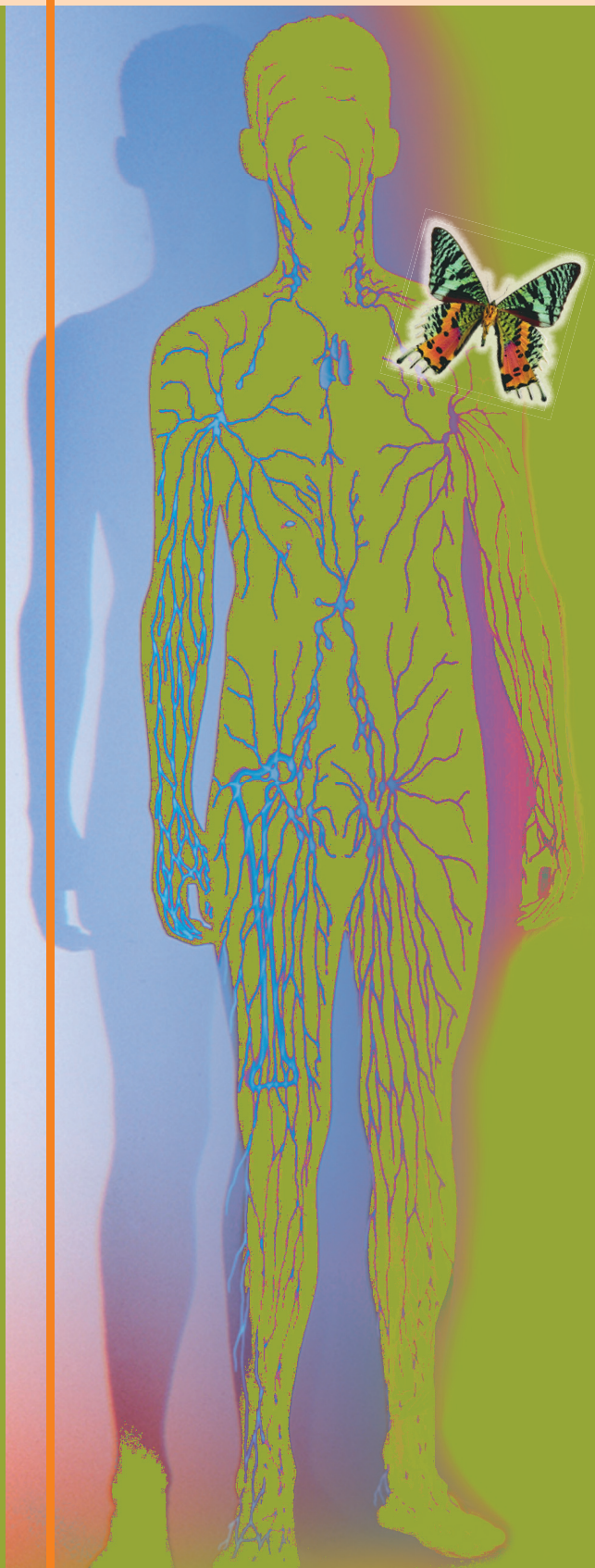


ФАРМАКОКИНЕТИКА *и* ДИНАМИКА





Главный редактор

Жердев Владимир Павлович

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

Зам. главного редактора

Фирсов Александр Алексеевич

член-корр. РАН, 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. РАН, 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 РАН, д.м.н.,
профессор, Волгоград

Стародубцев

Алексей Константинович

д.м.н., профессор, Москва

Сычёв

Дмитрий Александрович

д.м.н., профессор, Москва

Тюрников

Иван Николаевич

член-корр. РАН, д.м.н.,
профессор, Волгоград

Чистяков

Виктор Владимирович

д.ф.н., профессор, Москва

Выпускающая группа

Белоусов

Дмитрий Юрьевич

Ответственный за выпуск

журнала,

генеральный директор

ООО «Издательство ОКИ»

+7 (910) 449-22-73

+7 (926) 568-17-35

e-mail: clinvest@mail.ru

сайт: www.izdat-oki.ru

Дизайн, верстка:

Design2pro.ru

Афанасьева

Елена Владимировна

Финансовый директор

ООО «Издательство ОКИ»,

подписка

+7 (916) 986-04-65

e-mail: eva88@list.ru

Подписано в печать 01.05.2015 г.

«Тверской Печатный Двор», www.tpd-print.ru

Адрес редакции: 125315, Москва, ул. Балтийская, 8 ФГБУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» РАН Тел./факс: +7 (495) 601-21-57; e-mail: zherdevpharm@mail.ru

Подписка на журнал на 2016 г.: объединённый каталог «Пресса России» в каждом почтовом отделении РФ — индекс 45072.

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

Сайты

www.Pharmacokinetics.ru

www.ClinVest.ru

www.Clinical-Pharmacy.ru

Журналы

Фармакокинетика и Фармакодинамика

Качественная клиническая практика

Клиническая фармация

WEB-порталы

www.HealthEconomics.ru

www.Market-Access-Solutions.ru

www.Izdat-Oki.ru

Центр фармакоэкономических исследований

Market Access Solutions

Издательство ОКИ

ОТ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА 3

АКТУАЛЬНЫЕ ОБЗОРЫ

Обзор существующих методик оценки активности CYP2D6 с применением экзогенных и эндогенных маркеров
*Абдрашитов Р.Х., Гильдеева Г.Н.,
Раменская Г.В., Смирнов В.В.* 4

Биосимиляры — препараты будущего
*Ельцова Е.А., Раменская Г.В.,
Смолярчук Е.А., Бушманова А.В.* 12

Современные тенденции в стандартизации препаратов аллергенов
Игнатов А.А., Раменская Г.В., Смирнов В.В. 16

ИССЛЕДОВАНИЯ БИОЭКВИВАЛЕНТНОСТИ

Исследование биоэквивалентности препаратов ондансетрона с использованием метода ВЭЖХ-МС
*Степанова Е.С., Овчаров М.В., Барсегян С.С.,
Чистяков В.В., Никонова С.М., Шилов В.В.* 21

Исследования биоэквивалентности Нипезама ретард таблетки, 400 мг (АО «Химфарм», Республика Казахстан) и Финлепсина® 400 ретард таблетки, 400 мг («Плива Краков, Фармацевтическая компания С.А.», Польша)
*Сариев А.К., Абаимов Д.А., Танкевич М.В., Будац Я.,
Курилов О., Алтынбеков С.А., Джолдыгулов Г.А.,
Серяков В.Н., Алтынбеков К.С.* 27

Исследование сравнительной фармакокинетики и биоэквивалентности препаратов Кардиопринл таблетки, 20 мг (АО «Химфарм», Республика Казахстан) и Монопринл® таблетки, 20 мг («Бристол-Майерс Сквипб С.Р.Л.», Италия)
*Сариев А.К., Абаимов Д.А., Танкевич М.В.,
Алтынбеков С.А., Джолдыгулов Г.А., Серяков В.Н.,
Будац Я., Курилов О.* 35

ИССЛЕДОВАНИЯ ФАРМАКОДИНАМИКИ

Сравнение поведенческих и нейрорецепторных эффектов пантогама и бемитила при одно- и многократном введении мышам C57BL/6 и BALB/c
*Кондрахин Е.А., Салимов Р.М.,
Незнамов Г.Г., Ковалёв Г.И.* 44

ИССЛЕДОВАНИЯ ФАРМАКОКИНЕТИКИ

Доклиническое изучение фармакокинетики нового анксиолитика дипетидной структуры ГБ-115
*Жердев В.П., Бойко С.С., Блынская Е.В.,
Турчинская К.Г., Гудашева Т.А., Иванникова Е.В.* 52

PHARMACOKINETICS AND PHARMACODYNAMICS

№1
2015



Chief editor

Zherdev Vladimir

Ph.D., Professor, Honored Scientist of the Russian Federation, Moscow

Deputy chief editor

Firsov Alexander

Corresponding Member RAS, Ph.D., Professor, Moscow

Executive secretary

Litvin Alexander

Ph.D., Moscow

Editorial Board

Belolipetskaia Vera

Ph.D., Moscow

Belousov Yuri

Corresponding Member RAS,
Ph.D., Professor, Moscow

Bondareva Irina

Ph.D., Moscow

Voronin Tatiana

Honored Scientist RF, Ph.D.,
Professor, Moscow

Kovalev Georgy

Ph.D., Professor, Moscow

Kulmagambetov Ilyas

Ph.D., Professor, Academician
National Academy of Sciences,
Almaty, Kazakhstan

Mirzoyan Ruben

Honored Scientist RF, Ph.D.,
Professor, Moscow

Nasonov Alexander

Ph.D., Moscow

Ramenskaya Galina

Ph.D., Professor, Moscow

Sariev Abrek

Ph.D., Professor, Moscow

Sokolov Andrey

Ph.D., Moscow

Spasov Alexander

RAS, Ph.D., professor, Volgograd

Starodubtcev Alex

Ph.D., Professor, Moscow

Sychev Dmitry

Ph.D., Professor, Moscow

Tyurenkov Ivan

Corresponding Member PAS,
Ph.D., Professor, Volgograd

Chistyakov Viktor

Ph.D., Professor, Moscow

Graduate group

Belousov Dmitry

Responsible for this issue
CEO in LLC «Publishing OCL»
+7 (910) 449-22-73
e-mail: clinvest@mail.ru
Site: www.izdat-ok.ru

Design and layout:

Design2pro.ru

Afanasyeva Elena

Chief Financial Officer
LLC «Publishing OCL»
subscription
+7 (916) 986-04-65
e-mail: eva88@list.ru

Signed in print 01.05.2015

Typography: «Tver Printing House», www.tpd-print.ru

Editorial address: 125315, Moscow, ul. Baltiyskaya 8

FGBI «Institute of Pharmacology named after V.V. Zakusova» RAS
Tel. / Fax: +7 (495) 601-21-57; e-mail: zherdevpharm@mail.ru

Subscription on 2016: common catalog «Press of Russia» in every post office of the Russian Federation — index 45072.

Journal «Pharmacokinetics and Pharmacodynamics» is a supplement to the journal «Good Clinical Practice». Journal «Good Clinical Practice» registered by Russian Committee for Press 28.05.2001 Certificate of registration of mass media PI №77-9142. Copyright material does not necessarily reflect the views of the publisher. We take no responsibility for the accuracy of the information contained in promotional materials.

Sites

www.Pharmacokinetics.ru
www.ClinVest.ru
www.Clinical-Pharmacy.ru

WEB-portals

www.HealthEconomics.ru
www.Market-Access-Solutions.ru
www.Izdat-OKi.ru

Journals

Pharmacokinetics and Pharmacodynamics
Good Clinical Practice
Clinical Pharmacy

Center of Pharmacoeconomics Research
Market Access Solutions
Publisher OCL

CONTENTS

FROM THE EDITOR..... 3

CURRENT REVIEWS

Review of existing methodologies to assess the activity
of CYP2D6 using exogenous and endogenous markers

Abdrashitov A.D., Gildeeva G.N.,
Ramenskaya G.V., Smirnov V.V. 4

Biosimilars — drugs of the future

Eltcova E.A., Ramenskaya G.V.,
Smolyarchuk E.A., Bushmanova A.V. 12

Current trends in the standardization of preparations of allergens
Ignatov A.A., Ramenskaya G.V., Smirnov V.V. 16

BIOEQUIVALENCE STUDY

Bioequivalence study of ondansetron tablets by HPLC-MS

Stepanova E.S., Ovcharov M.V., Barseganyan S.S.,
Nikonova S.M., Shilov V.V., Chistyakov V.V. 21

Bioequivalence studies Nipezam retard tablets, 400 mg
(JSC «Himfarm», Kazakhstan) and Finlepsin® 400 retard tablets
400 mg («Pliva Krakow, SA Pharmaceutical company», Poland)
Sariev A.K., Abaimov D.A., Tankevich M.V., Budach Y.,
Kurilov O., Altinbekov S.A., Dzholdygulov G.A.,
Seryakov V.N., Altinbekov K.S. 27

A comparative study of pharmacokinetics and bioequivalence
of Cardipril tablets 20 mg (JSC «Himfarm», Kazakhstan) and
Monopril® tablets of 20 mg («Bristol-Myers Squibb SRL», Italy)
Sariev A.K., Abaimov D.A., Tankevich M.V., Altinbekov S.A.,
Dzholdygulov G.A., Seryakov V.N., Budach Y., Kurilov O. 35

PHARMACODYNAMICS STUDY

Comparison of behavioral and neuro-receptor effects of
pantogam and bemtil with single and multiple injections in mice
of C57BL/6 and BALB/c

Kondrakhin E.A., Salimov R.M.,
Neznamov G.G., Kovalev G.I. 44

PHARMACOKINETICS STUDY

Preclinical study the pharmacokinetics new anxiolytic drug
of dipeptide structure GB-115

Zherdev V.P., Boyko S.S., Blynskaya E.V.,
Turchinskaya K.G., Gudasheva T.A. Ivannikova E.V. 52

CONTENTS



Уважаемые коллеги!

В настоящем номере представлен ряд актуальных обзоров, посвящённых изучению новых лекарственных средств и межлекарственному взаимодействию. Прежде всего, продолжается серия обзоров, связанных с исследованием функционирования и полиморфизма известных изоферментов цитохрома P450.

В предыдущем номере был представлен подробный обзор о роли изофермента CYP1A2, играющего важную роль в биотрансформации большого количества лекарственных препаратов, представлена методология исследования активности этого изофермента.

В настоящем номере представлены данные по оценке активности не менее важного изофермента CYP2D6 с применением экзо- и эндогенных маркеров. В следующем номере планируется опубликовать обзор по методологии изучения изофермента CYP2C9, также играющего важную роль в метаболизме большой группы лекарственных средств. Этим исследованиям журнал уделяет большое внимание, т. к. ни один новый лекарственный препарат не может получить «путёвку в жизнь» без таких исследований с целью выявления ингибирующих или индуцирующих влияний на различные изоферменты цитохрома P450 *in vitro* и *in vivo* на людях. Эти исследования дают возможность судить о взаимодействии нового, создаваемого лекарственного средства с другими препаратами, а, следовательно, об эффективности фармакотерапии. Полученные данные должны найти отражение в инструкции по медицинскому применению лекарственного препарата.

