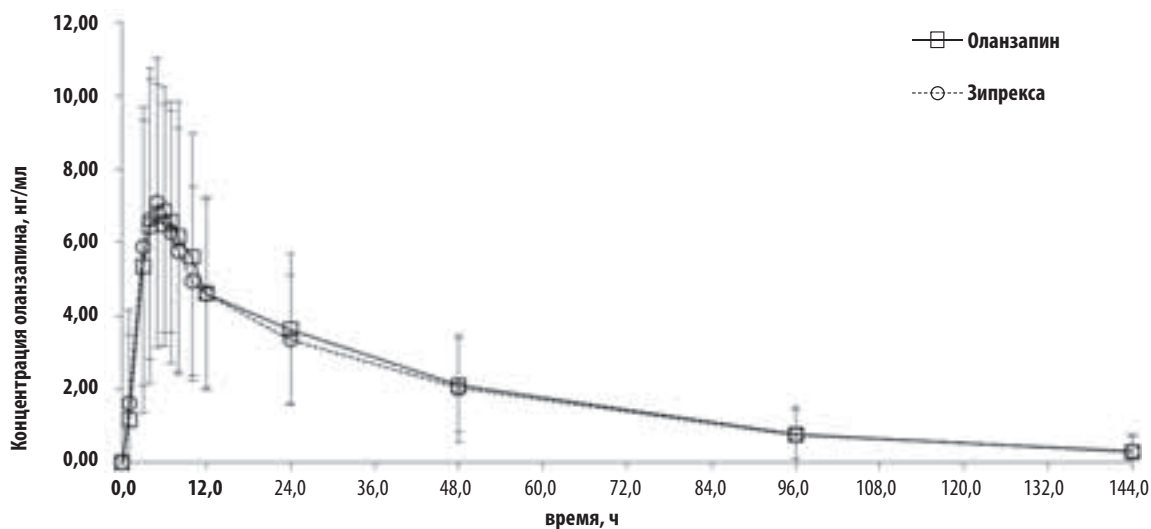


Рис. 1. Усреднённые фармакокинетические кривые рисперидона в плазме крови 18 добровольцев после однократного приёма препаратов РИСПЕРИДОН (ЗАО «Северная звезда», Россия) и РИСПОЛЕПТ («Янссен Фармацевтика Н.В.», Бельгия) в дозе 4 мг (в линейных координатах)

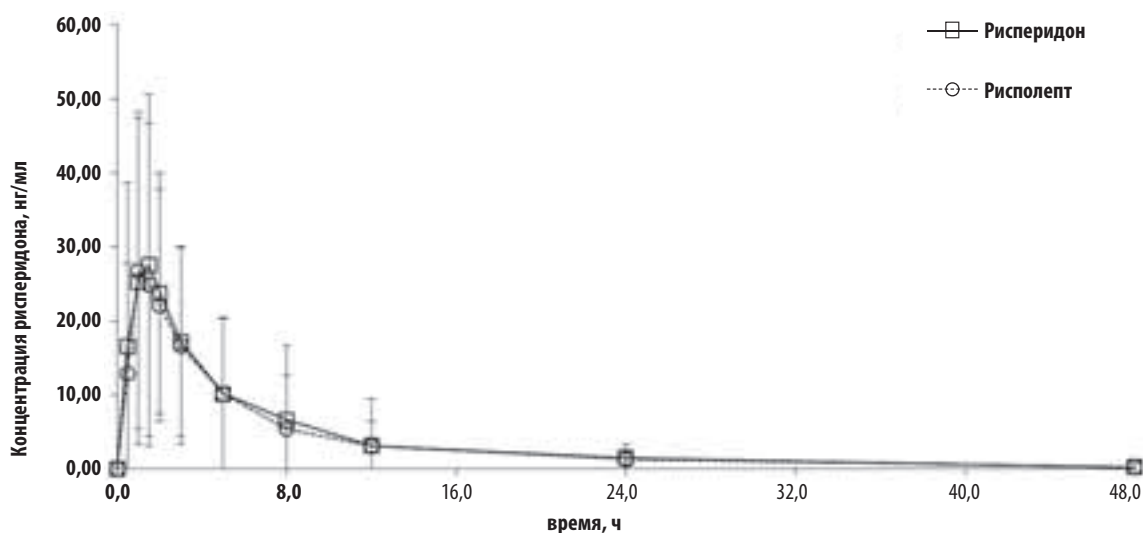


Рис. 2. Усреднённые фармакокинетические кривые оланзапина в плазме крови 18 добровольцев после однократного приёма препаратов ОЛАНЗАПИН (ЗАО «Северная звезда», Россия) и ЗИПРЕКСА® (Эли Лилли энд Компани Лимитед, Великобритания) в дозе 10 мг (в линейных координатах)

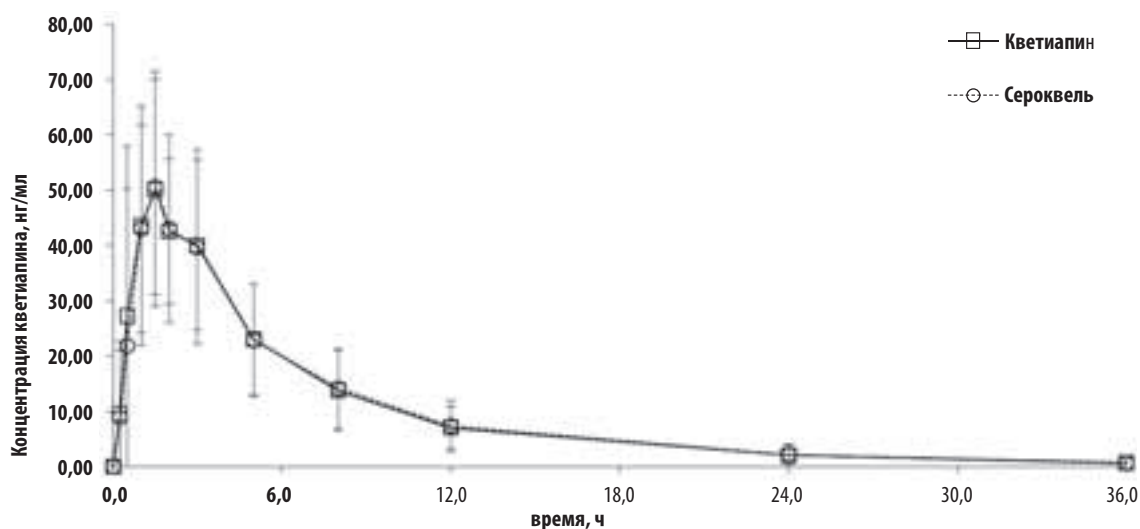


Рис. 3. Усреднённые фармакокинетические кривые кветиапина в плазме крови 24 добровольцев после однократного приёма препаратов КВЕТИАПИН (ЗАО «Северная звезда», Россия) и СЕРОКВЕЛЬ (АстраЗенекс ЮК Лтд, Великобритания) в дозе 25 мг (в линейных координатах)

мых препаратов по сравнению с приёмом соответствующих препаратов сравнения, а также отношения максимальных концентраций для данных препаратов (f'') представлены в табл. 2.

Результаты дисперсионного анализа (данные не представлены) позволили для сравниваемых параметров принять нулевую гипотезу о том, что различия в средних значениях основных фармакокинетических параметров не вызваны различиями между сравниваемыми препаратами — фактор «препарат» при уровне значимости 5% внёс статистически незначительный вклад в общую вариацию фармакокинетических параметров AUC_{0-t} , C_{max} и C_{max}/AUC_{0-t} рисперидона, оланзапина и кветиапина ($p < 0,05$). Эффекты, вызванные факторами «период» и «последовательность», для фармакокинетических параметров AUC_{0-t} , C_{max} и C_{max}/AUC_{0-t} всех препаратов также были статистически незначимыми ($p < 0,05$). При этом статистически значимый эффект фактора «Доброволец (внутри последовательности)» ($p > 0,05$) присутствовал для всех фармакокинетических параметров и свидетельствовал лишь об межиндивидуальной вариабельности внутри группы добровольцев.

Рассчитанные значения 90%-ных доверительных интервалов для отношений средних значений логарифмически преобразованных значений фармакокинетических параметров AUC_{0-t} , C_{max} и C_{max}/AUC_{0-t} рисперидона, оланзапина и кветиапина, а также коэффициенты внутрииндивидуальной вариабельности этих параметров представлены в табл. 3.

Доверительный интервал для отношения логарифмически преобразованных значений AUC_{0-t}

рисперидона составил 91,39—112,98% (среднее значение 101,61%). Рассчитанный 90% доверительный интервал не выходит за установленные рамки биоэквивалентности. Для логарифмически преобразованных значений C_{max} и C_{max}/AUC_{0-t} рисперидона доверительные интервалы отношений составили 91,12—105,02% (среднее значение 97,82%) и 88,69—104,50% (среднее значение 96,27%), что также удовлетворяет критериям биоэквивалентности [1].

Доверительный интервал для отношения логарифмически преобразованных значений AUC_{0-t} оланзапина составил 89,32—121,29% (среднее значение 104,08%). Рассчитанный 90% доверительный интервал не выходит за установленные рамки биоэквивалентности. Для логарифмически преобразованных значений C_{max} и C_{max}/AUC_{0-t} оланзапина доверительные интервалы отношений составили 95,79—114,68% (среднее значение 104,81%) и 87,11—116,42% (среднее значение 100,70%), что также удовлетворяет критериям биоэквивалентности [1].

Доверительный интервал для отношения логарифмически преобразованных значений AUC_{0-t} кветиапина составил 93,24—115,84% (среднее значение 103,98%). Рассчитанный 90% доверительный интервал не выходит за установленные рамки биоэквивалентности. Для логарифмически преобразованных значений C_{max} и C_{max}/AUC_{0-t} кветиапина доверительные интервалы отношений составили 90,03—120,80% (среднее значение 104,29%) и 92,96—108,33% (среднее значение 100,30%), что также удовлетворяет критериям биоэквивалентности [1].

Таблица 1

**Фармакокинетические параметры рисперидона, оланзапина и кветиапина
после однократного приёма соответствующих исследуемых препаратов и препаратов сравнения**

Параметр	C_{max} , нг/мл		$T_{C_{max}}$, ч		AUC_{0-t} , нг·ч/мл		$AUC_{0-\infty}$, нг·ч/мл		C_{max}/AUC_{0-t} , ч ⁻¹		k_{el} , ч ⁻¹		$T_{1/2}$, ч	
	T	R	T	R	T	R	T	R	T	R	T	R	T	R
Рисперидон														
$\bar{x}$	30,17	30,51	1,31	1,25	183,96	170,27	188,07	174,16	0,189	0,195	0,148	0,138	7,13	7,78
SD	22,29	21,56	0,42	0,49	179,22	135,91	179,34	135,97	0,078	0,072	0,117	0,092	3,67	6,90
G	25,23	25,79	1,24	1,19	144,55	142,27	147,88	145,73	0,175	0,181	0,116	0,113	5,95	6,15
CV, %	73,90	70,67	32,55	39,41	97,42	79,82	95,36	78,07	41,26	36,92	78,72	66,49	51,46	88,61
Median	24,65	25,32	1,25	1,00	146,09	121,29	146,91	130,08	0,182	0,191	0,084	0,098	8,22	7,13
Min	11,93	12,39	0,50	1,00	49,29	83,81	49,29	83,81	0,085	0,091	0,052	0,021	1,54	1,95
Max	99,68	99,65	2,00	3,00	850,68	607,38	850,68	607,38	0,327	0,323	0,450	0,355	13,20	33,15
Оланзапин														
$\bar{x}$	8,23	7,95	4,94	5,17	274,77	266,77	294,80	289,40	0,033	0,033	0,021	0,024	39,76	37,63
SD	4,30	4,09	1,26	1,38	152,67	152,50	174,83	179,23	0,013	0,013	0,013	0,019	13,62	15,12
G	7,21	6,88	4,79	4,98	228,64	219,67	239,31	231,59	0,032	0,031	0,019	0,021	36,82	33,74
CV, %	52,29	51,50	25,46	26,76	55,56	57,16	59,31	61,93	39,55	38,80	62,55	77,62	34,27	40,18
Median	7,58	7,23	5,00	5,00	270,49	231,14	274,10	231,14	0,029	0,031	0,017	0,018	39,77	38,33
Min	2,80	2,23	3,00	3,00	39,54	41,66	39,54	41,66	0,021	0,016	0,011	0,012	11,08	7,68
Max	17,82	14,47	7,00	8,00	620,68	517,24	672,14	625,49	0,071	0,067	0,063	0,090	61,46	58,15
Кветиапин														
$\bar{x}$	56,12	53,91	1,75	1,73	351,65	339,55	360,63	348,37	0,171	0,171	0,126	0,139	6,54	6,10
SD	23,76	23,51	0,69	0,66	143,16	160,18	149,53	167,47	0,051	0,053	0,059	0,078	2,64	2,37
G	51,87	49,74	1,60	1,62	316,07	304,08	322,61	310,57	0,164	0,164	0,115	0,124	6,01	5,58
CV, %	42,34	43,61	39,52	37,95	40,71	47,17	41,46	48,07	29,71	31,19	46,30	55,97	40,32	38,90
Median	50,86	49,09	1,50	1,50	389,28	344,25	393,20	348,66	0,174	0,162	0,111	0,122	6,35	6,01
Min	23,20	27,48	0,50	0,50	81,18	126,53	81,18	126,53	0,099	0,104	0,065	0,069	2,57	1,65
Max	129,06	126,83	3,00	3,00	557,13	703,68	571,48	727,36	0,286	0,304	0,270	0,421	10,68	10,01

Таблица 2

Средние значения ($\pm$ стандартное отклонение) относительных биодоступностей (f') рисперидона, оланзапина и кветиапина после приёма исследуемых препаратов по сравнению с приёмом соответствующих препаратов сравнения, а также отношения максимальных концентраций для данных препаратов (f'')

Параметр	Рисперидон	Оланзапин	Кветиапин
f'	$1,100 \pm 0,547$	$1,106 \pm 0,399$	$1,086 \pm 0,325$
f''	$0,991 \pm 0,166$	$1,071 \pm 0,229$	$1,125 \pm 0,433$

Таблица 3

90% доверительные интервалы для отношений средних значений (μ/μ_R) параметров AUC_{0-t} , C_{max} и C_{max}/AUC_{0-t} рисперидона, оланзапина и кветиапина (логарифмически преобразованные данные) и коэффициенты внутрииндивидуальной вариабельности для них

Параметр	отношение средних значений (μ_T/μ_R)	90% доверительные интервалы		Коэффициент внутрииндивидуальной вариабельности
		Нижняя граница	Верхняя граница	
Рisperидон				
AUC_{0-t}	101,61%	91,39%	112,98%	18,32%
C_{max}	97,82%	91,12%	105,02%	12,29%
C_{max}/AUC_{0-t}	96,27%	88,69%	104,50%	14,21%
Оланзапин				
AUC_{0-t}	104,08%	89,32%	121,29%	26,72%
C_{max}	104,81%	95,79%	114,68%	15,59%
C_{max}/AUC_{0-t}	100,70%	87,11%	116,42%	25,29%
Кветиапин				
AUC_{0-t}	103,98%	93,24%	115,84%	22,17%
C_{max}	104,29%	90,03%	120,80%	30,15%
C_{max}/AUC_{0-t}	100,30%	92,96%	108,33%	15,59%

Безопасность

Наличие нежелательных эффектов препаратов оценивалось по жалобам добровольцев, а также по данным физикального осмотра, оценки основных жизненных показателей и регистрации ЭКГ в 12 отведениях.

