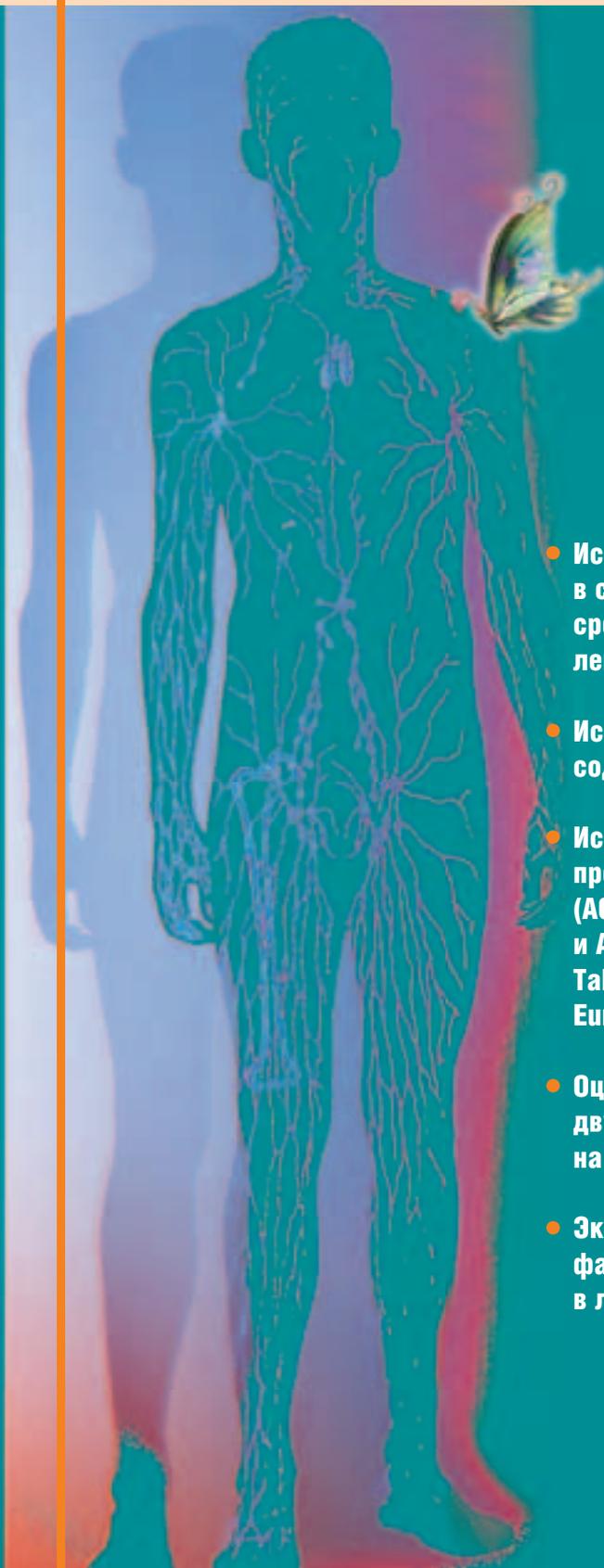


ФАРМАКОКИНЕТИКА и ДИНАМИКА



- Исследование фармакокинетики и биодоступности в создании новых оригинальных лекарственных средств пептидной структуры и их оптимальных лекарственных форм 1
- Исследование биоэквивалентности препаратов содержащих мемантин 18
- Исследование сравнительной биоэквивалентности препаратов Пиоглитазон таблетки, 20 мг (АО «Химфарм», Республика Казахстан) и Актос® таблетки, 30 мг («Eli Lilly Holdings, Takeda Global Research and Development Centre Europe Ltd») 25
- Оценка биоэквивалентности двух таблетированных форм лизиноприла на здоровых добровольцах 33
- Экспериментальное исследование фармакокинетики рифабутина в липосомальной форме 37

№2.2013

ФАРМАКОКИНЕТИКА И ФАРМАКОДИНАМИКА

№2
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

Белолипецкая

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

Тюренков

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 OKI»

+7 (910) 449-22-73

+7 (926) 568-17-35

e-mail: clinvest@mail.ru

сайт: www.izdat-ok.ru

Дизайн, верстка:

Design2pro.ru

Афанасьева

Елена Владимировна

Финансовый директор

ООО «Издательство OKI»,

подписка

+7 (916) 986-04-65

e-mail: eva88@list.ru

Подписано в печать 12.12.2013 г.

Типография: Издательское бюро «Филигрань».

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

ФГБУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» 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 OKI

Актуальный обзор

Исследование фармакокинетики и биодоступности в создании новых оригинальных лекарственных средств пептидной структуры и их оптимальных лекарственных форм (Иванникова Е.В., Жердев В.П., Бойко С.С., Блынская Е.В., Турчинская К.Г., Алексеев К.В.) 1

Исследования биоэквивалентности

Исследование биоэквивалентности препаратов содержащих мемантин (Карлицкая А.А., Красных Л.М., Смирнов В.В., Василенко Г.Ф., Кузнецова Н.И., Кукес В.Г.) 18

Исследование сравнительной биоэквивалентности препаратов Пиоглитазон таблетки, 20 мг (АО «Химфарм», Республика Казахстан) и Актос® таблетки, 30 мг («Eli Lilly Holdings, Takeda Global Research and Development Centre Europe Ltd») (Сариев А.К., Абимов Д.А., Ширяева М.В., Стырова Е.Ю., Алтынбеков С.А., Джолдыгулов Г.А., Серяков В.Н., Будац Я.М., Курилов О.Э.) 25

Оценка биоэквивалентности двух таблетированных форм лизиноприла на здоровых добровольцах (Алтынбеков С.А., Джолдыгулов Г.А., Серяков В.Н., Будац Я.М., Курилов О.Э., Кузнецова Н.И.) 33

Исследования фармакокинетики

Экспериментальное исследование фармакокинетики рифабутина в липосомальной форме (Карлина М.В., Косман В.М., Пожарицкая О.Н., Шиков А.Н., Макарова М.Н., Макаров В.Г., Балабаньян В.Ю.) 37

Исследование фармакокинетики и биодоступности в создании новых оригинальных лекарственных средств пептидной структуры и их оптимальных лекарственных форм

*Иванникова Е.В., Жердев В.П., Бойко С.С.,
Блынская Е.В., Турчинская К.Г., Алексеев К.В.*
ФГБУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова»
Российской академии медицинских наук, г. Москва

Резюме

В обзоре акцентируется внимание на исследованиях фармакокинетики и биодоступности при создании новых оригинальных препаратов пептидной структуры. Большое внимание уделяется методам количественного определения пептидных соединений в биоматериале, изучению их фармакокинетических характеристик, факторам, влияющих на биодоступность этих веществ, а также приводятся некоторые фармакокинетические данные по внедрённым в медицинскую практику лекарственным препаратам пептидной структуры.

Ключевые слова: фармакокинетика, короткие пептиды, биодоступность, вспомогательные вещества

Study the pharmacokinetics and bioavailability in the creation of new original drugs peptide structures and their optimum dosage forms

Ivannikova E.V., Zherdev V.P., Boyko S.S., Blynskaya E.V., Turchinskaya K.G., Alekseev K.V.

FGBI «Institute of Pharmacology the V.V. Zakusov», Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

Summary

The review focuses on the pharmacokinetics and bioavailability studies for creating new original drugs peptide structure. Much attention is paid to methods for the quantitative determination of peptide compounds in biological material, the study of their pharmacokinetic characteristics, factors that affect the bioavailability of these substances, as well as provide some pharmacokinetic data embedded in the practice of medicines peptide structure.

Keywords: pharmacokinetics, short peptides bioavailability

Введение

Тревожные расстройства — психические расстройства, характеризующиеся общей устойчивой тревогой, патологическим страхом, напряжением и нервозностью. В настоящее время распространённость заболеваний, связанных с тревожными расстройствами, составляет в западных странах от 13,6 до 28,8% и постоянно возрастает в связи с высоким темпом жизни, экологической и социальной напряжённостью [1-3].

В связи со значительным ростом заболеваний, связанных с тревожными и депрессивными расстройствами, актуальным является разработка и внедрение новых анксиолитических средств. На сегодняшний день препараты, обладающие таким фармакологическим эффектом, представлены в основном группой соединений бензодиазепинового ряда, для которых характерны утомляемость, сонливость, нарушение памяти, психическая и физическая лекарственная зависимость, синдром отмены, что снижает качество жизни пациентов.

Одним из таких анксиолитиков, лишённых этих побочных эффектов, является препарат — афобазол [4-7]. Вышесказанное подтверждает необходимость поисков других высокоэффективных препаратов, лишённых нежелательных реакций бензодиазепинов. Наука уделяет большое внимание эндогенным пептидам. К настоящему времени установлена важная роль эндогенного нейропептида холецистокинина в патогенезе тревожных расстройств. Известно, что холецистокинин, действуя на ХЦК-Б рецепторы, расположенные в ЦНС, проявляет анксиогенную активность — индуцирует панические атаки, взаимодействует с опиатной системой и таким образом может оказывать антианальгетический эффект. Также возможно, что холецистокинин играет роль в патогенезе депрессии и шизофрении [8-12].

Так как эндогенные нейропептиды имеют низкую энзиматическую устойчивость, подвержены гидролизу в ЖКТ, активны только после проникновения через ГЭБ, возникла необходимость поиска потенциальных анксиолитиков (антагонистов холецистокининовых

рецепторов) с более компактной и защищённой структурой, эффективных при системном введении.

Исходя из гипотезы, разработанной *Гудашевой Т.А.* ещё в 1985 г., о возможности имитации структуры не-пептидного прототипа с определённой нейротропной активностью, а также активного фрагмента исходного пептида с аналогичной активностью, был синтезирован новый дипептидный анксиолитик ГБ-115 (амид N-фенил-N-гексаноил-L-глицил-L-триптофан) — ретроаналог холецистокинина-4 [13-15]. Установлена фармакологическая активность соединения: экспериментально доказано, что ГБ-115 проявляет анксиолитические, антиалкогольные, антидепрессивные и анальгетические свойства. При пероральном введении ГБ-115 продемонстрировал свою максимальную анксиолитическую активность в дозе 0,1 мг/кг. Препарат купирует анксиогенную реакцию, индуцированную отменой этанола, в дозе 0,2 мг/кг, п/о. Максимальная анальгетическая активность проявляется в дозе 10 мг/кг, а антидепрессивный эффект — в дозе 0,025-0,05 мг/кг, в/б [16].

Проведение экспериментальных фармакокинетических исследований лекарственного препарата является необходимым этапом для его дальнейшего продвижения в медицинскую практику. Улучшить фармакокинетические параметры позволяет создание оптимальной лекарственной формы, которая бы отличалась подходящими степенью и скоростью всасывания, особенностями распределения, путями метаболизма и экскреции. Оценка же относительной биодоступности позволяет сделать выбор в пользу лекарственной формы с наилучшими для изучаемого соединения фармакокинетическими параметрами.

Фармакокинетика — современная, быстро развивающаяся наука, изучающая особенности проникновения лекарства в организм, распределения, биотрансформации и элиминации. Исследование этих процессов, включая их количественную оценку, и является основной целью фармакокинетики [17-20].

Фармакокинетическое изучение новых фармакологически активных веществ в эксперименте является обязательным этапом при исследовании, разработке и внедрении их в медицинскую практику. Эффективность препарата напрямую зависит от процессов всасывания, распределения и выведения лекарственных веществ из организма.

Фармакокинетические данные позволяют определить путь и метод введения, место проникновения лекарственного препарата, ориентировочную схему дозирования, а также основные пути элиминации лекарственного средства [17].

Всасывание, распределение, метаболизм и выведение лекарственного соединения — взаимосвязанные процессы. Все они подвержены влиянию множества факторов: скорость всасывания зависит от лекарственной формы препарата, концентрации действующего вещества, рН среды, в которой происходит растворение вещества, перистальтики кишечника и состояния

площади поверхности всасывания. На показатели распределения и биотрансформации лекарственного препарата влияют пол, возраст, соматическое состояние организма пациента, а также состояние ферментативных систем организма, что часто обусловлено индивидуальными различиями. Так, скорость метаболизма некоторых психотропных препаратов может варьироваться от 6 до 30 ч у разных пациентов. На выведение метаболитов из организма могут влиять сопутствующие заболевания, а также влияние других лекарственных веществ [21].

Для оценки различных фармакокинетических процессов лекарственных средств в организме животных и человека рассчитывают соответствующие фармакокинетические параметры, в том числе биодоступность (F, %) — часть дозы препарата, достигшая системного кровотока, после его внесосудистого введения [18-20].

Важно отметить условия проведения фармакокинетических экспериментов в доклинических испытаниях новых фармакологически активных соединений.

Изучаемые фармакологические средства принято считать объектом исследований, которые в доклинической практике проводятся на здоровых животных: крысах, мышах, кроликах, собаках, обезьянах и других, масса которых не должна отличаться от стандартной для каждого вида более чем на 10%.

Основными видами биологического материала являются плазма сыворотки крови, цельная кровь, различные органы и ткани, моча, фекалии.

Путь введения определяется формой лекарственного средства, рекомендованного на основании фармакокинетических исследований для дальнейшего фармакологического изучения. Методы введения могут быть различные: внутривенное, внутрибрюшинное, внутримышечное, подкожное, пероральное и др. Внутрь лекарственное средство вводят животным с помощью глоточного или дуоденального зонда натошак во избежание взаимодействия лекарственного вещества с пищей.

Введение возможно многократное или однократное. При однократном введении необходимо изучить фармакокинетику активной субстанции при использовании не менее трёх уровней дозы. Это необходимо для проверки линейности фармакокинетики.

Длительность эксперимента должна соответствовать времени в 5 раз продолжительнее периода полувыведения.

Число животных на одну точку (соответствующее значению концентрации) должно быть не менее 5, если у каждого животного из выборки отбирается только одна проба (в экспериментах на крысах в случае декарпитации: одно животное — одна точка).

Одним из важных этапов фармакокинетического и биофармацевтического изучения нового фармакологически активного соединения является исследование его абсолютной и относительной биодоступности (см. раздел «Биодоступность лекарственных веществ»).

1. Аналитические методы определения пептидов и их производных

Существуют различные методы качественного и количественного определения аминокислот, пептидов и их производных. И необходимо обоснованно подобрать оптимальный метод для анализа потенциального лекарственного препарата пептидной структуры. Это позволит добиться чувствительного анализа и получить точные и воспроизводимые результаты, которые показали бы особенности фармакокинетики того или иного соединения.

Классификация:

- Методы жидкостной хроматографии:
 - тонкослойная жидкостная хроматография
 - высокоэффективная жидкостная хроматография
- Газовая хроматография
- Иммунохимические методы анализа
- Капиллярный электрофорез

1.2 Хроматография аминокислот и пептидов

Хроматография — физико-химический метод разделения компонентов анализируемой смеси, основанный на разности коэффициентов их распределения между двумя фазами: неподвижной и подвижной [22]. Наиболее перспективными методами хроматографии являются: газовая хроматография (ГХ) и высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) в сочетании с масс-спектрометрическим детектором — ГХ-МС и ВЭЖХ-МС. Эти методы развиваются большими темпами, что связано с ростом задач, возникших в последние годы: протеомика, метаболомика, анализ биотоплив, определение биомаркеров заболеваний, создание и контроль качества лекарственных средств, контроль качества и безопасность пищевых продуктов, а также терроризм (определение отравляющих веществ, вредных веществ и боевых веществ) и экспрессное определение последствий чрезвычайных ситуаций [23].

1.2.1 Методы жидкостной хроматографии

1.2.1.1. Высокоэффективная жидкостная хроматография

ВЭЖХ — физико-химический метод разделения компонентов смеси веществ, основанный на их различном распределении между двумя несмешивающимися фазами, одна из которых подвижна, а другая неподвижна. В зависимости от полярности подвижной и неподвижной фаз ВЭЖХ принято разделять на нормально-фазовую (неподвижная фаза более полярная, чем подвижная) и на обращённо-фазовую (неподвижная фаза менее полярная, чем подвижная) [24-26].

Для разделения аминокислот и пептидов чаще используют обращённо-фазовую ВЭЖХ вследствие того, что большинство аналитов хорошо растворимы в водных подвижных фазах и ограниченно растворимы в большинстве неполярных растворителей [27-29]. Однако нормально-фазовую ВЭЖХ используют

для хроматографирования производных аминокислот и пептидов с короткой цепью, а также с низкой гидрофобностью, которые не удерживаются неподвижной фазой в обращённо-фазовой ВЭЖХ. Обращённо-фазовая ВЭЖХ была золотым стандартом для разделения и очистки пептидов до применения масс-спектрометрии в этой области. Для ОФ-ВЭЖХ характерны следующие преимущества по сравнению с другими методами хроматографического анализа: воспроизводимость результатов, высокая разделительная способность, селективность (возможность дифференцировать пептиды с разницей в одну аминокислоту), чувствительность, высокая скорость исполнения, а также использование маленького объёма летучих растворителей.

Селективность и качество анализа пептидов в обращённо-фазовой ВЭЖХ зависит от правильного выбора фаз: подвижной и неподвижной.

В качестве неподвижной фазы используют адсорбенты, представляющие собой модифицированный различными производными хлорсиланов силикагель. Такая фаза обладает высокой прочностью и индифферентностью к органическим растворителям. Обращённая фаза отличается характеристиками матрицы — силикагеля и строением привитого радикала, который отличается составом и строением углеродного фрагмента. При хроматографировании пептидов выбор обращённой фазы определяется размерами и гидрофобностью пептидов: для пептидов с короткой цепью, гидрофильных пептидов используют фазы С8 (н-октил) и С18 (н-октадецил), для крупных и гидрофобных — фазы С3 (триметил- или диметилпропил), С4 (н-бутил), С6 (фенил).

Для правильного выбора подвижной фазы необходимо учитывать рН, состав и концентрацию органического растворителя:

Для уменьшения полярности пептидов и обеспечения лучшего удерживания адсорбентом, рН элюента должен находиться в диапазоне 2-3. Также для увеличения времени удерживания пептидов в состав подвижной фазы вводят так называемые модификаторы или ион-парные реагенты (противоионы), которые способны образовывать ион-пары с положительно заряженными группировками пептидов. Основным ионным модификатором в ОФ ВЭЖХ служит трифторуксусная кислота. Она легко удаляется из элюатов упариванием, хорошо растворяет пептиды, УФ-прозрачна в области коротких длин волн, что не создаёт дополнительных пиков при детектировании. Муравьиная кислота также используется как модификатор и обеспечивает хорошее разделение, но её применение ограничено сильным поглощением в УФ-области [30-33].

Влияние органического растворителя на элюирующую способность подвижной фазы очень велико. Итак, элюирующая сила растворителя возрастает в следующем порядке: вода — метанол — ацетонитрил —

этанол — диоксан — тетрагидрофуран — 2-пропанол — 1-пропанол. Такая последовательность обусловлена уменьшением полярности органических веществ в данном ряду. Наиболее часто в качестве органического компонента подвижной фазы используется ацетонитрил, так как он прозрачен в УФ-области до 200 нм, обладает низкой вязкостью, высоко летуч, что позволяет, при необходимости, легко удалить его из собранной фракции элюата, характеризуется хорошей селективностью [34].

Разделение пептидных соединений может производиться в изократических условиях, где концентрация органического растворителя постоянная или же посредством градиентного элюирования — в этом случае концентрация органического растворителя увеличивается с течением времени. Исследуемые вещества элюируются в порядке увеличения гидрофобности [27].

1.2.1.2. Методы детектирования пептидов в высокоэффективной жидкостной хроматографии: УФ детектирование, масс-спектрометрия.

Для точного проведения качественного и количественного анализа после разделения лекарственных веществ методом ВЭЖХ необходимо использовать аппаратуру для их детектирования, к которой в свою очередь предъявляются следующие требования: детекторы должны обладать высокой чувствительностью (хороший сигнал, отсутствие шума), быстродействием, широким линейным динамическим диапазоном, стабильностью, отсутствием взаимодействия с подвижной фазой.

Одним из наиболее распространённых методов детектирования в высокоэффективной жидкостной хроматографии является ультрафиолетовое, что объясняется высокой чувствительностью анализа, простотой, доступностью с экономической точки зрения [27, 35-37]. Однако, УФ-детектор является менее чувствительным методом, чем масс-спектрометрия. УФ-детекторы представлены четырьмя основными видами на сегодняшний день:

1. с фиксированной длиной волны;
2. с монохроматором, который позволяет изменять длин волны в своём диапазоне;
3. с автоматически перестраиваемым монохроматором, который позволяет осуществлять многоволновую многоканальную детекцию;
4. диодно-матричные детекторы, позволяющие получать полную спектральную информацию в заданном диапазоне.

Благодаря наличию некоторых хромофоров в составе аминокислот, а также самой пептидной связи, стало возможным детектировать пептидные соединения с помощью УФ-излучения одним из четырёх выше перечисленных видов аппаратуры.

Пептидные соединения способны поглощать УФ-излучение в трёх областях:

- Выше 250 нм ($\lambda=280$ нм), что обусловлено присутствием в составе анализируемого соединения ароматических аминокислот — триптофана ($\lambda=278$ нм), тирозина ($\lambda=275$ нм) и фенилаланина.
- При 210-250 нм — такой сигнал могут давать другие аминокислоты с внутри- и межмолекулярными водородными связями в белковых молекулах.
- При 190 нм, что объясняется наличием пептидных связей [38].

Однако детектирование исследуемых соединений не проводят при длине волны ниже 210 нм ввиду влияния растворителей, используемых в ВЭЖХ, которые имеют собственное поглощение при длинах волн короче 210 нм, а также ввиду наличия примесей. Поэтому при детектировании пептидных веществ чаще используют диапазон длин волн — выше 250 нм. Если же соединения не содержат хромофоров, которые поглощали бы УФ-излучение в этой области, то прибегают к методу дериватизации.

Дериватизация — это химическая модификация анализируемого вещества с получением производного соединения, обладающего усовершенствованными аналитическими свойствами. В работе с ВЭЖХ-УФ посредством дериватизации необходимо получить соединение, регистрируемое в УФ-спектре в области, удобной для анализа биологического материала. Так в работе Руденко А.О. при определении важнейших аминокислот в сложных биологических матрицах был использован метод дериватизации 16 аминокислот. В качестве дериватирующего агента использовали *o*-фталевый альдегид [39].

Метод масс-спектрометрического детектирования состоит из трёх этапов: ионизации, разделения по принципу отношения массы к заряду и последующей детекции с использованием масс-анализатора [40-48]. Для анализа лекарственных соединений используют «мягкие» техники ионизации: ионизация электрораспылением, а также матрично-активированная лазерная десорбция (MALDI). Эти методы представляют собой щадящий режим ионизации, что особенно актуально для термически нестабильных биомолекул [40, 41, 49]. Однако данные виды ионизации являются недостаточно информативными, поэтому часто прибегают к тандемной масс-спектрометрии (МС/МС) — метод регистрации фрагментов анализируемых веществ. Если быть более точным, этот метод состоит из нескольких стадий: сначала анализируемые соединения ионизируются мягким способом, проходят через первый анализатор, затем их энергию повышают, за счёт чего исследуемые молекулы фрагментируются и второй анализатор фиксирует полученный масс-спектр [50-52].

Для количественного определения новых лекарственных соединений используют следующие типы масс-анализаторов:

- Квадрупольный (масс-анализатор на основе трёх квадруполей), который является «золотым стандартом» в исследовании новых лекарственных соединений [40, 41, 53];

- Времяпролётный (ТОФ), при использовании которого достигают меньшей чувствительности, чем при использовании тройных квадрупольных анализаторов [54-56].
- Ионно-циклотронного резонанса и орбитальной ионной ловушки, которые являются масс-анализаторами высокого разрешения и пока что редко используются ввиду высокой стоимости и сложности таких приборов [57-58].

Использование детектирования методом масс-спектрометрии в сочетании с ВЭЖХ позволило достичь высоких темпов анализа, повысить предел обнаружения лекарственных соединения, а также значительно повысить стабильность и точность исследований.