Важное место в номере занимает обзор по биосимилярам, которым в последнее время уделяется большое внимание. Биосимиляры или биоаналоги — это сложные пептидные молекулы, на многие из них истекает срок патентной защиты и встаёт острый вопрос: «Как проводить сравнительные исследования биоаналогов?». Сейчас обсуждаются «Общие правила проведения исследований биоаналоговых лекарственных средств (биоаналогов)», в составлении которых важную роль играют эксперты российских фармацевтических компаний и различные организации. Это сложная задача, поскольку данная группа биотехнологических препаратов существенным образом отличается от дженериков, для которых достаточно провести фармакокинетические исследования и доказать их биоэквивалентность в сравнении с инновационным препаратом. Поэтому, мы сочли целесообразным рассмотреть данную проблему на страницах нашего журнала.

Такая же проблема существует в стандартизации препаратов аллергенов — чему и посвящён третий обзор настоящего издания.

Кроме того, в журнале представлен раздел, связанный с изучением биоэквивалентности некоторых лекарственных препаратов, раздел по изучению фармакодинамики.

В последнем разделе впервые представлены новые данные по влиянию пантогама и бемитила на динамику развития ноотропного и анксиолитического эффектов и возможный механизм их рецепторного взаимодействия в эксперименте.

В разделе «Исследования фармакокинетики» представлены новые доклинические данные по изучению фармакокинетики анксиолитика дипептидной структуры ГБ-115.

*Главный редактор
Жердев Владимир Павлович*

Обзор существующих методик оценки активности CYP2D6 с применением экзогенных и эндогенных маркеров

Абдрашитов Р.Х., Гильдеева Г.Н., Раменская Г.В., Смирнов В.В.

ГБОУ ВПО «Первый Московский Государственный Медицинский Университет им. И.М. Сеченова», г. Москва

Резюме. Приведены особенности функционирования и полиморфизма изофермента цитохрома P450 CYP2D6. Рассмотрены существующие методики определения его активности при помощи эндогенных маркеров. Представлен обзор исследований по скринингу эндогенных субстратов, подвергающихся биотрансформации преимущественно под воздействием изофермента CYP2D6. Изложены результаты по определению отношения пинолина к его метаболиту 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-бета-карболину *in vitro* на культуре клеток и *in vivo* на мышах для последующей оценки активности изофермента CYP2D6.

Ключевые слова: биотрансформация, межлекарственные взаимодействия, фенотипирование, CYP2D6, цитохром P450, пинолин, персонализированная медицина

Review of existing methodologies to assess the activity of CYP2D6 using exogenous and endogenous markers

Abdrashitov A.D., Gildeeva G.N., Ramenskaya G.V., Smirnov V.V.

First Moscow State Medical University named after I.M. Sechenov, Moscow

Abstract. Peculiarities of functioning and polymorphism of cytochrome P450 isoenzyme CYP2D6. Existing methods for determining its activity using endogenous markers. A review of studies on the screening of endogenous substrates, biotransformation mainly under the influence of isoenzyme CYP2D6. The results by determination pinoline relationship to its metabolite 6-hydroxy-1,2,3,4-tetrahydro-beta-carboline *in vitro* in cell culture and *in vivo* in mice for evaluation isoenzyme activity CYP2D6.

Keywords: biotransformation, drug interactions, phenotyping, CYP2D6, cytochrome P450, pinoline, personalized medicine

Автор, ответственный за переписку:

Абдрашитов Рустем Хамзиевич — аспирант, ГБОУ ВПО «Первый Московский Государственный Медицинский Университет им. И.М. Сеченова»; адрес: 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2; e-mail: rustixx13@gmail.com; тел.: +7 (966) 140-93-69

Введение

К межлекарственному взаимодействию проявляют большой интерес учёные, участвующие в исследованиях лекарств, а также регулирующие органы, которые отвечают за общественное здоровье. Поскольку «полипрагматизация», или применение нескольких лекарственных средств (ЛС) для лечения одного или нескольких заболеваний, стала обычной практикой, лекарственные взаимодействия стали одной из основных причин госпитализации и даже смерти. Таким образом, усилия исследователей направлены на изучение препаратов, чтобы предотвратить развитие межлекарственных взаимодействий.

Наиболее распространённым механизмом, лежащим в основе межлекарственного взаимодействия, является ингибирование, либо индуцирование активности цитохрома P450. При ингибировании активности изоферментов происходит снижение метаболизма ЛС и концентрация препарата повышается, что приводит к усилению фармакологического действия препарата и к повышению частоты возникновения нежелательных лекарственных реакций (НЛР). Индукция активности цитохрома P450 повышает метаболизм ЛС, и концентрация препарата не попадает в терапевтический диапазон.

Очевидно, что безопасность ЛС зависит от индивидуальных особенностей организма, поэтому их применение требует персонализированного подхода к каждому конкретному человеку. Подобный адресный подход, лежащий в основе персонализированной медицины, позволит не только повысить безопасность медикаментозного лечения, но и сократить расходы на коррекцию нежелательных реакций. Персональный подбор лекарств и доз достигается методами генотипирования и фенотипирования, с помощью которых становится возможно определить индивидуальные особенности пациента. С фенотипирования начинается изучения метаболизма лекарственных средств в клинике. Ряд исследований показал, что существует межиндивидуальный и внутрииндивидуальный разброс фармакокинетических параметров, который связан с различиями в характере и скорости метаболизма.

История изучения метаболизма лекарственных средств

Первые эксперименты по изучению метаболизма лекарственных препаратов (ЛП) были впервые проведены и опубликованы более 180 лет назад, сначала на

собаках в 1824 году и, затем, на людях в 1841 году [1, 2]. Данные эксперименты заложили основу современного понимания биотрансформации путём установления парадигмы, что в организме протекает ряд химических реакций с экзогенным соединением для выведения его с мочой в химически модифицированной форме. Тем не менее, исследования метаболизма были ограничены сложностью изолирования и идентификации предполагаемых метаболитов. Однако существенный прогресс в области органической химии и аналитических методов привёл к прогрессу в исследованиях фармакокинетики и метаболизма ксенобиотиков.

Первой опубликованной реакцией метаболизма была реакция конъюгации с глицином. В 1841 и 1842 году, двое учёных независимо друг от друга приняли бензойную кислоту и, по сообщению исследователей, наблюдали данный конъюгат в моче «в обильном количестве» и «без видимых вредных последствий» [2-4]. Выделенное соединение было схоже с бензойной кислотой, но при изучении строения молекулы было обнаружено, что в составе так же был азот. Идентифицировал это соединение, как гиппуровую кислоту, конъюгат глицина с бензойной кислотой, французский учёный по имени *Дессень* [5].

В ходе проведённых экспериментов было обнаружено, что выделяемые соединения гораздо менее токсичны, чем исходные соединения. К 1893 году накопилось достаточно доказательств для внедрения в научную литературу термина «детоксикация» [6, 7].

В XIX веке считалось, что вещества модифицируются организмом в крови. Но в начале XX века, сторонники теории трансформации веществ в органах смогли подтвердить свои предположения с помощью таких методов, как резекция печени, перфузия печени и почек лабораторных животных. О том, что в печени проходит реакция конъюгации с глюкуроновой кислотой стало известно благодаря методу с применением серий перфузированных органов собаки (например, печени или селезенки).

Систематизировал накопившиеся труды по изучению метаболизма в 1947 году *Welshman R.T. Williams*. Именно *Williams* предложил разделить реакции метаболизма на 2 фазы, что привело к появлению до сих пор известных терминов «I фаза» и «II фаза» [8].

В 1983 году из печени человека были выделены, идентифицированы и охарактеризованы основные компоненты цитохрома P450 [9]. Определение точной структуры метаболитов и их количественное определение стало возможным благодаря развитию методов масс-спектрометрии и ядерно-магнитного резонанса.

Несмотря на то, что направление по изучению метаболизма считают зрелым, достижения техники двигают вперёд исследования по данной тематике. Фармацевтическая индустрия стимулирует к развитию большинство направлений современных технологических разработок, в том числе высокоразвитые аналитические инструменты. Также с развитием «геномной эры» были изучены генетические основы метаболизма

ЛП среди индивидов и популяций. В будущем изучение метаболизма будет зависеть от появления и развития новых технологий.

Изоферменты цитохрома P450

В реакциях I фазы метаболизма в качестве катализаторов участвуют различные классы ферментов. Поскольку изоферменты суперсемейства цитохрома P450 широко представлены в организме, они доминируют среди других ферментов по вкладу в биотрансформацию ЛП. Подсемейства CYP1, CYP2 и CYP3 метаболизируют большинство ЛП и ксенобиотиков [10, 11]. Два важных класса ферментов локализованы в эндоплазматическом ретикулуме, рядом с цитохромом P450: флавин-содержащие монооксигеназы, которые участвуют в реакциях *N* и *S*-окисления и уридин-5-дифосфат глюкуронилтрансферазы, которые катализируют конъюгацию с уридин-5-дифосфорной глюкуроновой кислотой. В дополнение к этим семействам, существуют *N*-ацетил трансферазы, сульфотрансферазы, глутатионтрансферазы, алкоголь дегидрогеназы и альдегид дегидрогеназы. Почти все метаболические пути включают один или несколько ферментов — большинство включают цитохром P450.

Цитохром P450 является одним из наиболее важных семейств ферментов, которые участвуют в регуляции фармакологически активных, токсичных и потенциально токсичных ксенобиотиков. Ферменты цитохрома являются мембранно-связанными гемопroteинами, которые соединяются с гладким эндоплазматическим ретикулумом [12]. Известно, что субстратами цитохрома являются соединения с различными функциональными группами, которые подвергаются метаболизму путём окисления.

Цитохром P450 состоит из группы изоферментов, которые участвуют в биотрансформации широкого диапазона структурно разнообразных химических веществ, как экзогенного, так и эндогенного происхождения. Также синтез стероидных гормонов, холестерина, желчных кислот и простагландинов происходит с помощью цитохрома. Многие изоферменты были выделены и идентифицированы в печени и других тканях, включая почки, лёгкие, кишечник и мозг. Хотя эти ферменты имеют высокую степень сходства их аминокислотной последовательности, многие из них имеют различные каталитические функции [12]. Цитохром P450 имеет множество изоформ — изоферментов, которых на данный момент выделено более 1000 видов, разделённых на семейства. Однако в метаболизме лекарственных средств принимают участие ферменты семейств I, II, III. Наиболее важными для метаболизма ЛС и хорошо изученными изоферментами цитохрома P450 являются следующие: CYP1A1, CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2E1, CYP3A4.

Эта номенклатура используется не только у человека, но и у других видов. Как правило, у различных видов изоферменты имеют схожие между собой структу-

ру, функции и название, но, важно отметить, что они не идентичны человеческим формам. Даже небольшое различие в аминокислотной последовательности может повлиять на сродство к субстрату и на способность фермента метаболизировать субстрат и/или регион специфичное место молекулы. Изучая метаболизм, следует обращать внимание на стадии биотрансформации, которым подвергается субстрат, а также определять ферменты, под действием которых происходят такие трансформации. Фармакокинетические показатели, полученные в испытаниях *in vivo* на мышах или других лабораторных животных, не всегда коррелируют с показателями человека. Для прогнозирования фармакокинетики ЛП у человека нужно проводить анализ на разных видах животных, а также учитывать данные, полученные в испытаниях *in vitro* и *in silico* [12, 13].

Как семейство, несколько изоферментов вместе участвуют в окислении и биотрансформации сложных соединений. Однако, у отдельных изоферментов есть тенденция к большей селективности к субстратам с определёнными свойствами, что позволяет дифференцировать их [14, 15]. CYP1A1 часто участвует в метаболизме арильных углеводов [16]. У CYP1A1 и CYP1A2 частично совпадает сродство к субстратам; однако, CYP1A2 преимущественно метаболизирует полициклические ароматические углеводы. Как CYP1A1, так и CYP1A2 участвуют в биотрансформации проканцерогенов в канцерогены. Было показано, что CYP1A2 является основным ферментом, метаболизирующим такие ЛП, как фенацетин и теofilлин. CYP2A6 отдаёт предпочтение более мелким, нейтральным, менее липофильным молекулам, таким как кетоны и нитрозамины. CYP2C9 и CYP2C19 могут метаболизировать кислые молекулы. CYP2C9 участвует в реакциях О-деметилирования фенольных радикалов, окислении ароматических метил радикалов, радикалов, содержащих атом серы, N-деалкилировании [12]. Напротив, CYP2D6 может метаболизировать основные молекулы с атомом азота (флуоксетин, нортриптилин, декстрометорфан и буфуралол), а также катализирует реакции О-деметилирования, окисления метил радикалов и фенол О-деметилирования. CYP2E1 эффективен в биотрансформации малых молекул (этанол, ацетаминофен, галотан и паранитрофенол), а CYP3A4 — больших, липофильных молекул (симвастатин, тестостерон, циклоспорин и мидазолам) [14, 17]. Также CYP3A4 проявляет активность при N-деалкилировании, гидроксилировании ароматических систем и окислении радикалов, содержащих серу.

Из всех изоферментов наибольший интерес учёных вызывают изоферменты CYP1A2, CYP3A4, CYP2D6, так как количество ЛС, в метаболизме которых они участвуют, составляет около 80%. Оценка активности данных изоферментов играет важную роль для определения особенностей метаболизма определённого ЛС, либо комбинации ЛС.

Было обнаружено, что CYP2D6 отвечает за метабо-

лизм 20-30% лекарственных препаратов. К этим препаратам относятся трициклические антидепрессанты, селективные ингибиторы обратного захвата серотонина, антагонисты 5HT₂ рецепторов, антипсихотики, опиаты, амфетамины, а также и антагонисты β-адренорецепторов и антиаритмические средства. Интересно, что CYP2D6 локализуется не только в печени, но этот изофермент находят и в мозге, и сердце. Часто возникают межлекарственные взаимодействия, такие как ингибирование метаболизма нортриптилина и дезипрамина пароксетином, венлафаксина дифенгидрамином, метопролола гидроксиклорохином и индукция метаболизма кодеина рифампицином. Часто возникают такие НЛР, как периферическая нейропатия, лактатацидоз.

Функциональные особенности и полиморфизм изофермента CYP2D6

Среди десятков изоферментов цитохрома P450, которые участвуют в биотрансформации ксенобиотиков, изофермент CYP2D6 является одним из наиболее важных ферментов, осуществляющих метаболизм лекарственных средств. По данным различных исследований CYP2D6 участвует в метаболизме от 15 до 25% лекарств. Изофермент в основном экспрессируется в печени, но он так же локализуется в лёгких и сердце. Особенностью данного изофермента является его высокая межвидовая и внутривидовая вариабельность активности, причиной которой является генетический полиморфизм. Такой полиморфизм может приводить к 30-40 кратной разнице в клиренсе препаратов, что приводит к выходу концентрации из терапевтического окна, как по нижней, так и по верхней границе [18]. Как следствие, такие различия в активности CYP2D6 могут привести не только к серьёзным НЛР (например, при антидепрессантной терапии), но также может наблюдаться отсутствие фармакологического эффекта (например, отсутствие анальгетического эффекта опиоидных препаратов).