Наибольшее количество нежелательных явлений наблюдалось у добровольцев после однократного приёма препаратов рисперидона в дозе 4 мг. За время исследования в общей сложности у 18 участников зарегистрировано 86 нежелательных явлений — от одного до девяти у каждого добровольца. Нежелательные явления наблюдались как после приёма исследуемого препарата РИСПЕРИДОН производства ЗАО «Северная звезда», Россия (47 нежелательных явлений, или 54,7% от общего числа задокументированных НЯ), так и после приёма препарата сравнения РИСПОЛЕПТ производства «Янссен Фармацевтика Н.В.», Бельгия (39 нежелательных явлений, или 45,3% от общего их числа) и

были расценены исследователями как «вероятно» или «отдаленно» имеющими связь с приёмом исследуемых препаратов. Наиболее частыми нежелательными явлениями после приёма препаратов рисперидона были сонливость (25 случаев), заложенность носа (20 случаев), головокружение (10 случаев), учащенное сердцебиение (6 случаев), артериальная гипертензия (4 случая) и гипотония (3 случая), в единичных случаях наблюдались тошнота, заторможенность, чувство тревоги, нарушение сна, бессонница, слабость, тяжесть в голове, сухость во рту, чувство нехватки воздуха, угнетенное настроение, апатия, дизартрия. Ни одно из нежелательных явлений не было серьезным и не потребовало назначения дополнительной терапии. Все нежелательные явления прекратились без последствий.

После однократного приёма препаратов оланзапина в дозе 10 мг из 18 включенных в исследование добровольцев (популяция безопасности), 12 человек

сообщили о 31 нежелательном явлении как после приёма исследуемого препарата ОЛАНЗАПИН (ЗАО «Северная звезда», Россия), так и после приёма препарата сравнения ЗИПРЕКСА® (Эли Лилли энд Компани Лимитед, Великобритания). В группе исследуемого препарата было задокументировано 13 (41,9%) нежелательных явлений, в то время как в группе сравнения — 18 (58,1%). Наиболее частыми нежелательными явлениями были «слабость», «сонливость» и «головокружение». У трёх добровольцев наблюдалась гипотония средней степени тяжести. Все наблюдаемые у добровольцев нежелательные явления были расценены как «связанные» с приёмом исследуемого препарата или препарата сравнения. Все наблюдаемые нежелательные явления носили несерьезный характер и прекращались без использования дополнительной терапии.

После приёма препаратов кветиапина в дозе 25 мг зарегистрировано 6 нежелательных явлений у 4 добровольцев из 24 (2 из них при приёме исследуемого препарата (33,3%) и 4 — при приёме препарата сравнения (67,7%)). В 5 случаях участники исследования испытывали сонливость, и у одного добровольца наблюдалась заторможенность. Данные нежелательные явления были расценены исследователем как несерьезные, лёгкие и связанные с приёмом препарата. Все зарегистрированные нежелательные явления разрешились без последствий.

По данным дополнительных методов исследований нежелательных явлений выявлено не было.

Таким образом, все нежелательные явления, зарегистрированные после приёма препаратов рисперидона, оланзапина и кветиапина, были связаны с приёмом исследуемых препаратов и обусловлены фармакологическим действием последних.

Заключение

Рассчитанные в процессе статистического анализа 90%-ные доверительные интервалы для отношений логарифмически преобразованных значений AUC_{0-t} , C_{max} и C_{max}/AUC_{0-t} в исследовании препаратов рисперидона составили, соответственно, 91,39—112,98%; 91,12—105,02% и 88,69—104,50%, в исследовании препаратов оланзапина 89,32—121,29%; 95,79—114,68% и 87,11—116,42% и в исследовании препаратов кветиапина 93,24—115,84%; 90,03—120,80% и 92,96—108,33%. Полученные результаты удовлетворяют общепринятому критерию биоэквивалентности — границы доверительных интервалов для параметра AUC_{0-t} должны находиться в диапазоне 80—125%, для C_{max} и C_{max}/AUC_{0-t} — в диапазоне 75—133%. Следовательно, биоэквивалентность препаратов РИСПЕРИДОН, ОЛАНЗАПИН и КВЕТИАПИН производства ЗАО «Северная звезда», Россия и соответствующих им оригинальных препаратов РИСПОЛЕПТ («Янссен Фармацевтика Н.В.», Бельгия), ЗИПРЕКСА® (Эли Лилли энд Компани Лимитед, Великобритания) и СЕРОКВЕЛЬ (АстраЗенека ЮК Лтд, Великобритания) следует считать установленной.

На основании анализа безопасности при проведении исследований биоэквивалентности препаратов — атипичных антипсихотиков производства ЗАО «Северная звезда», Россия, можно сделать вывод, что исследуемые препараты обладают сопоставимым профилем безопасности в сравнении с соответствующими оригинальными лекарственными средствами.

Литература

1. Методические указания Минздравсоцразвития Российской Федерации от 12 мая 2008 г. «Оценка биоэквивалентности лекарственных средств».
2. Петров Я. Создание брендированных дженериков как вариант развития портфеля российских производственных фармкомпаний в свете ФЦП «Фарма—2020». Обзор российского рынка брендированных дженериков // *Inpharmacia*. 2011. Т. 5, № 92. С. 9–15.
3. Ястребов Д.В., Аведисова А.С. Некоторые аспекты терапии атипичными антипсихотическими препаратами на примере оланзапина // Современная терапия в психиатрии и неврологии. 2012. Т. 2. С. 10–14.
4. Национальный стандарт РФ ГОСТ Р 52379-2005 «Надлежащая клиническая практика».
5. Федеральный закон «Об обращении лекарственных средств» в ред. Федеральных законов от 27.07.2010 №192-ФЗ, от 11.10.2010 №271-ФЗ, от 29.11.2010 №313-ФЗ.

ВЭЖХ определение, фармакокинетика и относительная биодоступность левофлоксацина производства ООО «ОЗОН», Россия

Кондратенко С.Н., Стародубцев А.К., Сенник Е.А., Дралова О.В., Кудинова С.Н.

Кафедра клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней,
отдел метаболического синдрома НИЦ ГБОУ ВПО

Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, г. Москва

Резюме

Описана простая, специфичная, чувствительная и хорошо воспроизводимая методика количественного определения левофлоксацина в плазме крови с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ-спектрофотометрическим детектированием. С помощью настоящей методики изучена фармакокинетика и относительная биодоступность отечественного воспроизведённого препарата левофлоксацин у 18 здоровых добровольцев после однократного перорального приёма в дозе 500 мг. Установлено, что тестируемый препарат левофлоксацин (ООО «Озон», Россия) является биоэквивалентным препарату сравнения Таваник® («Санофи Винтроп Индустрия», Франция).

Ключевые слова: левофлоксацин, ВЭЖХ, плазма крови, фармакокинетика, биодоступность, биоэквивалентность, воспроизведённые препараты, дженерик.

HPLC determination, pharmacokinetics and relative bioavailability of levofloxacin produced by «OZONE», Russia

Kondratenko S.N., Starodubtcev A.K., Senik E.A., Dralova O.V., Kudinova S.N.

Department of Clinical Pharmacology and Internal Medicine propaedeutic department metabolic syndrome SIC Medical University

First Moscow State Medical University. IM Sechenov, Moscow

Summary

A simple, specific, sensitive and reproducible good method for quantitative determination of Levofloxacin in plasma using HPLC with UV-spectrophotometric detection. With this technique the pharmacokinetics and relative bioavailability of domestic generic of levofloxacin in 18 healthy volunteers after a single oral dose of 500 mg. Found that the drug being tested, levofloxacin (OOO «Ozone», Russia) is bioequivalent to the reference drugs Tavanic® («Sanofi Winthrop Industry», France).

Keywords: levofloxacin, HPLC, blood plasma, pharmacokinetics, bioavailability, bioequivalence, generic drugs, generic

Введение

Левофлоксацин — синтетический антибактериальный препарат широкого спектра действия из группы фторхинолонов, содержащий в качестве активного вещества левовращающий изомер офлоксацина, широко применяемый в лечении инфекций лёгкой и средней тяжести у взрослых в виде таблеток под фирменным названием Таваник®.

Левофлоксацин (ООО «ОЗОН», Россия) — новый отечественный препарат-дженерик, содержащий в одной таблетке, покрытой плёночной оболочкой, 500 мг левофлоксацина. Создание воспроизведённых препаратов предполагает обязательное проведение

фармакокинетических исследований, а также оценку их биоэквивалентности оригинальному лекарственному препарату, которая является основным видом медико-биологического контроля качества дженериков [1].

Цель исследования

Целью настоящего исследования явилось изучение фармакокинетики, относительной биодоступности и биоэквивалентности препарата левофлоксацин (ООО «ОЗОН», Россия) в сравнении с его утверждённым аналогом в России Таваник® («Санофи Винтроп Индустрия», Франция).

Материалы и методы

В фармакокинетическое исследование было включено 18 здоровых добровольцев: 11 мужчин и 7 женщин в возрасте от 18 до 40 лет (средний возраст $24,6 \pm 1,6$ лет). Чтобы избежать периодических эффектов и исключить межвидовую вариабельность исследование проводили по открытой рандомизированной перекрёстной схеме. Рандомизация проводилась методом генерации случайных чисел с использованием статистической программы SAS v9.0. В процессе рандомизации каждому добровольцу, включённому в исследование, присваивался рандомизационный номер, который определял последовательность приёма исследуемого препарата и препарата сравнения (T/R или R/T) и в ходе исследования не изменялся.

В 8.30 — 9 ч утра добровольцам в локтевую вену вводился индивидуальный гепаринизированный катетер, отбиралась проба крови (исходная). Затем добровольцы принимали таблетку (500 мг) одного из исследуемых препаратов в соответствии с планом рандомизации в присутствии медицинского персонала, запивая 200 мл кипячёной воды комнатной температуры. Взятие проб крови на изучение содержания левофлоксацина осуществлялось в дискретные интервалы времени: через 0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 24 и 36 ч после приёма одного из сравниваемых препаратов в объёме примерно 5 мл каждый образец. На протяжении первых 12-ти ч пробы крови отбирались с помощью индивидуального гепаринизированного катетера, установленного в локтевую вену, затем катетер удалялся, и забор крови через 24 и 36 ч после приёма препаратов осуществлялся посредством разовой венопункции. Всего за 2 этапа исследования у 18 добровольцев было получено 576 образцов. Стандартный лёгкий завтрак допускался лишь через 3 ч после приёма препарата. Период вымывания препарата между этапами составил 7 дней.

Концентрацию левофлоксацина в плазме крови добровольцев определяли методом обращённофазной высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ-спектрофотометрическим детектированием. За основу нами была выбрана методика *Flor S.C. с соавт.* [2], которая была модифицирована. Количественное определение левофлоксацина в плазме крови осуществляли следующим образом.

Реактивы. Субстанция левофлоксацина (ЗАО «Активный компонент» Россия) серия 40409, хлороформ для хроматографии («Химмед», Россия), ацетонитрил для хроматографии («Химмед», Россия), метанол для жидкостной хроматографии («Labscan», Ирландия), гексансульфоновый натрий, гидрофосфат натрия, дигидрофосфат натрия («Sigma», США), кислота ортофосфорная («Химмед», Россия), вода бидистиллированная. Стандартные растворы левофлоксацина готовили растворением в метаноле, хранили при 4°C.

Обработка биопроб. К 0,5 мл плазмы крови добавляли 250 мкл фосфатного буферного раствора (pH=7) и 5 мл хлороформа, экстрагировали 15 мин при интенсивном встряхивании в завинчивающихся пробирках. Затем водный и органический слои разделяли центрифугированием (10 мин при 4500 об/мин). После чего плазму крови отбрасывали с помощью «ловушки», а органическую фазу количественно переносили в коническую колбу и упаривали досуха под вакуумом с помощью роторного испарителя при температуре 37°C. Сухой остаток растворяли в 250 мкл элюента, перемешивали на Vortex-мешалке 60 секунд. Затем пробу фильтровали через мембранный фильтр с диаметром пор 0,22 мкм, аликвоту (25 мкл) наносили на колонку хроматографа.