1.2.1.3 Тонкослойная хроматография

Сегодня ТСХ используется гораздо в меньшей степени, так как стали доступны более высоко-технологичные методы разделения пептидов, такие как ВЭЖХ, жидкостная колоночная хроматография, ионно-обменная хроматография, электрофорез белков в полиакриламидном геле, капиллярный электрофорез. Однако, ТСХ проявила себя в своё время как количественный, высокотехнологичный, относительно недорогой и легко воспроизводимый метод. Тонкослойная хроматография была популярна в 80-е годы — аминокислоты выделялись из растений, животных и различных биологических жидкостей [59].

1.2.1.4. Газовая хроматография пептидов

Качественный и количественный метод.

Метод разделения летучих компонентов, при котором подвижной фазой служит инертный газ (газ-носитель: водород, гелий, азот, аргон, углекислый газ), протекающий через неподвижную фазу (твёрдый носитель (силикагель, уголь, оксид алюминия) — газо-твёрдо-фазная хроматография; жидкость, нанесённая на поверхность инертного носителя — газо-жидкостная хроматография) с большой поверхностью [60].

Метод чувствительный и высокоселективный позволяет разделять пептиды и аминокислоты в сложных биологических матрицах. Однако, газовая хроматография не может быть использована для точного определения субстратов смесей самостоятельно, поэтому этот метод наиболее часто применим в сочетании с масс-спектрометрическим детектором, который позволяет проводить количественное определение после должного разделения веществ [61-66].

ГХ осложняется необходимостью дериватизации веществ для достижения их летучести, термостабильности и инертности. Использование дериватизации и гидролиза существенно затрудняет проведение анализа пептидов — это занимает время, вовлекает ряд дополнительных стадий, может увеличить возможные систематические и несистематические погрешности анализа [67-69].

Метод применим в различных областях: проверка лекарственных средств, контроль качества в производстве, проверка состояния окружающей среды.

1.3 Иммунохимические методы анализа

Качественные и количественные методы.

Объекты исследования: от низкомолекулярных соединений до вирусов и бактерий.

Методы основаны на специфическом связывании определённого соединения соответствующим антителом и, как правило, последующем определении данного комплекса каким-либо физико-химическим методом: спектрофотометрическим, флуориметрическим, люминесцентным и т.д. [70, 71].

1.4. Капиллярный электрофорез

Наряду с обращённо-фазовой ВЭЖХ капиллярный электрофорез является основным методом разделения пептидов. Каждый метод имеет свои преимущества. В свою очередь капиллярный электрофорез отличается быстротой проведения анализа, экспрессностью, микрообъёмами анализа, минимизацией использования токсических органических растворителей, экономичностью, высокой эффективностью разделения, что сводит к минимуму размытие пиков [72-76]. В основе метода капиллярного электрофореза лежит разделение заряженных компонентов сложной смеси в кварцевом капилляре под действием электрического поля, создаваемого подачей высокого напряжения к концам капилляра. Разделение исследуемых веществ анализируемой смеси происходит за счёт различной скорости перемещения компонентов в электрическом поле [77-78].

Капиллярный электрофорез (КЭ) методика с высокой разрешающей способностью. В лабораториях и клиниках метод применяют при анализе белков сыворотки крови, маркеров заболеваний. Очень часто КЭ используется в сочетании с масс-спектрометрией, что позволяет повысить эффективность проведения анализов. КЭ-МС позволил провести быстрый и точный анализ структуры белков в моче пациентов, страдающих иммуноглобулин-А нефропатией. КЭ широко используется в фармацевтической индустрии. Так, пептиды были разделены и проанализированы данным методом [77].

2. Валидация методики

В основе любого эксперимента лежит валидация методики анализа, основной задачей которой является проверка её надёжности. Основными её характеристиками являются:

- *Селективность* — способность разработанной методики определять исследуемые вещества в биологической матрице среди множества других эндогенных компонентов;

- **Нижний предел количественного определения** исследуемого вещества — минимальная концентрация исследуемого вещества, которую можно количественно измерить с достаточной точностью и прецизионностью;
- **Воспроизводимость калибровочной кривой:** на начальном этапе необходимо обозначить диапазон концентраций, ограниченный нижним пределом количественного определения (НПКО) и верхним пределом количественного определения (ВПКО), с целью наиболее полного описания фармакокинетики исследуемого вещества. Для построения калибровочной кривой необходимо использовать не менее 6 различных калибровочных концентраций. В результате их анализа необходимо описать параметры полученной калибровочной кривой, то есть обозначить функцию отклика (в случае линейной калибровочной кривой — наклон и свободный член);
- **Точность** методики определяется близостью полученных значений к действительной концентрации аналита, выражается в % и оценивается по образцам, к которым заранее добавлено известное количество исследуемого вещества. Эти образцы анализируются по калибровочной кривой, экспериментальные значения которых сравнивают с номинальными. Для одной калибровочной кривой необходимо оценить 5 образцов 1-ой концентрации для не менее, чем 4-х отличных концентраций, перекрывающих собой диапазон калибровочной кривой;
- **Прецизионность** — степень близости значений между повторными измерениями. Для подтверждения того, что полученные в ходе эксперимента значения достаточно близки, необходимо сравнить 5 образцов 1-ой концентрации для не менее, чем 4-х отличных концентраций, перекрывающих собой диапазон калибровочной кривой;
- **Эффект матрицы:**
При использовании методов масс-спектрометрии эффект матрицы оценивают по 6 образцам холостой матрицы от разных доноров. Для этого необходимо выполнить 3 этапа расчётов:
— вычислить фактор матрицы MF: площадь пика аналита в присутствии заранее экстрагированной матрицы/ площадь пика чистого аналита;
— точно так же MF рассчитывают по внутреннему стандарту — ВС;
— MF нормализуют по внутреннему стандарту, исходя из отношения MF аналита/ MF внутреннего стандарта.
Коэффициент вариации MF, нормализованному по ВС, не должен превышать 15%.
- **Стабильность:**
Необходимо подтвердить для каждого этапа биоаналитической методики, чтобы показать, что ни условия хранения, ни этапы анализа не влияют на концентрацию исследуемого вещества [79].

3. Биодоступность лекарственных веществ

Существуют различные определения, характеризующие биологическую доступность лекарственного вещества:

Понятие, принятое ВОЗ: Биологическая доступность (БД) — это степень всасывания лекарственного вещества из места введения в системный кровоток и скорость, с которой этот процесс происходит [80].

Однако, в понятие биодоступности входит не только скорость и степень всасывания активной субстанции, а также другие её характеристики: доступность активного вещества и образовавшихся метаболитов в месте действия. Это подтверждают следующие определения:

Биологическая доступность — это степень и скорость, с которой активная лекарственная субстанция абсорбируется из фармацевтической формы и становится доступной в месте её действия [81–83].

Биодоступность — часть принятой внутрь дозы лекарственного вещества, которая достигла системного кровотока в неизменном виде и в виде активных метаболитов, образовавшихся в процессе всасывания и пресистемного метаболизма [80].

Итак, суть всех определений заключается в том, что биологическая доступность лекарственных препаратов зависит от скорости и степени всасывания активных фармакологических ингредиентов из места введения в системный кровоток, а также доступности этих веществ и образовавшихся метаболитов в месте действия.

Для определения биодоступности используют методы *in vitro* и *in vivo*.

Биодоступность *in vitro* — это высвобождение лекарственного вещества вне биологической системы. Она является синонимом фармацевтической доступности. Это исследования, проводимые на различных культурах клеток, выступающих в качестве моделей биологических систем. Тест «Растворение» также относится к исследованиям *in vitro* [82].

Биодоступность *in vivo* — высвобождение лекарственного вещества в месте всасывания, определяемая с помощью фармакокинетических исследований на животных.

При фармакокинетическом методе определения биодоступности последовательно забирают пробы биожидкостей в течение определённого времени из различных мест (венозная, артериальная кровь, моча) после однократной или многократно повторяющихся доз.

Биодоступность вычисляется по формуле:

$$A_{ис.}/A_{ст.} \times 100\%,$$

где $A_{ис.}$ — количество препарата, всосавшегося из исследуемой лекарственной формы;

$A_{ст.}$ — количество препарата, всосавшегося из стандартной лекарственной формы.

Биодоступность определяют абсолютную и относительную. Важно отметить, что определение относительной биодоступности имеет большое значение при выборе оптимальной лекарственной формы, а абсолютная биодоступность больше важна для определения полноты всасывания, перспективности пути введения и влияющих на неё различных факторов.

Абсолютная биологическая биодоступность — это количество лекарственного вещества, введённого в лекарственной форме внутривенно или внутрисосудисто, которое поступает в кровообращение без влияния эффекта первого прохождения через печень или после корреляции на этот эффект, и скорость протекания этого процесса [80].

Итак, принято считать, что при абсолютной биодоступности вся доза препарата, введённого внутривенно, поступает в большой круг кровообращения, и биодоступность вещества в этом случае принимается за 100%. Однако, есть работы, которые доказывают обратное: лекарственные соединения после внутривенного введения поступают сначала в лёгочный круг кровообращения, проходят через лёгкие, которые могут кумулировать экзогенные соединения, подвергать их экскреции или же метаболизму [85–86]. Таким образом, лёгкие выполняют роль фильтра для частиц, которые могут попадать в организм при парентеральном введении.

Относительная биодоступность — это выраженное в процентах количество лекарственного вещества, высвобождённое из лекарственной формы, которое после введения достигает рецептора в количестве, достаточном для того чтобы вызвать биологический эффект.

Данное определение относительной биодоступности свидетельствует о том, что лекарственное вещество не полностью достигает места действия, а становится доступным в определённом процентном содержании.

Относительную биодоступность определяют для различных лекформ, для лекарственных средств при изменении технологии производства, для препаратов различных производителей и даже для различных серий препаратов, выпускаемых одной фармацевтической компанией. Обычно относительную биодоступность измеряют при одном и том же пути введения лекарственных средств. Однако этот показатель можно определять и при различных путях введения препаратов [86].

Проблемами и принципами биологической доступности занимается наука биофармация, которая представляет собой научную дисциплину фармации, занимающуюся исследованием влияния физических и физико-химических свойств действующих и вспомогательных веществ в лекарственных препаратах, производимых в различных лекарственных формах и по различным технологиям, но в одинаковых дозах, на их терапевтический эффект [80].

3.1 Фармацевтические факторы, влияющие на биодоступность лекарственных веществ

В ходе различных исследований было установлено, что фармацевтические факторы оказывают существенное влияние на динамику биодоступности лекарственных веществ, стабильность лекарственных препаратов в процессе хранения, терапевтическую активность действующих веществ и на многие другие показатели.

Фармацевтические факторы делятся на пять групп:

1. химическая модификация ЛВ;
2. физико-химические свойства ЛВ;
3. вид ЛВ и способ введения ЛС;
4. природа используемых вспомогательных веществ;
5. способ или технология изготовления лекарственной формы.

Также на биодоступность лекарственных веществ влияют так называемые эндогенные факторы. К ним относятся:

- физиологические факторы: возраст, пол, состояние организма пациента;
- биохимические факторы: состояние клеточных мембран, активность клетки, наличие эндогенных субстратов, накапливаемых при различных заболеваниях (билирубин, жирные кислоты и т.д.);
- патофизиологические: патологические состояния желудочно-кишечного тракта, печени, почек, сердечно-сосудистой системы, уровень транспортных белков в крови, генетически обусловленная разница в биотрансформации лекарственных веществ с пресистемным метаболизмом;
- клинические: выбор схемы дозирования, путь введения, место инъекции, интеракция одновременно или последовательно вводимых лекарственных веществ [80, 87].

В данном обзоре более подробно будут рассмотрены фармацевтические факторы, оказывающие влияние на биодоступность лекарственных препаратов, а именно: физическое состояние лекарственного вещества, вспомогательные вещества, а также виды лекарственных форм пептидных препаратов и технология их изготовления.

3.2. Влияние физического состояния лекарственных веществ на биодоступность лекарственных препаратов

Под физическим свойством лекарственных веществ понимают:

- степень измельчения или дисперсность лекарственных веществ;
- полиморфизм лекарственных веществ;
- агрегатное состояние (аморфность, кристалличность, форма и характер кристаллов);
- физико-химические свойства (рН, растворимость, оптическая активность, электропроводимость, температура плавления);

- поверхностные свойства лекарственного вещества (поверхностное натяжение);
- степень чистоты (вид и количество загрязнений, в том числе наличие микроорганизмов, аллергенов, вязущих веществ и др.).

Физическое состояние лекарственных веществ оказывает влияние на стабильность лекарственного препарата в процессе хранения, терапевтическую эффективность, скорость всасывания, проницаемости и выведения его из организма.

Наиболее существенно влияет на фармакотерапию степень измельчения и полиморфизм лекарственных веществ [80, 87].

3.3. Влияние микронизации лекарственных веществ на биодоступность лекарственных препаратов

Степень измельчения лекарственных веществ определяет скорость растворения, абсорбции и терапевтический эффект лекарственного препарата. В ряде случаев микронизация оказывает положительных эффект на биодоступность лекарственных веществ. Но выбор степени измельчения порошка должен быть научно обоснован, так как не всегда стремление к получению микронизированного порошка имеет преимущества. В табл. 1 рассмотрены положительные и отрицательные эффекты данного технологического приёма как микронизация на конкретных примерах:

Часто к микронизации прибегают для получения ингаляционных препаратов, в которых строго регламентирован размер частиц [88]. Влияние микронизации на терапевтическую активность было доказано для различных групп препаратов: сульфаниламидных, стероидных, производных фурана, кислоты салициловой, антибиотиков, в настоящее время — для противосудорожных, обезболивающих, мочегонных, противотуберкулёзных, антидиабетических и кардиотонических средств [87].

Так, для ацетилсалициловой кислоты (АСК) как противовоспалительного, обезболивающего и жаропонижающего препарата была разработана формула,

состоящая из микронизированной субстанции АСК, а также мощного дезинтегранта (эфффересцентного компонента или газообразующего компонента). Было проведено исследование, в котором сравнивались обычный аспирин с микронизированным в дозировке 500 мг. Пациенты принимали лекарственный препарат от острой зубной боли. По результатам фармакокинетических исследований было отмечено, что значительно повысилась скорость всасывания при использовании микронизированной субстанции: время достижения максимальной концентрации сократилось до 17,5 мин в сравнении с 45 мин для обычной субстанции. Увеличилась и сама максимальная концентрация с 4,4 мкг/мл до 13,8 мкг/мл. Однако, площадь под фармакокинетической кривой (степень всасывания) осталась почти неизменной (рис. 1). Полученные данные свидетельствуют о явных преимуществах микронизированной формулы для аспирина в лечении острой боли [89-90].

Микронизация позволяет снизить дозировку лекарственного препарата и достигнуть аналогичных фармакокинетических параметров, как и после введения более высокой дозы (рис. 2). К примеру, после приёма сахароснижающего препарата глибенкламид в дозе 3 мг, содержащего микронизированную активную субстанцию, концентрация действующего вещества в плазме крови составила — 97,2 нг/мл, что выше достигнутой максимальной концентрации (87,5 нг/мл) после введения стандартной субстанции в дозе 5 мг. Степень всасывания же составила 746 нг×ч/мл для немикронизированной субстанции вещества в дозе 5 мг и 568 нг×ч/мл для микронизированной субстанции в дозе 3 мг [91].

Однако микронизация и не всегда увеличивает скорость растворения и абсорбцию лекарственного вещества, в частности, вследствие плохой смачиваемости труднорастворимых веществ. Важно учитывать и то, что появление на измельченном материале электростатического заряда приводит к его комкованию, потере сыпучести, плохой смачиваемости, понижению химической стабильности, уменьшению сроков годности и др.

Таблица 1

Эффекты микронизации [80, 87]

Положительный эффект микронизации	Отрицательный эффект микронизации
Для сульфадимезина максимальная концентрация достигается на 2 ч раньше.	Для бисгидроксикумарина ускорение всасывания может привести к летальному исходу.
Для гризеофульвина позволяет в 2 раза снизить терапевтическую дозу.	Снижение терапевтической активности эритромицина и пенициллина вследствие усиления процессов гидролитической деструкции в присутствии пищеварительных соков.
При измельчении АСК в 30 раз возрастает терапевтический эффект в 2 раза.	Приём нитрофурантоина в виде сверхтонкого порошка увеличивает токсичность препарата на слизистые оболочки ЖКТ.
Кальциферол способен оказывать лечебное действие, если размер частиц не превышает 10 мкм.	<ul style="list-style-type: none"> • Быстрая инактивация, • Быстрое выведение из организма, • Усиление побочного действия, • Снижение стабильности.

Примечание. АСК — ацетилсалициловая кислота.

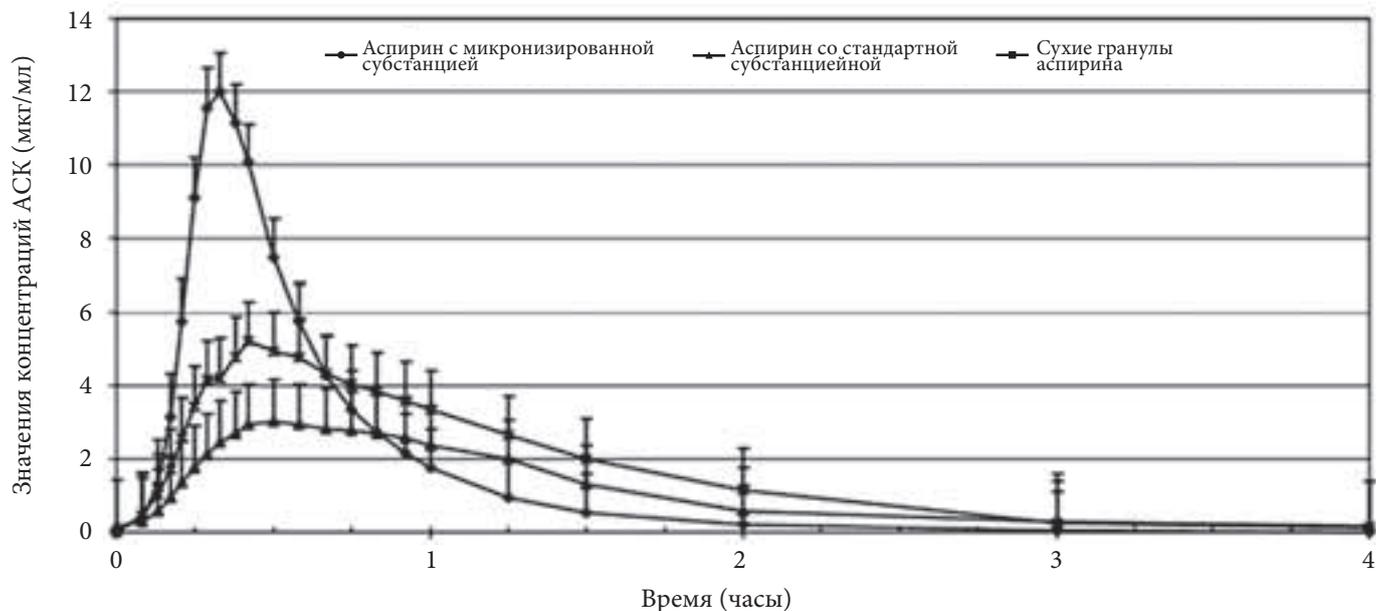


Рис. 1. Фармакокинетические кривые АСК после приёма таблеток в дозе 500 мг с микронизированной субстанцией, таблеток со стандартной субстанцией, сухих гранул аспирина

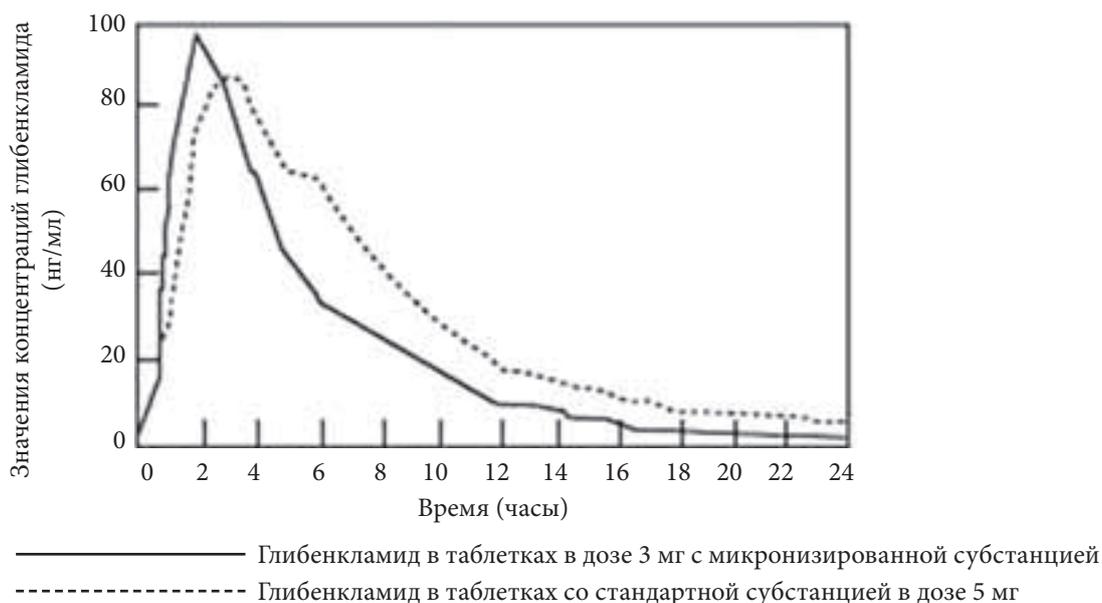


Рис. 2. Фармакокинетические кривые глибенкламида после приёма таблеток в дозе 3 мг с микронизированной субстанцией, таблеток со стандартной субстанцией в дозе 5 мг

3.4. Влияние вспомогательных веществ на биодоступность лекарственных средств и на их фармакотерапевтические свойства

Вспомогательные вещества не только имеют формообразующие и технологические функции, но и являются активными компонентами лекарственной композиции. Установлено, что ни один фармацевтический фактор не оказывает столь существенного и сложного влияния на действие лекарственного препарата как вспомогательные вещества. Влияние вспомогательных веществ на биодоступность и тера-

певтическую активность велико. Важно учитывать и безопасность используемых вспомогательных веществ, так как их неразумный подбор может привести к ослаблению терапевтической активности, а также к всевозможным побочным реакциям [92-95]. В связи с этим современная фармацевтическая наука выдвигает требования установить степень влияния вспомогательных веществ на терапевтическую эффективность лекарств. Иначе говоря, вспомогательные вещества должны применяться с определённой лекарственной субстанцией.

Возможные влияния вспомогательных веществ:

- усиление или снижение терапевтической активности;
- изменение характера действия лекарственных веществ;
- обеспечение локализации и продолжительности действия лекарственных веществ;
- регулирование скорости всасывания лекарственных веществ;
- обеспечение стабильности лекарственных препаратов.

Помимо влияния на биодоступность самого лекарственного вещества, вспомогательные вещества взаимодействуют и оказывают влияние на организм человека, поэтому целесообразно привести предъявляемые к эксципиентам требования:

1. Способствование проявлению надлежащего фармакологического эффекта активного лекарственного вещества.
2. Отсутствие нежелательных явлений, например: аллергических и токсических реакций.
3. Соответствие своему назначению и функциям (наполнители, связующие, дезинтегранты и т.д.), а также обеспечение биодоступности лекарственных субстанций.
4. Отсутствие химических или физико-химических взаимодействий с лекарственными веществами во избежание снижения эффективности лекарственного соединения или же возникновения побочных реакций.
5. Контроль чистоты вспомогательных веществ во избежание микробной контаминации [80, 87].

Существуют различные классификации вспомогательных веществ. Ниже приведены классификации вспомогательных веществ по происхождению, по своему назначению в производстве твёрдых лекарственных форм, а также обобщённая химическая классификация и роль фармацевтических вспомогательных веществ:

Классификация вспомогательных веществ по происхождению:

- животного происхождения: лактоза, желатин, стеариновая кислота;
- растительного происхождения: крахмал, сахара, целлюлоза, альгинаты;
- минерального происхождения: фосфат кальция, кремний;
- синтетического происхождения: полиэтиленгликоль, полисорбаты, повидон.