Основываясь на проявлениях фенотипа, генотипы можно разделить на 3 подгруппы:

1. «распространённые» (активные) метаболизаторы,
2. «медленные» метаболизаторы,
3. «сверхактивные» или «быстрые» метаболизаторы.

У людей с «медленным» метаболизмом отсутствуют функциональные аллели, у «распространённых» 1 — 2 аллели, у «быстрых» более 2 аллелей. На сегодняшний день существуют различные фармакогенетические тесты для определения генотипа пациента. Методы генотипирования получили широкое применение, поскольку были определены гены, кодирующие последовательность аминокислот основных изоферментов печени. В соответствии с этой концепцией, врачи могли выбрать среди вариантов лечения лекарства и дозировки с наибольшей эффективностью.

стью и наименьшими побочными эффектами для индивидуального пациента, которые основываются на его или её генетическом профиле. Однако текущий функциональный статус пациента (т.е. фенотип) может быть более значимым, чем его/её генотип. Таким образом, применение персонализированной медицины требует понимания и рассмотрения вовлечения соответствующих негенетических факторов (включая окружающую среду и персональную изменчивость) в дополнение к генетическим факторам.

В настоящее время, исследователи всё чаще отмечают такое явление, как модификационная (фенотипическая) изменчивость. При модификационной изменчивости происходит изменение клинического ответа на ЛС под действие факторов окружающей среды, либо при сопутствующем приёме лекарств, которые являются субстратами (ингибиторами, индукторами) соответствующих изоферментов. Генотип при этом не меняется.

Крупномасштабное исследование по оценке модификационной изменчивости с выборкой из 900 пациентов, которых лечили от депрессии, провели *Sheldon H. Preskorn* и его коллеги [19]. На первом этапе исследования по результатам тестов генотипирования, пациенты были классифицированы на генотипы «медленных» метаболизаторов (35/900 или 3,9%), «не медленных» (т.е. «распространённых», «быстрых» и «ультрабыстрых») метаболизаторов (865/900 или 96,1%). На втором этапе, после определения фенотипа пациентов, было получено, что к «медленным» метаболизаторам относится 243/900 или 27% пациентов, а к «не медленным» 657/900 или 67%. Таким образом, модификационная изменчивость до фенотипа «медленного» метаболизатора наблюдалась у 23% пациентов, обладающих генотипом «не медленного» метаболизатора. Эти результаты показывают, что методы генотипирования в клинической практике значительно недооценивают активность метаболизма у пациентов, которым назначают несколько препаратов. Они подчёркивают важное ограничение генотипирования: генотипирование устанавливает генетический потенциал индивида, но не обязательно функциональные возможности в любой момент времени.

Индивидуальная активность изоферментов при отсутствии ингибиторов или индукторов стабильна в течение жизни. Но на активность изоферментов постоянно меняется под действием различных препаратов, таких как хинидин, рифампицин, оральные контрацептивы, а также алкоголь, курение, инфекции, еда. Таким образом, для определения точной картины ферментной активности и для подбора адекватной дозы препарата нужно оценивать текущую активность изофермента цитохрома. Такую оценку позволяют определить методы фенотипирования, которые основаны на определении концентрации субстратов и их метаболитов.

Определение активности изоферментов цитохрома P450

В основе оценки активности изоферментов цитохрома P450, для последующего определения индивидуального клинического ответа на приём ЛС, лежат методы генотипирования и фенотипирования. Субстратная специфичность определённых ферментов метаболизма ЛС позволила разработать методы их фенотипирования. Активность того или иного фермента метаболизма определяется по фармакокинетике его специфического субстрата, называемого «маркерным» субстратом, путём измерения его концентрации и концентрации его метаболита в плазме крови или в моче [20]. На основании этих данных рассчитывается так называемый «метаболический» индекс, равный отношению концентрации ЛС к концентрации его метаболита.

Методы фенотипирования позволяют определять концентрацию ЛС в динамике, что является важным для того, чтобы установить на какой стадии произошло отклонение концентрации (на стадии всасывания или метаболизма). Также данные методы используются и в хронофармакологии для определения степени изменения фармакологического эффекта после приёма лекарственного препарата в различное время суток. При разработке оригинальных ЛС и их клинических испытаний, оценка активности изоферментов применяется для определения фармакокинетике препарата, а при разработке дженериковых ЛС методы фенотипирования позволяют оценить биоэквивалентность к оригинальной формуле.

В зависимости от субстрата методы определения активности изоферментов можно разделить на две группы: инвазивные и неинвазивные.

В инвазивных методах ЛС, являющееся маркерным субстратом, вводится перорально или внутривенно далее через определённое время в крови или сыворотке определяют концентрацию метаболита маркерного субстрата, а в некоторых случаях — и самого ЛС.

Инвазивные методы определения активности изофермента CYP3A4 имеют ряд неизбежных выраженных недостатков. В качестве примеров можно привести необходимость внутривенного введения препаратов, применение которых сопряжено с риском развития НЛР, прежде всего — аллергических реакций и аритмогенных эффектов; необходимость, как минимум, двукратного забора крови из вены; тестирование может проводиться только в условиях лечебно-профилактического учреждения. В некоторых случаях методы могут обладать недостаточной специфичностью. Например, в настоящее время известно, что MEGX может образовываться из лидокаина под влиянием не только CYP3A4, но и в незначительных количествах CYP1A2, а значит, данный тест отражает суммарную активность этих 2-х изоферментов цитохрома P450 [20].

При помощи скрининга определяются специфические субстраты, которые могут быть экзогенной или эн-

догенной природы. Большое распространение получили методики, основанные на экзогенных «маркерных» субстратах, таких как кофеин для CYP1A2, диклофенак для CYP2C9, декстрометорфан для CYP2D6, лидокаин для CYP3A4. Однако применение таких методик может привести к развитию у пациентов НЛР, таких как аллергические реакции и аритмогенные эффекты. Методики по определению эндогенных веществ и их метаболитов являются более перспективными, так как позволяют оценить активность изоферментов без введения пациенту специфических «маркеров». Данные методики являются на 100% безопасными. Одна из таких методик по определению кортизола и 6- α -гидрокортизола в моче с целью оценки активности CYP3A4 внедрена и успешно используется в Филиале «Клиническая фармакология» НЦ БМТ РАМН и Институте Клинической Фармакологии ФГУ «НЦ ЭСМП» [21] (табл. 1).

Количественное определение дебризохина и спартеина

Дебризохин и спартеин были первыми субстратами, с помощью которых стало возможным оценить большие различия в окислительном полиморфизме CYP2D6. Дебризохин применялся для лечения повышенного кровяного давления, а спартеин как антиаритмическое средство. Эти соединения используются для фенотипирования с 1970-х годов, и их «метаболические» индексы показали высокую степень корреляции. Метаболитом дебризохина является 4-гидроксидебризохин, который количественно определяется в моче [31]. Оптимальная средняя доза, которая применяется для фенотипирования составляет 10 мг. Преимуществом применения дебризохина является высокое значение pK_a и полярность, благодаря которым pH мочи сильно не влияет на «метаболический» индекс [32]. Недостаток заключается в том, что в биотрансформации дебризохина участвует не только CYP2D6, но и CYP1A1. Тем не менее, CYP1A1 обеспечивает не более 2% метаболизма дебризохина [22]. Также, весомым недостатком является снижение артериального давления при использовании дебризохина. Ещё стоит отметить, что на территории Российской Федерации препараты дебризохина не зарегистрированы.

Метаболит спартеина 2-дегидроспартеин и 5-дегидроспартеин также обнаруживается в моче. Под

действием CYP2D6 спартеин биотрансформируется до неустойчивого N1-оксида, который в дальнейшем распадается на 2- и 5-дегидроспартеин [23]. Доза в 100 мг при фенотипировании соответствует только 10% от рекомендованной для антиаритмической терапии, так что никакого фармакологического эффекта не наблюдается. Также нет ограничений для применения спартеина у пациентов с почечной недостаточностью, так как не образуются глюкуроновые формы и «метаболический» индекс спартеин/дегидроспартеин остаётся неизменным с низкой почечной функцией [33]. При проведении фенотипирования с применением спартеина могут возникнуть НЛР в виде аллергии. Данный препарат также не зарегистрирован на территории РФ.

Количественное определение трамадола

Анальгетическое действие трамадола главным образом обусловлено его метаболитом M1 (моно-О-дезметилтрамадол), у которого сродство к μ -рецептору в 200 раз выше, чем у самого препарата [25]. Известно, что M1 образуется благодаря изоферменту CYP2D6. Например, при применении трамадола с пароксетином (ингибитор CYP2D6) наблюдается уменьшение анальгетического действия, так как активность изофермента снижена [29].

При изучении фармакокинетики трамадола путём сравнения «метаболических» индексов трамадола/M1 к декстрометорфану/декстрорфану наблюдалась слабая корреляция [24]. В дальнейшем исследовании было обнаружено, что в метаболизме трамадола помимо изофермента CYP2D6, также участвуют CYP2B6 и CYP2C19, и для достижения хороших результатов увеличивают дозу, что приводит к более частому проявлению НЛР [26]. Трамадол относится к наркотическим ЛП, что также затрудняет применение его в анализах. Таким образом, применение трамадола в фенотипировании ограничено.

Количественное определение метопролола

Основными путями метаболизма метопролола являются О-деметилирование, α -гидроксилирование и N-деалкилирование. Для фенотипирования CYP2D6 достаточно 100 мг, около 70-80% метаболизма приходится на α -гидроксилирование и небольшой процент на О-деметилирование [34]. Различными исследованиями доказано, что α -гидроксилирование происходит

Существующие методики определения активности CYP2D6

Таблица 1

Субстрат	Метаболит	Доза, мг	Биообъект	Метод	Исследования
Дебризохина	4-гидроксидебризохин	10	Моча	ВЭЖХ, УФ детектор	[22, 14]
Спартеин	2-дегидроспартеин, 5-дегидроспартеин	100	Моча	ВЭЖХ, УФ детектор	[23, 24]
Трамадол	моно-О-дезметилтрамадол (M1)	50	Моча	ВЭЖХ, УФ детектор	[24, 25, 26]
Метопролол	α -гидроксиметопролол	100	Кровь	ВЭЖХ, УФ детектор	[27, 28]
Декстрометорфан	Декстрофан	30	Кровь, моча, слюна	ВЭЖХ, УФ детектор	[28, 29, 30]

только за счёт CYP2D6, в то время как в О-деметилировании могут участвовать и другие изоферменты.

При определении в моче отношения метопролола к α -гидроксиметопрололу наблюдается корреляция между рН и «метаболическим» индексом [27]. Таким образом, фенотипирование с метопрололом в моче неубедительно.

Следующее исследование, в котором после приёма декстрометорфана (22 мг) или метопролола (100 мг) с дальнейшим отбором крови в течение 8 часов, показало хорошую корреляцию между индексом метопролол/ α -гидроксиметопролол и декстрометорфан/декстрофан.

В целях фенотипирования метопролол может применяться только при определении в плазме крови. Также недостатком этого метода является то, что метопролол снижает артериальное давление.

Количественное определение декстрометорфана

Декстрометорфан является антагонистом опиоидных рецепторов, применяется в качестве противокашлевого и обезболивающего препарата. Благодаря своей безопасности, средним НЛР, декстрометорфан хорошо изучен в качестве маркера для определения активности CYP2D6. К сожалению, в государственном реестре лекарственных средств РФ декстрометорфан представлен только в комбинации с другими лекарственными веществами, следовательно, в нашей стране декстрометорфан недоступен.

Декстрометорфан преимущественно метаболизируется при участии цитохрома CYP2D6 в декстрофан путём О-деметилирования [32]. Другие изоферменты, такие как CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7, CYP2C9, CYP2C19, катализируют превращение декстрометорфана в неактивный 3-метоксиморфинан. Декстрофан и 3-метоксиморфинан деметируются в гидроксиморфинан. Все образующиеся метаболиты экскретируются с мочой, в основном в виде глюкуронидов.

На сегодняшний день разработано много методик по определению активности, используя в качестве пробы декстрометорфан, при этом в качестве пробы можно отбирать различные биологические жидкости: мочу, кровь и слюну [30]. Такие методики имеют множество достоинств по сравнению с рассмотренными выше, но поскольку методики инвазивные, могут развиваться НЛР, а также стоит учитывать индивидуальную переносимость препарата.

Определение активности CYP2D6 по отношению пинолин/6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-бета-карболин(6-НО-ТНВС)

Для фенотипирования изофермента CYP2D6 были разработаны и валидированы различные методики. Оригинальные тесты с дебризохином и спар-

теином постепенно заменились клинически более надёжными тестами с декстрометорфаном и метопрололом. Затем соперничество между методами фенотипирования отошло на второй план, так как стали быстро внедряться методы генотипирования, основанные на ДНК. Несмотря на развитие ПЦР за последние десять лет, остаётся проблема прогнозирования фенотипа CYP2D6 из методов генотипирования, основанных на ДНК. Современные методы фенотипирования по определению экзогенных «маркеров» могут приводить к развитию НЛР. Также нужно учитывать, что на территории РФ из всех возможных субстратов зарегистрированы только два ЛП: трамадол и метопролол. Возможно, что поиск эндогенных субстратов для CYP2D6 будет интересен не только для расширения знаний о работе изоферментов цитохрома, но и обретёт и практическое значение для новой методики фенотипирования, которой не будут присущи недостатки ранее разработанных методик.

Скрининг эндогенных субстратов CYP2D6

Проводится много исследований по поиску эндогенных веществ, которые метаболизируются только одним изоферментом. Широкое исследование провел *Ai-Ming Yu* с коллегами по поиску эндогенных веществ, специфичных изоферменту CYP2D6 [35]. В своём исследовании учёные рассмотрели ряд эндогенных веществ потенциально являющиеся специфическими субстратами для CYP2D6. Было установлено, что изофермент CYP2D6 не значительно метаболизирует эндогенные фенилэтиламины (2-фенилэтиламин, октопамин, синефрин, метанефрин и норметанефрин), индолэтиламины (триптамин, серотонин, 6-метокситриптамин и мелатонин) и β -карболины (гарман, норгарман и триптолин). Однако, индолметиламин 5-метокси-N,N-диметилтриптамин (5-MDMT) и пинолин (6-метокси-1,2,3,4-тетрагидро- β -карболин) показали относительно высокое сродство к CYP2D6 и О-деметилировались только под действием CYP2D6. При добавлении к исходным веществам моноклональных антител против CYP2D6, О-деметилирование 5-MDMT и пинолина не наблюдалось. Специфичность пинолина по отношению к CYP2D6 около 99% относительно других изоферментов цитохрома P450.