Хроматографический анализ. Анализ проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе «Hewlett-Packard» (США) с УФ-спектрофотометрическим детектором с переменной длиной волны Series 1050 при длине волны 310 нм и аттенюации 4–5. Использовалась обращённофазная хроматографическая колонка μ Bondapak™ C18, 10 мкм, 3,9×150 мм («Waters», США).

Элюирование проводили мобильной фазой, состоящей из ацетонитрила, метанола и раствора солевого буфера в объёмном соотношении 12:35:53, доведённой до pH=3 ортофосфорной кислотой. Солевой буфер готовили растворением в 1 л бидистиллированной воды 2,68 г дигидрофосфата натрия и 30,8 мг гексансульфонового натрия.

Полученный элюент перед анализом фильтровали через мембранный фильтр с диаметром пор 0,22 мкм и дегазировали под вакуумом. Разделение проводили при комнатной температуре. Скорость элюирования составляла 1 мл/мин, время удерживания левофлоксацина — $3,1 \pm 0,2$ мин. Хроматограмма стандартного раствора левофлоксацина представлены на рис. 1, а хроматограммы плазмы крови добровольца — на рис. 2.

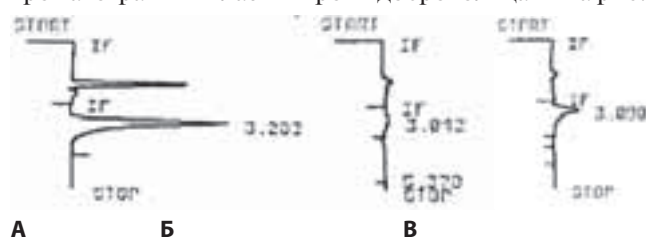


Рис. 1. Хроматограмма стандартного раствора левофлоксацина (1 мкг/мл).



Рис. 2. Хроматограммы проб плазмы крови добровольца (А — до приёма препарата левофлоксацин; Б — через 0,25 ч; В — через 2,5 ч после приёма препарата левофлоксацин).

Количественное определение левофлоксацина в плазме крови проводили методом абсолютной калибровки. Калибровку проводили следующим образом. К 0,5 мл плазмы крови, не содержащей препарата, добавляли такие количества стандартного раствора левофлоксацина, чтобы его концентрация соответствовала диапазону концентрации в плазме крови пациентов при обычном режиме дозирования [3, 4] (0, 0,1, 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 5, 7, 10 и 13 мкг/мл). Далее поступали в соответствии с описанной методикой.

В указанном диапазоне концентраций калибровочная зависимость была линейной, коэффициент детерминации $r^2 = 0,995644$, уравнение регрессии имело вид:

$$y = -0,2135 + 0,0048 \times x$$

где y — концентрация левофлоксацина в плазме крови (мкг/мл);

x — площадь хроматографического пика левофлоксацина.

Метрологические характеристики методики. Относительная погрешность среднего результата (точность методики) составляет 6,0; 14,4; 6,6 и 5,7%, а стандартное отклонение среднего результата (воспроизводимость) составляет 0,02; 0,12; 0,16 и 0,31 мкг/мл (или 2,4; 6,0; 2,6 и 2,2%) соответственно для концентрации левофлоксацина 0,8; 2,0; 6,0 и 14,0 мкг/мл плазмы крови. Рассчитанные метрологические характеристики не превышают критических значений. Истинное содержание левофлоксацина в пробах находится в рассчитанных доверительных границах, а разработанная методика количественного определения левофлоксацина в плазме крови свободна от систематических ошибок.

Проведённое исследование по валидации аналитической методики количественного определения левофлоксацина в плазме крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с спектрофотометрическим детектированием показало, что эффективность экстракции левофлоксацина из плазмы крови составляет $77,4 \pm 1,3\%$, чувствительность метода анализа составляет 0,1 мкг/мл, воспроизводимость, точность и достоверность результатов анализа с учётом критериев приемлемости достигается во всём интервале концентрации (0,1 — 13,0 мкг/мл плазмы). Поэтому представленная методика количественного определения левофлоксацина в плазме крови была использована для проведения клинического фармакокинетического исследования препаратов левофлоксацина.

Препараты. Тестируемый препарат — левофлоксацин — таблетки, покрытые плёночной оболочкой, по 500 мг, производства ООО «Озон», Россия. Серия препарата 011210, срок годности до 01.2014 г.

Препарат сравнения — Таваник® — таблетки, покрытые оболочкой, по 500 мг, производства «Санофи Винтроп Индустрия», Франция. Серия препарата 0Н14F, срок годности до 01.2016.

Фармакокинетические параметры рассчитывали модельно-независимым методом статистических моментов с помощью программы «M-IND» для персонального компьютера [5]. Рассчитывали следующие внемоделльные параметры: максимальную концентрацию $C_{\max}$, время её достижения $T_{\max}$, площадь под фармакокинетической кривой в пределах от момента введения до момента отбора последней пробы крови AUC_{0-t} и в пределах от момента введения до бесконечности $AUC_{0-\infty}$, общий клиренс препарата Cl_t , период полуэлиминации $T_{1/2}$, среднее время удержания препарата в организме MRT , объём распределения препарата V_z . Рассчитывали также отношение максимальной концентрации к площади под фармакокинетической кривой $C_{\max}/AUC_{0-t}$, разности между значениями $T_{\max}$ для тестируемого препарата и препарата сравнения (как характеристики скорости всасывания), относительную скорость всасывания (как отношение значений $C_{\max}/AUC_{0-t}$ тестируемого препарата и препарата сравнения), относительную биодоступность f , относительную степень всасывания f' , отношение максимальных концентраций f'' препарата левофлоксацин (ООО «Озон», Россия) по сравнению с препаратом Таваник® («Санофи Винтроп Индустрия», Франция). Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программы «InStat» для персонального компьютера.

Результаты и их обсуждение

Динамика усреднённых значений концентрации левофлоксацина (среднее значение $\pm$ стандартное отклонение среднего) в плазме крови здоровых добровольцев после однократного перорального приёма препаратов левофлоксацин и Таваник® представлена на рис. 3.

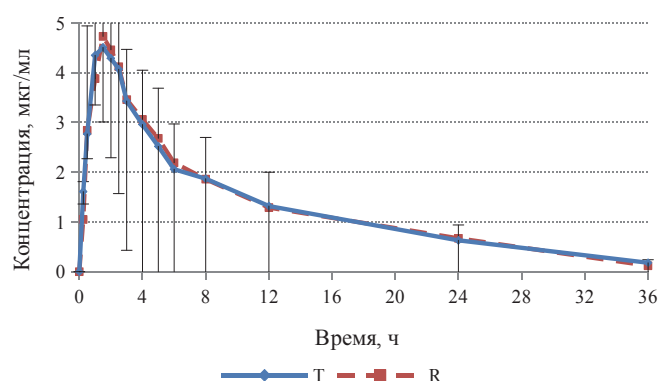


Рис. 3. Усреднённые фармакокинетические кривые препаратов левофлоксацин (Т) и Таваник® (R)

Значения концентрации левофлоксацина в плазме крови добровольцев для каждого момента времени статистически достоверно не различаются для исследуемых препаратов, а профили усреднённых фармакокинетических кривых практически совпадают. После приёма как тестируемого препарата, так и препарата

сравнения левофлоксацин быстро всасывался из желудочно-кишечного тракта в системный кровоток, через 0,25 часа уже регистрировался в плазме крови добровольцев ($1,61 \pm 0,29$ и $1,05 \pm 0,18$ мкг/мл, соответственно), достигая максимального уровня к 1,5 ч ($4,51 \pm 0,42$ и $4,73 \pm 0,40$ мкг/мл, соответственно), затем препарат медленно выводился из организма, и через 36 ч после приёма ещё обнаруживался в плазме добровольцев в незначительном количестве ($0,18 \pm 0,05$ и $0,12 \pm 0,03$ мкг/мл, соответственно). Наблюдался умеренный разброс индивидуальных значений концентрации (C.V.=26–55%), за исключением стадии всасывания (0,25–0,5 ч), где коэффициент вариации несколько выше (65–77%).

В табл. 1 представлены результаты расчётов фармакокинетических параметров препаратов левофлоксацин и Таваник®. Результаты приведены в виде среднего значения $\pm$ стандартная ошибка среднего.

Таблица 1

**Фармакокинетические параметры
препаратов Левофлоксацин и Таваник®**

Параметры	Левофлоксацин	Таваник
C_{max} , мкг/мл	$5,47 \pm 0,36$	$5,44 \pm 0,33$
T_{max} , ч	$1,44 \pm 0,14$	$1,47 \pm 0,15$
AUC_{0-t} , мкг·ч/мл	$46,03 \pm 3,51$	$46,07 \pm 3,87$
$AUC_{0-\infty}$, мкг·ч/мл	$50,15 \pm 3,58$	$50,47 \pm 3,90$
Cl_r , л/ч	$11,02 \pm 0,97$	$11,10 \pm 0,95$
$T_{1/2}$, ч	$10,2 \pm 0,8$	$10,2 \pm 0,7$
MR_r , ч	$14,1 \pm 1,0$	$13,8 \pm 0,9$
V_z , л	$165,0 \pm 19,0$	$166,7 \pm 19,4$
C_{max}/AUC_{0-t} , 1/ч	$0,123 \pm 0,007$	$0,124 \pm 0,006$

Как видно из представленных данных, значения всех фармакокинетических параметров изученных препаратов статистически достоверно не различаются, а разброс индивидуальных значений идентичен для двух препаратов. Полученные нами данные аналогичны литературным [3, 4].

Значения C_{max}/AUC_{0-t} для изученных препаратов статистически достоверно не различаются. Разности между значениями T_{max} для тестируемого препарата и препарата сравнения близки к 0, среднее значение составляет $0,03 \pm 0,19$ ч. Приведённые данные свидетельствуют о том, что скорости всасывания препаратов левофлоксацин и Таваник® статистически достоверно не различаются.

Значения относительной биодоступности (f) препарата левофлоксацин по сравнению с препаратом Таваник® у всех добровольцев находятся в диапазоне 85,6–118,6%, имеет место незначительный разброс индивидуальных значений относительной биодоступности (C.V.=10%). Среднее значение относительной биодоступности препарата левофлоксацин составляет $100,40 \pm 2,32\%$, среднее геометрическое — 99,95%.

Индивидуальные значения относительной степени всасывания (f') препарата левофлоксацин по сравнению с препаратом Таваник® у всех добровольцев варьируют в диапазоне 80,4–130,2%, разброс индивидуальных значений относительной степени всасывания незначительный (C.V.=12%). Среднее значение относительной степени всасывания препарата левофлоксацин составляет $101,56 \pm 2,95\%$, среднее геометрическое значение — 100,83%.

Индивидуальные значения отношения максимальных концентраций (f'') препаратов левофлоксацин и Таваник® у всех добровольцев находятся в пределах 80,8–140,9%. Среднее значение отношений максимальных концентраций препаратов левофлоксацин и Таваник® составляет $101,70 \pm 4,45\%$, среднее геометрическое значение — 100,17%. Наблюдается незначительный индивидуальный разброс значений отношений максимальных концентраций, коэффициент вариации не превышает 19%.

Индивидуальные значения относительной скорости всасывания препарата левофлоксацин по сравнению с препаратом Таваник® у всех волонтеров находятся в пределах 79,7–136,4%, разброс индивидуальных значений относительной скорости всасывания незначительный (C.V.=16%). Среднее значение относительной скорости всасывания препарата левофлоксацин составляет $100,45 \pm 3,81\%$, среднее геометрическое значение — 99,29%.

Доверительные интервалы для C_{max} , AUC_{0-t} , C_{max}/AUC_{0-t} составляют соответственно 0,930–1,060; 0,958–1,062; 0,935–1,096, т.е. не выходят за допустимые границы [1].

Таким образом, не выявлено статистически достоверных различий в процессах всасывания, распределения и элиминации двух препаратов, а также в их относительной биологической доступности. В связи с этим может быть сделан вывод о том, что препараты левофлоксацин (ООО «Озон», Россия) и Таваник® («Санофи Винтроп Индустрия», Франция) биоэквивалентны по фармакокинетическим показателям.

Литература

1. Методические рекомендации по проведению качественных клинических исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов «Оценка биоэквивалентности лекарственных средств». Москва, 2008. 32 с.
2. Flor S.C., Rogge M.C., Chow A.T. Bioequivalence of oral and intravenous ofloxacin after multiple-dose administration to healthy male volunteers. // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1993. vol. 37, № 7. P. 1468–1472.
3. Janssen-Ortho Inc. Product Monograph Levavlin (levofloxacin). Antimicrobial Agent. Control №:105554. 2006. P. 44–46.
4. Падейская Е.Н., Яковлев В.П. Антимикробные препараты группы фторхинолонов в клинической практике. Москва, Логата. 1998. 351 с.
5. Агафонов А.А., Пиотровский В.К. Программа M-IND оценки системных параметров фармакокинетики модельно-независимым методом статистических моментов. // Хим.-фарм. журнал. 1991. №10. С. 16 — 19.

Биоэквивалентность бисопролола, таблетки покрытые оболочкой 10 мг АО «Химфарм», Республики Казахстан

*Будач Я.М.¹, Курилов О.Э.¹, Сариев А.К.², Абаймов Д.А.², Ширяева М.В.²,
Стырова Е.Ю.², Алтынбеков С.А.³, Джолдыгулов Г.А.³, Серяков В.Н.³, Алтынбеков К.С.³*

¹ — АО «Химфарм», Республика Казахстан

² — ФГБУ «Научный центр неврологии» РАМН, Москва

³ — РГКП «Республиканский научно-практический центр психиатрии, психотерапии и наркологии» МЗ Республика Казахстан

Резюме

В рамках перекрёстного, однократного, открытого, рандомизированного исследования с 10 дневным периодом отмычки, с двумя последовательностями была изучена биоэквивалентность двух таблетированных форм бисопролола на 18 добровольцах (дозировка 10 мг). Образцы плазмы крови анализировали валидированным методом ВЭЖХ-МС/МС в течение 48 часов. Для анализируемых препаратов рассчитаны следующие фармакокинетические параметры: AUC_{0-t} , C_{max} , t_{max} , C_{max}/AUC . 90% доверительный интервал для логарифмически преобразованных значений для AUC_{0-t} составил 0,9142 — 1,0568 и для C_{max} — 0,9371 — 1,0473. По результатам исследования был сделан вывод о биоэквивалентности сравниваемого препарата бисопролола.