Классификация вспомогательных веществ по своему назначению в производстве твёрдых лекарственных форм:

- разбавители или наполнители (*микрористаллическая целлюлоза, лактоза, маннит, сорбит, крахмал, глицин, кальция сульфат и др.*): обеспечивают стабильность лекарственных веществ, определяют степень и скорость всасывания, органолептические свойства таблеток;

- разрыхлители или дезинтегранты (*поливинилпирролидон, твины, сены, неионогенные ПАВ*): ускоряют всасывания за счёт быстрого механического разрушения таблетки в жидкой среде;
- склеивающие или связующие вещества (*слизь крахмала, метилцеллюлоза, этилцеллюлоза, поливинилпирролидон*): придают прочность таблеткам, влияют на скорость растворения лекарственных веществ;
- скользящие вещества или лубриканты (*тальк, каолин, аэросил, крахмал*): улучшают сыпучесть лекарственных субстанций.

Из классификации, приведённой выше, видно, что некоторые из вспомогательных веществ могут одновременно выполнять несколько функций, и соответственно относятся к разным группам, поэтому такое деление условно (табл. 2).

Таблица 2

Обобщённая химическая классификация и роль фармацевтических вспомогательных веществ [92]

Химическая классификация	Выполняемые функции
Вода, спирты	Пластичность
Эфиры, карбоксильные кислоты	Точность дозирования
Глицериды, воска	Стабильность
Углеводы	Технологичность
Углеводороды, производные галогенов	Переносимость
Полимеры	Распадаемость
Минералы	Растворение
Протеины	Контролируемое высвобождение

Важно ещё раз подчеркнуть, что вспомогательные вещества должны быть подобраны индивидуально в каждом случае, и этот выбор должен быть научно обоснован. Ниже будут приведены частные случаи взаимодействия вспомогательных веществ с действующими в табл. 3.

3.4.1 Технологические характеристики неусиллина, лудипресса, твёрдой дисперсии на основе поливинилпирролидона

Сегодня фармацевтические предприятия стремятся создать вспомогательные вещества, которые бы способствовали увеличению биодоступности активной лекарственной субстанции, не взаимодействовали бы с ней, делали бы процесс производства быстрым и экономичным. Полимерные вспомогательные вещества пользуются популярностью у производителей и соответствуют выше перечисленным требованиям [96-97].

Неусиллин — многофункциональное вспомогательное вещество, которое представляет собой синтетическую аморфную форму магния аммония метасиликата. Неусиллин достаточно часто применяется в фармацевтическом производстве и обладает следующими положительными характеристиками: придаёт прочность таблеткам, обладает высокой поглощаю-

Взаимодействия вспомогательных веществ с лекарственными субстанциями [87]

Положительное влияние	Отрицательное влияние
Разбавители	
Лактоза усиливает действие тестостерона.	Лактоза сводит к минимуму действие изониазида. Лактоза замедляет действие барбитала. Лактоза в сочетании с АЦСК резко угнетает процессы её всасывания, что приводит к снижению терапевтической активности. Лактоза в сочетании с противосудорожным препаратом фенитоин за счёт усиления всасывания и резкого увеличения концентрации может привести к летальному исходу.
Разрыхлители	
Твин-80 усиливает абсорбцию витаминов А, Д, Е.	
Связующие вещества	
Преднизолон, гризеофульвин, салициламид в сочетании с поливинилпирролидоном характеризуются высокой степенью растворения и биодоступности.	
Скользкие вещества	
	Скользкие вещества гидрофобного характера затрудняют проникновение пищеварительных жидкостей в пористую систему таблетки, ухудшая её распадаемость и всасывание.

шей способностью масла и воды, улучшает свойства других наполнителей и связующих веществ, помогает продлить срок хранения лекарственных препаратов, служит для стабилизации чувствительных к влаге, а также липофильных активных фармацевтических ингредиентов. Неусиллин отличается отсутствием побочных явлений, одобрен национальными институтами США и Японии. Неусиллин также используется как активное антацидное лекарственное вещество. Таким образом, многие субстанции могут иметь многофункциональное назначение и выступать в роли как вспомогательного, так и активного вещества [98-101].

Сейчас создание эффективных лекарственных препаратов не требует применения большого числа вспомогательных веществ, так как были разработаны многофункциональные комплексные смеси, что значительно упрощает процесс производства, транспортировки и хранения веществ.

Лудипресс — инновационный продукт немецкой компании BASF, который представляет собой комбинированное вспомогательное вещество, состоящее из наполнителя (лактоза), связующего вещества (Коллидон — поливинилпирролидон, растворимый в воде) и дезинтегранта (Коллидон CL — поливинилпирролидон, не растворим ни в одном из разрешённых к медицинскому применению растворителей, что определяет введение в таблетлируемую массу в сухом виде). Лудипресс характеризуется отличной сыпучестью, что обеспечивает точность смешения и дозирования, низкой гигроскопичностью, что способствует стабильности при хранении. Использование комплексных вспомогательных веществ делает процесс производства лекарственных средств более быстрым, экономичным, менее энергозатратным. Данная комбинация отличается высоким качеством. Для производства таблетирован-

ной лекарственной формы достаточно использовать Лудипресс, лубрикант и активное фармацевтическое вещество, это упрощает процессы дозирования и хранения веществ. Пероральные лекарственные формы, содержащие Лудипресс, характеризуются высокой прочностью, что обеспечивает связующее вещество, а также мгновенной распадаемостью в ЖКТ и быстрым высвобождением активной лекарственной субстанции, что стало возможным благодаря использованию отличного дезинтегранта — Коллидон С1.

Повышение биодоступности нерастворимых в воде активных субстанций является актуальной задачей на этапе разработки лекарственных препаратов. Существуют различные методы для достижения желаемого эффекта, такие как образование солей, солюбилизация, микронизация, а также образование твёрдых дисперсий на основе гидрофильного носителя [105-106]. Последние представляют собой дисперсии одного или более активных ингредиентов в инертном носителе или матрице. В качестве матриц используют полимерные соединения: поливинилпирролидон (ПВП), полиэтиленгликоль (ПЭГ), сополимеры акриловой кислоты, эфиры целлюлозы. Использование твёрдых дисперсий позволяет увеличить скорость растворения некоторых активных фармацевтических субстанций в сотни раз. Твёрдые дисперсии получают методом сплавления или растворения (с последующей отгонкой растворителя) лекарственного вещества в матрице. Были проведены различные сравнительные работы по биодоступности активных фармацевтических субстанций в форме твёрдых дисперсий с ПВП и в качестве одиночного составляющего, и было установлено, что скорость и продолжительность действия лекарственного вещества, диспергированного в матрице, может быть повышена в 2-3 раза [107-112].

4. Современные подходы в технологии изготовления лекарственных форм пептидных препаратов

Пептидные лекарственные препараты имеют ряд недостатков, связанных с их структурой и фармакокинетическими характеристиками. К ним относятся: большой размер молекул, высокая гидрофильность и как следствие низкая проницаемость в ткани, метаболическая нестабильность (ферментативная деградация и подверженность гидролизу в кислой среде ЖКТ), короткий период полужизни, быстрый метаболизм и высокий клиренс, иммуногенность. Как следствие при пероральном применении пептидных препаратов уровень абсолютной биодоступности достигает в большинстве случаев 1% [13, 14, 113].

Чтобы увеличить биодоступность пептидных препаратов используют следующие приёмы: модификация физико-химических свойств активной субстанции (микронизация, конъюгация с полиэтиленгликолем), добавление новых функций к лекарственному препарату (введение в состав рецептуры ингибирующих ферментов, использование мукоадгезивных полимеров в составе лекарственных препаратов, добавление молекул-переносчиков к пептидным препаратам), использование усовершенствованных систем доставки, а также новых лекарственных форм [114-119]. Далее будут рассмотрены частные примеры техник повышения биодоступности пептидных препаратов.

Увеличение периода полувыведения ($T_{1/2}$) протеинов может быть достигнуто посредством пегилирования. Эта модификация активной субстанции представляет собой конъюгирование пептида с полиэтиленгликолем (ПЭГ), что повышает гидрофобность вещества, служит защитой от ферментативной деградации, уменьшает иммуногенность, которой могут обладать пептиды. Этот метод также способствует стерической стабилизации молекулы, тем самым увеличивая время её циркуляции в крови. Модификация пептидной структуры может быть достигнута не только посредством конъюгации с ПЭГ, а также с другими липофильными компонентами [113-114, 120]. Например, в соединении ГБ-115 для увеличения липофильности дипептида был предложен фрагмент фенилгексаноил [15].

Чтобы избежать возможности ферментативного разрушения пептидных лекарственных веществ, в состав лекарственных форм вводят ингибиторы протеаз. Однако увеличение всасывания лекарственных пептидов посредством ингибирования протеаз может привести к всасыванию нежелательных протеинов. Данная модификация не получила широкого применения на сегодняшний день и требует дальнейшего развития [121].

Добавление молекул-переносчиков к пептидным соединениям может повысить биодоступность лекарственных веществ. Однако такие препараты пока не доступны. В основе данной технологии лежит распознавание лигандов, конъюгированных с активной субстанцией, рецепторами межклеточных систем доставки организма. Такими лигандами являются лектины, ток-

сины, вирусные гемагглютинины, инвазины, трансферрин, витамин B_{12} , фолат, рибофлавин, биотин [114].

Использование различных систем доставки актуально для защиты от ферментативной и кислотной деградации лекарственных веществ в ЖКТ, способствует пролонгированному высвобождению лекарственного вещества из матрицы и как следствие пролонгированному действию, таргетной доставке, снижению иммуногенности. Для создания таких систем используют полимерные материалы. Данная технология заключается в стабилизации препаратов протеинов в материале-носителе путём заключения в матрицу, инкапсулирования или же ковалентного связывания. Полимерные системы доставки делятся на гидрогели, наночастицы, микросферы, а также системы доставки на основе липидов (микроэмульсии, липосомы, твёрдые липидные наночастицы) [122-124].

Для пептидных лекарственных субстанций, медленно растворимых в системе ЖКТ (особенно, если продолжительность растворения дольше, чем продолжительность физиологического транзита), помимо микронизации, используют специальные лекарственные формы, обеспечивающие их дисперсию в водной среде. К таким лекарственным формам относятся пеллеты, которые представляют собой агломераты тонко измельчённых порошков, имеют большую площадь свободной поверхности, что уменьшает время растворения лекарственного вещества в ЖКТ. Пеллеты покрывают кишечнорастворимой оболочкой и помещают в твёрдую желатиновую капсулу. Данная лекформа защищает пептидные лекарственные средства от ферментативной деградации и кислого содержимого желудка [125-126].

5. Фармакокинетические особенности коротких нейропептидов при различных способах введения

Нейропептиды или регуляторные пептиды — класс биоактивных веществ белковой природы, образующихся в центральной или периферической нервной системе и регулирующий физиологические функции организма. Нейропептиды как эндогенные вещества имеют ряд преимуществ с фармакологической точки зрения, а именно: высокая физиологическая активность, многофункциональность, минимум побочных эффектов. Но их использование в качестве лекарственных препаратов, особенно в пероральных формах не представляется возможным, так как пептиды обладают низкой энзиматической устойчивостью, плохой проницаемостью через ГЭБ, гидролизуются в кислой среде желудка, подвергаются пресистемному метаболизму, ограниченно всасываются ввиду большой молекулярной массы и присущей им гидрофильности.

Поэтому возникла необходимость синтеза коротких активных пептидов, среди которых особое место занимают дипептиды, защищённые химической группировкой, которая также придаёт молекуле препарата липофильность. Такая модификация дипептидов способствует стабильности и хорошей биодоступности.

Гудашиевой Т.А. ещё в 1985 г. предложен подход в дизайне дипептидов, которые бы имитировали структуру не-пептидного прототипа с определённой нейротропной активностью, а также активного фрагмента исходного пептида с аналогичной активностью [13].

С использованием этого дизайна в институте ФГБУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» РАМН были синтезированы пептидные препараты ноопепт и дилепт. Дипептидный ноотропный препарат с анксиолитической активностью ноопепт (N-фенилацетил-L-пролил-глицина), который представляет собой пептидный аналог пирацетама, успешно применяется в клинической практике. Ранее были проведены доклинические исследования фармакокинетики препарата после его перорального введения крысам и кроликам: при этом значение абсолютной биодоступности составило 7,1% у крыс и 9,33% — у кроликов, что значительно выше, чем это было установлено для многих других пептидных веществ. Именно поэтому на основании фармакокинетических данных ноопепта было рекомендовано создание пероральной лекформы этого препарата [128].

Этот принцип лежал и в основе создания нового дипептидного анксиолитика ГБ-115 (амид N-фенил-N-гексаноил-L-глицил-L-триптофан) — ретроаналога холецистокинина-4, фармакокинетика которого изучена в данной работе [14, 15, 127].

Далее целесообразно привести описание фармакокинетического исследования препарата на беспородных крысах-самцах: препарат вводился в дозе 50 мг/кг *per os* и определялся в плазме крови крыс через 5, 10, 15, 20, 25 мин после введения препарата. Результаты исследования таковы: препарат быстро всасывался в ЖКТ и поступал в системный кровоток уже через 5 мин после введения, достигал максимальной концентрации через 10 мин, затем его уровень снижался и через 25 мин ноопепт в плазме крови крыс не обнаруживался. Полученные в результате эксперимента основные фармакокинетические параметры представлены в табл. 4 [128].

Таблица 4

Фармакокинетические параметры препарата ноопепт после перорального введения в дозе 50 мг/кг крысам

Параметры	Значения в плазме крови
AUC, нг/мл×ч	216
T _{макс} , мин	10
C _{макс} , нг/мл	820
Cl _{po} , л/мин	3.86
K _{эл} , мин ⁻¹	0.10
T _{1/2} , мин	6.96
M _{RT} , мин	15.36
Vz _{po} , л	38.75

Другой модифицированный пептид — дилепт (метиловый эфир N-капроил-L-пролил-L-тирозина) является трипептоидным аналогом нейротензина, обладает антипсихотическим действием, способен

улучшать когнитивные функции и оказывать нейропротективное действие. Однако величина абсолютной биодоступности данного соединения у крыс составила 0,1%. Столь низкое значение обусловлено, скорее всего, эффектом первого прохождения через печень. В отношении данного препарата также были проведены исследования, результатом которых явились следующие фармакокинетические показатели (табл. 5): препарат достаточно долго определяется в крови и имеет период полувыведения 27 мин, величина среднего времени удерживания дипептида составила 42 мин. Максимальная концентрация препарата не превышает 8,5 нг/мл через 15 мин после введения препарата, что является очень низким показателем при введении достаточно высокой дозы — 200 мг/кг. Поэтому и наблюдаются высокие значения клиренса — 1341,7 л/мин и гипотетического объёма распределения — 52968 л. Степень всасывания, оцениваемая по величине AUC, невелика и составляет — 2,5 нг/мл×ч [129]. Однако следует отметить, что в процессе первого прохождения дилепта через печень в значительных количествах в крови животных определялся его активный метаболит M-1, что указывает на перспективность разработки пероральной лекформы этого соединения.

Таблица 5

Фармакокинетические параметры препарата дилепт после перорального введения активной субстанции крысам в дозе 200 мг/кг в виде водной суспензии

Параметры	Значения в плазме крови
AUC, нг/мл×ч	2.5
T _{макс} , мин	15
C _{макс} , нг/мл	8.5
Cl _{po} , л/мин	1341.7
Kэл, мин ⁻¹	0.025
T _{1/2} , мин	27
M _{RT} , мин	42
Vz _{po} , л	52968

Изучена также фармакокинетика другого пептидного препарата селанк [130], обладающего психотропной активностью и по структуре представляющего собой гептапептид — треонил-лизил-пролил-аргинил-пролил-глицил-пролил-диацетат, который выпускается в форме назальных капель 0,15%. Ввиду интраназального применения препарата целесообразно было проводить исследования после в/в введения крысам.

Гептапептид вводили в хвостовую вену крыс в дозе 20 мг/кг в водном растворе в течение 10 с. Крыс декапитировали через 1, 2, 5, 7 и 10 мин. В результате проведённого эксперимента было установлено, что через 1 мин после введения концентрация гептапептида в плазме крови составляет 950±150 нг/мл плазмы, через 2 мин она снижается до 560±200 нг/мл, а через 5 мин — до 333±150 нг/мл. Через 10 мин гептапептид в плазме крови крыс не обнаруживался. Итак, наблюдается

очень резкое снижение концентрации препарата после в/в введения и очень непродолжительное удерживание селанка в плазме крови крыс.

Как видно из представленных данных в табл. 6, гептапептид имеет короткий период полувыведения, равный 3,158 мин, величина же среднего времени удерживания препарата составляет — 4,283 мин, что также является низким показателем. При этом отмечаются большие значения клиренса и объёма распределения, которые при небольшой величине степени всасывания, свидетельствуют о его быстром метаболизме и переходе из кровеносного русла в периферические органы и ткани [130].

Таблица 6

Фармакокинетические параметры препарата селанк после в/в введения активной субстанции крысам в дозе 20 мг/кг в виде водной суспензии

Параметры	Значения в плазме крови
AUC, нг/млхч	4.596
T _{макс} , мин	1
C _{макс} , нг/мл	950
Cl _{po} , л/мин	4.352
Кэл, мин ⁻¹	0.2195
T _{1/2} , мин	3.158
M _{RT} , мин	4.283
V _{zpo} , л	15.290

В случае Селанка фармакокинетические исследования на животных не позволили рекомендовать создание его пероральной лекформы в связи с невозможностью количественного определения препарата при этом способе введения. Поэтому была изучена интраназальная лекформа, фармакокинетические результаты которой представлены выше и которая была внедрена в медицинскую практику.

Таким образом, на нескольких примерах показана важность проведения фармакокинетических исследований в особенности касающихся пептидных соединений, отличающихся своей спецификой, описанной выше. Эти исследования уже на фармакокинетическом уровне позволяют рекомендовать перспективный путь введения данного соединения, дают полную картину его фармакокинетических характеристик, путей его биотрансформации и позволяют дать ряд других ценных рекомендаций.

Недавно в ФГБУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» РАМН был создан новый дипептидный анксиолитик ГБ-115 (амид N-фенил-N-гексаноил-L-глицил-L-триптофан), обладающий анксиолитической, антиалкогольной, антидепрессивной и анальгетической активностью. Поэтому важным и необходимым является изучение доклинической фармакокинетики и биодоступности соединения ГБ-115 с целью получения необходимой информации для выбора путей введения этого соединения и оптимальной лекформы.

Литература

1. Michael T., Zetsche U., Margraf J. Epidemiology of anxiety disorders. // Psychiatry. 2007. 6 issue 4. P. 136-142.
2. Хабиров Ф.А., Хайбуллин Т.И., Бабичева Н.Н. и др. Клинико-нейрофизиологическая оценка эффективности применения мексидола в лечении тревожных расстройств у больных рассеянным склерозом хронической ишемией головного мозга. // Бюлл. экспер. биол. и мед. 2012. С. 6-10.
3. Andrews G., Sanderson K., Slade T. et al. Why does the burden of disease persist? Relating the burden of anxiety and depression to effectiveness of treatment. // Bulletin of the World Health Organization 2000. 78 (4). P. 446-454.
4. Аведисова А.С., Чахава В.О., Лесс Ю.Э. и др. Новый анксиолитик «Афобазол» при терапии генерализованного тревожного расстройства (результаты сравнительного исследования с диазепамом). // Психиатр. и психофармакотер. 2006. 8 (3). С. 116-119.
5. Аведисова А.С., Аханкин Р.В. Эффективность и переносимость терапии Афобазолом. // Психиатр. и психофармакотер. 2007. 9 (3). С. 16-20.
6. Краснов В.Н., Вельтищев Д.Ю., Немцов А.В., и др. Новые подходы к лечению стрессовых и тревожных расстройств: результаты многоцентрового исследования эффективности Афобазола в психиатрической практике. // Психиатр. и психофармакотер. 2007. 9 (4). С. 16-20.
7. Незнамов Г.Г., Давыдова И.А., Сюняков С.А. и др. Новый анксиолитик Афобазол: результаты сравнительного клинического исследования с диазепамом при генерализованном тревожном расстройстве. // Психиатр. и психофармакотер. 2006. 8 (4). С. 8-13.
8. Fink H., Rex A., Voits M. et al. Major biological actions of CCK — a critical evaluation of research findings. // Exp. Brain Res. 1998. 123(1-2). P. 77-83.
9. Bourin M., Malinge M., Vasar E. et al. Two faces of cholecystokinin: anxiety and schizophrenia. // Fundam. Clin. Pharmacol. 1996. 10(2). P. 116-126.
10. Bradwejn J., Koszycki D. Cholecystokinin and panic disorder: past and future clinical research strategies. // Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl. 2001. 234. P. 19-27.
11. Zwanzger P., Domschke K., Bradwejn J. Neuronal network of panic disorder: the role of the neuropeptide cholecystokinin. // Depress Anxiety. 2012.
12. Del Boca C., Lutz P.E., Le Merrer J. et al. Cholecystokinin knock-down in the basolateral amygdala has anxiolytic and antidepressant-like effects in mice. // Neuroscience. 2012. Т. 218. P. 185-195.
13. Гудашева Т.А. Стратегия создания дипептидных лекарств. // Вестн. Рос. акад. мед. наук. 2011. Т.7. С. 8-15.
14. Гудашева Т.А., Кирьянова Е.П., Колик Л.Г. и др. Дизайн и синтез дипептидных аналогов холецистокинина-4 с анксиолитической и анксиогенной активностью. // Биоорг. хим. 2007. 33(4). С. 413-420.
15. Гудашева Т.А., Середенин С.Б., Лезина В.П. и др. Синтез, анксиолитическая активность и конформационный анализ ретропептидных аналогов холецистокинина-4. // Хим-фарм. Журнал. 2006. Т. 7. С. 21-26.