Пинолин подвергается О-деметилированию с образованием метаболита 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро- β -карболина (рис. 1).

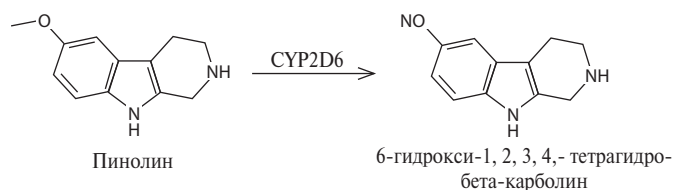


Рис. 1. Метаболизм пинолина посредством изофермента CYP2D6

Существующие методики определения пинолина

Определение *in vitro*. Как сообщалось ранее, эндогенное вещество пинолин подвергается О-деметилированию микросомами печени и его биотрансформация преимущественно катализируется изоферментом цитохрома P450 CYP2D6. Исследователи отделения фармацевтических наук университета в Баффало (штат Нью-Йорк, США) изучили, как влияет статус изофермента CYP2D6 на О-деметилирование пинолина и оценили, может ли пинолин применяться для определения активности CYP2D6. Также исследовали функциональные различия между аллельными изоформами CYP2D6.1, CYP2D6.2, CYP2D6.10. Затем проводились исследования кинетики, ингибирования и корреляции для определения роли CYP2D6 в биотрансформации пинолина.

Инкубация аллельных изоформ CYP2D6 и человеческих печёночных микросом проводилась в 0,1 М фосфатном буфере, pH 7,4, 37°C [35, 36, 37]. В среду вносили микросомальные протеины в концентрации 0,25 мг/мл, 0,2 мМ P450 редуктазу и 10 мкг L-α-дилаурилфосфатидилхолин. Активация реакции производилась при добавлении никотинамидадениндинуклеотид фосфата. Кинетика определялась по добавлению пинолина в концентрации от 0,2 до 20 мМ для изоформ и от 0,05 до 100 мМ для человеческих печёночных микросом. Время инкубации составило 5 минут для CYP2D6.1 и CYP2D6.2, 15 минут для CYP2D6.10 и 10 минут для человеческих печёночных микросом. В качестве ингибитора использовали хинидин в концентрации 1 мМ.

Количественное определение проводили методом ВЭЖХ. Хроматографические условия были следующие:

- хроматограф Agilent 1100 series
- колонка Zorbax фенил, 5 мкм, 250 мм X 4,6 мм
- подвижная фаза 50 мМ аммоний фосфатный буфер (pH = 3): ацетонитрил (95/5 об/об)
- детектор ДМД (214, 254, 280 нм)
- температура колонки 40°C

Исследования показали, что аллельная изоформа CYP2D6.10 (изоформа со сниженной функцией) не активна по отношению к пинолину. В то время, как под действием CYP2D6.1 и CYP2D6.2 (изоформы с нормальной функцией) происходило образование 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболина. По сравнению с CYP2D6.1, у изоформы CYP2D6.2 ката-

литическая активность ниже [38]. Затем, при добавлении ингибитора CYP2D6 хинидина наблюдали полную блокировку О-деметилирования пинолина, что указывает на селективность изофермента к субстрату.

Определение *in vivo*. Дальнейшее исследование *in vivo* на мышах проводилось с целью подтверждения результатов *in vitro* и, чтобы сравнить активность изофермента CYP2D6 у мышей дикого типа и Tg-CYP2D6.

Для анализа были выбраны взрослые мыши (7 недель) дикого типа и Tg-CYP2D6, средний вес 22-25 г. Пинолин вводился интраперитонеально в дозе около 750 мкг. В качестве пробы отбиралась моча через 24 ч после введения пинолина.

Количественное определение проводилось методом LC-MS/MS. Хроматографические условия были следующие:

- Shimadzu prominence HPLC system
- детектор API 3000 turbo ion spray ionization triple-quadrupole mass spectrometer
- Luna фенил-гексил (50 X 4,6 мм, 3 мкм)
- подвижная фаза буфер А (водный раствор муравьиной кислоты 0,02%) буфер В (метанольный раствор муравьиной кислоты 0,02%). Хроматографирование проходило в градиентном режиме с повышением соотношения буфера В от 5 до 80% до 9 минуты, затем устанавливался изократический режим на 2 минуты (буфер В 80%) и с 11,5 до 15 минуты концентрация буфера В устанавливалась на 5%
- скорость потока 0,3 мл/мин

Анализ подтвердил результаты *in vitro* испытания. По результатам был сделан вывод, что у мышей О-деметилирование проходит под действием CYP2D6. Около 99% метаболита пинолина выводится из организма с мочой, следовательно, в качестве пробы можно использовать этот биообъект [38]. У мышей дикого типа активность CYP2D6 была выше, чем у Tg-CYP2D6 (табл. 2).

Определение пинолина *in vitro* и *in vivo*. Логичным продолжением рассмотренного исследования будет изучение по определению эндогенного пинолина в моче у человека для оценки активности изофермента цитохрома P450 CYP2D6. У такой методики определения активности CYP2D6 не будет недостатков, присущих методикам с применением экзогенных веществ, которые могут оказывать гипотензивное, антиаритмическое действия, а также могут вызывать аллергические реакции [38].

Активность CYP2D6

Таблица 2

		Подтип генотипа	Активность изофермента
In vitro	Человеческие печёночные микросомы	«распространённые» метаболиты	Средняя
	Аллельные изоформы: CYP2D6.1 CYP2D6.2 CYP2D6.10	«распространённые» метаболиты «медленные» метаболиты	Средняя Ниже среднего Нет
In vivo	Мыши дикого типа	«распространённые» метаболиты	Средняя
	Мыши Tg-CYP2D6	«медленные» метаболиты	Низкая

Литература

1. Wöhler F. // Tiedemann's Z. Physiol. — 1824. — № 1. — 142 p.
2. Ure A. On gouty concretions with a new method of treatment. // Pharm. J. Trans. — 1841. — № 1. — 24 p.
3. Keller W. On the conversion of benzoic acid into hippuric acid. // Ann. Chem. Pharm. — 1842. — № 43. — P. 108.
4. Conti A., Bickel M.H. History of drug metabolism: discoveries of the major pathways in the 19th century. // Drug Metab. Rev. — 1977. — № 6(1). — P. 1-50.
5. Dessaignes V. // C. R. Acad. Sci. — 1845. — № 21. — 1224 p.
6. Neumeister R. Lehrbuch der physiologischen Chemiemit Berücksichtigung der pathologischen Verhältnisse. // Gustav Fischer. — 1893. — № 2. — 346 p.
7. Bachmann C., Bickel M.H. History of drug metabolism: the first half of the 20th century. // Drug Metab. Rev. — 1985. — № 16(3). — P. 185-253.
8. Caldwell J. Drug metabolism and pharmacogenetics: the British contribution to fields of international significance. // Br. J. Pharmacol. — 2006. — № 147. — P. 89-99.
9. Wang P.P. et al. Purification and characterization of six cytochrome P — 450 isozymes from human liver microsomes. // Biochemistry. — 1983. — № 22. — P. 5375-5383.
10. Rendic S., Di Carlo F.J. Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors. // Drug Metab. Rev. — 1997. — № 29. — P. 413-580.
11. Guengerich F.P. Cytochromes P450, drugs, and diseases. // Mol. Interv. — 2003. — № 3. — P. 194-204.
12. Sheridan R.P. et al. Empirical regioselectivity models for human cytochromes P450 3A4, 2D6, and 2C9. // J. Med. Chem. — 2007. — № 50(14). — P. 3173-3184.
13. Terfloth L., Bienfait B., Gasteiger J. Ligand — based models for the isoform specificity of cytochrome P450 3A4, 2D6, and 2C9 substrates. // J. Chem. Inf. Model. — 2007. — № 47. — P. 1688-1701.
14. Granvil C.P. et al. 4-Hydroxylation of debrisoquine by human CYP1A1 and its inhibition by quinidine and quinine. // J. Pharmacol. Exp. Ther. — 2002. — № 301. — P. 1025-1032.
15. Popa-Burke I.G. et al. Streamlined system for purifying and quantifying a diverse library of compounds and the effect of compound concentration measurements on the accurate interpretation of biological assay results. // Anal. Chem. — 2004. — № 76(24). — P. 7278-7287.
16. Drahusuk A.T. et al. Detection of CYP1A1 protein in human liver and induction by TCDD in precision — cut liver slices incubated in dynamic organ culture. // Carcinogenesis. — 1998. — № 19. — P. 1361-1368.
17. Guengerich F.P. et al. Diversity in the oxidation of substrates by cytochrome P450 2D6: lack of an obligatory role of aspartate 301 — substrate electrostatic bonding. // Biochemistry. — 2002. — № 41. — P. 11025-11034.
18. Кулес В.Г., Сычев Д.А., Шух Е.В. Изучение биотрансформации лекарственных средств — путь к повышению эффективности и безопасности фармакотерапии. // Врач. — 2007. — № 1. — С. 6-8.
19. Sheldon H.P. et al. Cytochrome P450 2D6 Phenocopy Is Common in Patients Being Treated for Depression: Implications for Personalized Medicine. // J. Clin. Psychiatry. — 2013. — № 74(6). — P. 614-621.
20. Кулес В.Г. Метаболизм лекарственных средств: клинико-фармакологические аспекты. — М.: Издательство «Реафарм», 2004. — 144 с.
21. Смирнов В.В., Савченко А.Ю., Раменская Г.В. Разработка и валидация методики количественного определения эндогенного кортизола и 6-β-гидроксикортизола в моче с целью определения активности изофермента CYP 3A4. // Биомедицина. — 2010. — № 4. — С. 56-60.
22. Distlerath L.M., Guengerich F.P. Characterization of a human liver cytochrome P-450 involved in the oxidation of debrisoquine and other drugs by using antibodies raised to the analogous rat enzyme. // Proc. Natl. Acad. Sci. — 1984. — № 81. — P. 7348-7352.
23. Griese E.U. et al. Assessment of the predictive power of genotypes for the in-vivo catalytic function of CYP2D6 in a German population. // Pharmacogenetics. — 1998. — № 8. — P. 15-26.
24. Pedersen R.S., Damkier P., Brosen K. Tramadol as a new probe for cytochrome P450 2D6 phenotyping: a population study. // Clin. Pharmacol. Ther. — 2005. — № 77. — P. 458-467.
25. Poulsen L. et al. The hypoalgesic effect of tramadol in relation to CYP2D6. // Clin. Pharmacol. Ther. — 1996. — № 60. — P. 636-644.
26. Subrahmanyam V. et al. Identification of cytochrome P-450 isoforms responsible for cis-tramadol metabolism in human liver microsomes. // Drug Metab. Dispos. — 2001. — № 29. — P. 1146-1155.
27. Kim M. et al. Inhibition of the enantio selective oxidative metabolism of metoprolol by verapamil in human liver microsomes. // Drug Metab. Dispos. — 1993. — № 21. — P. 309-317.
28. Labbe L. et al. Effect of gender, sex hormones, time variables and physiological urinary pH on apparent CYP2D6 activity as assessed by metabolic ratios of marker substrates. // Pharmacogenetics. — 2000. — № 10. — P. 425-438.
29. Tegeder I., Lotsch J., Geisslinger G. Pharmacokinetics of opioids in liver disease. // Clin. Pharmacokinet. — 1999. — № 37. — P. 17-40.
30. von Moltke L.L. et al. Multiple human cytochromes contribute to biotransformation of dextromethorphan in-vitro: role of CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, and CYP3A. // J. Pharm. Pharmacol. — 1998. — № 50. — P. 997-1004.
31. Dayer P. et al. Bioactivation of the narcotic drug codeine in human liver is mediated by the polymorphic monooxygenase catalyzing debrisoquine 4-hydroxylation (cytochrome P-450 db1/bu1). // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 1988. — № 152. — P. 411-416.
32. Chainuvati S. et al. Combined phenotypic assessment of cytochrome p4501A2, 2C9, 2C19, 2D6, and 3A, N-acetyltransferase-2, and xanthine oxidase activities with the "Cooperstown 5+1 cocktail". // Clin. Pharmacol. Ther. — 2003. — № 74. — P. 437-447.
33. Schellens J.H. et al. Lack of pharmacokinetic interaction between nifedipine, sparteine and phenytoin in man. // Br. J. Clin. Pharmacol. — 1991. — № 31. — P. 175-178.
34. Cerqueira P.M. et al. Influence of chronic renal failure on stereo selective metoprolol metabolism in hypertensive patients. // J. Clin. Pharmacol. — 2005. — № 45. — P. 1422-1433.
35. Yu A. et al. Screening for endogenous substrates reveals that CYP2D6 is a 5-methoxyindolethylamine O-demethylase. // Pharmacogenetics. — 2003. — № 13. — P. 307-319.
36. Felmlee M.A. et al. Cytochrome P450 expression and regulation in CYP3A4/CYP2D6 double transgenic humanized mice. // Drug Metab. Dispos. — 2008. — № 36. — P. 435-444.
37. Zhang W.Y. et al. Expression and functional analysis of CYP2D6.24, CYP2D6.26, CYP2D6.27 and CYP2D7 isozymes. // Drug Metab. Dispos. — 2009. — № 37. — P. 1-4.
38. Jiang X.L., Shen H.W., Yu A.M. Pinoline May be Used as a Probe for CYP2D6 Activity. // Drug Metabolism and Disposition. — 2013. — № 37(3). — P. 443-446.

Биосимиляры — препараты будущего

Ельцова Е.А., Раменская Г.В., Смолярчук Е.А., Бушманова А.В.

ГБОУ ВПО «Первый Московский Государственный Медицинский Университет им. И.М. Сеченова»,
г. Москва

Резюме. В статье изложены основные термины и определения, относящиеся к биосимилярам, дженерикам и оригинальным препаратам. Также описана краткая история возникновения и развития биотехнологической промышленности и препаратов, полученных с помощью биообъектов. Приведены основные различия между биосимилярами и дженериками, а также их отличия от инновационных лекарственных препаратов. Рассмотрен процесс биотехнологического производства и основные области применения биосимиляров. Проанализирована нормативно-правовая база Российской Федерации и Европейского Союза.