Ключевые слова: бисопролол, биоэквивалентность, фармакокинетика

Bioequivalence of bisoprolol, coated tablets 10 mg

JSC «Chimpharm» Republic of Kazakhstan

Budach Y.M.¹, Kurilo O.E.¹, Sariev A.K.², Abaimov D.A.², Shiryayev M.V.², Styrova E.Y.², Altynbekov S.A.³, Dzholdygulov G.A.³, Seryakov V.N.³, Altynbekov K.S.³

¹ — JSC «Chimpharm» Republic of Kazakhstan

² — FGBI «Neurology Research Center», RAMS

³ — State Enterprise «Republican Scientific and Practical Centre for Psychiatry, Psychotherapy and Addiction» MoH Republic of Kazakhstan

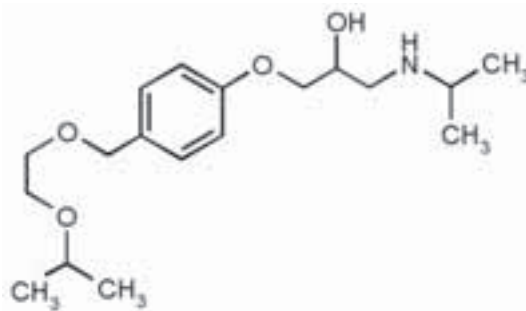
Summary

Within the cross, a single, open, randomized study with 10 day washout period, the two sequences has been studied bioequivalence of tablet forms two bisoprolol 18 volunteers (10 mg dosage). Plasma samples were analyzed by a validated HPLC-MS/MS within 48 hours. For preparations analyzed following pharmacokinetic parameters were calculated: AUC_{0-t} , C_{max} , T_{max} , C_{max}/AUC . 90% confidence interval for log-transformed values for AUC_{0-t} was 0.9142—1.0568 for C_{max} —0.9371—1.0473. The study concluded that comparable drugs were bioequivalence of bisoprolol.

Keywords: bisoprolol, bioequivalence, pharmacokinetics

Введение

Известно, что в клинической практике препараты, которые содержат одно и то же действующее активное вещество, но разработанные различными фармацевтическими производителями, могут существенно отличаться по фармакологической активности. Нередко это обусловлено различием ингредиентного состава вспомогательных веществ, содержащихся в твёрдой лекарственной форме [6]. Во всём мире для подтверждения одинаковой терапевтической активности воспроизводимых препаратов проводятся исследования биоэквивалентности. При этом в качестве основного критерия выбирается достаточно «близкая» биодоступность изучаемых



1-/-/2-(1-метил-этокси) этокси/метил/фенок-
си/-3-/(1-метилэтил) amino/-2-пропанол
(в виде фумарата), мол. масса — 325.443 г/моль

Рис. 1. Структурная химическая формула бисопролола

лекарственных средств. В этой связи, целью настоящей работы являлось исследование биоэквивалентности воспроизведённого лекарственного препарата Бисопролола таблетки, покрытые оболочкой 10 мг (Т, test — АО «Химфарм», Республика Казахстан) в сравнении с Конкором® (R, standart — «Мерк КГаА.» Германия).

Материалы и методы исследования

Исследуемые препараты

В качестве тест-препарата (Тест; Т) был использован Бисопролол таблетки, покрытые оболочкой (производитель — АО «ХИМФАРМ», Республика Казахстан), в качестве препарата-сравнения (Референс; R) использовался препарат Конкор® таблетки, покрытые оболочкой («Мерк КГаА.», Германия).

Дизайн исследования

Дизайн исследования соответствовал утверждённому протоколу исследования (№ *BEq-Bis-02-2013*, Версия 1.0 от «24» январь 2013г.), а также требованиям «Надлежащей клинической практики» (GCP) [1, 2, 3, 4, 8]. 18 здоровых волонтеров молодого возраста мужского (n=7) и женского (n=11) пола (возраст — $35,2 \pm 7,4$ лет, массы тела — $68,7 \pm 13,4$ кг) после подписания информированного согласия были направлены в клиническую базу РГКП «Республиканский научно-практический центр психиатрии, психотерапии и наркологии» МЗ Республики Казахстан. Там они были разделены на 2 группы случайным образом, согласно схеме рандомизации. Все участники были проверены на наличие наркотических веществ и алкоголя, кроме того, волонтерам женского пола был проведён тест на беременность. Общий анализ крови, биохимия и ЭКГ были проведены дважды: до начала исследования и в последний визит (в конце второго этапа исследования). В оба периода исследования участники находились в исследовательском центре непрерывно в течение 48 ч. Период «отмывки» (wash-out) между этапами составлял 10 дней (1 этап — 18.04.2013; 2 этап — 29.04.2013). На обоих этапах исследования отбор образцов крови (5 мл) производился: до введения дозы (0 ч), и в течение 48 часов после введения препарата. Взятие образцов крови для последующего определения содержания бисопролола в плазме крови осуществлялось в дискретные интервалы времени 0; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 6,0; 8,0; 12,0; 24,0 и 48,0 ч после приёма препаратов. Перед каждым отбором крови больной находился в течение 5 минут в лежачем положении. Кровь была взята из локтевой вены (с нулевого фона до 4 ч, путём катетеризации локтевой вены) и с 6 по 48 ч. одноразовыми шприцами в количестве 5-10 мл в стеклянные пробирки с добавлением гепарина. Образцы крови отстаивались в течение 15 мин в условиях комнатной температуры, затем путём центрифугирования (3000 об/мин в течение 10 мин) получали плазму крови. Плазма хранилась при температуре -24°C. Приготовление стандартных растворов бисопролола осуществлялось в плазме крови.

Аналитический метод

Для количественного определения бисопролола применяли метод [9] с модификациями.

Растворители, реактивы и материалы

Все реактивы, использованные в работе, имели характеристики чистоты не ниже х.ч., растворители имели маркировку HPLC-grade.

Приготовление образцов для анализа

Для приготовления растворов стандартных образцов использовали субстанции стандартов бисопролола (производитель «Аревифарма GmbH», Германия, серия 4047807) и метопролола (производитель «Ипка Лабораториз Лимитед», Индия, серия 001505RI). Для количественного определения готовили маточные растворы стандартов бисопролола и метопролола в метаноле с концентрациями 1 мг/мл. Раствор бисопролола применяли для приготовления растворов рабочих стандартных образцов на плазме крови с концентрациями 0,78 нг/мл; 1,56 нг/мл; 3,125 нг/мл; 6,25 нг/мл; 12,5 нг/мл; 25 нг/мл; 50 нг/мл, 100 нг/мл. Раствор внутреннего стандарта с концентрацией 1 мг/мл разбавляли в 400 раз для получения рабочего раствора метопролола с концентрацией 2,5 мкг/мл.

Экстракция бисопролола из плазмы крови

Жидкостную экстракцию бисопролола и метопролола осуществляли согласно *Peste G. et al., 2009* [9]. К 0,5 мл плазмы с содержащимися в ней аналитом добавляется 50 мкл раствора внутреннего стандарта с концентрацией 2,5 мкг/мл для достижения конечной концентрации 250 нг/мл. Затем плазму крови подщелачивали 0,5 мл 0,1 М NaOH, образец перемешивали. Далее к образцу добавляли 5 мл диэтилового эфира, полученную смесь встряхивали на вибромиксере на скорости 2000 об/мин в течение 5 мин. Далее образцы центрифугировали для разделения слоёв в течение 5 мин, надосадочный органический слой декантировали и упаривали в вакуумном центрифужном концентраторе при температуре 45°C. Сухой остаток растворяли в 0,5 мл метанола и инжестировали в петлю хроматографа в объёме 10 мкл.

Хромато-масс-спектрометрический анализ

Насос — «Finnigan Surveyor LC Pump Plus». Детектор — масс-спектрометрический детектор «LCQ Fleet MS» (квадрупольная ионная ловушка). Аналитическая колонка — Hypersil Gold C18 фирмы Thermo Electron Corp., США (100×4,6 мм; 5 мкм). Подвижная фаза состояла из двух растворов: 10 mM ацетат аммония (раствор А) и ацетонитрил — 10 mM ацетат аммония (90:10) (раствор Б), взятых в соотношении 15%А:85%Б, работа проводилась в изократическом режиме элюирования. Скорость потока подвижной фазы 0,6 мл/мин. Объём пробы — 10 мкл. Температура разделения 25°C. Продолжительность хроматографирования — 8 минут. Время удерживания аналита — 4,95 мин. Время удерживания внутреннего стандарта (метопролол) — 4,65 мин. Детектирование: масс-спектрометрическое, по дочернему

иону с m/z 116,1 образующемуся в результате распада молекулярного иона биспролола с m/z 326,4 при нормализованной энергии соударений 25 eV (масс-спектр второго порядка для биспролола представлен на рис. 2). Внутренний стандарт (метопролол) детектировали по дочернему иону с m/z 191,0 образующемуся в результате распада молекулярного иона метопролола с m/z 268,4. Масс-спектрометр работал в режиме регистрации ионов, положительно заряженных электропреем (ESI), создаваемым напряжением в 5 кВ. Скорость потока газа-небулайзера (азота): 5 л/мин, давление на распылителе — 100 psi. Температура интерфейса капилляра составляла 350°C, температура нагревателя — 300°C. Амплитуда возбуждения на концевых электродах ловушки 0,1 В. Детектирование проводилось в режиме полного сканирования MS/MS — Full Scan ms^2 , в диапазоне m/z 120-900. В качестве демпфирующего газа в ионной ловушке использовался гелий. Данные обрабатывались с помощью Xcalibur 2.1 w/Foundation 1.0.1.

Метод количественного определения: отношение площадей хроматографических пиков аналита и внутреннего стандарта — концентрация. Метод внутреннего стандарта.

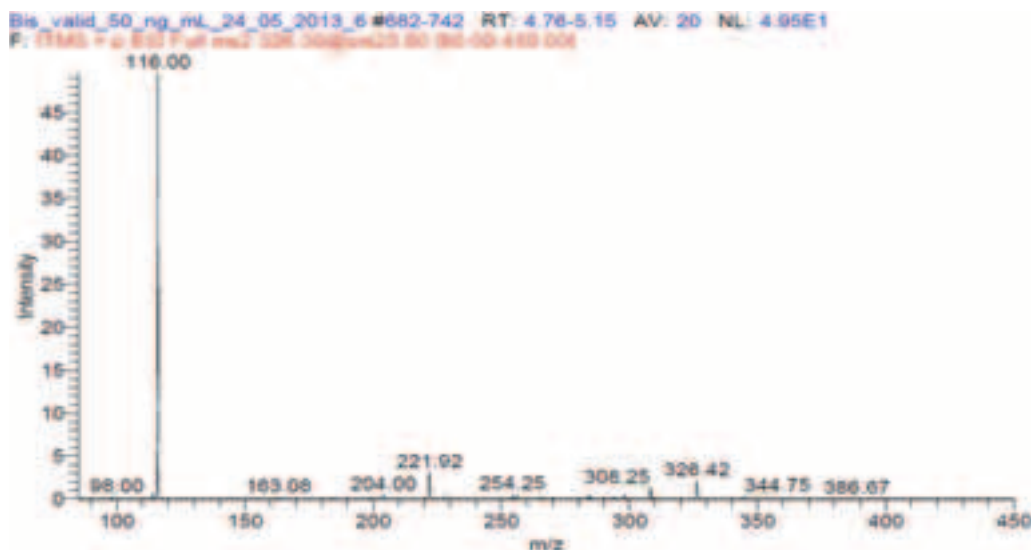
Регрессия: линейная. Метод наименьших квадратов.

Диапазон калибровки: 0,78 — 100 нг/мл. Точность количественного определения биспролола представлена в табл. 1.