16. Колик Л.Г. Разработка оригинального анксиолитика с антиалкогольной активностью на основе фармакологического изучения новых производных холецистокинина (Диссертация на соискание учёной степени доктора биологических наук). Москва; 2012.
17. Каркищенко Н.Н., Хоронько В.В., Сергеева С.А. и др. Фармакокинетика. Ростов Феникс; 2001.
18. Кукеса В.Г. Клиническая фармакокинетика: теоретические, прикладные и аналитические аспекты: руководство. М.: ГЭОТАР_Медиа. 2009.
19. Urso R., Blandi P., Giorgi G. A short introduction to pharmacokinetics. // *Eu Rev. for Med. and Pharmacol. Sci.* 2002. 6. P. 33-44.
20. Panchagnula R., Narisetty S. Biopharmaceutics and pharmacokinetics in drug research. // *Int. Jour. of Pharm.* 2000. 201. P.131—150.
21. Srivastava P. Drug Metabolism and Individualized Medicine. // *Current Drug Metabolism.* 2003. 4: P. 33-44.
22. Kennedler E. Introduction to chromatography. Vienna: Institute for Analytical Chemistry, 2004.
23. Шнугул О. А., Яшин Я. И. Состояние и перспективы развития хроматографических методов и аппаратуры. Всероссийская конференция «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез». Краснодар. — 26 сентября — 01 октября 2010 г.
24. McPolin O. An introduction to HPLC for pharmaceutical analysis. Mourn training services. 2009.
25. Settle F. Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry, Editor: «High Performance Liquid Chromatography», Phyllis Brown, Kathryn DeAntonois, Prentice Hall. 1997. P.147-164.
26. Skoog, Holler, Nieman. Principles of Instrumental Analysis., 5th Edition., Saunders College Publishing. 1998. P. 673-697, 725-766.
27. HPLC of peptides and proteins: methods and protocols / edited by Marie-Isabel Aguilar. Humana Press Inc. 2004.
28. Vydac G. The Handbook of analysis and purification of peptides and proteins by reversed-phase HPLC, third edition. 2002.
29. Carr D. A guide to the analysis and purification of proteins and peptides by reversed-phase HPLC: www.ace-hplc.com
30. Chen, Y., Mehok, A.R., Mant, C.T. et. al. Optimum concentration of trifluoroacetic acid for reversed-phase liquid chromatography of peptides revisited. // *J. of Chromatogr.* 2004. № 1043. P. 9 — 18.
31. Chen Y., Mant C.T., Hodges R.S. The selectivity differences in the separation of amphipathic a-helical peptides during reversed phase liquid chromatography at pHs 2.0 and 7.0 Effects of different packings, mobile phase conditions and temperature. // *J.Chromatogr.*, 1043. P. 99-111.
32. Corradini D., Kalghatgi K., Horvath C. Effect of mobile phase additives on peptide retention in reversed phase chromatography with pellicular and totally porous sorbents. // *J. Chromatogr.* 1996. P. 225-233.
33. McCalley D.V. Effect of the ionic strength of salts on retention and overloading behavior of ionizable compounds in reversed-phase liquid chromatogr. 2004. P. 43-55.
34. Dr. Stuart Jones. HPLC in a World Without Acetonitrile. Laserchrom HPLC Laboratories Ltd, Rochester, Kent ME2 4HU, UK.
35. E. Lendi B., R. Meyer V. The UV Detector for HPLC — An Ongoing Success Story OmniLab Ltd, Mettmenstetten, Switzerland, EMPA St. Gallen, Swiss Federal Laboratories for Materials Testing and Research, St. Gallen, Switzerland. LC • GC Europe. 2005. 18(3). P. 156—163.
36. Бражников В.В. Детекторы для хроматографии. М.: Машиностроение. 1992. С. 320.
37. Sutariya V., Wehrung D., J. Geldenhuys W. Development and Validation of a Novel RP-HPLC Method for the Analysis of Reduced Glutathione. // *Journ. of Chrom. Science.* 2012. V.50. P. 271—276.
38. Hamrnikova I., Miksik I., Uhrova M. et. al. Ultraviolet detector response of glycine and alanine homopeptides: Some specific features in capillary electrophoresis. // *Analytica Chimica Acta.* 1998. V.372. P. 257-272.
39. Руденко А.О., Карцова Л.А. Снарский С.И. Определение важнейших аминокислот в сложных объектах биологического происхождения методом обращённо-фазовой ВЭЖХ с получением фенилтиогидантоинов аминокислот. // *Сорб. и хром. процессы.* 2010. Т. 10(2). С. 223-230.
40. Scott E. Van Bramer. An Introduction to Mass Spectrometry. Chester. 1998.
41. Dr Alison E. Ashcroft. An Introduction to Mass Spectrometry. Leeds
42. Lee M. S. LC/MS Applications in Drug Development. John Wiley & Sons, New York. 2002.
43. Rohrs H. W., Gross M. L. The Encyclopedia of Mass Spectrometry. 2007. V. 6. P. 285.
44. Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A. et. al. The Proteomics Protocols Handbook. ed. J. M. Walker, Humana Press, Clifton, New Jersey. 2005. P. 751.
45. Chakraborty A.B., Berger S.J. Optimizatio of Reversed-Phase Peptide Liquid Chromatography Ultraviolet Mass Spectrometry Analyses Using an Automated Blending Methodology. *Journal of Biomol. Techn.* 2005. V.16 P. 325—333.
46. Downard K. Mass Spectrometry: A Foundation Course. Royal Society of Chemistry, UK. 2004.
47. Dass C. An Introduction to Biological Mass Spectrometry. Wiley, USA. 2002.
48. Siuzdak G. The Expanding Role of Mass Spectrometry in Biotechnology. MCC Press, San Diego. 2004.
49. Ashcroft A.E. Ionization Methods in Organic Mass Spectrometry. Analytical Monograph, Royal Society of Chemistry, UK. 1997.
50. Mamyrin B.A. Time-of-flight mass spectrometry (concepts, achievements, and prospects). // *Intern. Journ. of Mass Spectr.* 2001. V. 206. P. 251-266.
51. John H., Walden M., Schafer S. et. al. Analytical procedures for quantification of peptides in pharmaceutical research by liquid chromatography-mass spectrometry. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2004. V. 378. P. 883-897.
52. Qin W., Zhang Z., Tian Y., Xu F. et. al. Rapid quantification of lisinopril in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. // *Biomed. Chromatogr.* 2007. V. 21. P. 415-421.
53. Chernushevich I.V., Loboda A.V., Thomson, B.A. An introductionto quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. // *J. Mass. Spectrom.* 2001. V. 36. P. 849-865.
54. Hortin G.L. The MALDI-TOF mass spectrometric view of the plasma proteome and peptidome. // *Clin. Chem*. 2006. V. 52. P. 1223-1237.
55. Na D.H., DeLuca P.P., Lee K.C. Direct determination of the peptide content in microspheres by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. // *Anal. Chem.* 2004. V. 76. P. 2669-2673.
56. Amini A., Nilsson E. Quantitative analysis of polypeptide pharmaceuticals by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2008. V. 46. P. 411-417.
57. Qizhi Hu, Robert J. N., Hongyan Li et. al. The Orbitrap: a new mass spectrometer. // *J. Mass Spectrom.* 2005. V. 40. P. 430—443.
58. Scigelova M., Makarov A. Orbitrap Mass Analyzer — Overview and Applications in Proteomics. // *Practical Proteomics.* 2006. P. 16-21.
59. Bhusan R., Mahesh V. K., Mallikharjun P. V. Thin layer chromatography of peptides and proteins: A review. // *Biomed. Chrom.* 1989. V.3 (3). P. 95—104.
60. Thermo scientific Pierce GC and HPLC technical handbook. Thermo Fisher Scientific Inc. 2008. www.thermo.com.
61. Priddle J.D., Rose K., Offord R.E. The Separation and Sequencing of Permethylated Peptides by Mass Spectrometry Directly Coupled to Gas-Liquid Chromatography. // *Biochem. J.* 1976. V.157. P. 777-780.

62. Mohabbat, T., Drew, B., Caple, M. A Rapid, Simultaneous Determination of 33 Amino Acids and Dipeptides in Spent Cell Culture Media by Gas Chromatography-Flame Ionization Detection Following Solid and Liquid Phase Extraction. 2006.
63. Kaspar H. Amino acid analysis in biological fluids by GC-MS. Regensburg. — 2009.
64. Seifert W.E., McKee R.E., Beckner C.F. et. al. Characterization of mixtures of dipeptides by gas chromatography/mass spectrometry. // Anal. Biochem. 1978. V. 88. P. 149-161.
65. Kingston E.E., Duffield A.M. Plasma amino acid quantitation using gas chromatography chemical ionization mass spectrometry and ¹³C amino acids as internal standards. // Biomed. Mass. Spectrom. 1978. V. 5. P. 621-626.
66. Patzold R., Theis C., Bruckner H. Gas-chromatographic separation of stereoisomers of dipeptides. // Chirality. 2006. V. 18. P. 551-557.
67. Monlar-Perl I., Katona Z.F. GC-MS of amino acids as their trimethylsilyl/t-butylidimethylsilyl derivatives: in model solutions III. // Chromatographia (suppl.). -2000. V. 51. P. 228-236.
68. Husek P. Rapid derivatization and gas chromatographic determination of amino acids. // J. Chromatogr. 1991. V. 552. P. 289-299.
69. Zahradnicková H., Chvalová D., Hušek P. et. al. HPLC/MS and GC/MS analysis of amino acids, small peptides and biogenic amines in body fluids as their N (O,S) alkoxy carbonyl alkyl ester derivatives. 15th International symposium on pharmaceutical and biomedical analysis, Florence, Italy, Abstract Book. 2004. P. 273.
70. Koivunen M.E., Krogsrud R.L. Principles of Immunochemical Techniques Used in Clinical Laboratories. // LABMEDICINE. 2006. V.37 (8).
71. Renshaw S. Immunohistochemistry: Methods Express. Scion Publishing Ltd, Bloxham, UK. 2007.
72. Sedlakova P., Svobodova J., Miksik I. Capillary electrophoresis of peptides and proteins with plug of Pluronic gel. // J. of Chrom. B. 2006. V.839. P. 112—117.
73. Surugau L.N. Peptide separation by capillary electrophoresis with ultraviolet detection: some simple approaches to enhance detection sensitivity and resolution. // The Malaysian Journal of Analytical Sciences. 2011. V.15 (2). P. 273 — 287.
74. Catai J.R. Efficient capillary electrophoresis of peptides and proteins with bilayer-coated capillaries. — 2006.
75. Heiger D., Grimm R., Marzell H. Peptide mapping and analysis using capillary electrophoresis. Agilent Technologies, Waldbronn, Germany.
76. Schwartz H., Pritchett T. Separation of Proteins and Peptides by Capillary Electrophoresis: Application to Analytical Biotechnology. Beckman Coulter.
77. Sekhon B.S. An overview of capillary electrophoresis: Pharmaceutical, biopharmaceutical and biotechnology applications. // J Pharm Educ Res. 2011. V.2 (2).
78. Хомов Ю.А., Фомин А.Н. Капиллярный электрофорез как высокоэффективный метод. // Совр. пробл. науки и образ. 2012. Т. 5. С. 349.
79. Руководство по экспертизе лекарственных средств. ФГБУ Научный центр экспертизы средств медицинского применения. 2013. Т.1.
80. Хорушая Т.Г., Чучалин В.С. Биофармация — научное направление в разработке и совершенствовании лекарственных препаратов. 2006.
81. Toutain P.L., Bousquet-Me ?Lou A. Bioavailability and its assessment. // J.vet. Pharmac. Therapy. 2004. V.27. P. 455—466
82. Oral bioavailability: prediction using in vitro kinetic data. Kinetics and Metabolism. 2009.
83. Guidance for Industry, Bioavailability and Bioequivalence Studies for Orally Administered Drug, Products — General Considerations. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). 2003.
84. Fischer U.M., Harting M.T., Jimenez F. Pulmonary Passage is a Major Obstacle for Intravenous Stem Cell Delivery: The Pulmonary First-Pass Effect. // Stem cells and devel. 2009. V.18 (5).
85. Boer F. The role of the lungs in drug distribution. Amsterdam. 1999.
86. Белоусов Ю.Б., Моисеев В.С., Лепахин В.К. Клиническая фармакология и фармакотерапия. Универсум Паблишинг. 1997. С. 532.
87. Тихонов А.И., Ярных Т.Г., Зупанец И.А. Биофармация. Издательство «Золотые страницы». 2003.
88. Larran M. Micronisation of Pharmaceutical Powders for Use in Inhalation. // Pharmaceutical Manufacturing and Packing Sourcer Spring. 2005. (5).
89. Voelker M., Hammer M. Dissolution and pharmacokinetics of a novel micronized aspirin formulation. // Inflammopharmacology. 2012. V.20(4). P. 225-231.
90. Cooper S.A., Voelker M. Evaluation of onset of pain relief from micronized aspirin in a dental pain model. // Inflammopharmacology. 2012. V.20(4). P.233-242.
91. <http://www.drugs.com/pro/glyburide-micronized.html>
92. Pifferi G., Restani P. The safety of pharmaceutical excipients. // Il Farmaco. 2003. V.58. P. 541-550.
93. Bharate S.S., Bharateb S.B., Bajaj A.N. Interactions and incompatibilities of pharmaceutical excipients with active pharmaceutical ingredients: a comprehensive review. // J. Exc. and Food Chem. 2010. 1 (3).
94. Tekeshwar K., Shailendra K.G., Mukesh K.P. et. al. Natural Excipients: A Review. // Asian J. of Pharm. and Life Sci. 2012. V.2 (1). P. 97-108.
95. Patel H., Shah V., Upadhyay U. New pharmaceutical excipients in solid dosage forms — A review. // Int. J. of Pharm. & Life Sci. (IJPLS), Vol. 2, Issue 8. 2011.
96. Ipatova O.M., Torkhovskaia T.I., Medvedeva N.V. et. al. Bioavailability of oral drug formulations and methods for its improvement. // Biomed Khim. 2010. V. 56(1). P. 101-119.
97. Егوشيная Ю.А., Поцелуева Л.А. Современные вспомогательные вещества в таблеточном производстве. // Усп. совр. естесств. 2009. №10. С. 30-33.
98. <http://www.neusilin.com/>
99. http://www.harke.com/fileadmin/images/pharma/Broschueren/Fuji_Neusilin.
100. Gupta M.K. Formation of physically stable drugs by milling with Neusillin. // J.Pharm. Sci. 2003. V. 92(3). P. 536-551.
101. Gupta M.K. Enhanced drug dissolution and bulk properties of solid dispersions granulated with a surface adsorbent. // Pharm. Dev. Technol. 2001. V.6(4). P. 563-572.
102. http://www.pharmaingredients.basf.com/Documents/ENP/Brochure/EN/BASF_Ludipress_LCE.pdf
103. http://www.pharmaingredients.basf.com/Statements/Technical%20Informations/EN/Pharma%20Solutions/EMP%20030731e_Ludipress.pdf
104. Heinz R., Wolf H., Schuchmann H., et. al. Formulation and development of tablets based on Ludipress and scale-up from laboratory to production scale. // Drug Dev Ind Pharm. 2000. V. 26(5). P. 513-521.
105. Serajuddin A.T.M. Solid dispersions of poorly water-soluble drugs: early promises, subsequent problems and recent breakthroughs. // I. Pharm. Sci. 1999. V.88 (10). P. 1058-1066.
106. Leuner C., Dressman J. Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. // Eur. J. Pharm. u biopharm. 2000. V.50 P. 47-60.

107. *Craig D.Q.M.* The mechanism of drug release from solid dispersions in water-soluble polymers. // *Int. J. of Pharmaceutics*. 2002. V.231. P. 131-144.
108. *Anupama K., Poddar M.* Solid dispersions: an approach towards enhancing dissolution rate. // *International. J. of Pharm. and Pharm. Sci.* 2011. V. 3(4).
109. *Carina D.* Drugs and polymers in dissolving solid dispersions: NMR imaging and spectroscopy. Doctoral Thesis at the Royal Institute of Technology Stockholm, Sweden. 2010.
110. *Sanjoy K.D., Sudipta R., Yuvaraja K. et. al.* Solid Dispersions: An Approach to Enhance the Bioavailability of Poorly Water-Soluble Drugs. // *Int. J. of Pharmac. and Pharm.Tech.* V. 1(1). P. 37-46.
111. *Tiwari R., Tiwari G., Srivastava B., et.al.* Solid Dispersions: An Overview To Modify Bioavailability Of Poorly Water Soluble Drugs. // *International Journal of PharmTech Research*. 2009. V.1(4). P. 1338-1349.
112. *Хабриев Р.У., Решетняк В.Ю., Попков В.А. и др.* Повышение растворимости мезапама путём получения его твёрдых дисперсий. // *Хим-фарм. Журн.* 2010. №11. С. 25-29.
113. *Ratnaparkhi M.P., Chaudharis S.P., Pandya V.A.* Peptides and proteins in pharmaceuticals. // *Int. J. of Curr. Pharm. research*. 2011. V.3(2).
114. *Morishita M., Peppas N.A.* Is the oral route possible for peptide and protein drug delivery? // *Drug Disc.Today*. 2006. V.11(19/20).
115. *Saltero R., Ekwuribe N.* The oral delivery of protein and peptide drugs. // *Innov.in pharm. tech.* P.106-110.
116. *Sotto C.* Converting a peptide into a drug: strategies to improve stability and bioavailability. // *Curr. Med. Chem*. 2002. V. 9 (9). P. 963-978.
117. *Adessi C., Sotto C.* Strategies to improve stability and bioavailability of peptide drugs. // *Frontiers in Med. Chem*. 2004. V.1 (1). P. 513-527.
118. *Kompella U.B.* Delivery systems for penetration enhancement of peptide and protein drugs: design considerations. // *Adv. Drug Del. Rev.* 2001. V. 46. P.211-245.
119. *Pawan D.* Protein or Peptide drugs: Applications, Problems and Solutions. // *Biotech. Soc. Of Nep.* 2010. V.2.
120. *Harris, J.M., Chess R.B.* Effect of pegylation on pharmaceuticals. // *Nat. Rev.* 2. 2010. P. 214—221.
121. *Herrero E.P., Alonso M.J., Csaba N.* Polymer-based oral peptide nanomedicines. // *Therapeutic Delivery*. 2012. 3(5). P. 657—668.
122. *Bodhankar M.M., Agnihotri V.V., Bhushan S.B.* Feasibility, formulation and characterization of innovative microparticles for oral delivery of peptide drug. // *Int. J. of research in pharm. and chem.* 2011. V.1 (3). P. 630-636.
123. *Almeida A.J., Souto E.* Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for peptides and proteins. // *Adv. Drug. Del. Rev.* 2007. V.59 P. 478—490.
124. *Chunbai H., Fuying C., Lichen Y.A.* A polymeric composite carrier for oral delivery of peptide drugs: bilaminated hydrogel film loaded with nanoparticles. // *Eur. Polymer J.* 2009. V.45. P. 368-376.
125. *Vikash D., Behera S. K., Agarwal R., et.al.* Pelletization technique in drug delivery system. // *J.of Curr. Pharm. Research*. 2012. V. 9 (1). P. 19-25.
126. *Manivannan R.* Multiparticulate drug delivery system: pellet & pelletization technique. // *Drug Inv.today*. 2010. V.2(5). P. 233-237.
127. *Бойко С.С., Кольванов Г.Б., Жердев В.П. и др.* Экспериментальное исследование фармакокинетики триптофансодержащего дипептида ГБ-115. // *Бюлл. эксп. биолог. и мед.* 2007. Т.144(9). С. 285-287.
128. *Бойко С.С., Островская Р.У., Жердев В.П. и др.* Фармакокинетика и проницаемость через гематоэнцефалический барьер нового ацил-пролилдипептида с ноотропными свойствами после перорального введения. // *Бюлл. эксп. биолог. и мед.* 2000. Т.129(4). С. 426-429.
129. *Менсонжик Н.В.* Экспериментальное изучение фармакокинетики и метаболизма нового фармакологического препарата дилепт. Диссертация на соискание учёной степени кандидата биологических наук. Москва. 2009.
130. *Бойко С.С., Жердев В.П., Дворянинов А.А. и др.* Фармакокинетика и метаболизм гептапептида — перспективного синтетического аналога тафтсина с психостимулирующим действием у крыс. // *Эксп. и клин. Фармаколог.* 1998. Т.61(5). С. 42-45.

Исследование биоэквивалентности препаратов содержащих мемантин

*Карлицкая А.А.¹, Красных Л.М.¹, Смирнов В.В.^{1,2},
Василенко Г.Ф.¹, Кузнецова Н.И.², Кукес В.Г.^{1,2}*

¹ — ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения», Москва, Россия

² — ГБОУ ВПО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова», г. Москва

Резюме

В настоящее время в России разработан отечественный аналог Мемантина акатинола — Меманейрин в виде капель, который фармацевтически эквивалентен препарату Акатинол мемантин. Целью настоящей работы являлось исследование биоэквивалентности двух препаратов мемантина: Меманейрин (капли, 10 мг) и Акатинол мемантин (капли, 10 мг). Оценка биоэквивалентности проводилась путём определения концентрации мемантина в плазме крови добровольцев, которая определялась методом ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектором.

Ключевые слова: биоэквивалентность, акатинол мемантин, болезнь Альцгеймера

Bioequivalence study drug containing memantine

Karlitskaya A.A.¹, Krasnyh L.M.¹, Smirnov V.V.^{1,2}, Vasilenko G.F.¹, Kuznetsova N.I.², Kukes V.G.^{1,2}

¹ — FGBI «Scientific Center for Expertise of Medical Products», Moscow, Russia

² — Medical University «First MGPU them. IM Sechenov», Moscow

Summary

At present, Russia has developed domestic analogue of Memantine Akatinol — Memaneyrin in the form of droplets which is pharmaceutically equivalent drug memantine Akatinol. The aim of this study was to investigate the bioequivalence of the two formulations of memantine: Memaneyrin (drops, 10 mg) and Akatinol memantine (drops, 10 mg). Bioequivalence assessment was carried out by determining the concentration of memantine in plasma of volunteers, which was determined by HPLC with mass spectrometric detection.

Keywords: bioequivalence Akatinol memantine, Alzheimer's disease

Введение

Более чем десятилетние интенсивные исследования были посвящены поиску антагонистов NMDA-рецепторов с целью создания методов потенциального нейропротективного лечения как острых, например, инсульта, так и хронических нейродегенеративных заболеваний [1]. Однако только отдельные из предлагавшихся медикаментозных агентов дошли до поздних стадий клинических испытаний из-за наличия у них тяжёлых побочных эффектов. Вместе с тем было обнаружено, что ряд препаратов, уже несколько лет используемых в клинической практике, например мемантин, амантадин, декстрометорфан и др. обладают NMDA-блокирующими свойствами, которые по всей вероятности и определяют их терапевтическую эффективность при лечении деменции [2, 3]. Мемантин, препарат, который блокирует ионные каналы образованные NMDA рецепторами, является широко применяемым препаратом для лечения болезни Альцгеймера [4, 5].

Мемантин является неконкурентным низкоаффинным антагонистом NMDA-рецепторов [6]. Он позволя-

ет физиологически активировать NMDA-рецепторы в процессе нейронарной передачи сигнала (например, при обучении) и одновременно блокирует обусловленную нейродегенеративным процессом патологическую активность NMDA-рецепторов [7].

Большое количество выпускаемых различными фирмами воспроизводимых лекарственных препаратов совсем не означает одинакового фармакологического и терапевтического действия этих лекарств. Для того чтобы ориентироваться в правильном назначении того или иного препарата, врачу необходимо знать, чем отличаются воспроизводимые лекарства (иными словами — знать отличия фармакокинетических параметров этих препаратов). На основании этих знаний врач может грамотно назначать дозировку лекарства и подбирать оптимальные интервалы дозирования.

В настоящее время в России разработан отечественный аналог Мемантина акатинола — Меманейрин в виде капель, который фармацевтически эквивалентен препарату Акатинол мемантин. Разработка препарата соответствует провозглашённой Правительством РФ лекарственной политике, направленной на импортзамещение [8].

Во всём мире для подтверждения одинаковой терапевтической активности воспроизводимых препаратов проводятся исследования биоэквивалентности.

Поэтому целью настоящей работы являлось исследование биоэквивалентности двух препаратов мемантина: Меманейрин (капли, 10 мг) и Акатинол мемантин (капли, 10 мг). Оценка биоэквивалентности проводилась путём определения концентрации мемантина в плазме крови добровольцев, которая определялась методом ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектором.

Материалы и методы исследования

Исследуемые препараты

Тест-препарат (Т): Меманейрин (ЗАО «БИС», Россия), капли содержащие 10 мг мемантина.

Препарат сравнения (R): Акатинол мемантин (Merz, ФРГ), капли содержащие 10 мг мемантина.

Дизайн исследования

Исследование проводили открытым методом по перекрёстной и рандомизированной схеме на здоровых добровольцах.

Для проведения фармакокинетического исследования препаратов было отобрано 18 здоровых добровольцев, мужского (n=8) и женского (n=10) пола (возраст — $36,2 \pm 5,5$ лет; масса тела — $78,2 \pm 12,4$ кг; рост — $173,6 \pm 9,5$ см). В качестве добровольцев были привлечены лица, добровольно изъявившие желание участвовать в испытаниях, прошедшие клинико-физиологическое обследование и допущенные к участию в данных испытаниях врачом исследователем.

Отбор проб крови осуществлялся из кубитального катетера. Через 10-15 минут после установки катетера, натошак, до применения препарата отбиралась исходная проба крови. Затем добровольцы принимали внутрь 10 мг одного из препаратов (в соответствии с планом рандомизации). Далее отбор крови производился через 1; 1,5; 2; 3; 4; 5; 6; 8; 12; 24; 48; 72 и 96 часов после приёма препарата. Приём пищи предлагался спустя 4 ч после приёма препарата (стандартный обед). Повторное исследование проводили через 14 дней по идентичной схеме. Кровь в количестве 5 мл отбирали в стеклянные пробирки. Пробирки маркировали с указанием шифра испытуемого, номера пробы, названия препарата. Промежуток времени между отбором крови и её обработка не превышал 5 мин. Плазму отделяли центрифугированием и хранили при температуре -35°C до проведения анализа. Пробы с сопроводительным направлением, в котором указывали инициалы испытуемого, пол, возраст, масса тела, рост, соответствующие шифру на пробирке, предоставляли в лабораторию.

При проведении исследований по изучению сравнительной фармакокинетики препаратов мемантина ни один доброволец не выбыл из исследования. Анализ лабораторных и инструментальных исследований добровольцев до и после приёма исследуемых препа-

ратов показал, что параметры были в пределах нормы. Таким образом, не было обнаружено проявлений нежелательного действия препаратов на состояние добровольцев.