Ключевые слова: биосимиляр, биотехнология, биоаналог, подобный биологический лекарственный продукт, дженерики

Biosimilars — drugs of the future

Eltcova E.A., Ramenskaya G.V., Smolyarchuk E.A., Bushmanova A.V.

First Moscow State Medical University named after I.M. Sechenov, Moscow

Abstract. The article describes the basic terms and definitions relating to biosimilars, generics and original drugs. Also described a brief history of the origin and development of the biotechnology industry and drugs produced using biological objects. The main difference between biosimilars and generics, as well as their differences to innovative medicines. The process of biotechnological production, and main applications of biosimilars. It analyzed the legal framework of the Russian Federation and the European Union.

Keywords: biosimilar, biotechnology, bioanalogue, similar biological medicinal product, generic

Автор, ответственный за переписку:

Ельцова Е.А. — ГБОУ ВПО «Первый Московский Государственный Медицинский Университет им. И.М. Сеченова»; адрес: 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

Введение

Биотехнология — стремительно развивающаяся отрасль современного естествознания, которая находит всё большее применение в различных сферах деятельности, и особенно в медицине. Всё активнее разрабатываются и внедряются в медицинскую практику новые биофармацевтики — лекарственные средства, полученные с помощью современных биотехнологий [1].

Биосимиляры — это аналоги биофармацевтических лекарственных средств, с близкой, но не идентичной исходной молекулой. Они представляют собой современные лекарственные препараты на основе белков, полученных путём биологического синтеза в клетках дрожжей и бактерий [4]. На биотехнологические препараты сейчас возлагают основные надежды как на средства борьбы с наиболее опасными инфекционными заболеваниями современности (рак, рассеянный склероз, болезнь Альцгеймера, болезни накопления и др.) [19].

Термины и определения

Воспроизведённые биологические лекарственные средства сегодня чаще всего называют биосимилярами (biosimilars). Этот термин возник в результате сокращения довольно длинного словосочетания, которым именуют эту категорию официальные документы («similar biological medicinal product»). Впервые понятие «аналогичный биологический лекарственный

продукт» было использовано в Директиве 2003/63/ЕС (ч.2, абз.4), дополнившей Директиву Европарламента и Евросоюза 2001/83/ЕС (Европейский фармацевтический кодекс) [20].

Под термином биосимиляр понимают полученное с помощью биотехнологий воспроизведённое лекарственное средство (ЛС), которое может быть разрешено к медицинскому применению после истечения срока действия патента на оригинальное активное вещество [3].

Иногда эту категорию лекарственных препаратов называют также «биодженериками».

Однако это вряд ли верно, поскольку действующее вещество воспроизведённого биотехнологического препарата, в отличие от «классических» дженериков, не полностью идентично оригинальному веществу. Причиной неполной идентичности являются различные организмы, с помощью которых синтезируется целевой протеин, а также другие методы получения, очистки или иные способы гликозилирования. Всё это влияет на фармакокинетику и иммуногенность.

С точки зрения регуляторных органов, в частности FDA (Food and Drug Administration) и EMA (European Medicines Agency, ранее EMEA), эти препараты следует называть аналогами биотехнологических ЛС или биоаналогами (biosimilars) [4].

В последнее время часто употребляется также термин Follow-on-Biologicals. Под ним понимают действительно новые, собственные разработки производителей по известным прототипам [4].

Дженерики, химически воспроизведённые ЛС, являются по существу *аналогичными* лекарственными препаратами. В отношении же биотехнологически воспроизведённых ЛС используется термин «*подобный биологический лекарственный продукт*». Хотя такого понятия («биосимиляр», «биоподобный лекарственный препарат») в российском законодательстве не закреплено.

Развитие биотехнологических препаратов

Биотехнологические лекарственные препараты получают с помощью биообъектов, которые чаще всего представлены микроорганизмами и ферментами (также это могут быть растения) [17].

Своё развитие они начали в 1940 году, когда английский бактериолог *Хоуард У. Флори* и биохимики *Э. Чейн* работали над выделением и промышленным производством пенициллина.

Спустя почти 75 лет биотехнологические лекарственные препараты занимают большую часть рынка. В 2001 г. на долю биопрепаратов приходилось только 7% общего объёма продаж TOP-10 самых продаваемых препаратов. В 2012 г. этот показатель составил уже 71% [4].

Перспективы, которые открываются благодаря биотехнологии, объясняют такие темпы развития.

Преимуществами биотехнологического производства являются возможность получения специфических соединений, которые не удаётся создать с помощью химического синтеза, проведение биотехнологических процессов в мягких условиях (при относительно невысоких температурах и давлениях), экологичность (т.к. близки к естественным процессам, а также возможность использовать в качестве сырья отходы сельского хозяйства). Микроорганизмы, как биообъекты, имеют большую скорость роста, что позволяет синтезировать целевой продукт в больших количествах. При этом в настоящее время истекает срок патентной защиты многих биотехнологических препаратов, что и способствует производству биосимиляров [1].

Основные отличия биосимиляров и дженериков

Воспроизведённое лекарственное средство (дженерик) — это лекарственное средство, содержащее такую же фармацевтическую субстанцию или комбинацию

таких же фармацевтических субстанций в такой же лекарственной форме, что и оригинальное лекарственное средство, и поступившее в обращение после поступления в обращение оригинального лекарственного средства [2].

Таким образом, дженерик — это ЛС, *аналогичное* оригинальному препарату, полученное с помощью химического синтеза. Для того, чтобы он был терапевтически эквивалентен запатентованному ЛС, необходимо лишь доказать идентичность химической формулы одного или нескольких действующих веществ и провести фармакокинетические исследования.

Поскольку нет необходимости проводить клинические исследования, дженерики ниже по стоимости и быстрее выводятся на рынок.

Ситуация же с биосимилярами совершенно другая. Они представляют собой сложные пептидные молекулы, чаще всего синтезируемые микроорганизмами, с массой от десятков до сотен кД. Белок может быть первичной, вторичной, третичной и четвертичной структуры, которая наиболее подвержена изменениям при незначительных модификациях технологического процесса. В отличие от химических молекул, взаимодействия внутри молекулы белка прогнозировать очень сложно [18].

Белковая природа молекулы также является причиной её нестабильности: свойства препарата могут меняться под воздействием различных факторов (температура, давление, кислород, влияние вспомогательных веществ и упаковки).

Биотехнологическое производство

Биотехнологическое производство представляет собой многоэтапный и сложный процесс, схему которого можно представить в следующем виде: выделение необходимого участка ДНК, введение его в вектор, встраивание вектора в клетку-хозяина, скрининг и отбор рекомбинантных клеток для создания банка клеток, культивирование и получение целевого продукта, выделение и очистка, создание лекарственной формы [11].

По определению ЕМА, биопрепараты — это лекарственные средства, произведённые путём биотехнологических процессов с применением технологии рекомбинантной ДНК; метода контролируемой экспрессии генов, кодирующих выработку биологически активных белков,

Сравнение дженериков, биосимиляров и инновационных биотехнологических продуктов [4]

Таблица 1

Параметр сравнения	Инновационный биотехнологический препарат	Биосимиляр	Дженерик
Производство	• Синтезируются в специализированных клеточных линиях • Чувствительны к изменениям производственного процесса — используется дорогое и специализированное оборудование • Трудно установить воспроизводимость		• Получают путём химического синтеза • Менее чувствительны к изменениям производственного процесса • Воспроизводимость легко установить
Клинические исследования	• Обширные клинические исследования, включая фазы I-III • Требуется постоянный фармаконадзор и периодические обновления данных по безопасности		• Часто только фаза I исследований • Упрощённая процедура регистрации
Регуляторные аспекты	На данный момент не предназначены для «автоматической» замены	«Автоматическая» замена запрещена	• Требуется доказательство биоэквивалентности • «Автоматическая» замена разрешена

методом гибрид и моноклональных антител [10]. Большинство протеинов подвергаются посттрансляционной модификации. Например, путём сплайсинга, повторов, замен аминокислот, олигомеризации, а также присоединения различных групп (гликозилирование, сульфатирование, фосфорилирование). Эти процессы определяют как биологическую активность белка, так и микрогетерогенность [12].

Живые клеточные системы подвержены также и естественным изменениям, вследствие чего нельзя получить идентичный биотехнологический препарат. Можно произвести лишь подобный препарат, что и закреплено в терминологии — биосимиляр, биоаналог, биоподобный препарат, follow-on protein products («препарат, подобный белковым лекарственным средствам»). Поэтому безопасность и эффективность этих продуктов будет сильно зависеть от надёжности контроля качества [16, 21].

Система разработки и производства биосимиляров направлена на обеспечение эквивалентности референтному продукту. Для этого необходимо разрабатывать такие технологии, в результате которых различия будут не более значительны, чем после изменений производственных процессов оригинального продукта.

Области применения биосимиляров

К биотехнологическим препаратам относятся гормоны, цитокины, факторы свертывания крови, моноклональные антитела, ферменты, колониестимулирующие факторы, вакцины, антибиотики и препараты, созданные на базе клеток и тканей. Они используются при анемиях, лейкозах, нейтропениях, при онкологии и в трансплантологии, при сахарном диабете, задержке роста, тромбозах и инфекциях. Производство лекарственных препаратов на основе моноклональных антител занимает второе место после вакцин, 80% из которых используется в онкологии.

Нормативно-правовая база

Европейское медицинское агентство по лекарственным средствам (ЕМА) является ведущим регуляторным органом по разработке нормативных актов касательно биотехнологических лекарственных препаратов: Директива 2003/63/ЕС, Директива 2004/27/ЕС [21], Руководство по подобным биологическим лекарственным продуктам 2005 г. В данных документах отражены общие понятия и положения по регулированию обращения биосимиляров. Также есть руководства по проведению доклинических и клинических исследований, контролю качества, оценке иммуногенности и приложения по вопросам доклинических и клинических исследований для отдельных классов биосимиляров для:

- соматропина [7];
- инсулина [9];
- гранулоцитарного колониестимулирующего фактора [5];

- эритропоэтина [6];
- моноклональных антител [14];
- низкомолекулярных гепаринов [13];
- интерферонов альфа [15].

Анализ сопоставимости должен показывать, что биосимиляры полностью идентичны по эффективности, безопасности и качеству оригинальному биотехнологическому препарату. Но даже при полном соблюдении технологии производства клиническая эффективность биосимиляров может отличаться даже от серии к серии. Поэтому при их регистрации требуется проведение клинических исследований.

Однако и после регистрации необходимо также следить за безопасностью биосимиляра, т.к. временные рамки клинических исследований не позволяют полностью выявить ряд побочных явлений и иммуногенность препарата. Так, при длительном применении рекомбинантных препаратов в организме пациентов вырабатываются антитела, которые нейтрализуют его.

Нормативно-правовая база в России пока не разработана. В ФЗ №61 не закреплено понятие «биоаналог». Однако в настоящее время существует проект поправок Федерального закона от 21 января 2013 г. «О внесении изменения в Федеральный закон «Об обращении лекарственных средств» и в статью 333.32.1. части второй Налогового кодекса Российской Федерации», согласно которому биоаналоговое лекарственное средство (биоаналог) — биологическое лекарственное средство, схожее с оригинальным биологическим лекарственным средством по технологии производства, фармацевтической субстанции (комбинации фармацевтических субстанций), лекарственной форме, показаниям к применению и поступившее в обращение с соблюдением прав интеллектуальной собственности на оригинальное лекарственное средство [3].

Будущее биосимиляров

Биотехнологические лекарственные средства внесли большой вклад в терапию тяжёлых метаболических и дегенеративных заболеваний, таких как сахарный диабет, аутоиммунные заболевания, псориаз, онкологические заболевания и др. Истечение сроков патентной защиты на большинство оригинальных биопрепаратов создало предпосылки к внедрению аналогичных биопрепаратов, так называемых биосимиляров.

Согласно данным прогноза продаж фармацевтического рынка на 2014 год молекулы биопрепаратов, дающие около 40% мировых продаж потеряют патентную защиту к 2015 г. Ожидается, что к 2020 г. продажи биосимиляров превысят 100 млрд \$.

Среди основных факторов развития рынка биосимиляров называют умеренную цену по сравнению с оригинальными продуктами, широкую сферу применения, увеличение заинтересованности в них государства.