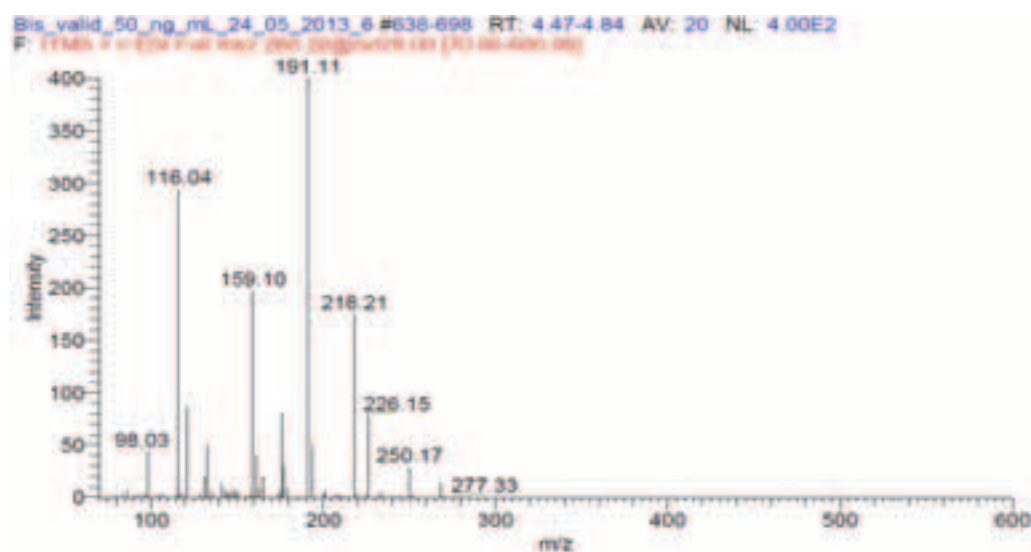
Таблица 1

Точность количественного определения биспролола в течение рабочего дня

Концентрация нг/мл	%C.V.	%dev	n
3,125	7,82	-3,71	6
12,5	5,50	4,27	6
50	6,63	-3,88	6
Предел количественного определения — 0,78 нг/мл			

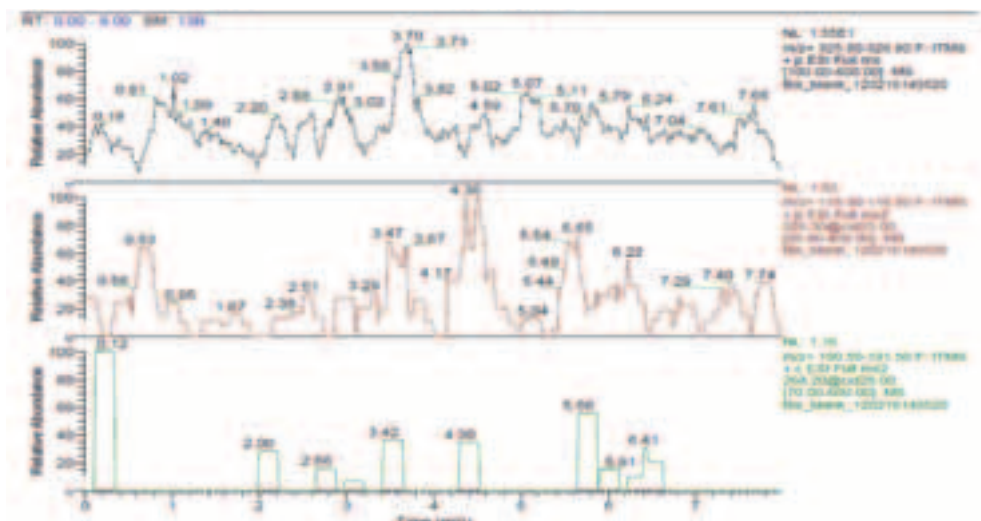


А

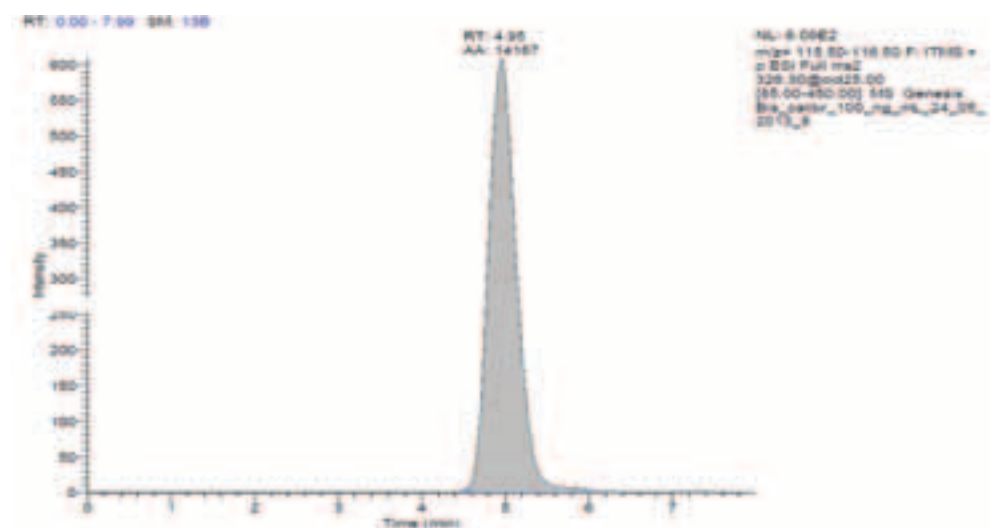


Б

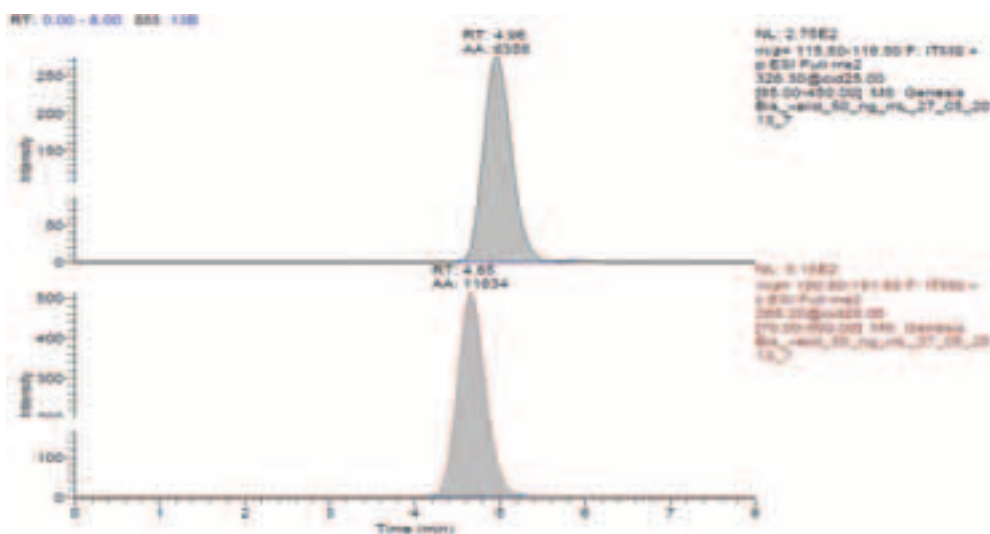
Рис. 2. Масс-спектры второго порядка для биспролола (А) и метопролола (Б)



а — Хроматограмма экстракта интактной плазмы крови (верхнее окно — MS1 m/z 100-800, среднее окно — MS2 биспролола, нижнее окно — MS2 метопролола).



б — Хроматограмма стандартного раствора биспролола с концентрацией 100 нг/мл.



в — Хроматограмма экстракта плазмы крови с концентрацией биспролола 50 нг/мл, верхний пик — пик аналита, нижний пик — пик внутреннего стандарта.

Рис. 3. Хроматограммы экстрактов плазмы крови

Специфичность определения бисопролола: установлено, что матричные эффекты коэкстрактивных веществ из плазмы крови не мешают определению бисопролола и внутреннего стандарта. Типичные хроматограммы интактной плазмы крови, образца бисопролола с концентрацией 25 нг/мл и плазмы крови с концентрацией бисопролола 50 нг/мл представлены ниже (рис. 3а, б, в).

Метод количественного определения: Отношение площадей хроматографических пиков аналитов и внутреннего стандарта — концентрация. Метод внутреннего стандарта.

Регрессия: Линейная. Метод наименьших квадратов.

Диапазон калибровки: 0,625 — 40 нг/мл.

Типичная калибровочная кривая представлена на рис. 4.

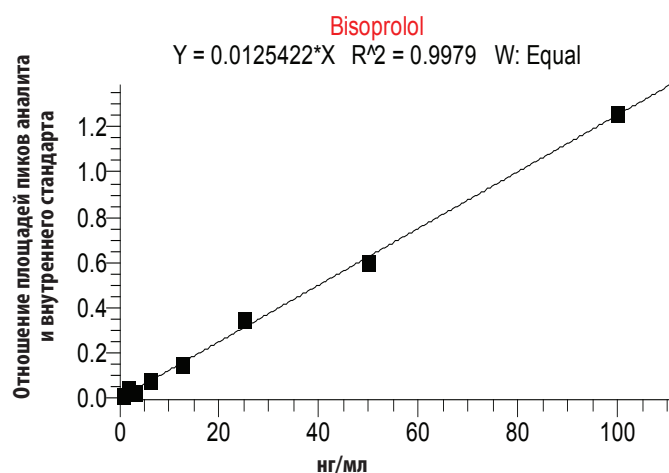


Рис. 4. Калибровочная кривая бисопролола в плазме крови

Градуировочная зависимость бисопролола в плазме крови описывалась формулой:

$$C = 79,731 \times AR$$

где C — концентрация бисопролола (нг/мл), AR (Area Ratio) — отношение площадей пиков аналита и внутреннего стандарта. Коэффициент корреляции составил $R^2 = 0.9979$, что соответствует хорошей аппроксимации [7].

Предел количественного определения — 0,78 нг/мл.

Точность и воспроизводимость

Точность выражалась в виде коэффициента вариации (%C.V.) для каждой серии образцов согласно уравнению:

$$\frac{SD}{\bar{x}} \times 100\%,$$

где SD — стандартное отклонение серии определений;

$\bar{x}$ — среднее арифметическое значение полученных концентраций.

Воспроизводимость измерялась, как процент отклонения (%dev.) от теоретического значения по формуле:

$$\frac{\bar{x} - \mu}{\mu} \times 100\%,$$

где $\bar{x}$ — среднее арифметическое значение полученных концентраций;

μ — теоретическая концентрация.

Метрологическая характеристика среднего результата

$\bar{x}$ — среднее арифметическое значение полученных концентраций;

SD — стандартное отклонение;

$S_{\bar{x}}$ — стандартное отклонение среднего результата;

$\Delta\bar{x}$ — полуширина доверительного интервала ($p=0,95$);

$\varepsilon\%$ — ошибка среднего результата.

Точность в течение рабочего дня

Каждый из образцов, предназначенных для контроля качества, анализировали в течение 1 рабочего дня (6 определений). Также провели контроль во время исследования и после его окончания. Для 3,125 нг/мл средняя точность составила 7,82% C.V. и -3,71% dev. Остальные пробы с концентрациями 12,5 и 50 нг/мл имели точность от 5,50 до 6,63% C.V. Воспроизводимость колебалась от -3,88 до 4,27% dev.

Результаты представлены в табл. 2.

Таблица 2

Точность определения бисопролола в плазме крови в течение рабочего дня

Концентрация добавленная (нг/мл)	3,125	12,5	50
Концентрация найденная (нг/мл)	2,58	12,24	48,05
	3,14	13,16	46,57
	3,19	12,10	50,87
	2,93	13,82	42,62
	3,21	13,68	51,25
	3,01	13,19	48,99
$\bar{x}$	3,01	13,03	48,06
SD	0,24	0,72	3,19
%CV	7,82	5,50	6,63
%dev	-3,71	4,27	-3,88

Метрологические характеристики разработанной методики представлены в таблице 3. Относительная ошибка определения бисопролола не превышала 15%.

Статистическая обработка полученных результатов

Полученные экспериментальные данные подвергнуты математической статистической обработке

Таблица 3

Метрологические характеристики методики определения бисопролола в плазме крови

Взято (нг/мл)	Найдено (нг/мл)						$\bar{x}$	SD	$S_{\bar{x}}$	$\Delta \bar{x}$	$\varepsilon\%$
3,125	2,93	3,21	3,01	2,93	3,34	3,39	3,13	0,20	0,18	0,46	14,57
12,50	13,82	13,68	13,19	13,52	12,58	12,21	13,17	0,64	0,51	1,32	10,04
50,00	42,62	51,25	48,99	45,09	46,72	48,82	47,25	3,10	2,44	6,27	13,28

с помощью программы «Statistica v.6.0». В табл. 4 приведены средние арифметические значения ($\bar{x}$), соответствующие им стандартные отклонения (SD) и стандартные ошибки среднего значения ($S_{\bar{x}}$), коэффициенты вариации (C.V.%). Расчет фармакокинетических параметров анализируемых препаратов был проведен с использованием модельно-независимого метода. В работе кроме ($\bar{x}$) и (SD) приведены коэффициенты вариации (C.V.%) и размах — непараметрический параметр статистики (разность между максимальным и минимальным значениями ряда). Оценка биоэквивалентности проводилась применительно к параметрам AUC_{0-t} , C_{max} (натуральные и логарифмически преобразованные данные) с использованием методов параметрической статистики. В табл. 6 представлены результаты работы анализа вариации ANOVA для различных показателей биоэквивалентности ($\ln AUC_{0-t}$, $\ln C_{max}$). Условием применения является предположение о нормальном распределении изучаемого показателя. Нулевая гипотеза: между средними значениями показателей биоэквивалентности тест- и референс-препарата отсутствуют статистически значимые различия. В качестве источников вариации изучаются межиндивидуальные различия (испытуемые), последовательность получения препаратов и различия между препаратами. Полученные значения сравниваются со значением остаточной вариации с учётом числа степеней свободы (DF). Результаты сравнения отражены в столбце F табл. 5. Для установления статистически значимых различий между средними значениями показателя биоэквивалентности сравниваемых препаратов значение F для строки «препарат» должно превышать соответствующее табличное значение (таблица критерия Фишера для числа степеней свободы (1, n-2) и выбранного уровня значимости α). В нашем случае, для 18 добровольцев табличное значение F критическое равно 4,49 для 5% уровня значимости. Если рассчитанное значение F превосходит табличное значение, нулевая гипотеза об отсутствии значимых различий между средними значениями данного показателя биоэквивалентности может быть отброшена, а различия признаны статистически значимыми на соответствующем уровне значимости.

Рассчитывали парные критерии Стьюдента в предположении отсутствия влияния периода получения препарата и нормального распределения изучаемого показателя. Гипотеза биоэквивалентности принималась, когда 90% доверительный интервал

для отношения среднего значения (μ_T/μ_R) логарифмически преобразованных данных AUC составлял $0,8 < \mu_T/\mu_R < 1,20$ и для C_{max} $0,7 < \mu_T/\mu_R < 1,43$. Границы, этих интервалов, рассчитывались при помощи дисперсионного анализа ANOVA. Расчет 90% доверительных интервалов проводили с использованием программы Bioeqv [5].