Хромато-масс-спектрометрический анализ

Из описанных в литературе методов определения мемантина в плазме крови применяются методы ВЭЖХ с флуориметрическим детектированием [9, 10], а также с применением масс-спектрометрического детектирования. За основу нами были выбраны методики [11, 12], которые были существенно модифицированы.

Анализ проб с целью определения мемантина в плазме крови проводился на хромато-масс-спектрометре (Система Agilent 1200 SL, США) с двойным квадрупольным анализатором (Agilent 6140 LC/MS/MS), оборудованном внешним источником ионов с электрораспылительной ионизацией при атмосферном давлении (APCI), автосамплером (Auto Sampler HIG-ALS G 1367C) с термостатом колонки (G 1316B TCC).

Масс-спектрометрическое детектирование проводилось в режиме положительной ионизации электрораспылением (ESI, Positive). В масс-спектре мемантина, полученном при ионизации вещества в режиме MS (или MS) с двуквадрупольным анализатором, наблюдался интенсивный пик с m/z 180, соответствующий протонированному молекулярному иону (M+H)⁺ целевого вещества.

В анализе использован мониторинг 1 выбранного иона: первый анализатор (MC1) настроен на пропускание ионов с одним фиксированным значением m/z 180 (для мемантина), второй анализатор (MC2) фиксирует количество прошедших ионов либо по одному, либо по нескольким (Multiple Reaction Monitoring — MRM) каналам с заданными значениями m/z 163 фрагментов (m/z выбранного дочернего иона мемантина). Параметры работы детектора подбирались для достижения максимального выхода MRM.

Наилучшее разделение мемантина было достигнуто при температуре разделения 23°C , подвижной фазе, состоящей из смеси ацетонитрила и деионизированной воды с 0,1% муравьиной кислоты (35:65, об/об), скоростью потока 0,7 мл/мин. Объём вводимой пробы — 10 мкл. Фрагментатор 100 В, температура азота 350°C , расход газа 5,0 л/мин, давление небулайзера 15 psi, напряжение 5 В. В этих условиях время удерживания мемантина составило $1,3 \pm 0,05$ мин.

Количественный анализ

Количественный анализ проводили методом абсолютной калибровки. Для построения калибровочной кривой и расчёта процента извлечения мемантина из плазмы крови готовили его концентрированный раствор (10 мг/мл). Методом последовательных разведений получили серию стандартных растворов мемантина в метаноле в диапазоне концентраций от 1,0 — 50 нг/мл.

Для выделения мемантина из плазмы крови использовали метод осаждения белков. Указанный метод пробоподготовки существенно отличается от ранее описанных.

Статистическая обработка полученных результатов

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета Microsoft Office Excel 2007 для персонального компьютера. Используя программу Statistica (v. 6.0) рассчитывались следующие статистические параметры: среднее арифметическое значение (Mean), среднее геометрическое значение (GMean); стандартное отклонение (SD), коэффициент вариации (CV), медиана (Median). Достоверность различий полученных параметров оценивали с помощью дисперсионного анализа (ANOVA). Проведено попарное сравнение фармакокинетических параметров.

Результаты и их обсуждение

Валидация методики

Специфичность

Для определения специфичности протестировано 6 образцов биологической матрицы на возможность создания помех потенциально мешающими веществами (эндогенные компоненты матрицы, метаболиты, продукты разложения и т.д.). Проведён анализ образцов стандартного раствора мемантина (рис. 1), образцов чистой плазмы (рис. 2), образцов чистой плазмы с добавлением стандартного раствора мемантина (рис. 3). На хроматограммах образцов чистой плазмы не наблюдалось пиков со временем удерживания, соответствующим времени удерживания мемантина.

Линейность

Линейность калибровочной кривой оценивали по растворам мемантина, используя алгоритм линейной регрессии наименьших квадратов в системе координат «площадь хроматографического пика — концентрация мемантина». График зависимости площади пика от концентрации изучаемого вещества представлен на рис. 4.

Выявлена линейная зависимость между концентрациями мемантина и площадями хроматографических пиков определяемого вещества в интервале от 1 до 50

нг/мл. Калибровочная зависимость описывалась уравнением: $y=134337x+82262$. Коэффициент детерминации составил в среднем $R^2=0,996$.

Предел количественного определения

Детектирование с использованием масс-спектрометрического детектора позволяет достичь необходимого предела обнаружения мемантина с хорошей воспроизводимостью результатов.

Предел количественного определения определяли согласно данным линейности. Предел обнаружения — наименьшая концентрация анализируемого вещества, которая может быть обнаружена данным аналитическим методом — составил 1 нг/мл.

Точность и воспроизводимость

Для оценки точности и воспроизводимости результатов были получены 6 калибровочных кривых и проведён расчёт концентраций используемых стандартов по всем кривым и определены статистические данные. Данные по точности и воспроизводимости методики количественного определения мемантина в плазме крови представлены в табл. 1 и удовлетворяют критериям приемлемости (не более 20% для нижнего предела обнаружения и не более 10% — для остальных концентраций).

Степень извлечения

Степень извлечения мемантина из плазмы крови человека определялась сравнением площадей пиков проб, экстрагированных из образцов, с площадями пиков неэкстрагированных рабочих стандартных растворов, представляющих 100%. Средняя степень извлечения мемантина из плазмы крови человека составила 78,3%.

Исследование фармакокинетики

Усреднённые значения динамики концентрации мемантина в плазме крови добровольцев после однократного перорального приёма тестового и референтного препаратов в дозе 10 мг, где анализируемое вещество определяется в течение 96 ч, приведены на рис. 5.

Характер усреднённых фармакокинетических кривых, полученных после приёма изучаемых препаратов сходен.

Таблица 1

Точность и воспроизводимость методики количественного определения мемантина в плазме крови

Концентрация фактическая, нг/мл	Воспроизводимость		Точность	
	Концентрация найденная нг/мл	% отклонения	CV, % intraday	CV, % interday
1,0	1,18	7,9	18,3	19,5
5,0	5,5	5,3	9,6	9,7
10,0	11,0	3,2	6,2	7,0
15,0	16,2	4,1	6,5	6,6
25,0	24,8	3,5	7,2	7,9
50,0	52,3	3,9	5,4	5,5

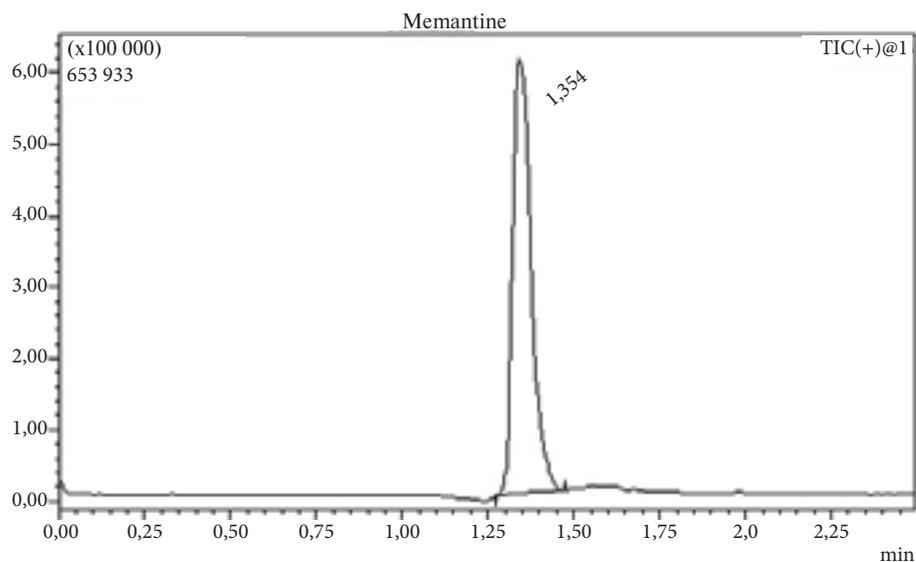


Рис. 1. Типичная хроматограмма стандартного раствора мемантина в метаноле

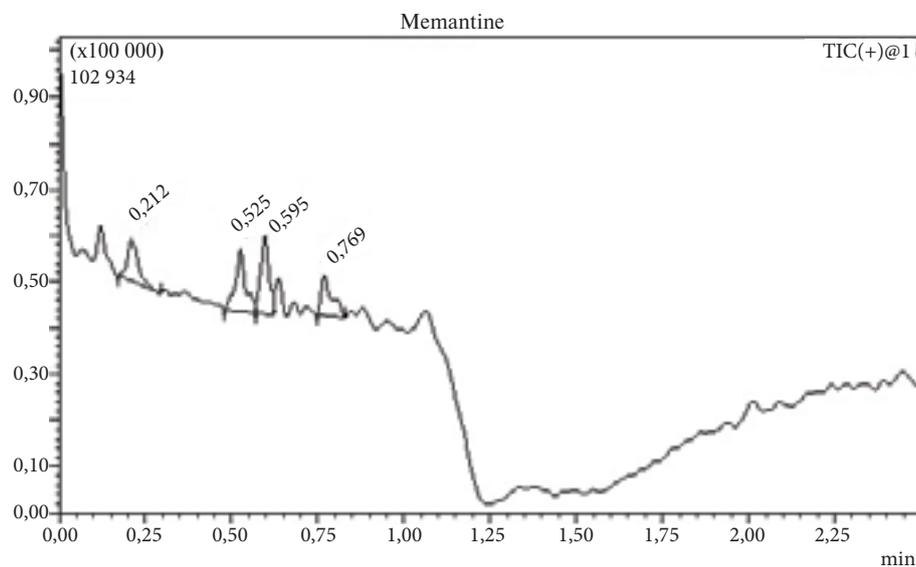


Рис. 2. Типичная хроматограмма пробы плазмы крови, не содержащей мемантин

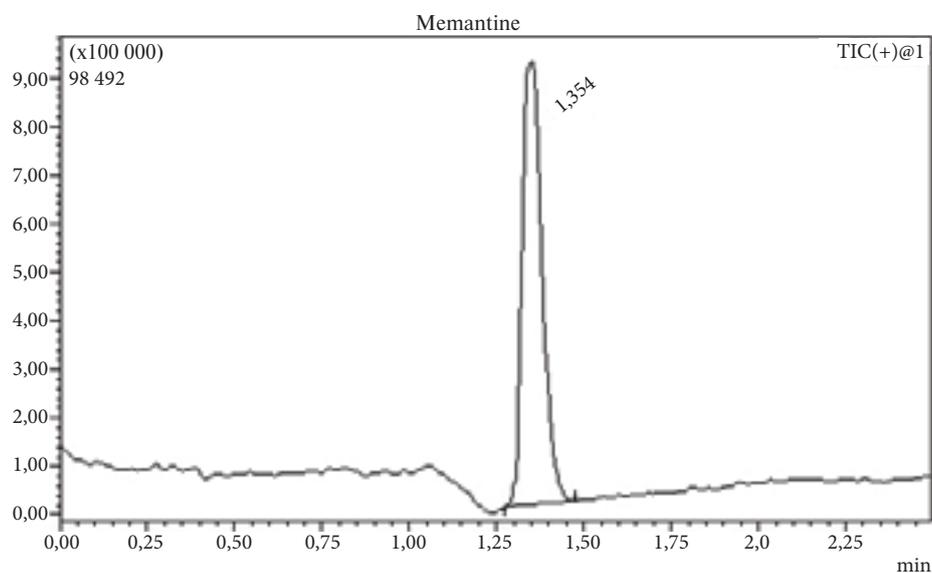


Рис. 3. Типичная хроматограмма пробы плазмы крови, содержащей мемантин

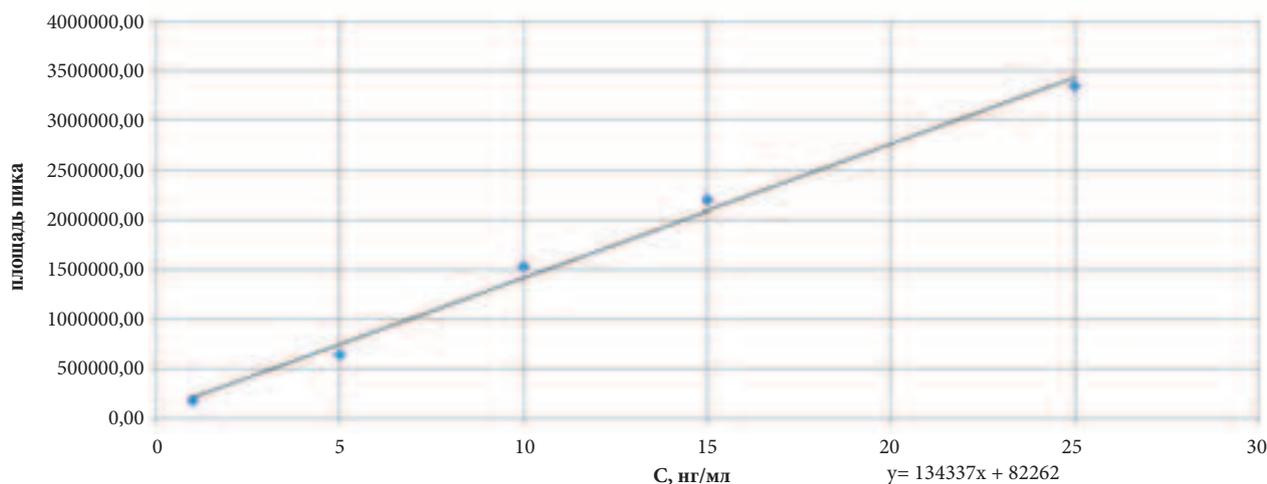


Рис. 4. Калибровочная зависимость площади пика от концентрации мемантина

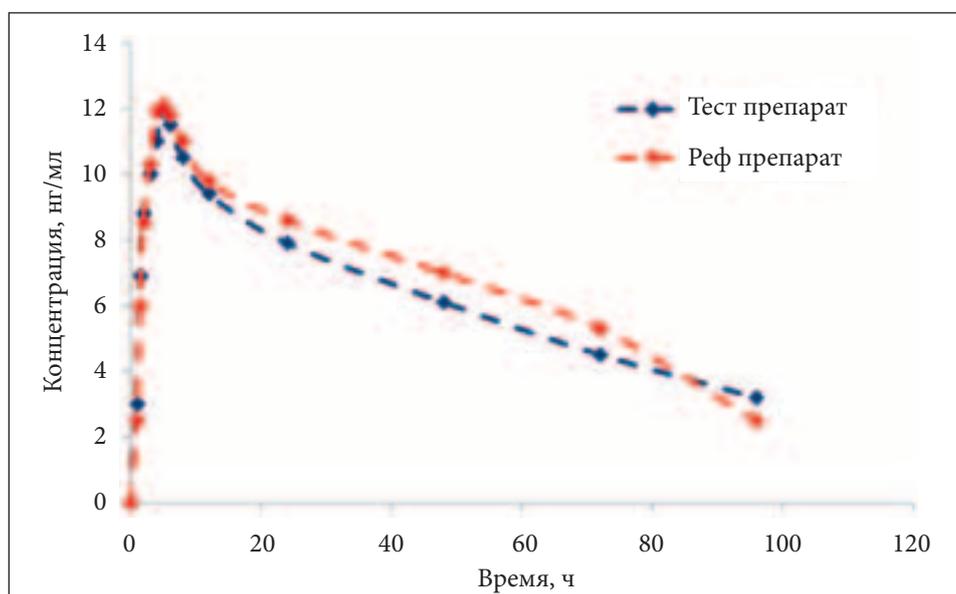


Рис. 5. Усреднённые кинетические кривые мемантина в плазме крови добровольцев (n=18) после однократного приёма внутрь препаратов Т и R

Сравнительная фармакокинетика препаратов мемантина

Таблица 2

Параметры	AUC _{0-∞} нг×ч/мл	AUC _{0-t} нг×ч/мл	C _{max} ч	T _{max} ч	T _{1/2} ч	K _{abc} 1/ ч	MRT ч	Cl/F л	V _{ss} /F л
Меманейрин (Т)									
Mean	527	935	12,4	4,9	61	0,66	88	11,4	920
Gmean	523	906	12,3	4,8	59	0,61	85	11,0	909
SD	69	267	1,7	0,9	19	0,28	26	2,8	139
CV	13	28	13	18	32	42	30	25	15
Median	543,5	857	12,5	5,0	56	0,6	80,0	11,7	964
Акатинол мемантин (R)									
Mean	557	956	12,8	4,8	68	0,62	92	10,3	899
Gmean	550	919	12,7	4,8	63	0,54	86	9,7	882
SD	87	275	1,5	0,9	26	0,33	31	3,7	181
CV	15	29	11	18	38	53	34	49	20
Median	582	901,5	13,1	5,0	67,5	0,60	98,5	10,1	868

Анализ усреднённых фармакокинетических кривых показал, что после приёма как препарата сравнения, так и испытуемого препарата мемантин достаточно долго всасывается в системный кровоток из желудочно-кишечного тракта. Максимальный уровень мемантина достигался к 5 ч и также долго препарат выводится из организма.

Индивидуальная вариабельность концентрации мемантина в обоих случаях примерно одинакова.

Полученные экспериментальные данные концентрации мемантина исследуемых препаратов были обработаны с использованием метода математического моделирования, что позволило количественно оценить фармакокинетические процессы и рассчитать параметры фармакокинетики. Значения усреднённых фармакокинетических параметров мемантина после однократного перорального приёма добровольцами препаратов Т и R в дозе 10 мг представлены в табл. 2.

Как видно из представленных данных, не выявлено достоверно значимых различий для сравниваемых величин всех рассчитанных параметров фармакокинетики. Так среднее значение площади под фармакокинетической кривой (AUC_t) мемантина для препарата Т составляло — 506 ± 78 нг×ч/мл, а для препарата R — 555 ± 98 нг×ч/мл; AUC_{∞} для препарата Т — 906 ± 267 нг×ч/мл, для препарата R — 1160 ± 710 нг×ч/мл. Максимальная концентрация (C_{max}) для препарата Т составила $12,4 \pm 1,7$ нг/мл, а для препарата R — $12,8 \pm 1,5$ нг/мл. Время достижения максимальной концентрации для препаратов составило $4,9 \pm 0,9$ ч и $4,8 \pm 0,9$ ч, соответственно. Период полуэлиминации составил 61 ± 19 ч для Т препарата и 68 ± 26 ч — для R препарата, а среднее время удерживания препарата в организме составило 88 ± 26 ч и 92 ± 31 ч для изучаемых препаратов, соответственно.

Таким образом, значения средних параметров фармакокинетики, характеризующих индивидуальные кривые «концентрация мемантин — время», после приёма испытуемого препарата и препарата сравнения статистически достоверно не различались.

Усреднённое значение отношений максимальной концентрации к площади под фармакокинетической кривой C_{max}/AUC (параметр характеризующий скорость всасывания) для двух исследуемых препаратов мемантина представлены в табл. 3.

Значение отношений максимальной концентрации к площади под фармакокинетической кривой

Таблица 3

Значения	T C_{max}/AUC_t	R C_{max}/AUC_t
Mean	0,024	0,023
Gmean	0,020	0,020
SD	0,005	0,006
CV	11,90	17,90
Median	0,020	0,020

Как видно из представленных данных, C_{max}/AUC_t для Т препарата составило $0,024 \pm 0,005$ и для препарата R — $0,023 \pm 0,006$. Средние значения отношения C_{max}/AUC_t оказались сопоставимыми.

Параметры относительной биодоступности мемантина после однократного приёма изучаемых препаратов представлены в табл. 4.

Параметры относительной биодоступности
Тест препарата мемантина по отношению к Референс препарату

Таблица 4

Значения	f'	f''
Mean	0,95	0,98
SD	0,12	0,14
CV	12,7	13,9
Доверительный интервал	$0,83 \div 1,07$	$0,84 \div 1,12$

Из приведённых данных видно, что средняя относительная степень всасывания (относительная биодоступность — f') после приёма препарата Меманейрин и величина отношения максимальных концентраций мемантина после приёма испытуемого препарата и препарата сравнения (f'') незначительно отличались от единицы и составили $0,95 \pm 0,12$ и $0,98 \pm 0,14$ соответственно. Средние значения и доверительные интервалы генеральных средних для f' и f'' не выходят за допустимые пределы [13].

Таким образом, не выявлено статистически достоверных различий в процессе всасывания (как по полноте, так и по скорости всасывания) изучаемых препаратов.

Дисперсионный анализ значений C_{max} , C_{max}/AUC_t , AUC_t , проведённый после их логарифмического преобразования не выявил статистически значимых различий между препаратами (табл. 5).

Результаты дисперсионного анализа

Таблица 5

Источник вариации	C_{max}		C_{max}/AUC_t		AUC_t	
	Испытуемые	Препарат	Испытуемые	Препарат	Испытуемые	Препарат
df	17	1	17	1	17	1
SS	56,89	1,36	0,0005	0,000005	301779	16874
MS	3,35	1,36	0,00003	0,000005	17751	
F	2,14	0,87	12,25	2,06	8,33	3,92
P-Значение	0,063	0,363	0,000002	0,170	0,00003	0,012

Как видно из результатов дисперсионного анализа расчётное значение F для вклада фактора «препарат» нигде не превосходит критического значения 4,45.

Заключение

Проведённое исследование показало одинаковый уровень концентраций и сходный фармакокинетический профиль мемантина у добровольцев после однократного приёма внутрь препаратов

Меманейрин и Акатинол мемантин. Изучение относительной биологической доступности этих препаратов подтвердило их биоэквивалентность.

Таким образом, в целях повышения экономической доступности лекарственных средств (Распоряжение правительства РФ от 6 июля 2010 г. № 1141-р) [8] разработан препарат Меманейрин (ЗАО «Биологические системы», Россия), который по изученным параметрам не отличается от зарубежного аналога препарата Акатинол мемантин.

Литература

1. *Forette F., Hauw J.J.* Alzheimer's disease: from brain lesions to new drugs. // *Bulletin de L'academie nationale de medicine.* 2008. 192(2). P. 363—380.
2. *Гаврилова С.И., Калын Я.Б., Селезнева Н.Д. и др.* Глутаматергическая терапия болезни Альцгеймера на стадии умеренно-тяжёлой и тяжёлой деменции: результаты 26 недельного исследования эффективности и безопасности препарата Акатинол мемантин. // *Неврология и психиатрия им. С.С. Корсакова.* 2005. № 2. С. 72—76.
3. *Reisberg B., Doody R., Stoffer A. et al.* Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease. // *N. Engl. J. Med.* 2003. V. 348. P. 1333—1341.
4. *Дамулин Н.В.* Новая нейропротекторная и терапевтическая стратегия при деменции: антагонист NMDA-рецепторов акатинол мемантин. // *Рус. мед. журнал.* 2001. 9(25). С. 1178—1182.
5. *Marum van R.J.* Update on the use of memantine in Alzheimer's disease. // *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 2009. Vol. 5. P. 237—247.
6. *Danysz W., Parsons C.G., Quack G.* Memantine is a clinically well tolerated N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist — a review of preclinical data. // *Neuropharmacology.* 1999. Vol. 38. P. 735—767.
7. *Subramaniam S., Sixt K.M., Barrow R. et al.* Rhes, a striatal specific protein, mediates mutant-huntingtin cytotoxicity. // *Science.* 2009. Vol. 324. P. 1327—1330.
8. Федеральный закон №61-ФЗ от 12 апреля 2010 г. «Об обращении лекарственных средств».
9. *Hassan M.G., Emara K.M. Mohamed H.A. et al.* Determination of memantine in rat plasma by HPLC-fluorescence method and its application to study of the pharmacokinetic interaction between memantine and methazolamide. // *Biomed. Chromatogr.* 2011. Vol. 10. P. 1648.
10. *Toker S.E., Sagirli O., Cetina S.M. et al.* A new HPLC method with fluorescence detection for the determination of memantine in human plasma. // *J. Sep. Sci.* 2011. Vol. 19. P. 2645—2649.
11. *Koeberle M.J., Hughes P.M., Wilson C.G. et al.* Development of a liquid chromatography-mass spectrometric method for measuring the binding of memantine to different melanins. // *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 2003. Vol. 787(2). P. 313—322.
12. *Leis H.J., Fauler G., Windischhofer W.* Quantitative analysis of memantine in human plasma by gas chromatography/negative ion chemical ionization/mass spectrometry. // *J. Mass. Spectrom.* 2002. Vol. 37(5). P. 477—480.
13. Оценка биоэквивалентности лекарственных средств: Методические указания. М., 2008. 32 с.