Литература

1. На мировом фармрынке доминируют биопрепараты URL:http://www.pharmvestnik.ru/pubs/lenta/obzory/na-mirovom-farmrynke-dominirujut-biopreparaty.html#.U0wwBFV_tc0.
2. Об обращении лекарственных средств [Электронный ресурс]: Федеральный закон от 12.04.2010 N 61-ФЗ (ред. от 12.03.2014). Доступ из справ.-правовой системы «Консультант Плюс».
3. Проект Федерального закона от 21.01.2013 г. «О внесении изменений в Федеральный закон «Об обращении лекарственных средств» и в статью 333.32.1. части второй Налогового кодекса Российской Федерации».
4. Biosimilars: a overview. http://www.researchgate.net/publication/228730641_Biosimilars_an_overview.
5. Annex to Guideline on Similar Biological Medicinal Products Containing Biotechnology derived Proteins as Drug Substance — Non Clinical and Clinical Issues containing Recombinant Granulocyte Colony-Stimulating Factor, CHMP/31329/05, February 2006. URL: www.ema.europa.eu/pdfs/human/biosimilar/3132905en
6. Annex to Guideline on Similar Biological Medicinal Products Containing Biotechnology derived Proteins as Drug Substance — Non Clinical and Clinical Issues containing Recombinant Human Erythropoietin, CHMP/94526/05, March 2006. URL: www.ema.europa.eu/pdfs/human/biosimilar/9452605en. Accessed 02 September 2010.
7. Annex to Guideline on Similar Biological Medicinal Products Containing Biotechnology derived Proteins as Drug Substance— Non Clinical and Clinical Issues containing Recombinant Human Growth Hormone, CHMP/94528/05, February 2006. URL: www.ema.europa.eu/pdfs/human/biosimilar/9452805en.
8. Guideline on Immunogenicity Assessment of Biotechnology-derived Therapeutic Proteins. EMEA/CHMP/BMWP/14327/2006, December 2007. URL:http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003946.pdf.
9. Guideline on non-clinical and clinical development of similar biological medicinal products containing recombinant human insulin and insulin analogues EMEA/CHMP/BMWP/32775/2005_Rev., December 2012. URL:http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2012/12/WC500136392.pdf.
10. Guideline on Similar Biological Medicinal Products, CPMP/437/04, October 2005. URL:http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003517.pdf (дата обращения 14.04.2014).
11. Guideline on Similar Biological Medicinal Products Containing Biotechnology-derived Proteins as Drug Substance — Non Clinical and Clinical Issues, EMEA/CHMP/BMWP/42832/05, February 2006. URL: <http://www.triskel.com/2%20Guideline%20biotech%20derived%20proteins.pdf>.
12. Guideline on Similar Biological Medicinal Products containing biotechnology-derived proteins as active substance: quality issues (revision 1). EMA, Committee for Medicinal Products for Human Use, 2012. URL:http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2012/05/WC500127960.pdf (дата обращения 14.04.2014).
13. Guideline on Similar Biological Medicinal Products Containing Low-molecular Weight Heparins. Draft released for consultation in April 2008. URL: www.ema.europa.eu/pdfs/human/biosimilar/11826407en.
14. Guideline on similar biological medicinal products containing monoclonal antibodies — non-clinical and clinical issues, CHMP/BMWP/403543/2010, May 2012. URL:http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2012/06/WC500128686.pdf.
15. Guideline on similar biological medicinal products containing recombinant interferon alpha, CHMP/BMWP/102046/2006, October 2007. URL:http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003931.pdf.
16. IMS Health 2007 & 2009, Evaluate Pharma, Sandoz analysis.
17. Jenkins N., Murphy L., Tyther R. Post-translational modifications of recombinant proteins: significance for biopharmaceuticals. // Mol. Biotechnol.— 2008. — № 39. — P. 113—118.
18. Misra A. Are biosimilars really generics? // Expert Opin. Biol. Ther. — 2010. — № 10(4). — P. 489—494.
19. Goldsmith D., Kuhlmann M., Covic A. Through the looking glass: the protein science of biosimilars. // ClinExpNephrol. 2007;11: 191—195.
20. Sahoo N., Choudhury K., Manchikanti P. Manufacturing of biodrugs: need for harmonization in regulatory standards. // Biodrugs. 2009;23: 217—229.
21. The Commission of the European Communities (2003) Commission Directive 2003/63/EC of 25 June 2003 amending Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council on the Community code relating to medicinal products for human use. // In Official Journal of the European Union. — L159. — P. 46—94.
22. The European Parliament and the Council of the European Union (2004) Directive 2004/27/EC of the European Parliament and of the Council of 31 March 2004 amending Directive 2001/83/EC on the Community code relating to medicinal products for human use. // In Official Journal of the European Union, L136, pp. 34—57.

Современные тенденции в стандартизации препаратов аллергенов

Игнатов А.А., Раменская Г.В., Смирнов В.В.

ГБОУ ВПО «Первый Московский Государственный Медицинский Университет им. И.М. Сеченова», г. Москва

Резюме. В статье рассмотрены современные требования к качеству аллергенных экстрактов, используемых для аллерген-специфической иммунотерапии. Проведён сравнительный анализ нормативной документации, регламентирующей качество аллергенных препаратов. Приведены требования Европейской фармакопеи к качеству аллергенов как фармацевтических препаратов. Рассмотрены возможности применения современных физико-химических методов (ВЭЖХ-МС, ЯМР) для анализа препаратов данной группы.

Ключевые слова: аллерген-специфическая иммунотерапия, аллергенные экстракты, стандартизация, суммарная аллергенная активность, биологическая активность

Current trends in the standardization of preparations of allergens

Ignatov A.A., Ramenskaya G.V., Smirnov V.V.

First Moscow State Medical University named after I.M. Sechenov, Moscow

Abstract. The article deals with the modern requirements to the quality of the allergenic extracts used for allergen-specific immunotherapy. The comparative analysis of regulatory documents governing the quality of the allergenic drugs. Presents the requirements of the European Pharmacopoeia the quality of allergens like pharmaceuticals. The possibilities of application of modern physico-chemical methods (HPLC-MS, NMR) analysis of drugs in this group.

Keywords: allergen-specific immunotherapy, allergenic extracts, standardization, total allergenic activity, biological activity

Автор, ответственный за переписку:

Игнатов Алексей Анатольевич — аспирант, ГБОУ ВПО «Первый Московский Государственный Медицинский Университет им. И.М. Сеченова», г. Москва; адрес: 119991, Российская Федерация, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2; e-mail: rem_browne@mail.ru; тел. +7 (985) 788-93-05

Введение

В настоящее время в мире наблюдается рост заболеваемости аллергическими болезнями, к которым относятся бронхиальная астма, аллергический ринит, аллергический конъюнктивит, атопический дерматит, крапивница, пищевая, лекарственная, инсектная аллергия [1]. Причиной развития аллергических болезней является воздействие аллергенов на сенситилизованный организм. Для диагностики аллергических заболеваний проводится сбор аллергологического анамнеза, физикальное обследование и аллергические тесты, например, кожные пробы или определение *in vitro* аллерген-специфических IgE антител [2].

Наиболее эффективным методом лечения сезонных аллергических риноконъюнктивитов является аллерген-специфическая иммунотерапия (АСИТ) [3]. Этот метод лечения был впервые предложен *Леонардом Нуном* и *Джоном Фриманом* в 1911 году для лечения поллиноза. Они установили, что в результате инъекции больному поллинозом экстракта пыльцы трав до сезона цветения растений, во время цветения отмечается облегчение или полное исчезновение симптомов аллергии [1]. Метод АСИТ заключается в назначении пациенту возрастающих доз того аллергена, к которо-

му у него выявлена гиперчувствительность. Аллергены применяются в виде специально приготовленных водно-солевых экстрактов, а также модифицированных на разных носителях препаратов [4]. Основной задачей данной терапии является гипосенсибилизация, то есть постепенное снижение чувствительности пациента вплоть до полной индифферентности к естественной экспозиции аллергена, к которому он чувствителен, в окружающей среде [5].

АСИТ является единственным этиопатогенетическим методом лечения аллергических болезней (аллергического ринита, конъюнктивита, бронхиальной астмы), воздействующим на все патогенетические звенья аллергического процесса, изменяющим характер реагирования организма на аллерген. Использование этого метода позволяет достичь долгосрочного улучшения состояния пациентов после завершения курса. Данный метод лечения оказывает профилактическое действие на прогрессирование аллергических заболеваний и развитие осложнений. АСИТ снижает вероятность развития бронхиальной астмы у больных аллергическим риноконъюнктивитом [1, 6].

Аллергенные экстракты представляют собой лекарственные препараты, которые могут быть использованы для диагностики, профилактики и лечения

аллергических болезней. На протяжении всей истории клинической аллергологии их получали экстракцией водно-солевым раствором активных действующих веществ из различного сырья растительного и животного происхождения, вызывающих аллергические реакции и заболевания. Процесс приготовления экстрактов аллергенов на основе природного сырья включает следующие этапы: измельчение, экстракция, очистка, диализ, стерилизация, проба на токсичность [7, 8].

Важное значение имеет оценка качества исходного сырья (растения, клещи домашней пыли, насекомые, грибы и т.д.). В сырье регламентируется содержание посторонних примесей. При проведении визуального и микробиологического анализов допускается присутствие не более 1% любых посторонних примесей в исследуемом образце [9]. Для измельчения сырья используют лабораторный миксер, ультразвуковые приборы.

Поскольку в процессе экстракции возможно закисление раствора, для экстракции используют слабощелочную среду с pH 7,5 — 8,5. Для поддержания pH используют буферные растворы: щелочной раствор Кока для приготовления экстрактов из грибов, домашней пыли, пыльцы и др., буферный раствор с NaCl для приготовления экстрактов из овощей, орехов, фруктов, эпидермиса животных и т.д. Обезжиренный материал смешивают с наиболее подходящим раствором, проводят экстрагирование при комнатной температуре в тест-системе от 17 до 24 ч при постоянном встряхивании [8].

Полученные таким образом водно-солевые экстракты содержат, помимо аллергенных, другие компоненты, что влияет на качество препарата. Поэтому аллергенные препараты подвергают специальной очистке, которая может быть проведена следующими методами: осаждением, центрифугированием, фильтрованием либо сочетанием этих методов. После очистки следует диализ, в процессе которого происходит удаление низкомолекулярных веществ и пигментов.

Экстракты аллергенов, предназначенные для инъекционного введения, подвергаются стерилизации, наиболее эффективным способом которой является фильтрация через бактериальные фильтры. Данный метод подходит для термолabileльных веществ. Контроль стерильности проводится путём посева на питательные среды и обнаружения возможного роста микроорганизмов.

Испытание на токсичность включает в себя определение pH, а также проведение микробиологического и токсикологического контролей [8].

Новые технологии клонирования белковых молекул позволяют получить многие важные аллергены (например, пыльцы растений, постельного клеща, эпидермиса некоторых животных, насекомых, яда перепончатокрылых) в виде индивидуальных рекомбинантных белков. Полученные таким методом аллергены обладают аллергенной активностью, сопоставимой с соответствующими природными белковыми аллер-

генами. Данная технология облегчает стандартизацию препаратов аллергенов, позволяя количественно определять только главные аллергены в производственных сериях лекарственных форм [7, 10].

Лекарственные формы аллергенов совершенствуются с целью повышения их безопасности при сохранении основного свойства — иммуногенности. Предприняты попытки модификации аллергенов путём полимеризации формальдегидом или глутаровым альдегидом, а также получения сорбированных форм на L-тирозине или гидроокиси алюминия, применения пролонгированных форм с использованием различных природных и синтетических носителей [7].

Качество аллергенных препаратов является ключевым вопросом как диагностики, так и лечения аллергических заболеваний. Поэтому стандартизация аллергенных экстрактов имеет первостепенное значение для улучшения их качества и предоставления врачам надёжного метода диагностики и лечения аллергических болезней [11].

Общая всемирная стратегия стандартизации препаратов аллергенов предусматривает определение суммарной аллергенной активности, биологической активности и содержания главных аллергенов в единице массы препарата.

Основная проблема стандартизации аллергенных препаратов связана с отсутствием единых протоколов стандартизации для всех производителей. В США регулирующим органом, осуществляющим стандартизацию, контроль за качеством и чистотой лечебных аллергенов, является FDA (Food and Drug Administration — Управление по контролю качества продуктов питания и лекарственных средств). В Европе оценкой соответствия экстрактов аллергенов всем требованиям Европейской Фармакопеи занимается ЕМА (European Medicines Agency — Европейское агентство по лекарственным средствам). Также в европейских странах действует несколько регулирующих организаций, которые придерживаются единых установленных правил в соответствии с рекомендациями ВОЗ.

Суммарную аллергенную активность лекарственного препарата стандартизуют по соотношению вызываемой им кожной реакции на аллерген (*prick*-тест) со степенью кожной реакции на гистамин у больных, чувствительных (сенситизированных) к данному аллергену [12]. Таким образом, основным методом стандартизации аллергенных экстрактов является определение биологической активности препарата посредством способности связывания комплекса антиген-антитело (АГ-АТ) [13].

Для оценки биологической активности используют методы *in vitro* и *in vivo*. К *in vitro* методам относятся такие методы, как изоэлектрофокусирование, электрофорез в полиакриламидном геле с додецил-сульфатом натрия, IgE-иммуноблоттинг, перекрёстный радиоиммуноэлектрофорез, радиоаллергосорбентный тест (РАСТ), используемый для оценки IgE-связывающих

свойств препарата. К методам *in vivo* относятся: кожные пробы, *prick*-тесты, аппликационные, скарификационные, внутрикожные тесты [5, 7, 12, 13].

Однако, до настоящего времени каждый производитель оценивал специфическую активность и концентрацию аллергенов в удобных для него единицах с использованием своих внутренних стандартов — In House Reference Standards (IHRS). Иммунологическая активность выражалась в следующих единицах: биологические единицы — Biological Units (BU), биологические аллергенные единицы — Biological Allergenic Units (BAU), аллергенные единицы — Allergy Units (AU), единицы активности АСИТ — Specific treatment units (STU), индекс реактивности — Index of reactivity (IR-Europe) и др. [8]. Использование собственных внутренних стандартов делает практически невозможным сравнение качества продукции различных производителей. Даже если количество главных аллергенов установлено, различия в методиках количественного определения, эталонных экстрактах и используемых антителах могут повлиять на результат. Таким образом, для сравнения диагностических и иммунотерапевтических средств от разных производителей следует использовать одинаковые аналитические методы и материалы [11].

В настоящее время для разных производителей стало важным определение содержания главных аллергенов, преимущественно ответственных за повышенную чувствительность организма к сложному по составу аллергену. С этой целью Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) передаёт в распоряжение разных стран международные референс-стандарты, содержащие определённые количества соответствующих аллергенов. ВОЗ также была предложена система международных единиц — International Units (IU). В этих единицах выражается биологическая активность международных стандартов, разработанных организацией [8]. Но, несмотря на все достоинства, международные референс-стандарты не получили широкого распространения: каждый производитель использует свой IHRS и активность каждого стандарта выражает в своих собственных единицах. Разработка одной унифицированной единицы, по которой проводилась бы стандартизация у подавляющего большинства производителей, до сих пор остаётся практически нерешаемой задачей [8].

Европейская фармакопея предъявляет ряд требований к качеству препаратов аллергенов. Предъявляются требования к качеству исходного сырья, используемого для приготовления аллергенных препаратов. Так, содержание пыльцы других растений не должно превышать 1% для смесей пыльцы разных видов и 0,5% для пыльцы одного вида (устанавливается подсчётом пылевых частиц под микроскопом). При использовании плесени в качестве сырья особые меры принимаются для предотвращения попадания посторонних штаммов плесени. В случае экстрактов клещей не допускается попадания в сырьё посторонних видов

клещей. Виды насекомых, из которых экстрагируется яд, должны быть идентифицированы, а пищевые аллергены должны отвечать требованиям, предъявляемым к продуктам питания [18].

Согласно требованиям Европейской фармакопеи, препараты аллергенов, предназначенные для парентерального применения, а также глазные препараты, препараты для ингаляций и препараты для проведения кожных проб должны производиться в асептических условиях. Эти препараты должны выдерживать испытание на стерильность. Нестерильные аллергенные препараты должны соответствовать требованиям, предъявляемым к нестерильным фармацевтическим препаратам. Аллергенные экстракты могут содержать в своём составе консерванты, природа и концентрация которых нормируется [18].