Результаты и их обсуждение

На рис. 5 — представлены усреднённые фармакокинетические кривые бисопролола в плазме крови добровольцев после однократного приёма таблеток Бисопролола и Конкора®, где анализируемое лекарственное вещество определяется на протяжении 48 часов.

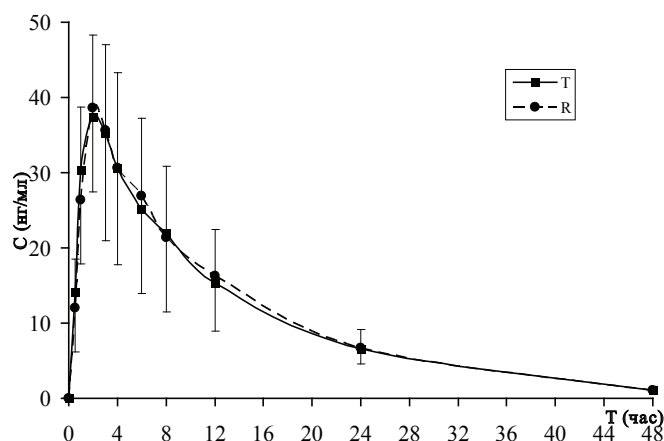


Рис. 5. Усреднённые кинетические кривые бисопролола в плазме крови добровольцев после однократного приёма таблеток БИСОПРОЛОЛА (Т) и таблеток КОНКОРА® (R): (n=18; $\pm$ SD)

Сравнительный анализ основных фармакокинетических параметров (табл. 4) бисопролола после однократного приёма 10 мг таблеток Бисопролола и Конкора® показал, что изучаемые препараты почти с одинаковой скоростью всасываются из желудочно-кишечного тракта (параметр C_{max}/AUC_{0-t} — для Т составил $0,081 \pm 0,018$; для R — $0,080 \pm 0,014$ ч⁻¹; $\bar{x} \pm SD$). Время достижения максимальной концентрации (t_{max}) составило в среднем для Т — $2,11 \pm 0,68$ и для R — $2,28 \pm 1,02$ час, соответственно. При этом средняя максимальная концентрация бисопролола, определяемая в плазме крови добровольцев (C_{max}), составила для препарата Бисопролола — $40,03 \pm 10,74$ нг/мл и для Конкора® — $40,70 \pm 12,86$ нг/мл.

Таблица 4

Фармакокинетические параметры бисопролола у добровольцев после однократного приёма 20 мг бисопролола (Т) и Конкора® (R)

Размерность	AUC _{0-t} (нг/мл×ч)		C _{max} (нг/мл)		t _{max} (ч)		C _{max} / AUC (ч ⁻¹)	
	Т	R	Т	R	Т	R	Т	R
$\bar{x}$	518,42	527,91	40,03	40,70	2,11	2,28	0,081	0,080
SD	190,97	192,51	10,74	12,86	0,68	1,02	0,018	0,014
$S_{\bar{x}}$	45,04	45,40	2,53	3,03	0,16	0,24	0,004	0,003
C.V.%	36,8	36,5	26,8	31,6	32,0	44,7	22,7	17,4
Размах	663,07	628,16	32,73	40,67	2,00	5,00	0,06785	0,05771

Индивидуальный анализ основного параметра, характеризующего степень и скорость всасывания действующего вещества из лекарственной формы — AUC_{0-t} указывает на значительную вариабельность данного параметра (размах для препарата Бисопролола составил 663,07 и для препарата Конкора® — 628,16 нг/мл×ч). Среднее значение AUC_{0-t} для тест-препарата составило 518,42±190,97 и для референс-препарата — 527,91±192,51 нг/мл×ч. Относительная биодоступность таблеток Бисопролола по отношению к таблеткам Конкора®, определяемая отношением соответствующих значений AUC_{0-t}, составила в среднем 0,9978±0,1813 (усреднённые данные на основании точечных индивидуальных оценок). Доверительный интервал для логарифмически преобразованных значений AUC_{0-t} составил 0,9142—1,0568. Степень биодоступности, определяемая отношением соответствующих значений C_{max}, составила 0,9988±0,1313, а доверительный интервал для логарифмически преобразованных значений C_{max} — 0,9371 — 1,0473 (табл. 5). Полученные доверительные интервалы лежат, в установленных «Рекомендациями», пределах, что говорит в пользу биоэквивалентности исследуемых препаратов [5].

Таблица 5

90% доверительные интервалы отношения средних значений (μ_T/μ_R) AUC_{0-t}, C_{max} (логарифмически преобразованные данные), полученные на основе дисперсионного анализа (ANOVA)

Параметры	Нижнее значение	Среднее значение	Верхнее значение
AUC _{0-t}	0,9142	0,9978	1,0568
C _{max}	0,9371	0,9988	1,0473

Дисперсионный анализ также показал, что 2 источника вариации, учитываемых при установлении биоэквивалентности, т.е. «препараты» и «последовательность приёма препаратов» в дисперсионных отношениях F для этих факторов не превосходят табличное значение (табл. 6).

Таблица 6

Результаты дисперсионного анализа фармакокинетических параметров (ln AUC_{0-t} и ln C_{max}), определяющих биодоступность бисопролола из таблеток ln AUC_{0-t}

Источник вариации	SS	DF	MS	F
Препарат	0,003	1	0,003	0,17312
Последовательность	0,021	1	0,021	1,33199
Испытуемые	3,737	17	0,220	14,17685
Остаточная вариация	0,248	16	0,016	-
Общая вариация	4,008	35	-	-

ln C_{max}

Источник вариации	SS	DF	MS	F
Препарат	0,001	1	0,001	0,08666
Последовательность	0,003	1	0,003	0,28815
Испытуемые	2,307	17	0,136	14,88405
Остаточная вариация	0,146	16	0,009	-
Общая вариация	2,456	35	-	-

Обозначения в таблице:

SS — сумма квадратов отклонений;

MS — средний квадрат;

DF — число степеней свободы;

F — рассчитанное значение F-критерия Фишера (при уровне значимости α=5%).

Следует подчеркнуть, что для установления статистически значимых различий между средними значениями показателя биоэквивалентности сравниваемых препаратов значение F для строки «препарат» должно превзойти соответствующее табличное значение (таблица критерия Фишера для числа степеней свободы (1, n-2) и выбранного уровня значимости α). В нашем случае, для 18 пациентов табличное значение F критическое равно 4,49 для P=0,95. Рассчитанное значение F не превосходит табличное значение (для параметра lnAUC_{0-t}

$F = 0,17312$ и для $\ln C_{\max}$ $F = 0,08666$). Следовательно, нулевая гипотеза об отсутствии значимых различий между средними значениями данного показателя биоэквивалентности подтверждается, а различия не признаются статистически значимыми на соответствующем уровне значимости. Из результатов исследования относительной биологической доступности двух препаратов следует, что исследуемый препарат Бисопролол, таблетки, покрытые оболочкой 10 мг, производства АО «ХИМФАРМ», Республика Казахстан является биоэквивалентным препарату сравнения Конкор®, таблетки, покрытые оболочкой 10 мг, производства «Мерк КГаА.» Германия.

Основные выводы

1. Таблетки «Бисопролол» с фармакокинетической позиции являются биоэквивалентным к таблеткам «Конкор®».
2. Результаты сравнительного фармакокинетического исследования позволяют утверждать, что «Бисопролол» и «Конкор®» имеют одинаковую эффективность и переносимость.
3. С учётом основных положений доказательной медицины целесообразность проведения генерической замены препарата «Конкор®» препаратом «Бисопролол» является обоснованной.

Литература

1. Надлежащая клиническая практика, основные положения, СТ РК 1616-2006, Астана, 2006; 68.
2. Национальный стандарт Российской Федерации. Надлежащая клиническая практика, ГОСТ Р.52379-2005, Москва, 2005; 26.
3. Оценка биоэквивалентности лекарственных средств. Москва, 2008; 32.
4. Проведение надлежащих исследований биоэквивалентности лекарственных средств в республике Казахстан, Астана, 2007; 44.
5. Сергиенко В.И., Джеллифф Р., Бондарева И.Б. Прикладная фармакокинетика: основные положения и клиническое применение. Москва, Издательство РАМН, 2003; 208.
6. Соколов А.В., Белоусов Ю.Б., Зырянов С.К., Нечаева Е.Б., Милкина С.Е. Пути обеспечения качества и безопасности генерических лекарственных препаратов. // Фармакокинетика и фармакодинамика, 2012; № 1; 43-49.
7. Сычев К.С. Практическое руководство по жидкостной хроматографии. 2010; с. 216.
8. Handbook For Good Clinical Research Practice (GCP): guidance for implementation, Printed in France, 2005; 132
9. Peste G., Bibire N., Apostu M., Vlase A. and Oniscu C.: A New Liquid Chromatography-Tandem-Mass Spectrometry Method for Determination of Bisoprolol in Human Plasma Samples. // J. of Biomedicine and Biotechnology, 2009, Article ID 736327, 8 pages.

Изучение фармакокинетики трёх лекарственных форм препарата для регенеративной генной терапии повреждений поверхностных тканей человека различной этиологии

Духовлинов И.В.¹, Аль-Шехадат Р.И.¹, Орлов А.И.²

¹ — Общество с ограниченной ответственностью «Фарма Ген»

² — ФГБУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины» СЗО РАМН, г. Санкт-Петербург

Резюме

Целью настоящего исследования явилось сравнение фармакокинетических и фармакодинамических показателей трёх лекарственных форм нового лекарственного препарата на основе плазмидной ДНК pCIGF для регенеративной генной терапии повреждений поверхностных тканей человека различной этиологии. Доклиническое исследование фармакологических свойств и лекарственной безопасности препарата проведено на мышах, которым препарат вводился однократно и двукратно. Введение жидкой и лиофилизованной форм препарата проводили внутримышечно, гелевая форма применялась наружно. Анализировали различные органы: мозг, сердце, кровь (лейкоцитарную массу и сыворотку), лёгкое, печень, почку, селезёнку, мышцу (место укола) на наличие в них плазмиды в зависимости от времени после введения.

Ключевые слова: фармакокинетика, фармакодинамика, регенеративная генная терапия

Examine the pharmacokinetics of three formulations of the drug for regenerative gene therapy damage the surface of human tissues of various etiologies

Duhovlinov I.V.¹, Al-Shekhadat R.I.¹, Orlov A.I.²

¹ — LLC «Pharma Gen»

² — FGBI «Scientific Research Institute of Experimental Medicine» RAMS, St. Petersburg

Summary

The purpose of this study was to compare the pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters of three formulations of a new drug on the basis of plasmid DNA pCIGF for regenerative gene therapy damage the surface of human tissues of various etiologies. Preclinical study of the pharmacological properties of the drug and drug safety carried out in mice, which was administered once and twice. Introduction of liquid and lyophilized forms of the drug was carried out by intramuscular injection, topically applied gel form. Analyzed various organs: brain, heart, blood, lung, liver, kidney, spleen, muscle for the presence of plasmid depending on the time after administration.

Keywords: pharmacokinetics, pharmacodynamics, regenerative gene therapy

Введение

Исследование фармакокинетических свойств новых лекарственных веществ является одним из важнейших этапов доклинических испытаний. Изучение фармакокинетики и фармакодинамики лекарственных препаратов позволяют проанализировать процессы всасывания, метаболизма, распределения и выведения исследуемых лекарственных веществ. Анализ процессов распределения позволяет детектировать органы и ткани, в которые они проникают наиболее интенсивно и/или в которых удерживаются наиболее длительно, что может способствовать более деталь-

ному изучению механизмов действия лекарственных веществ [1].

Работа посвящена исследованию фармакокинетических свойств лекарственного препарата для регенеративной генной терапии повреждений поверхностных тканей человека различной этиологии (механические, химические, термические травмы, местные радиационные и электрические повреждения и т.п.).

Актуальность проекта связана с ростом травматизма, смертности и возрастающей инвалидизацией от травм в Российской Федерации в условиях неблагоприятной экологической обстановки, снижающей регенераторные способности организма человека [2].

В связи с этим неотъемлемым направлением решения данной проблемы является разработка новых медицинских технологий для лечения травматических повреждений. Одним из ключевых элементов системы медицинской помощи при травмах является стимуляция процессов регенерации. Процессы регенерации являются одним из важнейших механизмов поддержания гомеостаза организма, особенно при повреждениях различной этиологии. К ним можно отнести травмы механические, включая операционные, химические, термические, радиационные, ишемические и др. Регенерация повреждённых тканей зависит, в основном, от пролиферации в зоне поражения клеток различных типов и синтеза клетками как собственных элементов, так и компонентов межклеточного вещества.

Лечение ран с использованием данного препарата превосходит известные способы лечения ран, основанные на стимуляции регенераторных процессов. Лечение заболеваний, требующих стимуляции регенераторных процессов, включая повреждения тканей человека различной этиологии, с помощью фармацевтической композиции или препарата для генной терапии на основе синтетического модифицированного гена инсулиноподобного фактора роста человека первого типа является эффективным и обладает существенным преимуществом, так как позволяет снизить дозы инъекционных препаратов и частоту их введения [3].

Целью данного исследования явилось изучение распределения в организме и тканевой биодоступности нового лекарственного препарата на основе плазмидной ДНК pCIGF для регенеративной генной терапии повреждений поверхностных тканей человека различной этиологии. Доклиническое исследование фармакологических свойств и лекарственной безопасности препарата проведено на мышах, которым препарат вводился однократно и двукратно. Введение жидкой и лиофилизованной форм препарата проводили внутримышечно, гелевая форма применялась наружно. Анализировали различные органы: мозг, сердце, кровь (лейкоцитарную массу и сыворотку), лёгкое, печень, почку, селезёнку, мышцу (место укола) на наличие в них плазмиды в зависимости от времени после введения.