Исследование сравнительной биоэквивалентности препаратов Пиоглитазон таблетки, 20 мг (АО «Химфарм», Республика Казахстан) и Актос® таблетки, 30 мг («Eli Lilly Holdings, Takeda Global Research and Development Centre Europe Ltd»)

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

¹ — ФГБУ «Научный центр неврологии» РАМН, Москва

² — РГКП «Республиканский научно-практический центр психиатрии (директор, д.м.н., профессор С.А. Алтынбеков)

³ — АО «Химфарм», Республика Казахстан

Резюме

В рамках перекрёстного, однократного, открытого, рандомизированного исследования с двухнедельным периодом отмычки, с двумя последовательностями была изучена биоэквивалентность двух таблетированных форм пиоглитазона на 18 добровольцах (дозировка 30 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 AUC_{0-t} составил 0,945 — 1,066 и для C_{max} — 0,871 — 1,044. По результатам исследования был сделан вывод о биоэквивалентности сравниваемых препаратов пиоглитазона.

Ключевые слова: Пиоглитазон, Актос®, фармакокинетика, биоэквивалентность

Comparative bioequivalence study of Pioglitazone tablets, 20 mg (JSC «Chimpharm», Kazakhstan) and Actos® Tablets, 30 mg («Eli Lilly Holdings, Takeda Global Research and Development Centre Europe Ltd»)

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

¹ — FGBI «Neurology Research Center», RAMS

² — State Enterprise «Republican Scientific and Practical Centre for Psychiatry, Psychotherapy and Addiction» MoH

³ — JSC «Chimpharm» Republic of Kazakhstan

Summary

Within the cross, a single, open, randomized study with a two-week washout period, the two sequences has been studied bioequivalence of tablet forms two pioglitazone 18 volunteers (30 mg dosage). Plasma samples were analyzed by a validated HPLC-MS/MS within 48 hours. Analyzed for drugs following pharmacokinetic parameters were calculated: AUC_{0-t} , C_{max} , t_{max} , C_{max}/AUC . 90% confidence interval for log-transformed values of AUC_{0-t} was 0.945 — 1.066 and C_{max} — 0.871 — 1.044. The study concluded that bioequivalence compared pioglitazone drugs.

Keywords: Pioglitazone, Actos®, pharmacokinetics, bioequivalence

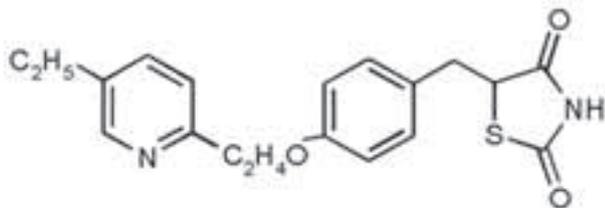
Введение

Современная стратегия ведения пациентов с сахарным диабетом (СД) 2-го типа предполагает, помимо долгосрочного гликемического контроля, обязательную коррекцию факторов риска развития макро- и микрососудистых осложнений. Препараты из группы

тиазолидиндионов, в частности пиоглитазон характеризуются мощным сахароснижающим действием, а также способствуют уменьшению выраженности факторов риска осложнений сердечно-сосудистых заболеваний: инсулинорезистентности (ИР), артериальной гипертензии и дислипидемии. ИР рассматривается в настоящее время как основополагающее патофизи-

ологическое нарушение в развитии СД 2-го типа, и, соответственно, коррекция ИР приобретает ведущую роль в терапии СД 2-го типа.

Целью настоящего исследования являлась оценка биоэквивалентности генерического препарата пиогли-тазон таблетки 30 мг, производства АО «Химфарм» (Республика Казахстан) в сравнении с зарегистрированным на территории Республики Казахстан препаратом Актос® таблетки 30 мг, производства «Eli Lilly Holdings, Takeda Global Research and Development Centre Europe Ltd» после однократного их приёма испытуемыми.



5-[[4-[2-(5-Этил-2-пиридинил)этокси] фенил] метил-2,4-тиазолидиндион (в виде гидрохлорида)

Материалы и методы исследования

Исследуемые препараты

В качестве тест-препарата (Тест; Т) использовали Пиоглитазон, таблетки, содержащие 30 мг пиогли-тазона (производитель — АО «ХИМФАРМ», Республика Казахстан), в качестве препарата-сравнения (Референс; R) использовался препарат Актос®, таблетки, содержащие 30 мг пиоглитазона («Eli Lilly Holdings, Takeda Global Research and Development Centre Europe Ltd»).

Дизайн исследования

Дизайн исследования соответствовал утверждённому протоколу исследования (№ ВЕq-Piog-01-2013, Версия 1.0 от «21» январь 2013 г.), а также требованиям «Надлежащей клинической практики» (GCP) [2-5, 9]. 18 здоровых волонтеров молодого возраста мужского (n=6) и женского (n=12) пола (возраст — 31,4±6,6 лет, массы тела — 67,5±8,5 кг) после подписания информированного согласия были направлены в клиническую базу РГКП «Республиканский научно-практический центр психиатрии, психотерапии и наркологии» МЗ РК. 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 проведен 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 21 дней (1 этап — 05.05.2013; 2 этап — 27.05.2012). На обоих этапах исследования отбор образцов крови (5 мл) производился: до введения дозы (0 ч), и в течение 48 ч после введения препарата. Взятие образцов крови для последующего определения содержания активного метаболита пиоглитазона — пиоглитазоната в плазме крови осуществлялось в дискретные интервалы времени 0; 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 6, 8, 12, 24 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 катеризации 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 путем центрифугирования (3000 об/мин в течение 10 мин) получали плазму крови. Плазма хранилась при температуре -24°C. Приготовление стандартных растворов пиоглитазоната осуществлялось в плазме крови.

дующего определения содержания активного метаболита пиоглитазона — пиоглитазоната в плазме крови осуществлялось в дискретные интервалы времени 0; 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 6, 8, 12, 24 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 катеризации 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 путем центрифугирования (3000 об/мин в течение 10 мин) получали плазму крови. Плазма хранилась при температуре -24°C. Приготовление стандартных растворов пиоглитазоната осуществлялось в плазме крови.

Аналитический метод

Для количественного определения пиоглитазона применяли метод [10] 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 пиогли-тазона (производитель «Zhejiang Huahai Pharmaceutical Co., Ltd», Китай, серия D-5031-11-006m1, срок годности 07.2013) и росиглитазона (производитель «Sigma-Aldrich», США, серия R2408, CAS Number 122320-73-4). Для количественного определения готовили маточные растворы стандартов пиоглитазона и росиглитазона в метаноле с концентрациями 1 мг/мл. Раствор пиогли-тазона применяли для приготовления растворов рабочих стандартных образцов на плазме крови с концентрациями 0,039 мкг/мл; 0,078 мкг/мл; 0,156 мкг/мл; 0,3125 мкг/мл; 0,625 мкг/мл; 1,25 мкг/мл; 2,5 мкг/мл; 5 мкг/мл. Раствор внутреннего стандарта с концентрацией 1 мг/мл разбавляли в 50 раз для получения рабочего раствора росиглитазона с концентрацией 20 мкг/мл. Определение концентрации пиоглитазоната проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием.

Экстракция пиоглитазона из плазмы крови

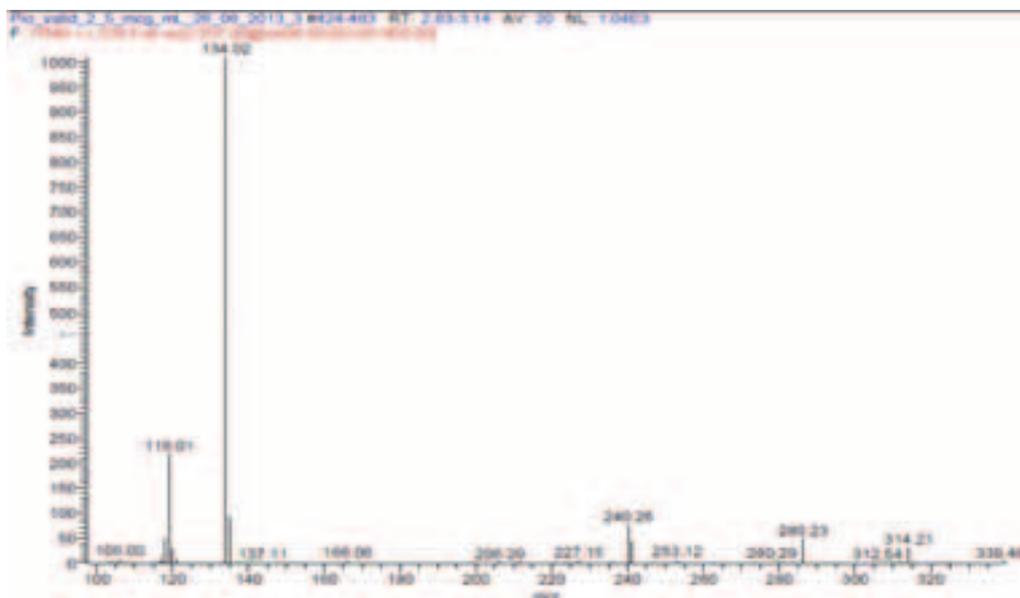
Жидкостную экстракцию пиоглитазона и росигли-тазона осуществляли согласно Zhang H. et al., 2004 г.: к 0,5 мл плазмы с содержащимися в ней аналитом добавляется 50 мкл раствора внутреннего стандарта с концентрацией 20 мкг/мл для достижения конечной концентрации 2 мкг/мл. Затем плазму крови подщелачивали 0,5 мл 0,1 М K₂HPO₄, образец перемешивали. Далее к образцу добавляли 5 мл этилацетата, 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 60°C. Сухой остаток растворяли в 0,5 мл метанола и инжестировали в петлю хроматографа в объёме 5 мкл.

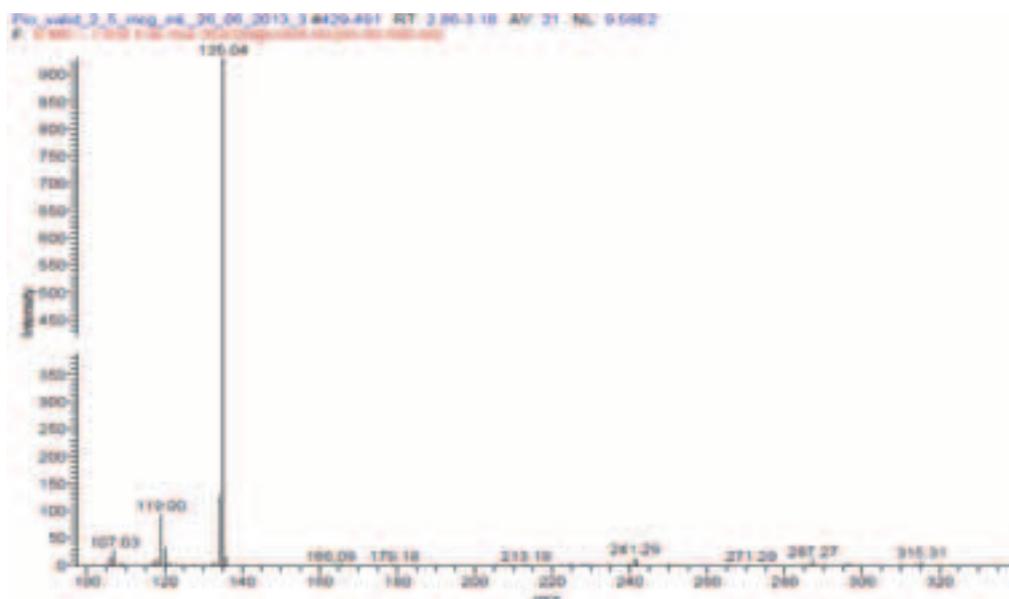
Хромато-масс-спектрометрический анализ

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 25%А:75%Б, работа проводилась в изократическом режиме элюирования. Скорость потока подвижной фазы 0,6 мл/мин. Объём

пробы — 5 мкл. Температура разделения 25°C. Продолжительность хроматографирования — 7 мин. Время удерживания аналита — 2,98 мин. Время удерживания внутреннего стандарта (росиглитазона) — 3,02 мин. Детектирование: масс-спектрометрическое, по дочернему иону с m/z 134,0 образующемуся в результате распада молекулярного иона Пиоглитазона с m/z 357,2 при нормализованной энергии соударений 25 eV (масс-спектр второго порядка для Пиоглитазона представлен на рис. 1). Внутренний стандарт (росиглитазон) детектировали по дочернему иону с m/z 135,0 образующемуся в результате распада молекулярного иона росиглитазона с m/z 358,3. Масс-спектрометр работал в режиме регистрации ионов, положительно заряженных электроспреем (ESI), создаваемым напряжением в 5 кВ. Скорость потока газа-небулайзера (азота): 5 л/мин, давление на распылителе — 100 psi. Температура интерфейса ка-



А



Б

Рис. 1. Масс-спектры второго порядка для пиоглитазона (А) и росиглитазона (Б)

пильяра составляла 350°C, температура нагревателя — 300°C. Амплитуда возбуждения на концевых электродах ловушки 0,1 В. Детектирование проводилось в режиме полного сканирования МС/МС — Full Scan ms², в диапазоне m/z 80–600. 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: 0,039 — 5 мкг/мл. Точность количественного определения Пиоглитазона представлена в табл. 1.

Таблица 1
Точность количественного определения Пиоглитазона в течение рабочего дня

Концентрация мкг/мл	%C.V.	%dev	n
0,156	5,20	10,02	6
0,625	3,94	3,85	6
2,5	2,11	-1,84	6
Предел количественного определения — 0,039 мкг/мл			

Специфичность определения Пиоглитазона: установлено, что матричные эффекты коэкстрактивных веществ из плазмы крови не мешают определению Пиоглитазона и внутреннего стандарта. Типичные хроматограммы интактной плазмы крови, образца Пиоглитазона с концентрацией 2,5 мкг/мл и плазмы крови с концентрацией Пиоглитазона 0,625 мкг/мл представлены ниже (рис. 2а, б, в).

Количественный анализ

Калибровочная кривая представлена на рис. 3. Градуировочная зависимость пиоглитазона в плазме крови описывалась формулой: $C = 2,132 \times AR$, где C — концентрация пиоглитазона (мкг/мл), AR (Area Ratio) — отношение площадей пиков аналита и внутреннего стандарта. Коэффициент корреляции составил $R^2 = 0,9986$, что соответствует аналитической аппроксимации.

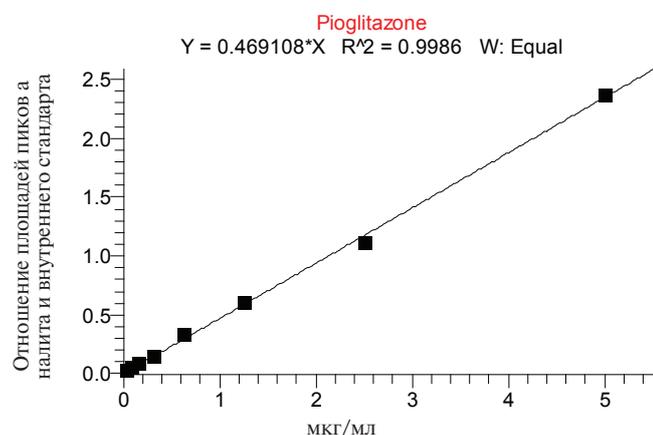


Рис. 3. Калибровочная кривая пиоглитазона в плазме крови (в мкг/мл).

Предел количественного определения — 0,039 мкг/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.

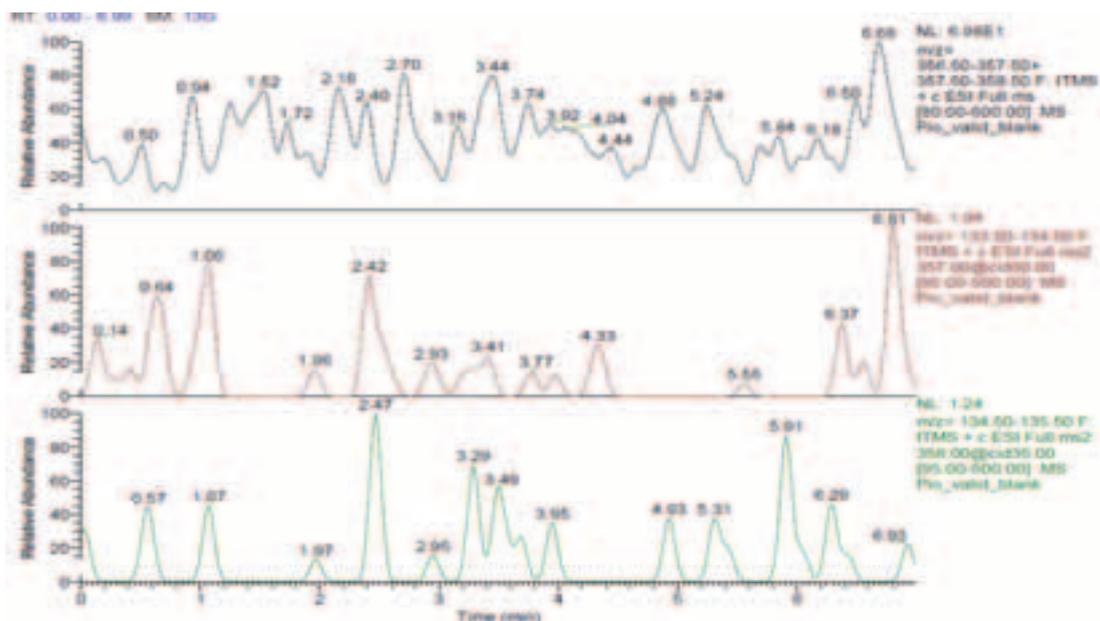
Точность в течение рабочего дня

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 0,156 мкг/мл средняя точность составила 5,20% C.V. и 10,02% dev. Остальные пробы с концентрациями 0,625 и 2,5 мкг/мл имели точность от 2,11 до 3,94% C.V. Воспроизводимость колебалась от -1,84 до 3,85% dev.

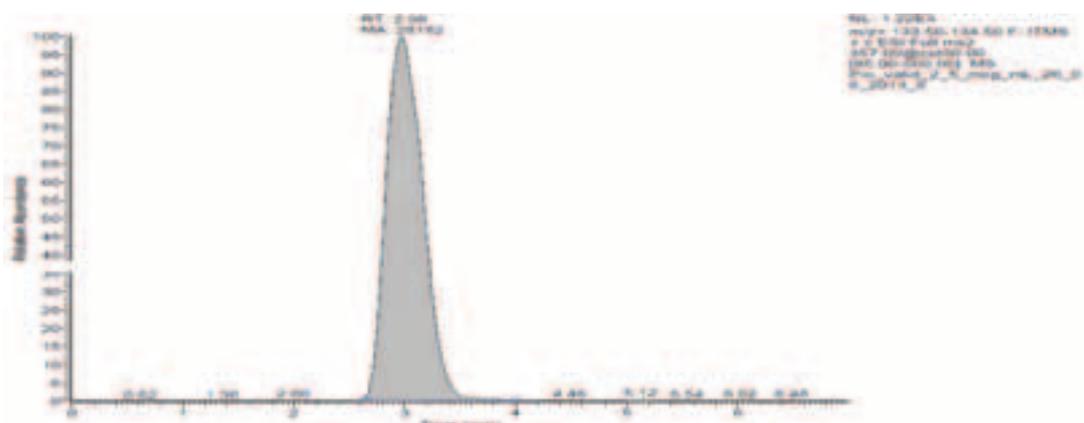
Результаты представлены в табл. 2.

Таблица 2
Точность определения Пиоглитазона в плазме крови в течение рабочего дня

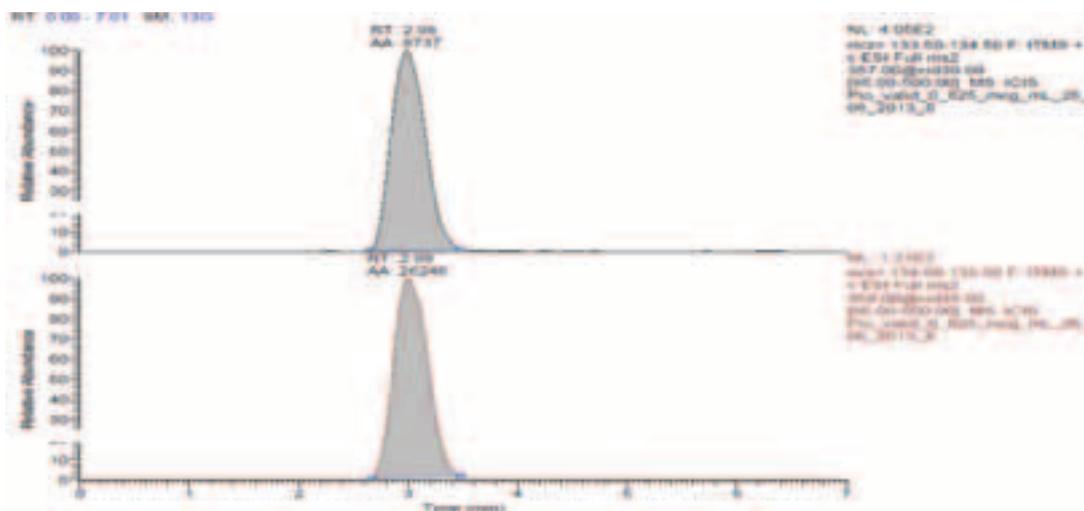
Концентрация добавленная (мкг/мл)	0,156	0,625	2,5
Концентрация найденная (мкг/мл)	0,16	0,67	2,44
	0,16	0,65	2,52
	0,18	0,65	2,38
	0,18	0,62	2,43
	0,18	0,68	2,45
	0,17	0,62	2,50
\bar{x}	0,17	0,65	2,45
SD	0,01	0,03	0,05
%CV	5,20	3,94	2,11
%dev	10,02	3,85	-1,84



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



б — Хроматограмма стандартного раствора Пиоглилизона с концентрацией 2,5 мкг/мл.



в — Хроматограмма экстракта плазмы крови с концентрацией пиоглилизона 0,625 мкг/мл, верхний пик — пик анализа, нижний пик — пик внутреннего стандарта.

Рис. 2. Хроматограммы экстрактов плазмы крови

Таблица 3

Метрологические характеристики методики определения пиоглитазона в плазме крови

Взято (мкг/мл)	Найдено (мкг/мл)						X	SD	$S_{\bar{x}}$	$\Delta \bar{x}$	$\varepsilon\%$
0,156	0,177	0,188	0,171	0,174	0,176	0,164	0,175	0,008	0,006	0,014	8,264
0,625	0,617	0,650	0,622	0,674	0,633	0,616	0,636	0,023	0,018	0,046	7,165
2,5	2,429	2,449	2,503	2,396	2,410	2,353	2,423	0,051	0,037	0,095	3,915

Таблица 4

Фармакокинетические параметры пиоглитазона у добровольцев после однократного приёма 30 мг Пиоглитазона (Т) и Актоса® (R)

Размерность	AUC _{0-t} (мкг/мл×ч)		C _{max} (мкг/мл)		t _{max} (ч)		C _{max} /AUC (ч ⁻¹)	
	Т	R	Т	R	Т	R	Т	R
\bar{x}	15,36	15,30	1,50	1,55	1,83	1,78	0,098	0,103
SD	3,82	3,92	0,50	0,44	0,89	0,60	0,023	0,026
$S_{\bar{x}}$	0,90	0,92	0,12	0,10	0,21	0,14	0,005	0,006
C.V.%	24,9	25,6	33,5	28,4	48,6	33,7	23,4	24,7
Размах	12,34	14,16	1,53	1,69	3,500	2,000	0,09551	0,10174

Метрологические характеристики разработанной методики представлены в табл. 3. Относительная ошибка определения пиоглитазона не превышала 15%.