В лиофилизированных препаратах регламентируется содержание воды (не более 5%). Содержание белков определяется методами изоэлектрического фокусирования, электрофореза в полиакриламидном геле с додецил-сульфатом натрия, иммуноэлектрофореза, капиллярного электрофореза, хроматографическими методами и масс-спектрометрией. Оно должно составлять от 80 до 120% от указанного количества. Если в качестве адсорбентов используются алюминия или кальция фосфат, в препаратах нормируется содержание алюминия или кальция, которое должно составлять от 80 до 120% от указанного количества. Суммарная аллергенная активность должна находиться в пределах от 50 до 150% от указанного количества (определяется путём подавления связывающей способности специфических IgE антител или эквивалентного *in vitro* метода). Содержание индивидуальных аллергенов должно составлять от 50 до 200% от указанного количества для каждого компонента [18].

В Российской Федерации стандартизацию, контроль качества и чистоты аллергенных препаратов осуществляет Государственный научно-исследовательский институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов имени Л.А. Тарасевича. Диагностические и терапевтические препараты, выпускаемые отечественными производителями, стандартизуют по содержанию единиц белкового азота — Protein nitrogen units (PNU). Аллергенную активность устанавливают по результатам кожного тестирования на пациентах, которые чувствительны к данному аллергену. Количественную оценку ни в испытаниях *in vitro*, ни на пациентах не проводят [7, 13].

В последнее время на российском фармацевтическом рынке стали появляться стандартизованные в индексах реактивности препараты. Подобная система стандартизации применяется французской компанией «Stallergenes» при изготовлении препаратов «Phostal»® «Аллерген пыльцы деревьев», «Staloral»® «Аллерген пыльцы берёзы» и «Staloral»® «Аллерген клещей» [14, 15, 19].

В настоящее время в РФ для комплексной АСИТ применяют водно-солевые экстракты, представляю-

щие собой смесь аллергенных и неаллергенных материалов, депонированные и модифицированные формы аллергенов. Их применяют для лечения респираторных аллергических заболеваний, а также анафилактических реакций на яд насекомых. Депонированные аллергены, так же, как и модифицированные аллергены обладают меньшей аллергенностью и большей иммуногенностью. Такие средства более эффективны и безопасны при проведении АСИТ. В клинической практике широко применяются алергоиды. Термин «алергоиды» используется для обозначения природных аллергенов, которые были модифицированы с помощью альдегидов с целью снижения их аллергенности и повышения безопасности. Алергоиды обычно получают путём полимеризации аллергенов формальдегидом. Депонированные аллергены представляют собой суспензионную форму аллергенов, адсорбированную на гидроокиси алюминия или фосфате кальция и химически модифицированную с помощью глutarового альдегида. В ГНЦ Институте иммунологии ФМБА проводятся работы по направленной модификации белков путём создания новых конъюгированных форм аллергенов (аллерготропинов) с иммуномодулятором полиоксидонием. Клинические исследования новой группы препаратов показали их высокую эффективность и безопасность использования для АСИТ, что позволяет судить о перспективности дальнейшей разработки данной группы лекарственных средств [7, 14].

Стандартизации модифицированных аллергенов предусматривает проведение стандартизации исходного аллергена до модификации, определение воспроизводимости процесса модификации с сохранением содержания главных аллергенных эпитопов в конечном продукте, а также соответствие свойств (иммуногенности) исходного и конечного продуктов.

В России к медицинскому применению допущены аллергены в виде водно-солевых экстрактов пыльцы растений (деревьев, злаковых и сорных трав), домашней пыли, клещей рода *Dermatophagoides*; алергоиды из пыльцы злаковых трав и сорных трав. Разрешены к медицинскому использованию также смеси водно-солевых аллергенов пыльцы злаков, деревьев и сорных трав. Другие лекарственные формы аллергенов в нашей стране пока не зарегистрированы и находятся на стадии внедрения в медицинскую практику [7]. Лечебные аллергены, разрешённые к медицинскому применению в РФ, производятся компаниями ФГУП НПО «Микроген» (Ставрополь), «Севафарма» (Чехия), «Биомед» (ФГБУ «НИИВС им. И.И. Мечникова» РАМН) [8].

Разработанный при финансовой поддержке Европейского Союза проект «CREATE» («Development of Certified Reference Materials for Allergenic Products and Validation of Methods for their Quantification») — «Сертифицированные эталоны (референсы) аллергенов для оценки качества продукции» должен был решить проблему внедрения унифицированных методов ко-

личественного определения содержания главных аллергенов в стандартные протоколы [11, 16]. Главными («мажорными») аллергенами считаются те аллергены, которые способны вызывать иммунологический ответ более чем у половины пациентов и связывать более половины антител IgE у сенсibilизированных к данному аллергену пациентов [13, 17]. Однако реализовать данный проект не удалось в связи с трудновыполнимостью поставленных задач. В результате только две молекулы рекомбинантных аллергенных белков Bet v 1 (аллерген пыльцы берёзы) и Phl p 5 (аллерген пыльцы тимopheевки), произведённые по правилам GMP, смогли быть включены в Европейскую фармакопею в качестве международных стандартов [11, 18].

Поскольку единицы биологической активности трудно сопоставимы у разных производителей, активность препарата может быть выражена в концентрациях «мажорных» аллергенов. Для их определения можно предложить метод жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором (ЖХ-МС) — Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) [20]. В настоящий момент данное направление является приоритетным в области стандартизации экстрактов аллергенов.

В связи с тем, что выпускаемые отечественными производителями лечебные и диагностические аллергены стандартизуются ещё старым методом (по содержанию единиц белкового азота), необходимо привести отечественные технологии получения и стандартизации аллергенных препаратов в соответствие с мировым уровнем. Это может быть достигнуто путём внедрения в стандартизацию современных физико-химических методов, таких как ЖХ-МС (LC-MS) [20, 21].

Метод масс-спектрометрии (МС) заключается в ионизации молекул в исследуемом образце с последующим разделением и регистрацией образующихся ионов. Данный метод позволяет проводить определение нескольких различных аллергенных компонентов одновременно (аллергенов и их изоформ). Это облегчает работу с аллергенными препаратами, которые содержат обширную группу IgE-связывающих белков, такими как, например, экстракты клещей. Метод МС также позволяет различить изоформы аллергенов, чего трудно достичь, используя иммунологические методы. МС могла бы быть полезна и для стандартизации алергоидов, поскольку определение «мажорных» аллергенов в данных препаратах другими методами невозможно из-за их химической модификации альдегидами [11]. Таким образом, благодаря ряду преимуществ (высокая чувствительность, экспрессность, информативность, возможность работы с многокомпонентными смесями и др.) применение масс-спектрометрии для анализа белковых молекул, в т.ч. аллергенных белков, стало одним из важнейших этапов в их исследовании. Введение таких методик, как ионизация электрораспылением (ИЭР) и матрично-адсорбированная лазерная десорбция / ионизация (МАЛДИ), привело к большому про-

рыву в масс-спектрометрии [8]. В ведущих научных и учебных центрах России широко используются хромато-масс-спектрометры компании Shimadzu [22].

Для изучения молекул аллергенов также могут быть применены новые методы, такие как спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР) и рентгено-структурный анализ. Они могли бы стать важным шагом на пути к полноценной стандартизации аллергенных препаратов [11].

Дальнейшее усовершенствование метода АСИТ требует развития стандартизации аллергенных препаратов. Это, в свою очередь, требует разработки новых методов определения содержания аллергенов в лекарственных препаратах. Достижения в области стандартизации экстрактов аллергенов позволят наладить производство качественных лечебных и диагностических аллергенов в Российской Федерации и повысят эффективность и безопасность аллергенных вакцин.

Подводя итог, представим международные требования, предъявляемые к препаратам аллергенов. Суммарную аллергенную активность определяют по соотношению степени вызываемой препаратом кожной реакции со степенью кожной реакции на гистамин у

пациентов, чувствительных к данному аллергену [7]. В США регулирующим органом, осуществляющим стандартизацию лечебных аллергенов, является FDA. В европейских странах контроль соответствия качества аллергенных препаратов требованиям Европейской фармакопеи осуществляет ЕМА.

В мире широко распространены две системы стандартизации препаратов аллергенов. В США, согласно требованиям FDA, используются аллергенные единицы AU (Allergy Units). Проводится оценка степени выраженности кожной реакции пациента *in vivo*: измеряется суммарный диаметр эритемы в мм в ответ на внутрикожное титрование аллергеном. В Европе применяется система стандартизации в биологических единицах BU (Biological Units). Она позволяет измерить дозу аллергена в биоэквивалентных единицах, которые рассчитываются по степени выраженности кожной реакции при *prick*-тестировании. 1000 BU/мл эквивалентны кожной реакции пациента на раствор гистамина в концентрации 10 мг/мл. Европейская фармакопея также даёт полноценную характеристику аллергенов как фармацевтических препаратов [9, 18].

Литература

1. Аллергология и иммунология / Под общ. ред. А.А. Баранова и Р.М. Хаитова. — М.: Союз педиатров России, ООО «М-Студио». — 2008. — 248с. (серия «Клинические рекомендации для педиатров»).
2. Ferrer M. et al. Molecular diagnosis in Allergy: application of the microarray technique. // J Investig Allergol Clin Immunol. — № 19 (1). — P. 19-24.
3. Маслова Л.В. Поллиноз: методы контроля заболевания. // Рецепт. — 2013. — № 3. — С. 118 — 127.
4. Гушин И.С. Аллерген-специфическая иммунотерапия (гипосенсибилизация). // Лечащий врач. — 2001. — № 3. — С.10 — 27.
5. Курбачева О.М., Павлова К.С. Аллерген-специфическая иммунотерапия. // Доктор.ру. — 2010. — № 3. — С.16 — 19.
6. Jacobsen L., Wahn U., Bilo M.B. Allergen-specific immunotherapy provides immediate, long-term and preventive clinical effects in children and adults: the effects of immunotherapy can be categorized by level of benefit — the centenary of allergen specific subcutaneous immunotherapy. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.ctajournal.com/content/2/1/8> (дата обращения: 15.11.2014).
7. Хаитов Р.М., Ильина Н.И. Аллергология и иммунология: Национальное руководство. — М.: Гэотар-Медиа. — 2009. — 656 с.
8. Боков Д.О., Смирнов В.В. К вопросу стандартизации аллергенных экстрактов: пути дальнейшего развития. // Сеченовский вестник. — 2013. — №4. — С. 39 — 46.
9. Code of Federal Regulations Food and Drug Administration (21 680.1) — «Allergenic Products». — Vol. 7. — Date: 2011 — 04 — 01. — P. 133 — 136.
10. Павлов А.Е. и др. Получение и оценка свойств рекомбинантного аналога мажорного аллергена пыльцы берёзы Bet v 1. // Российский аллергологический журнал. — 2012. — № 3. — С. 7 — 13.
11. Fernández-Caldas E., Zakzuk J., Lockey F.R. Allergen Standardization and Characterisation [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://files.sld.cu/allergen/files/2011/08/allergenvaccines2009opt1.pdf> (дата обращения: 17.11.2014).
12. Желтикова Т.М. Аллергены для аллерген-специфической иммунотерапии: достижения и проблемы. // Consilium medicum (Педиатрия). — 2012. — № 1. — С. 29 — 31.
13. Астафьева Н.Г. и др. Место аллерген-специфической иммунотерапии в лечении атопии. // Consilium medicum. — 2013. — № 3. — С. 55 — 61.
14. Справочник Видаль. Лекарственные препараты в России: Справочник. — М.: АстраФармСервис. — 2013. — 1640 с.
15. Stallergenes S.A. [Электронный ресурс]: Stallergenes group. Режим доступа: <http://www.stallergenes.com/en/stallergenes-group/our-products.html> (дата обращения: 15.11.2014).
16. Van Ree R. et al. The CREATE project: development of certified reference materials for allergenic products and validation of methods for their quantification. // Allergy. — 2008. — № 63. — P. 310 — 326.
17. Breiteneder H., Chapman M.D. Allergen Nomenclature. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.allergen.org/pubs/10BRP69BreitenederMDCAllergenNomenclature2014.pdf> (дата обращения: 16.11.2014).
18. European pharmacopoeia. 7-th ed. suppl. 7.0. Strasbourg: European Department for the Quality of Medicines. — 2010. — № 1. — 1207 p.
19. Frati F. et al. Development of a sublingual allergy vaccine for grass pollinosis. // Drug Design, Development and Therapy. — 2010. — № 4. — P. 99 — 105.
20. LC/MS Information. [Электронный ресурс]: Technology Reviews. Режим доступа: http://www.lcms.com/lcms_information/refer_books.html (дата обращения: 17.11.2014).
21. Ласкин Дж., Лифшиц Х. Принципы масс-спектрометрии в приложении к биомолекулам. — М.: Техносфера. — 2012. — 608 с.
22. Родин И.А., Варламов В.В. Инновационные хромато-масс-спектрометры Shimadzu в лабораторной практике 21 века. // Аналитика. Оборудование и материалы. — 2012. — №1. — С. 6 — 10.

Исследование биоэквивалентности препаратов ондансетрона с использованием метода ВЭЖХ-МС

Степанова Е.С.¹, Овчаров М.В.¹, Барсегян С.С.¹,
Чистяков В.В.¹, Никонова С.М.², Шилов В.В.²

¹ — ФГАОУ ВПО «Российский университет дружбы народов», Центр коллективного пользования, г. Москва

² — ФБУН СЗНЦ «Гиgieny и общественного здоровья», г. Санкт-Петербург

Резюме. В рамках перекрёстного, открытого, рандомизированного исследования с недельным периодом отмывки, с двумя последовательностями была изучена биоэквивалентность двух таблетированных форм ондансетрона на 18 добровольцах (дозировка 8 мг). Образцы плазмы крови анализировали валидированным методом ВЭЖХ-МС, с внутренним стандартом — трописетроном. Предел количественного определения составил 1 нг/мл.

Для анализируемых препаратов рассчитаны фармакокинетические параметры: AUC_{0-t} , C_{max} , T_{max} , MRT , C_{max}/AUC . 90% доверительный интервал для логарифмически преобразованных значений AUC_{0-t} составил 0,9507 — 1,0037, для $AUC_{(0-\infty)}$ 0,9402-0,9974 и для C_{max} — 0,9255 — 1,0095. По результатам исследования сделан вывод о биоэквивалентности сравниваемых препаратов ондансетрона.

Ключевые слова: ондансетрон, трописетрон, ВЭЖХ/МС, валидация, фармакокинетика, биоэквивалентность

Bioequivalence study of ondansetron tablets by HPLC-MS

Stepanova E.S.¹, Ovcharov M.V.¹, Barsegyan S.S.¹, Nikonova S.M.², Shilov V.V.², Chistyakov V.V.¹

¹ — Peoples' Friendship university of Russia, Shared Research and Education Center, Moscow

² — Science Center «Hygiene and Public Health», St-Petersburg

Abstract. Within the cross, a single, open, randomized study with a week washout period, the two sequences has been studied bioequivalence of tablet forms two ondansetron 18 volunteers (8 mg dosage). Plasma samples were analyzed by a validated HPLC-MS, tropisetron was used as the internal standard. Limit of quantification was 1 ng/ml.