Материалы и методы

Получение плазмидной ДНК pCIGF и исследование фармакокинетических свойств трёх лекарственных форм препарата осуществлялось в несколько этапов:

1. Нарботка очищенного препарата плазмидной ДНК

Музейная культура штамма *Escherichia coli*/pCIGF представляет собой ночную бульонную культуру, полученную трансформацией штамма *E.coli* DH10B/R (GIBCO, США) рекомбинантной плазмидной ДНК pCIGF и выращенную из отдельной колонии на среде Луриа-Бертани (LB) с добавлением ампициллина до конечной концентрации 100 мкг/мл. Культивирование

вели при температуре 37°C, частоте вращения мешалки от 50 до 250 об/мин, обеспечивающей насыщение культуры кислородом не менее 30%, до достижения оптической плотности 20-40 ед, после чего осуществляли сепарирование биомассы, которая и являлась биологической субстанцией для выделения препарата pCIGF.

Очистку препаратов плазмидной ДНК проводили по методу, предложенному *Horn с соавторами* [4]. Затем применяли только реактивы фармакопейной чистоты (pharmaceutical), и свободную от ЛПС деионизованную воду, проводили работу в стерильных условиях. ДНК растворяли в буфере для хроматографии, которая проводилась на оборудовании ÄKTAexplorer (Amersham Pharmacia Biotech, Sweden) при скорости потока жидкости 0,75 мл/мин. Фракции, содержащие не менее 50% суперскрученной формы плазмидной ДНК, объединяли. ДНК осаждали этанолом и повторно наносили на колонку SR 50/100 (Amersham Pharmacia Biotech, Sweden), наполненную Sephacryl S-1000. Объединяли фракции, содержащие не меньше 90% суперскрученной формы плазмиды. ДНК осаждали этанолом и ресуспендировали в физиологическом растворе хлорида натрия.

Для оценки препарата pCIGF использовали анализ изменения оптической плотности (A) в диапазоне длин волн 200-300 нм. Для этого проводили серию измерений оптических плотностей с шагом 10 нм. Далее строили график зависимости оптической плотности от длины волны. При этом соотношения $A_{260\text{нм}}/A_{280\text{нм}}$ и $A_{260\text{нм}}/A_{230\text{нм}}$ характеризовали чистоту плазмидной ДНК и, соответственно, были не меньше 1,8—1,75.

Для определения концентрации плазмидной ДНК в препарате использовали спектрофотометрический метод. Для этого проводили измерение оптической плотности исследуемого образца в стандартной кювете из кварцевого стекла шириной 1 см на спектрофотометре СФ-46 (ЛОМО, Россия) при длине волны 260 нм. Концентрацию плазмидной ДНК определяли по формуле:

$$[\text{ДНК}] = A_{260} \times N \times 50 \text{ [мкг/мл]},$$

где A_{260} — оптическая плотность исследуемого образца при длине волны 260 нм;

N — разведение исходного образца.

Конечная концентрация плазмидной ДНК в препарате должна составлять 1 мг/мл. Контроль структуры плазмидной ДНК оценивали при помощи электрофореза. При этом содержание суперскрученной формы плазмиды было не менее 95% в препарате, а присутствие РНК не детектировалось. Контроль идентичности целевого гена проводили секвенированием. Всего было получено 10 мг плазмидной ДНК pCIGF. Концентрированный препарат pCIGF хранили при 4°C в защищённом от света месте. Полученная партия плазмиды использовалась для изготовления

инъекционной, лиофильно высушенной и гелевой форм препарата. Для длительного хранения было заложено при температурах -20° , $+4^{\circ}$, $+20^{\circ}$, $+37^{\circ}$ по одной серии каждой лекарственной формы.

2. Изучение фармакокинетики гелевой лекарственной формы препарата

Было изучено распределение плазмидной ДНК pCIGF в организме мыши при наружном применении (в случае с гелевой формой препарата) и при однократном и двукратном введении. Введение жидкой и лиофилизированной (разведена физиологическим раствором) форм препарата проводили внутримышечно (100мкг/100мкл плазмиды в физиологическом растворе на мыш). Анализировали различные органы: кожу, мозг, сердце, кровь (лейкоцитарную массу и сыворотку), лёгкое, печень, почку, селезёнку, мышцу на наличие в них плазмиды в зависимости от времени после введения. Тотальную ДНК выделяли обработкой ткани протеиназой К и депротеинизацией фенолом/хлороформом. Наличие плазмидной ДНК тестировали ПЦР с последующим электрофорезом результатов ОТ и ПЦР в 1% агарозном геле.

Результаты

3. Изучение фармакокинетики гелевой лекарственной формы препарата

Было изучено распределение плазмидной ДНК pCIGF в организме мыши при наружном применении. Анализировали различные органы: кожу, мозг, сердце, кровь (лейкоцитарную массу и сыворотку), лёгкое, печень, почку, селезёнку, мышцу на наличие в них плазмиды в зависимости от времени после введения.

Сводные данные по фармакокинетики препарата плазмиды pCIGF в форме геля (примерное содержание в анализируемых образцах) представлены в табл. 1.

Как видно из представленных результатов, плазмиды pCIGF сразу после нанесения на кожу присутствует в мышце. Наибольшее количество плазмидной ДНК наблюдается в мышце сразу после нанесения

геля, затем это количество постепенно уменьшается. В крови (клетки) сигнал появляется через 6 ч после нанесения препарата и увеличивается через сутки, держится в течение 7 суток, затем уменьшается. В крови (сыворотка) слабый сигнал детектируется через 7 суток после введения. В сердце небольшое количество плазмиды обнаруживается через 6 ч после нанесения гелевой формы препарата и сохраняется ещё в течение 2 суток. В лёгких плазмиды детектируются через 6 ч после нанесения препарата и сохраняется в течение суток. В почках небольшое количество плазмидной ДНК обнаруживается через 6 ч после нанесения препарата и немного увеличивается через сутки, держится до 2 суток.

В мозге, селезёнке, печени и хвосте плазмиды не детектируются. Через 8 недель количество плазмиды во всех органах мыши становится ниже уровня детекции.

Исследование фармакокинетики препарата в жидкой форме и в лиофилизированной форме

Было изучено распределение плазмидной ДНК pCIGF в организме мыши, при однократном и двукратном введении. Введение жидкой и лиофилизированной (разведена физиологическим раствором) форм препарата проводили внутримышечно (100мкг/100мкл плазмиды в физиологическом растворе на мыш). Анализировали различные органы: мозг, сердце, кровь (лейкоцитарную массу и сыворотку), лёгкое, печень, почку, селезёнку, мышцу (место укола) на наличие в них плазмиды в зависимости от времени после введения.

Электрофореграммы ПЦР-анализа образцов ДНК на наличие в них примеси плазмиды представлены на рис. 1.

Каждая реакция включала в себя отрицательный контроль — отсутствие ДНК (чаще всего вода) и положительный контроль, представляющий собой известные разведения плазмидной ДНК в 1 мкг геномной ДНК контрольной мыши. Сводные данные примерного количества плазмиды pCIGF в анализируемых образцах представлены в табл. 2 и 3.

Таблица 1

Приблизительная оценка количества плазмидной ДНК pCIGF в различных органах после введения гелевой формы препарата

Исследуемые органы	Количество плазмидной ДНК (пг/мкг геномной)					
	0 часов	6 часов	1 сутки	2 суток	7 суток	8 нед.
Мышца	>10	>10	10	1	0,1	-
Кровь (клетки)	-	0,1	0,2	1	0,1	-
Кровь (сыворотка)	-	-	-	-	0,1	-
Мозг	-	-	-	-	-	-
Селезёнка	-	-	-	-	-	-
Сердце	-	0,01	-	0,001	-	-
Лёгкое	-	0,001	0,02	-	-	-
Печень	-	-	-	-	-	-
Почка	-	0,001	0,02	0,001	-	-
Хвост	-	-	-	-	-	-

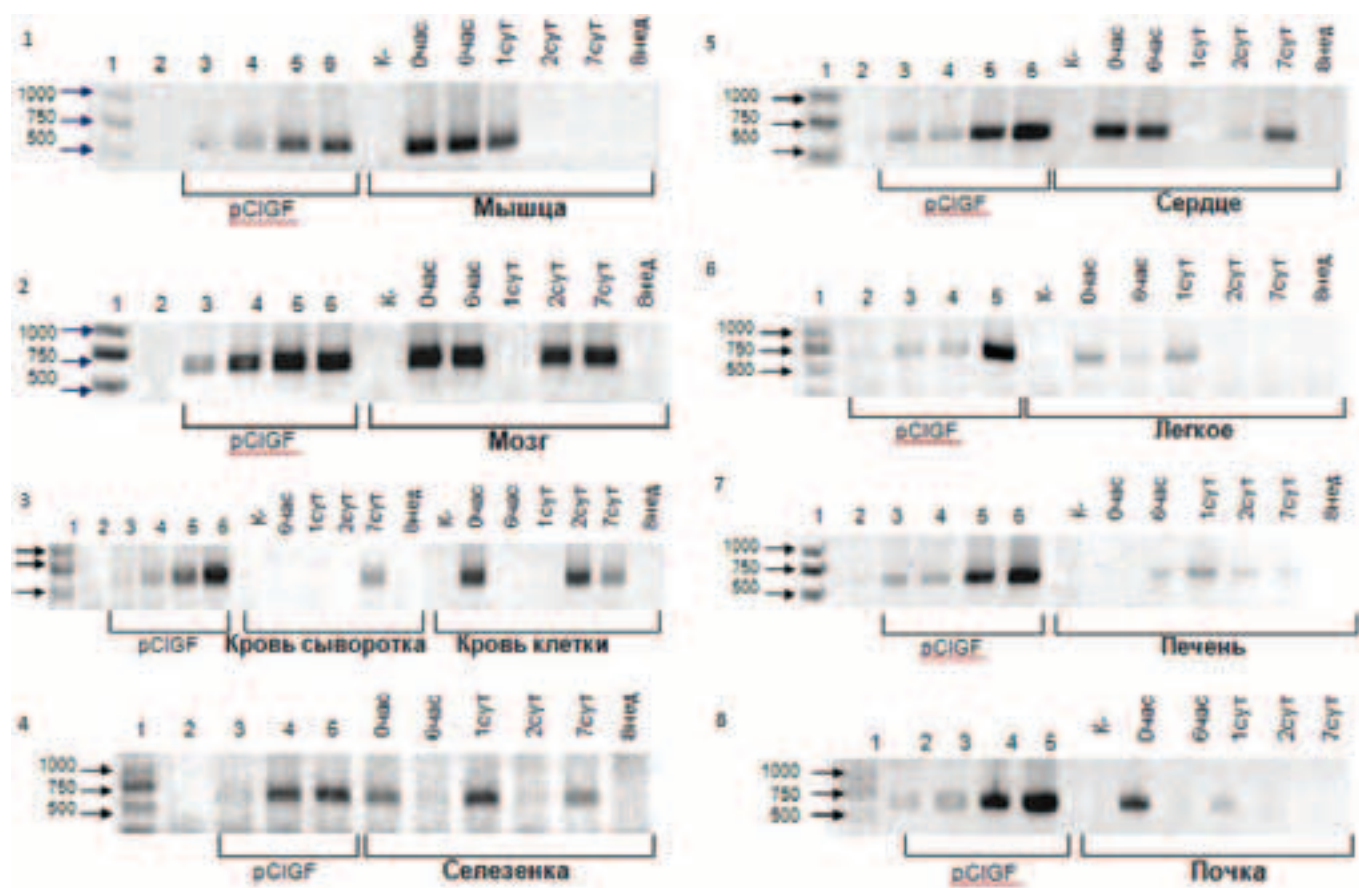


Рис. 1. Присутствие плазмидной ДНК pCIGF в различных структурах и органах мыши. 1 — мышцы, 2 — сыворотка и клетки крови, 3 — мозг, 4 — селезенка, 5 — сердце, 6 — лёгкое, 7 — печень, 8 — почки
Типы веществ в пробе на электрофореграмме: 1 — Маркер 1 тпн; 2 — контроль (вода); 3 — pCIGF 10фг; 4 — pCIGF 100фг; 5 — pCIGF 1пг; 6 — pCIGF 10пг.

Таблица 2

Приблизительная оценка количества плазмидной ДНК pCIGF различных органах после введения жидкой и разведённой лиофилизованной форм препарата

Исследуемые органы	Количество плазмидной ДНК (пг/мкг геномной)					
	0 часов	6 часов	1 сутки	2 суток	7 суток	8 нед.
Мышца	>100	>100	10	1	-	-
Кровь (клетки)	5	-	-	3	0,5	-
Кровь (сыворотка)	-	-	-	-	0,4	-
Мозг	>10	10	-	0,1	0,05	-
Селезенка	0,1	0,001	0,1	0,005	0,09	-
Сердце	0,05	0,02	-	0,001	0,01	-
Лёгкое	0,01	0,001	0,02	-	-	-
Печень	-	0,01	0,1	0,01	0,001	-
Почка	0,1	0,001	0,02	0,001	-	-
Хвост	-	-	-	-	-	-

Таблица 3

Приблизительная оценка количества плазмидной ДНК pCIGF в различных органах при повторном введении жидкой и лиофилизованной форм препарата

Исследуемые органы	Количество плазмидной ДНК (пг/мкг геномной) при повторном введении		Количество плазмидной ДНК (пг/мкг геномной) при разовом введении	
	1 сутки	7 суток	1 сутки	7 суток
Мышца	10	5	10	-
Кровь (клетки)	10	1	3	0,5
Кровь (сыворотка)	-	1	-	0,4
Мозг	>10	-	0,1	0,05
Селезенка	1	0,2	1	0,1
Печень	10	1	0,1	0,1

Как видно из представленных результатов, плазмида рCIGF сразу после инъекции присутствует во всех анализированных органах, кроме печени и хвоста. Также плазмида не идентифицируется сразу после введения в клетки крови. Наибольшее количество плазмидной ДНК наблюдается в мышце сразу после инъекции, через 6 ч это количество немного уменьшается, на седьмые сутки становится ниже предела чувствительности метода. В лёгком сигнал пропадает на вторые сутки, в почке — на седьмые. В сыворотке крови слабый сигнал появляется на седьмые сутки после введения. В мозге, селезёнке и печени наличие плазмиды наблюдается в течение недели. Через 8 недель количество плазмиды в органах становится ниже уровня детекции.