Статистическая обработка полученных результатов

Полученные экспериментальные данные подвергнуты математической статистической обработке 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.%). Расчёт 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. 3 представлены результаты работы анализа вариации ANOVA для различных показателей биоэквивалентности (lnAUC_{0-t}, lnC_{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 значе-

ниями 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 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. Расчёт 90% доверительных интервалов проводили с использованием программы Bioeqv [6].

Результаты и их обсуждение

На рис. 4 — представлены усреднённые фармакокинетические кривые пиоглитазона в плазме крови добровольцев после однократного приёма таблеток Пиоглитазона и Актоса®, где анализируемое лекарственное вещество определяется на протяжении 48 часов.

Сравнительный анализ основных фармакокинетических параметров (табл. 4) пиоглитазоната после однократного приёма 30 мг таблеток Пиоглитазон и Актос® показал, что изучаемые препараты почти с одинаковой скоростью всасываются из желудочно-кишечного трак-

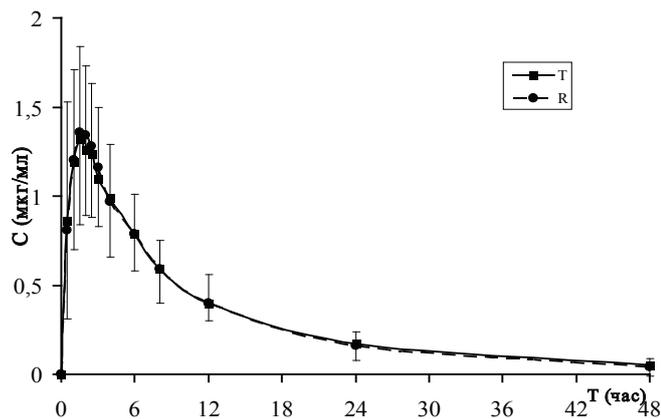


Рис. 4. Усреднённые кинетические кривые пиоглиитазона в плазме крови добровольцев после однократного приёма таблеток ПИОГЛИТАЗОН (Т) и таблеток АКТОС® (R): (n=18; ±SD)

та (параметр C_{max}/AUC_{0-t} — для Т составил $0,098 \pm 0,023$; для R — $0,103 \pm 0,026 \text{ ч}^{-1}$; $\bar{x} \pm SD$). Время достижения максимальной концентрации (t_{max}) составило в среднем для Т — $1,83 \pm 0,89$ и для R — $1,78 \pm 0,60$ ч, соответственно. При этом средняя максимальная концентрация пиоглиитазона, определяемая в плазме крови добровольцев (C_{max}), составила для препарата Пилоглитазон — $1,50 \pm 0,50$ мкг/мл и для Актос® — $1,55 \pm 0,44$ мкг/мл.

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 Пилоглитазон составил 12,34 и для препарата Актос® — 14,16 мкг/мл×ч). Среднее значение AUC_{0-t} для тест-препарата составило $15,36 \pm 3,82$ и для референс-препарата — $15,30 \pm 3,92$ мкг/мл×ч. Относительная биодоступность таблеток Пилоглитазон по отношению к таблеткам Актос®, определяемая отношением соответствующих значений AUC_{0-t} , составила в среднем $1,014 \pm 0,151$ (усреднённые данные на основании точечных индивидуальных оценок). Доверительный интервал для логарифмически преобразованных значений AUC_{0-t} составил 0,945 — 1,066. Степень биодоступности, определяемая отношением соответствующих значений C_{max} , составила $0,975 \pm 0,210$, а доверительный интервал для логарифмически преобразованных значений C_{max} — 0,871 — 1,044 (табл. 3). Полученные доверительные интервалы лежат, в установленных «Рекомендациями», пределах, что говорит в пользу биоэквивалентности исследуемых препаратов [5].

Таблица 5

90% доверительные интервалы отношения средних значений $(\mu_1/\mu_2) AUC_{0-t}, C_{max}$ (логарифмически преобразованные данные), полученные на основе дисперсионного анализа (ANOVA)

Параметры	Нижнее значение	Среднее значение	Верхнее значение
AUC_{0-t}	0,945	1,014	1,066
C_{max}	0,871	0,975	1,044

Дисперсионный анализ также показал, что 2 источника вариации, учитываемых при установлении биоэквивалентности, т.е. «препараты» и «испытуемые» 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 пиоглиитазона из таблеток $\ln AUC_{0-t}$

Источник вариации	SS	DF	MS	F
Препарат	0,000	1	0,000	0,01266
Последовательность	0,003	1	0,003	0,26936
Испытуемые	2,662	17	0,157	14,62535
Остаточная вариация	0,171	16	0,011	-
Общая вариация	2,836	35	-	-

$\ln C_{max}$

Источник вариации	SS	DF	MS	F
Препарат	0,020	1	0,020	0,83704
Последовательность	0,003	1	0,003	0,11765
Испытуемые	3,659	17	0,215	8,92721
Остаточная вариация	0,386	16	0,024	-
Общая вариация	4,068	35	-	-

Обозначения в таблице: SS — сумма квадратов отклонений; MS — средний квадрат; DF — число степеней свободы; F — рассчитанное значение F-критерия Фишера (при уровне значимости $\alpha=5\%$).

Следует подчеркнуть, что 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 пациентов табличное значение F критическое равно 4,49 для $P=0,95$. Рассчитанное значение F не превосходит табличное значение (для параметра $\ln AUC_{0-t}$ $F = 0,01266$ и для $\ln C_{max}$ $F = 0,83704$). Следовательно, нулевая гипотеза об отсутствии значимых различий между средними значениями данного показателя биоэквивалентности подтверждается, а различия не признаются статистически значимыми на соответствующем уровне значимости.

Вывод

Из результатов исследования относительной биологической доступности двух препаратов следует, что исследуемый препарат Пилоглитазон, таблетки 30 мг, производства АО «ХИМФАРМ», Республика Казахстан является биоэквивалентным препарату сравнения Актос®, таблетки 30 мг, производства «Eli Lilly Holdings, Takeda Global Research and Development Centre Europe Ltd».

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. *Zhang H., Wang X., Zhang X., Zhang Q., Yin Q. and Li. K.* Study on bioequivalence of pioglitazone hydrochloride tablets in healthy Chinese volunteers. // Asian Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetic. 2004; 4(2): 119-122.

Оценка биоэквивалентности двух таблетированных форм лизиноприла на здоровых добровольцах

Алтынбеков С.А.¹, Джолдыгулов Г.А.¹, Серяков В.Н.¹, Будач Я.М.²,
Курилов О.Э.², Кузнецова Н.И.³

¹ — РГКП «Республиканский научно-практический центр психиатрии, психотерапии и наркологии» МЗ РК, Республика Казахстан, г. Алматы

² — АО «Химфарм», Республика Казахстан, г. Алматы

³ — ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный университет им. И.М. Сеченова», г. Москва

Резюме

В рамках перекрёстного, однократного, открытого, рандомизированного исследования с периодом отмычки 1 неделя, с двумя последовательностями на 18 добровольцах изучена биоэквивалентность таблеток, покрытых оболочкой, лизиноприла двух производителей (доза 20 мг). Концентрацию лизиноприла в образцах плазмы крови определяли методом ВЭЖХ с флуориметрическим детектированием в течение 72 ч. Для исследуемых препаратов рассчитаны следующие фармакокинетические параметры: $AUC_{0-\infty}$, C_{max} , t_{max} , C_{max}/AUC . 90% доверительный интервал отношений $AUC_{0-\infty}$ сравниваемых препаратов составил 0,8520 — 1,2102 и для C_{max} — 0,9288 — 1,1451. В дополнение к 90% доверительным интервалам, дисперсионный анализ не выявил статистически значимых различий между изучаемыми препаратами. Сделан вывод о биоэквивалентности сравниваемых препаратов лизиноприла.

Ключевые слова: лизиноприл, ВЭЖХ, флуориметрическое детектирование, биоэквивалентность.

Evaluation of bioequivalence of two tablet forms of lisinopril in healthy volunteers

Altynbekov S.A.¹, Dzholdygulov G.A.¹, Seryakov V.N.¹, Budach Y.M.², Kurilo O.E.², Kuznetsova N.I.³

¹ — Republican Scientific and Practical Centre for Psychiatry, Psychotherapy and Addiction, MoH, Republic of Kazakhstan, Almaty

² — JSC «Chimpharm», Republic of Kazakhstan, Almaty

³ — Medical University «First Moscow State University, IM Sechenov», Moscow

Summary

Under cross, single, open, randomized trial with 1 week washout period, with two sequences of 18 volunteers studied bioequivalence coated tablets, two manufacturers of lisinopril (20 mg dose). The concentration of lisinopril in the plasma samples was determined using HPLC with fluorimetric detection within 72 hours for the investigated preparations the following pharmacokinetic parameters were calculated: $AUC_{0-\infty}$, C_{max} , t_{max} , C_{max}/AUC . 90% confidence interval relations $AUC_{0-\infty}$ compared drugs totaled 0.8520 — 1.2102 for C_{max} — 0,9288 — 1,1451. In addition to the 90% confidence intervals, analysis of variance revealed no statistically significant differences between the studied drugs. Concluded bioequivalence compared drugs lisinopril.

Keywords: lisinopril, HPLC, fluorometric detection, bioequivalence

Введение

Лизиноприл, (S)-1-[N₂-(1-карбокси-3-фенил)-L-лизил]-L-пролина дигидрат, представляет собой длительно действующий ингибитор ангиотензин-превращающего фермента, который используется для лечения гипертензии и хронической сердечной недостаточности в суточной дозировке 5-40 мг [4]. Он снижает концентрации ангиотензина и альдостерона в плазме крови за счёт ингибирования ангиотензин-превращающего фермента.

На рынки стран СНГ введены в обращение несколько воспроизведённых препаратов лизиноприла. При этом следует иметь в виду, что воспроизведённый препарат должен быть эквивалентен оригиналу по фармакокинетическим и фармакодинамическим параметрам, обладая при этом более низкой стоимостью, что делает его доступным для большего числа пациентов с хроническим инвалидизирующим заболеванием. Поэтому целью данного исследования является оценка биоэквивалентности двух препаратов лизиноприла.

Материалы и методы

Методом отбора к исследованию были допущены 8 женщин и 10 мужчин ($35,3 \pm 6,0$ лет; $68,6 \pm 6,3$ кг; $170,5 \pm 6,0$ см).

В случайном порядке добровольцы принимали вначале 1 таблетку (20 мг) тестируемого препарата (Лизиноприл, таблетки 20 мг, АО «Химфарм», Республика Казахстан; тест-препарат; Т) [1-й период исследования], спустя 7 дней — 1 таблетку (20 мг) референс-препарата (Лизиноприл-Ратиофарм® таблетки 20 мг, производства «Меркле» ГмБХ, ФРГ; препарат сравнения; R) [2-й период исследования]. В обратном порядке добровольцы вначале принимали 1 таблетку препарата Лизиноприл-Ратиофарм® [1-й период исследования], а затем спустя 7 суток — 1 таблетку Лизиноприла [2-й период исследования]. Препараты принимали внутрь, не разжёвывая, запивая 200 мл воды. Взятие образцов крови для определения содержания лизиноприла в плазме крови осуществлялось в дискретные интервалы времени — до принятия препарата (0) и через 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 6,0, 8,0, 12,0, 24,0, 48,0 и 72,0 ч после приёма препаратов.

Определение концентраций лизиноприла в плазме крови добровольцев проводили методом ВЭЖХ с флуориметрическим детектированием [5]. В качестве дериватирующего агента использовали флуороскамин (0,7 мг/мл в ацетоне). Предел количественного определения лизиноприла составил 5,0 нг/мл.

Оценка биоэквивалентности проводилась применительно к параметрам площади под фармакокинетической кривой лизиноприла в плазме крови добровольцев от нуля до бесконечности ($AUC_{0-\infty}$, поскольку вклад экстраполированной части кривой от последней точки определения концентрации лизиноприла до бесконечности в среднем составил 2,2%) и максимальной концентрации лизиноприла в плазме крови (C_{max}) (натуральные и логарифмически преобразованные данные) с использованием методов параметрической статистики.

В статье представлены результаты дисперсионного анализа ANOVA для показателей биоэквивалентности $\ln AUC_{0-\infty}$ и $\ln C_{max}$. Условием применения является предположение о нормальном распределении изучаемых показателей.

В качестве рабочей была принята нулевая гипотеза: между средними значениями показателей биоэквивалентности тест-препарата и препарата сравнения отсутствуют статистически значимые различия.

В качестве источников вариации изучались межиндивидуальные различия, обусловленные испытуемыми, которые принимали исследуемые препараты («испытуемые»), лекарственной формой препарата («препарат») и последовательностью приёма препаратов («последовательность»).

Гипотеза биоэквивалентности принималась, когда 90% доверительный интервал для отношения среднего значения (μ_T/μ_R) логарифмически преобразованных данных AUC, составлял $0,8 > \mu_T/\mu_R > 1,25$, для C_{max} и

C_{max}/AUC $0,7 > \mu_T/\mu_R > 1,33$. Границы, этих интервалов, рассчитывались при помощи дисперсионного анализа ANOVA. Расчёт 90% доверительных интервалов проводили с использованием программы «Bioeqv», Россия [3].

Расчёт фармакокинетических параметров анализируемых препаратов проведён с использованием модельного-независимого метода. В табл. 1 приведены средние арифметические значения (\bar{x}) соответствующие им стандартные отклонения (SD) и стандартные ошибки среднего значения ($S_{\bar{x}}$), коэффициенты вариации (C.V.%), размах — непараметрический параметр статистики (разность между максимальным и минимальным значениями ряда) и среднее геометрическое (x_{geom}^-).

Рассчитывали парные t-критерии Стьюдента в предположении отсутствия влияния периода получения препарата и нормального распределения изучаемого показателя. По результатам строили графики, показывающие распределение индивидуальных различий между значениями показателя для сравниваемых препаратов. График индивидуальных различий демонстрирует, насколько симметрично они расположены относительно оси абсцисс. График стандартизованных различий (центрированных на среднее значение и нормированных на стандартное отклонение) позволяет выявить резко отличающиеся индивидуальные различия. Учитывая нормальное распределение индивидуальных различий (со средним значением равным 0 и стандартным отклонением равным 1), более 95% от их общего числа должно располагаться в полосе [-2;2].

Результаты и их обсуждение

На рис. 1 представлены усреднённые фармакокинетические профили лизиноприла в плазме крови добровольцев после однократного приёма 20 мг таблеток Лизиноприл и Лизиноприл-Ратиофарм, где анализируемое лекарственное вещество определяется на протяжении 72 ч.

Сравнительный анализ основных фармакокинетических параметров (табл. 1) лизиноприла, получен-

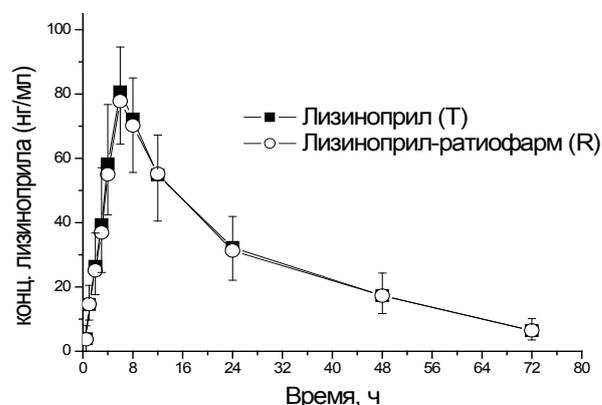


Рис. 1. Усреднённые фармакокинетические профили лизиноприла в плазме крови добровольцев после однократного приёма 20 мг таблеток Лизиноприл (тест-препарат) и 20 мг таблеток Лизиноприл-Ратиофарм (референс-препарат) ($n=18; \pm SD$)

ных по концентрационным кривым лизиноприла из таблеток Лизиноприл и Лизиноприл-Ратиофарм показал, что изучаемые препараты всасываются из желудочно-кишечного тракта практически с одинаковой скоростью. Так параметр, характеризующий скорость всасывания — $C_{max}/AUC_{0-\infty}$ для таблеток Лизиноприла составил $0,0410 \pm 0,0080 \text{ ч}^{-1}$, и для таблеток Лизиноприл-Ратиофарм — $0,0401 \pm 0,0065 \text{ ч}^{-1}$ (между сравниваемыми параметрами статистически значимые отличия не обнаружены). Время достижения максимальной концентрации (t_{max}) лизиноприла в плазме крови добровольцев не отличалось для сравниваемых препаратов и составило в среднем — $6,3 \pm 0,8 \text{ ч}$. При этом средняя максимальная концентрация лизиноприла, определяемая в плазме крови добровольцев (C_{max}), составила для таблеток Лизиноприла — $81,6 \pm 13,6 \text{ нг/мл}$ и для таблеток Лизиноприл-Ратиофарм — $79,1 \pm 13,4 \text{ нг/мл}$.

Анализ основного параметра, характеризующего степень и скорость биодоступности действующего вещества из лекарственной формы — $AUC_{0-\infty}$ указывает

на умеренную вариабельность данного параметра (не выше 25%). Среднее значение $AUC_{0-\infty}$ для препарата Лизиноприл составило $2056,1 \pm 500,0$ и для Лизиноприл-Ратиофарм — $2022,1 \pm 482,0 \text{ нг/мл} \times \text{ч}$. При этом не выявлено достоверно значимых различий для сравниваемых величин.

Степень относительной биологической доступности лизиноприла из таблеток тест-препарата по отношению к референс-препарату, определяемая отношением соответствующих значений $AUC_{0-\infty}$, составила в среднем $1,103 \pm 0,474\%$ (усреднённые данные на основании точечных индивидуальных оценок) (табл. 2).

Доверительный интервал для логарифмически преобразованных значений $AUC_{0-\infty}$ составил $0,8520 - 1,2102$ (или $85,20 - 121,02\%$). Степень биодоступности, определяемая отношением соответствующих значений C_{max} , составила $1,0687 \pm 0,2870$, а доверительный интервал для логарифмически преобразованных значений C_{max} — $0,9288 - 1,1451$ (или $92,88 - 114,51\%$). Полученные данные представлены в табл. 3.

Таблица 1

Фармакокинетические параметры лизиноприла у добровольцев после однократного приёма 20 мг исследуемых препаратов

	$AUC_{0-\infty}$ (нг/мл×ч)		C_{max} (нг/мл)		t_{max} (ч)		C_{max}/AUC (ч ⁻¹)	
	T	R	T	R	T	R	T	R
\bar{x}	2056,1	2022,1	81,6	79,1	6,3	6,3	0,0410	0,0401
SD	500,0	482,0	13,6	13,4	0,8	0,8	0,0080	0,0065
$S\bar{x}$	117,9	113,7	3,2	3,2	0,2	0,2	0,0019	0,0015
C.V.%	24,32	23,84	16,70	17,00	12,11	12,11	19,55	16,16
Размах	1839,8	1685,4	58,0	49,8	2,0	2,0	0,0294	0,0280
$\bar{x}_{геом.}$	1997,6	1967,3	80,5	78,0	6,3	6,3	0,0403	0,0397

Таблица 2

Точечная оценка индивидуальных отношений параметров, характеризующих относительную биодоступность (f) лизиноприла из таблеток Лизиноприл и Лизиноприл-Ратиофарм (Т-тест/R-референс)

№/№	AUC-ratio	C_{max} -ratio	C_{max}/AUC -ratio	№/№	AUC-ratio	C_{max} -ratio	C_{max}/AUC -ratio
1	0,58720	0,87807	1,49490	13	0,66192	1,02964	1,55738
2	1,08854	0,94142	0,86321	14	0,99669	1,13820	1,14332
3	1,27689	0,89308	0,69932	15	0,87144	1,03125	1,18256
4	1,29391	0,99128	0,76522	16	1,38273	1,27208	0,92148
5	0,89602	0,80845	0,90226	17	0,7019	0,91842	1,30769
6	2,36468	1,59619	0,67512	18	0,90535	1,09302	1,20604
7	0,82369	0,80865	0,98006	\bar{x}	1,10271	1,06869	1,04846
8	0,44121	0,48651	1,10165	SD	0,47443	0,28701	0,27184
9	0,83033	1,08582	1,30769	$S\bar{x}$	0,111895	0,06769	0,064112
10	1,71076	1,30587	0,76310	C.V.%	43,02	26,86	25,93
11	1,3777	1,69432	1,22965				
12	1,63784	1,26408	0,77172				

Таблица 3

90% доверительные интервалы отношения среднего значения (μ/μ_r) $AUC_{0-\infty}$ и C_{max} (логарифмически преобразованные данные), полученные на основе дисперсионного анализа (ANOVA)

Параметр	Нижнее значение	Верхнее значение
$AUC_{0-\infty}$	0,85200	1,21015
C_{max}	0,92881	1,14508

In $AUC_{0-\infty}$

Источник вариации	SS	DF	MS	F
Препарат	0.018	1	0.018	1.84435
Последовательность	0.024	1	0.024	2.44571
Добровольцы	0.769	17	0.045	4.63858
Остаточная вариация	0.156	16	0.010	
Общая вариация	0.967	35		

In C_{max}

Источник вариации	SS	DF	MS	F
Препарат	0.003	1	0.003	0.26483
Последовательность	0.000	1	0.000	0.00012
Добровольцы	0.359	17	0.021	1.61603
Остаточная вариация	0.209	16	0.013	
Общая вариация	0.572	35		

Обозначения в таблице: SS — сумма квадратов отклонений; MS — средний квадрат; DF — число степеней свободы; F — рассчитанное значение F-критерия Фишера (при уровне значимости $\alpha=5\%$).

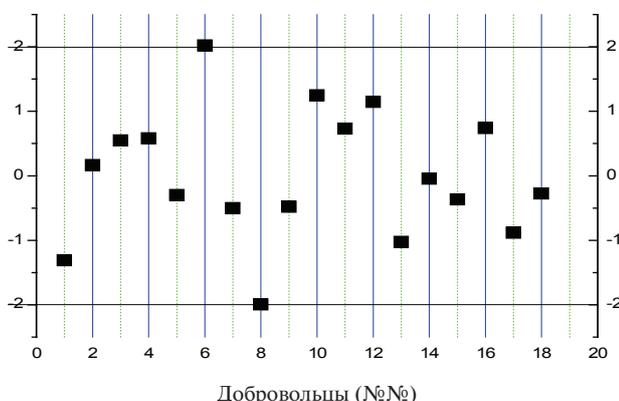


Рис. 2. График стандартизованных различий (центрированных на среднее значение и нормированных на стандартное отклонение) для значений $\ln AUC_{0-\infty}$ лизиноприла

Литература

1. Оценка биоэквивалентности лекарственных средств (Методические рекомендации), Москва, 2008, с.32.
2. Проведение надлежащих исследований биоэквивалентности лекарственных средств в Республике Казахстан, Астана, 2007, с. 44.
3. Сергиенко В.И., Джеллифф Р., Бондарева И.Б. Прикладная фармакокинетика: основные положения и клиническое применение. Москва, Издательство РАМН, 2003; 208.
4. Регистр лекарственных средств России РЛС. Энциклопедия лекарств. Москва, РЛС-Медиа, 2013; 1296.
5. Sagirli O., Ersoy L. An HPLC method for the determination of lisinopril in human plasma and urine with fluorescence detection. // J. Chromatogr. B. 2004, Vol. 809, P. 159-165.
6. Neng Zhou I, Yi-zeng Liang I, Ben-mei Chen et al. Development and Validation of LC—MS Method for the Determination of Lisinopril in Human Plasma and its Application in a Bioequivalence Study. // Journal of Chromatogr. Sci. 2008, Vol. 46, P. 848-853.
7. Shin M.C., Kim J.K., Kim C.K. Bioequivalence evaluation of two brands of lisinopril tablets by in vitro comparative dissolution test and in vivo bioequivalence test. // Arzneimittelforschung. 2008, Vol. 58(1), P. 11-17.
8. Tamimi J.J., Salem I.I., Alam S.M., Zaman Q., Dham R. Bioequivalence evaluation of two brands of lisinopril tablets (Lisotec and Zestril) in healthy human volunteers. // Biopharm. Drug Dispos. 2005, Vol. 26(8), P. 335-339.