По данным, представленным в табл. 3, видно, что в случае повторного введения жидкой и лиофилизированной форм препарата количество ДНК рCIGF в первые сутки превышает (кровь [клетки], мозг, печень) количество ДНК при разовом введении или сравнимо с ним (мышцы, селезёнка, кровь [сыворотка]). Однако через 7 суток после повторного введения препарата во всех органах, кроме мозга, наблюдается большее количество плазмидной ДНК, чем при разовом введении.

Обсуждение

Фармакокинетика исследуемого препарата отличается при использовании разных лекарственных форм. Так, например, при нанесении гелевой ДНК рCIGF обнаруживается сразу после нанесения на кожу в мышце, где и локализуется максимальное количество

нанесённого вещества. В клетках крови ДНК рCIGF детектируется через 6 ч после нанесения препарата и увеличивается через сутки, держится в течение 7 суток, затем уменьшается, тогда как в сыворотке слабый сигнал детектируется только спустя 7 суток после введения. В целом лишь в некоторых органах с обильным кровоснабжением детектируется небольшое количество плазмиды (сердце, легкие, почки), которое сохраняется в среднем не дольше 2-х суток. В мозге, селезёнке, печени и хвосте плазмида не детектируется. Через 8 недель количество плазмиды во всех органах мыши становится ниже уровня детекции.

Фармакокинетика жидкой и лиофилизированной форм препарата такова, что ДНК рCIGF сразу после инъекции присутствует во всех анализированных органах, кроме печени и хвоста, однако наибольшее количество плазмидной ДНК также наблюдается в основном в мышце. Стоит отметить, что в мозге, селезёнке и печени наличие плазмиды наблюдается в течение недели. Через 8 недель количество плазмиды в органах становится ниже уровня детекции.

Таким образом, можно заключить, что использование гелевой лекарственной формы препарата является более эффективным, так как оказывает в основном локальное действие на прилегающие к раневой поверхности клетки соединительной ткани. Однако, применение разведённого лиофилизированного препарата в виде инъекций имеет преимущество в том, что препарат может храниться более длительное время, сохраняя при этом стабильность структуры ДНК рCIGF и биологическую активность.

Литература

1. Каркищенко Н.Н., Хоронько В.В., Сергеева С.А., Каркищенко В.Н. Фармакокинетика. Феникс, Ростов-на-Дону. 2001.
2. Демографическая политика Российской Федерации на период до 2025 года. // Программа Министерства труда и социальной защиты РФ от 13.11.2012г. (информация взята с сайта Министерства труда и социальной защиты РФ <http://www.rosmintrud.ru/ministry/programms/6>).
3. Bonadio J., Smiley E., Patil P., Goldstein S. Localized, direct plasmid gene delivery in vivo: prolonged therapy results in reproducible tissue regeneration. // Nature Medicine 1999. Vol. 5. P. 753—759.
4. Horn N., Meek J., Budahazi G., Marquet M. Cancer gene therapy using plasmid DNA: purification of DNA for human clinical trials. // Hum Gene Therapy. 1995. Vol. 6. P. 565—573.

Экскреция соединения VMA-99-82 — нового производного аденина, обладающего противовирусной активностью

Смирнова Л.А., Сучков Е.А., Рябуха А.Ф., Кузнецов К.А., Озеров А.А., Караваев А.В.

Лаборатория фармакологической кинетики НИИ фармакологии,
Волгоградский медицинский университет, г. Волгоград

Резюме

При изучении экскреции препарата установлено, что VMA-99-82 определяется в моче в течение не менее 72 ч исследования. Почечный клиренс составляет 0,936 мл/ч, внепочечный — 666,04 мл/ч при внутривенном пути введения; 1,8 мл/ч и 1009,72 мл/ч, соответственно при пероральном пути введения. Превосходство внепочечного клиренса над почечным коррелирует с полученными ранее данными о характере распределения соединения VMA-99-82 в органы и ткани. Препарат определялся в почках в невысоких концентрациях и при внутривенном и при пероральном путях введения. Тканевая доступность составила 0,452 и 0,413 при внутривенном и пероральном путях введения, соответственно. Доля элиминации неизменённой субстанции от введённой дозы составляет менее 1%, причём в кале её количество примерно в 5 раз ниже, чем в моче. В связи с этим можно предположить интенсивное протекание процессов биотрансформации.

Ключевые слова: производные аденина, экскреция

Excretion connection VMA-99-82 — a novel adenine having antiviral activity

Smirnova L.A., Suchkov E.A., Ryabukha A.F., Kuznetsov K.A., Ozerov A.A., Karavaev A.V.

Laboratory pharmacological kinetics Institute of Pharmacology, Volgograd Medical University, Volgograd

Summary

In the study of excretion of the drug established that VMA-99-82 detected in the urine for at least 72 hours of the study. Renal clearance was 0.936 ml/hr, extrarenal — 666.04 ml/h by intravenous route of administration, 1.8 ml/hr and 1009.72 ml/h, respectively, by the oral route of administration. Superiority over the renal clearance extrarenal correlates with earlier data on the distribution of the compound VMA-99-82 in organs and tissues. The drug was determined in the kidney in low concentrations and by intravenous and oral routes of administration. Tissue availability was 0,452 and 0,413 in intravenous and oral routes of administration, respectively. Win unmodified substance elimination of the administered dose is less than 1%, and its amount in the feces is about 5 times lower than that in the urine. In this regard, we can assume an intense flow of processes of biotransformation.

Keywords: adenine derivatives excretion

Введение

На процессы изменения концентраций лекарственных препаратов, их взаимодействие и метаболизм, т.е. освобождение организма от любых ксенобиотиков, огромное значение оказывают процессы биотрансформации и экскреции. Иначе говоря, эффективность и безопасность любого лекарственного средства во многом обусловлена процессами биотрансформации и выведения, которое осуществляется различными путями. Соответственно, изучение процессов экскреции является важным и обязательным этапом исследования любого биологически активного вещества, предлагаемого к использованию в качестве лекарственного средства [1, 2].

Из ряда 9-производных аденина, синтезированных на кафедре фармацевтической и токсикологической химии ВолГМУ в результате скрининговых

исследований было выбрано вещество лидер по противовирусной активности — соединение VMA-99-82 (адепрофен). Данное соединение продемонстрировало высокую ингибиторную активность в отношении различных ДНК- и РНК-содержащих вирусов, в частности цитомегаловируса человека и ВИЧ-1 [3-5].

Таким образом, целью данной работы явилось изучение процессов экскреции нового производного аденина — соединения VMA-99-82.

Методы исследования

Эксперименты выполнены на 50 белых беспородных крысах-самцах массой 180-220 г, которые содержались в условиях вивария на стандартной диете с соблюдением всех правил и Международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях.

Содержание изучаемого соединения определяли в моче и кале. Сбор проб мочи и кала осуществляли в метаболических камерах «Термопласт» (Италия).

Соединение VMA-99-82 вводили крысам внутривенно и перорально в высшей терапевтической дозе 50 мг/кг. Сбор проб мочи и кала осуществлялся в течение 3 суток каждые 24 ч. Сбор проб в контрольной группе животных проводился в течение 24 ч [6].

Для количественного определения соединения VMA-99-82 был использован метод ВЭЖХ, жидкостной хроматограф (Shimadzu, Япония). Определение проводили при помощи диодноматричного ультрафиолетового детектора, длина волны 205 нм. Хроматографическое разделение осуществлялось на колонке SUPELCOSIL LC-18 (5 мкм; 150 мм×4,6мм). Время удерживания составило около 7,0–7,5 мин. Чувствительность метода — 1 мкг/мл, средняя ошибка измерения не превышает 10%.

Статистическую обработку результатов проводили при помощи компьютерной программы Microsoft Excel [7].

Результаты исследования

При изучении экскреции препарата было выявлено, что VMA-99-82 определяется в моче при внутривенном пути введения в течение не менее 72 ч исследования. При этом максимум выведения приходится на 2 сутки после введения (рис. 1). С мочой выделилось менее 1% неизменной субстанции от общего количества введенного препарата. Почечный клиренс составляет 0,936 мл/ч, внепочечный — 666,04 мл/ч, то есть значительно превышает ренальный.

При исследовании экскреции VMA-99-82 с содержимым кишечника было обнаружено, что максимальное выделение препарата приходится на 2 сутки исследования (рис. 1). Соединение определяется не менее 72 ч. Суммарная экскреция неизменной субстанции в 5 раз ниже таковой в моче, что свидетельствует о низкой степени участия данного пути выведения в процессах элиминации препарата в организме крыс.

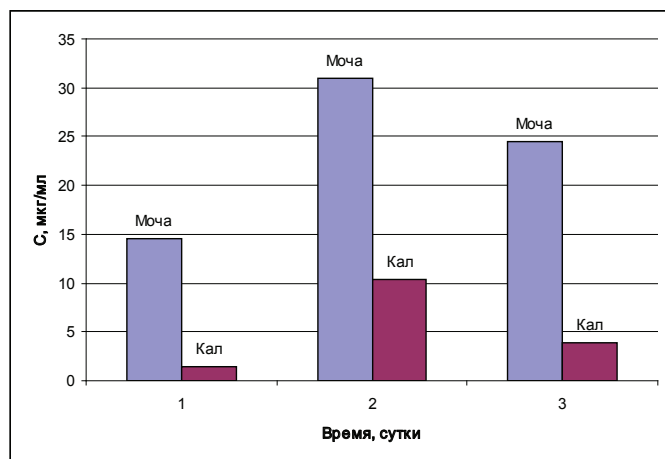


Рис. 1. Содержание препарата VMA-99-82 в моче и кале крыс при внутривенном введении в дозе 50 мг/кг

После перорального введения крысам VMA-99-82 определяется в моче в течение не менее 72 ч исследования. При этом максимум выведения приходится на 1 сутки после введения (рис. 2). Почечный клиренс составляет 1,8 мл/ч, внепочечный — 1009,72 мл/ч.

При исследовании экскреции VMA-99-82 с содержимым кишечника было обнаружено, что максимальное выделение препарата также приходится на 1 сутки исследования (рис. 2). Соединение определяется в течение 48 ч.

Картина экскреции несколько отличается от таковой при внутривенном пути введения, и основная часть выведения происходит в первые сутки исследования, но количество неизменной субстанции, выделяемой с мочой и калом также крайне незначительно (менее 1%).

При пероральном введении крысам было установлено, что VMA-99-82 быстро всасывается из желудочно-кишечного тракта, максимум концентрации достигается через 30 мин после введения.

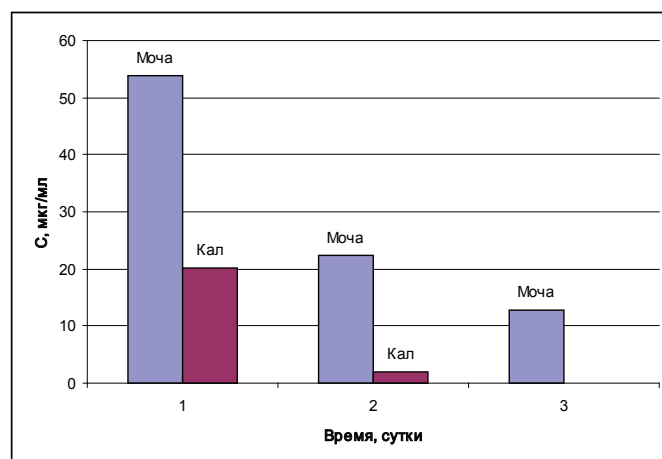


Рис. 2. Содержание препарата VMA-99-82 в моче и кале крыс при пероральном введении в дозе 50 мг/кг

Установленное в результате проведенных исследований значительное превосходство внеренального клиренса над ренальным коррелирует с полученными ранее данными о характере распределения соединения VMA-99-82 в органы и ткани. Препарат определялся в почках в низких концентрациях и при внутривенном и при пероральном путях введения. Тканевая доступность составила 0,452 и 0,413 при внутривенном и пероральном путях введения соответственно.

Длительное время определения изучаемого соединения в экскретах соотносится с установленными ранее данными о длительной циркуляции в крови и высоких значениях периода полувыведения (11 и 6,5 ч для внутривенного и перорального пути введения, соответственно).

Низкие значения элиминации неизменной субстанции с мочой и калом могут свидетельствовать о выраженной способности вещества подвергаться процессам биотрансформации в организме и о высоком значении эффекта «первого прохождения через печень».

Работа была выполнена в рамках государственного контракта № 11411.1008700.13.077 с Минпромторгом России.

Литература

1. Белоусов. Ю.Б. Клиническая фармакокинетика, Москва, Литтерра. 2005.
2. Каркищенко Н.Н., Хоронько В.В., Сергеева С.А., Каркищенко В.Н. Фармакокинетика, Ростов-на-Дону, Феникс. 2001.
3. Петров В.И., Озеров А.А., Новиков М.С. и др. Фундаментальные исследования. 2004. № 1. С. 78-79
4. Петров В.И., Озеров А.А., Новиков М.С. и др. Вестник Волгоградского государственного медицинского университета, 2004. № 11. С. 21-24
5. Petrov V.I., Ozerov A.A., Novikov M.S. Chemistry of Heterocyclic Compounds, 2003. Vol. 39 (9). P. 1218-1226.
6. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. // Р.У. Хабриев (ред.), Москва. 2005.
7. Дерфель К. Статистика в аналитической химии. Москва, Мир. 1994.