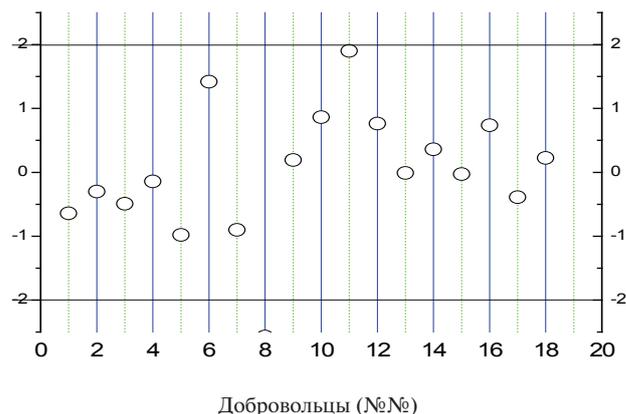


Рис. 3. График индивидуальных стандартизованных различий (центрированных на среднее значение и нормированных на стандартное отклонение) для значений C_{max} лизиноприла

Полученные интервальные значения лежат в пределах, установленных «Оценкой биоэквивалентности лекарственных средств (Методические рекомендации)» и «Проведением надлежащих исследований биоэквивалентности лекарственных средств в Республике Казахстан» [1, 2], что говорит о биоэквивалентности исследуемых препаратов.

Дисперсионный анализ показал, что на конечные результаты оказал влияние такой фактор, как «испытываемые»: на $AUC_{0-\infty}$ — доброволец № 6, на C_{max} — доброволец №8 (см. табл. 3, рис. 2, 3).

В литературе описаны случаи оценки биоэквивалентности различных воспроизведенных препаратов лизиноприла. Так, Neng Zhou и соавт. разработали ВЭЖХ-МС методику определения лизиноприла в плазме крови человека и апробировали ее при изучении биоэквивалентности 2 препаратов лизиноприла (доза 20 мг) на 18 добровольцах [6]. Авторами сделан вывод о биоэквивалентности исследуемых препаратов. Представленные в этом исследовании фармакокинетические параметры значительно отличались от полученных нами (за исключением t_{max}). Имеющиеся различия можно объяснить разными подходами в пробоподготовке и аналитической методикой. Аналогичные результаты получены Shin M.C. и соавт. и Tamimi J.J. и соавт., доказавших биоэквивалентность препаратов лизиноприла на 26 и 28 добровольцах, соответственно, с использованием метода ВЭЖХ-МС/МС [7, 8].

Экспериментальное исследование фармакокинетики рифабутина в липосомальной форме

*Карлина М.В.¹, Косман В.М.¹, Пожарицкая О.Н.¹, Шиков А.Н.¹,
Макарова М.Н.¹, Макаров В.Г.¹, Балабаньян В.Ю.²*

¹ — ЗАО «Санкт-Петербургский институт фармации», г. Санкт-Петербург

² — ООО «Технология лекарств», Московская область, г. Химки

Резюме

На беспородных крысах-самцах изучена фармакокинетика препарата рифабутин в липосомальной форме, относительная биодоступность и распределение в тканях после эндотрахеального введения препарата, проведена оценка линейности фармакокинетики.

Для определения рифабутина в плазме крови и органах был разработан и валидирован метод ВЭЖХ с УФ-детекцией.

В ходе проведенного исследования установлена линейность фармакокинетики новой липосомальной формы рифабутина в диапазоне доз 6.5-26 мг/кг, рассчитаны основные фармакокинетические параметры, установлено, что рифабутин интенсивно распределяется в сильно васкуляризованные органы, содержание его в слабо васкуляризованных органах значительно ниже. После введения препарата наибольшая концентрация действующего вещества наблюдается в месте введения, а именно в легких.

Относительная биодоступность препарата Рифабутин в липосомальной форме в проведенном эксперименте составила 522%.

Ключевые слова: рифабутин, липосомы, фармакокинетика, биодоступность, ВЭЖХ, валидация.

Experimental study of the pharmacokinetics of rifabutin in liposomal form

Carlin M.V.¹, Cosman V.M.¹, Pozharitskaya O.N.¹, Shikov A.N.¹, Makarova M.N.¹, Makarov V.G.¹, Balabanyan V.Y.²

¹ — JSC «Saint-Petersburg Institute of Pharmacy», St. Petersburg

² — LLC «Technology of medicines», Moscow region, Khimki

Summary

On mongrel male rats studied pharmacokinetics of rifabutin in liposomal form, the relative bioavailability and tissue distribution after intratracheal administration, evaluated pharmacokinetic linearity. To determine rifabutin in plasma and organs were developed and validated HPLC method with UV detection. In the course of the study established a new linear pharmacokinetics of liposomal form of rifabutin dose range 6.5-26 mg/kg, calculate the main pharmacokinetic parameters found that rifabutin intensively distributed in highly vascularized organs, its content in poorly vascularized organs is much lower. After injection the highest concentration of active substance is observed at the injection site, namely the lungs. Relative bioavailability of rifabutin in liposomal form in this experiment was 522%.

Keywords: rifabutin, liposomes, pharmacokinetics, bioavailability, HPLC validation

Введение

Рифабутин — противотуберкулезное антибактериальное средство широкого спектра действия, обладающее низкой растворимостью, что существенно ограничивает его применение. Терапия рифабутином часто оказывается малоэффективной в случае, если возбудители инфекционных заболеваний паразитируют внутри клеток хозяина. Способность липосом обеспечивать доставку лекарственных препаратов внутрь клетки делает их перспективными носителями для создания систем доставки рифабутина [1, 2]. Липосомы облегчают проникновение лекарственных препаратов внутрь клетки, что важно в случае лечения туберкулеза, так как возбудитель туберкулеза *Mycobacterium tuberculosis* является

факультативным внутриклеточным паразитом, основная часть микобактерий находится в фагосоме макрофагов, что осложняет лечение заболевания. Кроме того, липосомы существенно увеличивают биодоступность лекарственных веществ при различных путях введения, не вызывают аллергических, пирогенных, иммунологических реакций [3]. Данные по изучению эффективности липосомальных антибиотиков показали возможность замены инъекционных форм пероральными. При этом возможно снижение дозы в два и более раз без потери терапевтической эффективности [4].

В ООО «Технология лекарств» разработана новая система доставки рифабутина в виде лиофилизированного липосомального порошка для эндотрахеального введения.

Целью настоящей работы явилось исследование фармакокинетики липосомальной формы рифабутина на животных после эндотрахеального введения, изучение распределения в тканях рифабутина, а также оценка относительной биодоступности новой лекарственной формы рифабутина в сравнении с субстанцией.

Экспериментальная часть

В исследовании использовали аутбредных белых крыс-самцов массой 220—250 г (Питомник лабораторных животных РАМН «Рапполово»), которые содержались в стандартных условиях вивария со световым режимом 12 часов света и 12 часов темноты на полнорационной сбалансированной по содержанию питательных веществ диете для лабораторных животных (по ГОСТ Р 50258-92). Эксперименты выполнены согласно методическим руководствам и нормативным документам, правилам лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ Р 53434-2009), согласованном с «Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и научных целей» и одобрены на заседании биоэтической комиссии СПб института фармации.

Исследуемый препарат — Рифабутин в липосомальной форме (ООО «Технология лекарств», Россия) вводили в трех дозах 6,5, 13 и 26 мг/кг однократно эндотрахеально с помощью аэрозоллера для мелких лабораторных животных (Penn-Century Inc., USA). Субстанцию рифабутина (Sichuan Med-Shine Pharmaceutical Co., Китай) вводили в дозе 13 мг/кг однократно эндотрахеально.

Пробы крови и органы (легкие, печень, сальник) отбирали после эвтаназии животных с помощью CO₂-камеры через 0, 0,25, 0,5, 1,0, 2,0, 4,0, 8,0, 10,0, 24,0, 48 ч. Количество животных на одну временную точку — 5. Образцы крови помещали в гепаринизированные пробирки, центрифугировали при 2000 об/мин в течение 20 мин для получения плазмы. Образцы плазмы и органов были заморожены и хранились до анализа при температуре -20°C.

Подготовка плазмы крови к анализу: в пробирку вместимостью 1,5 мл (типа «Эппендорф») помещали 0,2 мл плазмы, прибавляли 0,1 мл элюента, перемешивали, прибавляли 0,4 мл смеси дихлорметана и изооктана в соотношении 2:3 и экстрагировали аналит. Далее пробы центрифугировали при 3000 об/мин 15 минут, органический слой отделяли. Экстракцию смесью дихлорметана и изооктана повторяли еще раз, органические слои объединяли, растворитель удаляли, сухой остаток растворяли в 0,2 мл метанола, пробу переносили в вialу для автосамплера и дозировали в ВЭЖХ-систему.

Подготовка органов к анализу: размороженный орган гомогенизировали в измельчителе тканей с элюентом в соотношении 1:2. 0,4 мл полученного гомогената переносили в пластиковую пробирку вместимостью 5 мл с завинчивающейся крышкой, прибавляли 2 мл

смеси дихлорметана и изооктана, вортексировали 10 с и затем встряхивали 10 мин для экстракции аналита. Далее пробы центрифугировали при 3000 об/мин 15 минут, органический слой отделяли. Процедуру экстракции повторяли еще раз. Объединенные извлечения помещали в пластиковые центрифужные пробирки вместимостью 5 мл, растворитель удаляли, сухой остаток растворяли в 0,2 мл метанола и переносили в вialу для автосамплера и дозировали в ВЭЖХ-систему.

Образцы анализировали на хроматографе высокого давления фирмы Shimadzu (Япония) с колонкой Luna C₁₈ (2) (4,6x150 мм, 5 μm) и предколонкой (3,0 мм) заполненной тем же сорбентом (Phenomenex, США) в изократическом режиме элюирования смесью буферного раствора с pH~4,0 (раствор, содержащий 3,8 г/л аммония уксуснокислого, доведенного ледяной уксусной кислотой до pH 4,0±0,2) и ацетонитрила в соотношении 50:50, скорость подачи элюента 1,0 мл/мин, объём пробы 20 мкл, длина волны детектирования 275 нм. Регистрация и обработка хроматограмм выполнена с помощью программного обеспечения LabSolution (Shimadzu, Япония).

Статистическая обработка данных выполнена с помощью программного обеспечения Microsoft Office Excel 2007. В таблицах приведены средние арифметические значения (\bar{x}), соответствующие им стандартные ошибки среднего значения (S_x). Параметры фармакокинетики рассчитаны методом статистических моментов [5].

Результаты и обсуждение

Для анализа биологических проб плазмы разработали методику количественного определения рифабутина, которая была валидирована в соответствии с современными требованиями [6-9]. Методика была адаптирована для анализа проб органов и ревалидирована на примере проб печени. Основные валидационные параметры методик приведены в табл. 1.

Таблица 1

Валидационные параметры методик определения рифабутина в плазме крови и печени

Параметр	Значение в плазме	Значение в печени
Линейность (Linearity) и аналитическая область (Range), мкг/мл	0,01—50,0	0,06—46,0
Уравнение регрессии*	$Y=37368 \cdot X+300$	$Y=36742 \cdot X-483$
Коэффициент корреляции r	0,9993	0,9998
Относительное стандартное отклонение, RSD, %	0,7	0,7
Степень экстракции (Recovery), %	89,7	83,8
Точность (Accuracy), %	1,0-6,6	0,6-14,1
Прецизионность (Precision), %	0,6-8,5	0,3-6,2
Предел обнаружения (LOD), мкг/мл	0,003	0,02
Предел количественного определения (LOQ), мкг/мл	0,010	0,06

Примечания: *у — площадь пика рифабутина;
х — концентрация рифабутина, мкг/мл

Разработанные и валидированные методики определения содержания рифабутина были использованы для анализа проб плазмы крови и органов, полученных от лабораторных животных.

Для оценки фармакокинетики липосомальной формы рифабутина и ее линейности препарат был введен в трех дозах — 6,5, 13 и 26 мг/кг, параллельно для изучения относительной биодоступности была введена субстанция рифабутина в дозе 13 мг/кг. Полученные результаты приведены на рис. 1.

После введения субстанции и липосомальной формы рифабутина фармакокинетическая кривая имеет схожую форму (рис. 1). Максимальная концентрация в плазме крови достигается достаточно быстро — через 30 минут после введения. Далее наблюдается постепенное снижение концентрации рифабутина и к 48 часу эксперимента действующее вещество в плазме крови определяется в незначительных количествах. Концентрации рифабутина, определяемые в плазме крови статистически значимо выше после введения липосомальной формы.

Основные фармакокинетические параметры, рассчитанные методом статистических моментов, приведены в табл. 2

Основной параметр, характеризующий степень биологической доступности препарата Рифабутин в липосомальной форме, AUC_{0-48} , увеличивается с уве-

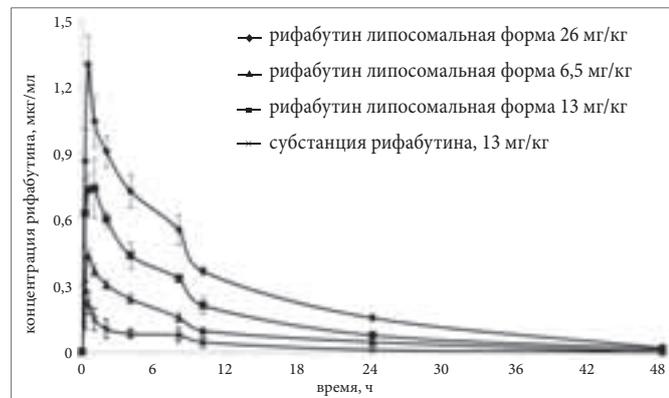


Рис. 1. Кривая «концентрация-время» рифабутина при однократном эндотрахеальном введении исследуемого препарата в различных дозировках и субстанции рифабутина (n=5, $\bar{x} \pm S_x$)

личением дозы линейно (рис. 2) и имеет статистически значимые различия в зависимости от вводимой дозы.

Для проверки гипотезы линейности был проведен регрессионный анализ, в результате которого было установлено, что уравнение линейной регрессии является значимым (P=0,0047), свободный член уравнения незначимо отличается от нуля: абсолютное значение критерия t составило 0,91 при критическом значении двустороннего t-критерия Стьюдента 4,30. Полученные результаты позволяют принять гипотезу линейности для изучаемых доз препарата Рифабутин в липосомальной форме.

Значения максимальной концентрации C_{max} также имеют статистически значимые отличия в зависимости от дозы. Среднее время удержания препарата (MRT) период полувыведения ($T_{1/2}$) и показатель C_{max}/AUC_t не имеют значимых отличий при изменении дозы препарата.

С целью оценки относительной биодоступности субстанции рифабутина и его липосомальной формы сравнивали значения максимальной концентрации (C_{max}), времени её достижения (T_{max}), площади под фармакокинетической кривой (AUC_{0-48}), полученные при введении изучаемых объектов в дозе 13 мг/кг.

Основной параметр, характеризующий степень биологической доступности препарата, AUC_{0-48} , а также максимальная концентрация C_{max} имеют статисти-

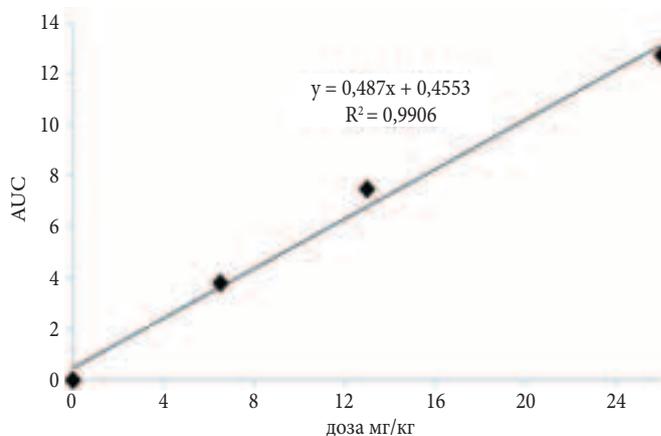


Рис. 2. Зависимость значений AUC_{0-48} от величин вводимых доз препарата Рифабутин в липосомальной форме

Таблица 2

Показатели фармакокинетики рифабутина при однократном эндотрахеальном введении препарата Рифабутин в липосомальной форме (ООО «Технология лекарств», Россия) и его субстанции $\bar{x} \pm S_x$

Объект	C_{max}' мкг/мл	AUC_{0-48}' ч·мкг/мл	MRT, ч	C_{max} / AUC_t , ч	$T_{1/2}'$, ч	T_{max}' , ч
Рифабутин липосомальный 6,5 мг/кг	0,44±0,03	3,78±0,27	9,42±0,98	0,12±0,01	6,53±0,67	0,60±0,10
Рифабутин липосомальный 13 мг/кг	0,92±0,09	7,46±0,31	9,88±0,97	0,13±0,02	6,85±0,68	0,55±0,12
Рифабутин липосомальный 26 мг/кг	1,30±0,13	12,74±0,94	10,69±0,19	0,10±0,01	7,41±0,13	0,50±0,10
Рифабутин субстанция 13 мг/кг	0,25±0,08	1,43±0,48	8,34±0,63	0,17±0,01	5,78±0,43	0,42±0,08

чески значимые отличия в зависимости от вводимого объекта: максимальная концентрация рифабутина после введения липосомальной формы в 3,7 раза выше, чем после введения субстанции, значения площади под фармакокинетической кривой выше в 5,2 раза.

Время достижения максимальной концентрации несколько выше после введения липосомальной формы, однако, статистически значимых различий установлено не было. Остальные параметры (MRT , $T_{1/2}$, C_{max}/AUC_t) также не имеют значимых отличий.

Относительная биологическая доступность рифабутин в липосомальной форме, рассчитанная как отношение площадей под фармакокинетической кривой «концентрация-время» для липосомальной формы и субстанции составила 522%. Полученные данные свидетельствуют о значимом увеличении биологической доступности рифабутин при эндотрахеальном введении его в липосомальной форме по сравнению с субстанцией.

Для липосомальной формы рифабутин было изучено накопление действующего вещества в ткани легких, а также распределение в тканях печени и сальника (рис. 3).

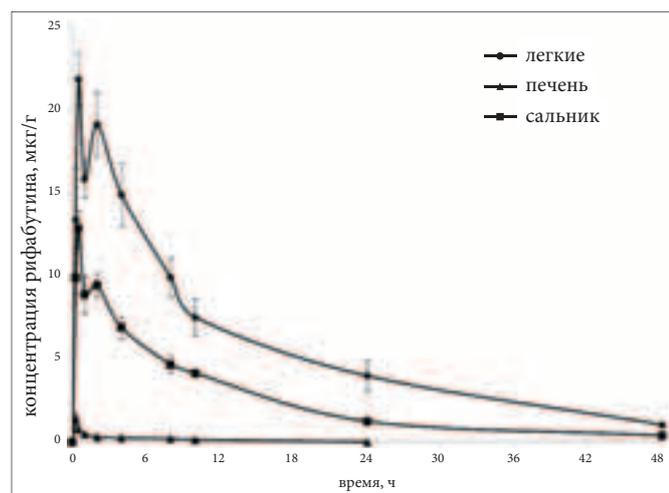


Рис. 3. Кривые «концентрация-время» рифабутин при однократном эндотрахеальном введении исследуемого препарата Рифабутин в липосомальной форме в различных органах ($n=5$, $\bar{x} \pm S_x$)

В исследуемых тканях рифабутин определяется уже через 15 минут после введения, максимум концентрации достигается через 30 минут. Минимальное количество действующего вещества (C_{min} около 1,4 мкг/г) наблюдается в сальнике — наименее васкуляризированной ткани. Для лёгочной ткани и ткани печени максимальная концентрация составила 21,8 и 12,8 мг/г, соответственно. Через 2 часа после введения липосомальной формы рифабутин в печени и лёгких наблюдается второй, менее выраженный, подъем концентра-

ции рифабутин.

Интенсивность проникновения фармакологического средства в периферические ткани была охарактеризована тканевой доступностью (f_t), определяемой как отношение значения AUC в ткани (AUC_t) к соответствующей величине AUC в плазме, а также значением периода полувыведения и среднего времени удержания ($T_{1/2,t}$ и MRT_t). Рассчитанные параметры приведены в табл. 3.

Таблица 3

Основные показатели проникновения рифабутин в сальник при однократном эндотрахеальном введении препарата Рифабутин в липосомальной форме ($\bar{x} \pm S_x$)

Орган	AUC_{0-48} , мкгЧ	MRT_t , ч	$T_{1/2,t}$, ч	f_t
лёгкие	274,34±28,76	12,51±0,60	8,67±0,41	36,77
печень	123,80±4,65	10,84±0,51	7,51±0,35	16,59
сальник	3,72±0,92	4,36±0,82	3,02±0,57	0,50

Рифабутин в липосомальной форме интенсивно распределяется в ткани исследованных органов. Схожие результаты были получены при изучении распределения в тканях рифабутин на мышах после внутривенного введения липосомальной формы рифабутин [2]: в исследовании было установлено интенсивное распределение действующего вещества в ткани лёгких, селезёнки и печени. В проведённом исследовании концентрации рифабутин в сильно васкуляризированных органах значительно выше, чем в слабо васкуляризированных органах. В лёгочной ткани концентрации рифабутин значительно более высокие по сравнению с плазмой крови (площадь под фармакокинетической кривой в плазме в 36 раз меньше, чем в легких), среднее время удержания также наиболее высокое в легких.

Проведённое на крысах исследование фармакокинетики липосомальной лекарственной формы рифабутин показало, что после однократного введения препарата на трёх уровнях доз фармакокинетики препарата Рифабутин в липосомальной форме является линейной в диапазоне доз 6,5—26 мг/кг, действующее вещество интенсивно распределяется в сильно васкуляризированные органы, содержание его в слабо васкуляризированных органах значительно ниже.

Таким образом, включение рифабутин в липосомы является перспективной терапевтической системой для лечения или профилактики инфекционных заболеваний. Эндотрахеальное введение липосомального рифабутин крысам привело к повышению концентрации действующего вещества в месте введения (лёгких) по сравнению с введением чистого рифабутин, при этом относительная биодоступность рифабутин в липосомальной форме составила 522%.

Литература

1. *Gaspar M.M., Neves S., Portaels F., Pedrosa J., Silva T.M., Cruz M.E.* Therapeutic efficacy of liposomal rifabutin in a *Mycobacterium avium* model of infection. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000. Vol. 44, № 3. P. 292–306.
2. *Gaspar M.M., Cruz A., Penha A.F., Reymão J., Sousa A.C., Eleuterio C.V., et al.* Rifabutin encapsulated in liposomes exhibits increased therapeutic activity in a model of disseminated tuberculosis. // *International Journal of Antimicrobial Agents.* 2008. Vol.31, P. 37–45.
3. *Kulkarni P.R., Yadav J.D., Vaidya K.A.* Liposomes: a novel drug delivery system. // *International J. of current pharmaceutical research.* 2011. Vol.3, №.2. P. 10-18.
4. *Исмаилова Г.К., Жилченко Е.Б., Ефременко Д.В., Головченко Т.В., Малецкая О.В., Одинец А.В., Кремнева Г.М., Романова Л.В.* Эффективность применения липосомальных форм антибиотиков при лечении некоторых инфекционных заболеваний в эксперименте. // *Вестник ВолГМУ.* 2007. Т. 21, №1. С. 64-67.
5. *Пиотровский В.К.* Метод статистических моментов и интегральные модельно-независимые параметры фармакокинетики. // *Фармакология и токсикология.* 1986. Т. 49, №5. С.118-127.
6. Guideline on bioanalytical method validation. EMEA/CHMP/EWP192217/2009, London, Committee for medicinal products for human use (CHMP), 2011.
7. ICH, Q2A, Harmonized tripartite guideline, text on validation of analytical procedures, ICPMA, in: Proceedings of the International Conference on Harmonization, Geneva, March 1994, pp. 1–5.
8. ICH, Q2B, Harmonized tripartite guideline, validation of analytical procedure: methodology, ICPMA, in: Proceedings of the International Conference on Harmonization, Geneva, March 1996, pp. 1–8.
9. Guidance for Industry: Bioanalytical method for validation. — Rockville, MD, U.S. Department of Health and Human Services, FDA, Center for Drug Evaluation and Research, Center for veterinary medicine, 2001.