Analyzed for drugs following pharmacokinetic parameters were calculated: AUC_{0-t} , C_{max} , T_{max} , MRT , C_{max}/AUC . 90% confidence interval for log-transformed values of AUC_{0-t} was 0,9507 — 1,0037, of $AUC_{(0-\infty)}$ was 0,9402-0,9974, of C_{max} was 0,9255 — 1,0095. The study concluded that bioequivalence compared ondansetron drugs.

Keywords: ondansetron, tropisetron, HPLC/MS, validation, pharmacokinetics, bioequivalence

Автор, ответственный за переписку:

Степанова Елена Сергеевна — ФГАОУ ВПО «Российский университет дружбы народов», Центр коллективного пользования, г. Москва; адрес: Россия, 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 8/2; e-mail: stepanova_25@inbox.ru; тел.: +7 (985) 442-17-49

Введение

Значительные успехи химиотерапии в последние годы основываются на развитии поддерживающей и сопроводительной терапии, что позволило сделать лечение пациентов с онкологическими заболеваниями более эффективным. Практически весь спектр цитостатических препаратов имеет ряд выраженных побочных эффектов. Тошнота и рвота относятся к наиболее частым осложнениям при проведении химиотерапии. Ещё совсем недавно около 10% больных отказывались от химиотерапии или прерывали её преждевременно из-за развития непереносимой тошноты и рвоты [1].

Ключевую роль в развитии острой тошноты и рвоты играет нейромедиатор — серотонин (5—НТ), высвобождение которого происходит при воздействии лучевой терапии или введении цитостатических препаратов из энтерохромаффинных клеток слизистой тонкой кишки.

Разработка и внедрение в широкую практику в начале 1990 г. антагонистов рецепторов 5—НТ₃ позволили кардинально уменьшить тошноту и рвоту при проведении химиотерапии. За счёт селективного действия, эти препараты практически полностью купируют тошноту и рвоту, имея при этом минимальные побочные эффекты [2].

Антагонисты 5-HT₃ рецепторов стали препаратами выбора среди противорвотных средств [3]. Внутри класса антагонистов 5-HT₃ рецепторов существенных различий между препаратами в отношении их эффективности не выявлено [4].

Выбор препарата лечения основывается на индивидуальных особенностях пациентов.

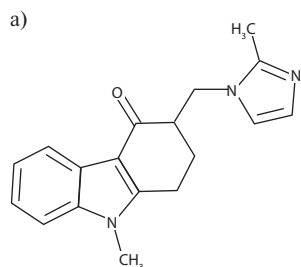
Ондансетрон — один из представителей группы антагонистов 5-HT₃ рецепторов успешно применяется в клинической практике для купирования тошноты и рвоты развивающейся на фоне химиотерапии, лучевой терапии, а также тошноты и рвоты возникающей в послеоперационный период.

Цель исследования

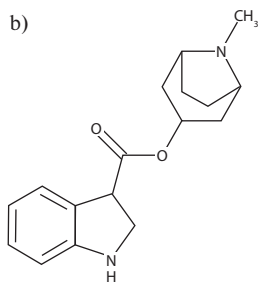
Целью настоящего исследования является изучение биоэквивалентности препаратов Ондавелл, таблетки, покрытые плёночной оболочкой, 8 мг («ПТ. Новелл Фармасьютикал Лабораториз», Индонезия) и Эметрон®, таблетки, покрытые оболочкой 8 мг («Гедеон Рихтер А.О.», Венгрия).

Материалы и методы

Субстанции



Ондансетрон (ОНД)
Брутто формула: C₁₈H₁₉N₃O
Молекулярная масса: 293,15



Трописетрон (ТР)
Брутто формула: C₁₇H₂₀N₂O₂
Молекулярная масса: 284,15

Оборудование

Высокоэффективный жидкостной хроматограф «Dionex ultimate 3000» (ФРГ), с масс-детектором Bruker micrOTOF-Q II (ФРГ). Весы аналитические «MX5» «Mettler Toledo» (Швейцария).

Дозаторы переменного объёма на 50,0, 200,0 Колор «Ленпипет» (РФ) 1000,0; и 5000,0 мкл «Biohit» (Финляндия) со сменными одноразовыми пластиковыми наконечниками «Экохим» (РФ); аппарат для встряхивания жидкости «Genius 3», «Vortex» (США); центрифуга Centrifuge 5424, Eppendorf (ФРГ); пробирки

Эппендорфа «Экохим» (РФ); калиброванные мерные колбы вместимостью 50; 100; 250; 1000 мл (ГОСТ 1770-74), мерные цилиндры объёмом 50, 250, 1000 мл (ГОСТ 1770-74).

Реактивы и растворы

Субстанция ондансетрона гидрохлорида 92,16% (Sun Pharma), субстанция трописетрона гидрохлорида, ацетонитрил 99,9% (LabScan), ацетат аммония 99% (Fluka), кислота муравьиная 50% (Fluka), аргон 99,95%, азот (Dominick Hunter) 99 %, вода Milli-Q.

Пробоподготовка

В пробирку Эппендорфа 1,5 мл отбирали 200 мкл плазмы, белки осаждали 400 мкл ацетонитрила, содержащего 10 нг/мл трописетрона (ТР) — внутренний стандарт. Раствор перемешивали 5 с на вихревой мешалке. Образец центрифугировали 3 мин при 14000 об/мин. 400 мкл супернатанта отбирали в 1,5 мл флаконы, прибавляли 400 мкл воды и помещали в термостат авто-сAMPLера при 10°C для последующего хроматографического анализа.

Методика количественного определения

Для количественного определения ондансетрона в плазме крови добровольцев при исследовании биоэквивалентности использован валидированный метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ/МС) [5].

Хроматографические условия:

- колонка XDB-C18 5 мкм 4,6×150 мм
- элюент — раствор 0,05% муравьиной кислоты и ацетонитрил в соотношении 25:75
- поток подвижной фазы — 0,6 мл/мин
- объём вводимой пробы — 50 мкл

Условия масс-детектирования:

Масс-детектор напряжение на игле -5500 В, температура источника 220°C, расход осушающего газа 6 л/мин, давление распыляющего газа 1,5 бар. Ионизация электрораспылением, регистрация положительных ионов, целевой ион ОНД 294,15±0,1 и ТР 285,15±0,1. Время удерживания ТР в этих условиях 4,21 мин, ОНД — 4,84 мин. Скорость записи спектров 1 Гц. Общее время анализа 5,5 мин.

Через каждые 50 анализов производилась промывка хроматографической системы в течении 40 мин при потоке 1 мл/мин, градиент: [% ацетонитрила] 25→0→0→100→100→25→25, время [мин] 0→1→5→20→25→27→40.

Дизайн клинического этапа исследования

Таблица 1

Дизайн клинического этапа исследования

Участники исследования	18 добровольцев в возрасте от 18 до 45 лет, отобранных согласно критериям включения и исключения (на случай замены выбывших из исследования добровольцев предусмотрено 2 дублера)
Доза	8 мг однократно
Прием препарата	Доброволец натощак принимает 1 таблетку одного из препаратов, запивая 240 мл кипячёной воды комнатной температуры
Период вымывания между этапами исследования	7 дней
Сбор образцов крови для анализа	Всего у 18 добровольцев отобрано 504 образца крови в течение двух этапов исследования. Время отбора образцов: до и через 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12 ч после приёма препарата

Расчёт фармакокинетических параметров

Для обсуждения биологической доступности лекарственных средств рассчитывали концентрации ондансетрона в плазме крови и определяли фармакокинетические параметры:

- максимальная концентрация ($C_{\max}$) — максимальное значение из измеренных;
- время достижения максимальных концентраций ($T_{\max}$) — время, при котором измерялась $C_{\max}$;
- площадь под фармакокинетической кривой — в пределах длительности наблюдений (AUC_{0-t}) рассчитывают методом трапеций;
- площадь под кривой в интервале времени от 0 до ∞ ($AUC_{0-\infty}$);
- среднее время удержания препарата в организме (MRT);
- значение $C_{\max}/AUC_{0-t}$, отражающее скорость всасывания.

Фармакокинетические параметры рассчитывали на компьютере Pentium 4 с использованием программ «Bioeqv», статистическая обработка данных проведена с использованием «Excel», графика — «SigmaPlot».

Результаты**Калибровочная кривая**

Диапазон концентраций для калибровочной кривой выбрали в пределах от 1,0 до 50,0 нг/мл (рис. 1). Коэффициент корреляции R для кривой составил 0,9944. Калибровочная кривая описывалась уравнением $y = 0,070332 \times x - 0,014394$, где x — концентрация ОНД, y — отношение площадей хроматографических пиков ОНД к ТР.

Валидация методики

Методика количественного определения ОНД была валидирована по нескольким параметрам, представленным в табл. 2, для доказательства её пригодности для исследований биоэквивалентности [6].

Основные фармакокинетические параметры и статистическая обработка данных

Усреднённые графики изменения концентрации ОНД в плазме крови добровольцев после приёма тестируемого и референтного препаратов представлены на рис. 6 (ср. значения $\pm 90\%$ дов.инт., $n=18$). Видно, что профили концентраций ондансетрона после применения таблеток Ондавелл «ПТ Новелл Фармасьютикал Лабораториз» (Индонезия) повторяют профили концентраций ондансетрона при использовании таблеток референс-препарата Эметрон® «Гедеон Рихтер А.О.» (Венгрия).

Рассчитанные основные фармакокинетические параметры представлены в табл. 3. Максимальные

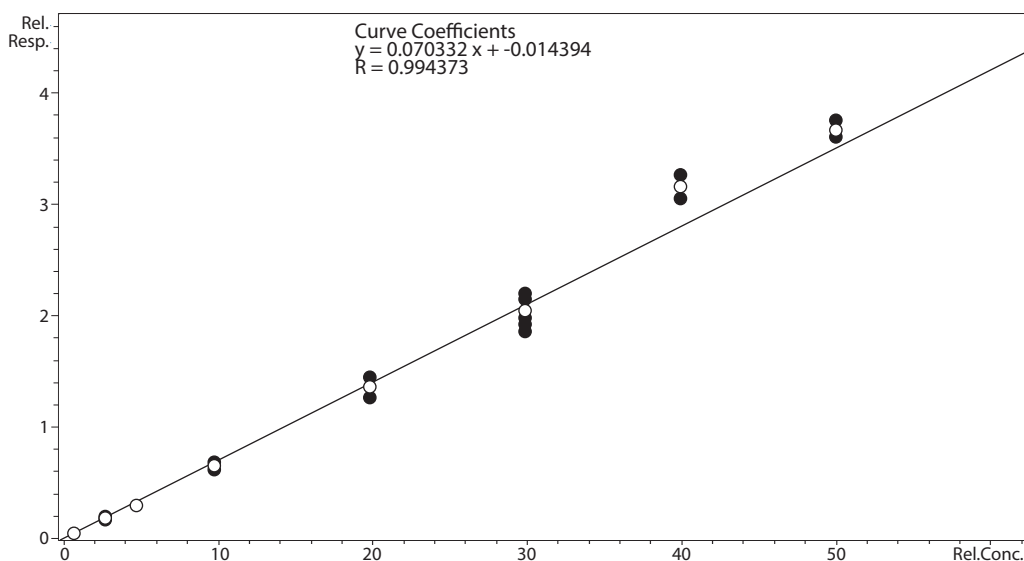


Рис. 1. График калибровки. Ось X (Rel.Conc.) — концентрация ОНД. Ось Y (Rel.Resp.) — отношение площадей хроматографических пиков ОНД к ТР

Таблица 2

Характеристика валидационных параметров методики

№ п/п	Валидационный параметр	Результаты анализа
1	Селективность	Анализ нескольких образцов интактной плазмы крови и плазмы содержащей аналит доказал высокую селективность выбранной методики (рис. 2-5). В данных условиях эндогенные соединения не мешают определению анализируемого вещества и внутреннего стандарта.
2	Предел обнаружения	0,1 нг/мл, отношение интенсивности сигнала вещества и шума (S/N) равно 4:1.
3	Предел количественного определения	Нижний предел количественного определения ОНД равный нижней точке калибровочной кривой составил 1 нг/мл (рис. 3).
4	Линейность, точность, воспроизводимость	График калибровки описывается линейным уравнением $y=0,070332 \times x - 0,014394$, где x — концентрация ОНД, y — отношение площадей хроматографических пиков ОНД к ТР. Относительное стандартное отклонение (RSD) для всех точек калибровочной кривой не превышает 15%, точность относительно теоретических концентраций от 91,4 до 112,4%.
5	Извлечение	Около 100%.
6	Эффект влияния матрицы	Не более 17,5%.
7	Стабильность в автосамплере	Исследована путём сравнения площадей хроматографических пиков полученных при первичном анализе пробы и повторном анализе после выдерживания образца в термостатируемом автосамплере при 10°C в течение 10 часов. Влияние внешних факторов на стабильность образца составило не более 4%.
8	Эффект переноса	Исследован при последовательном анализе образца с концентрацией ОНД 30 нг/мл и образца, не содержащего аналит. Перенос ОНД отсутствует.

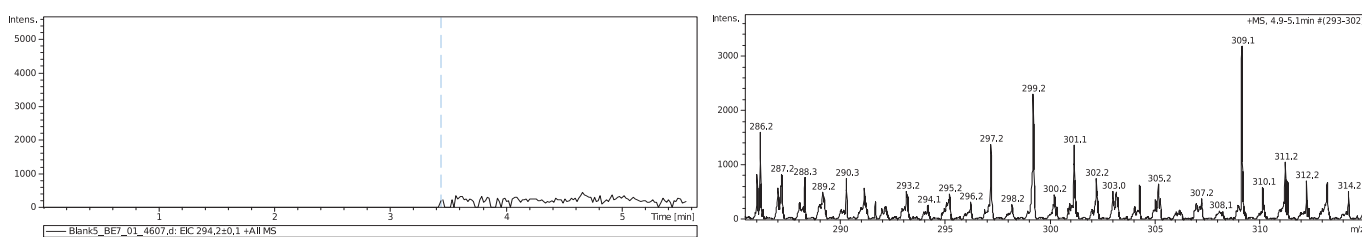


Рис. 2. Типичная хроматограмма и масс-спектр плазмы крови, не содержащей ОНД

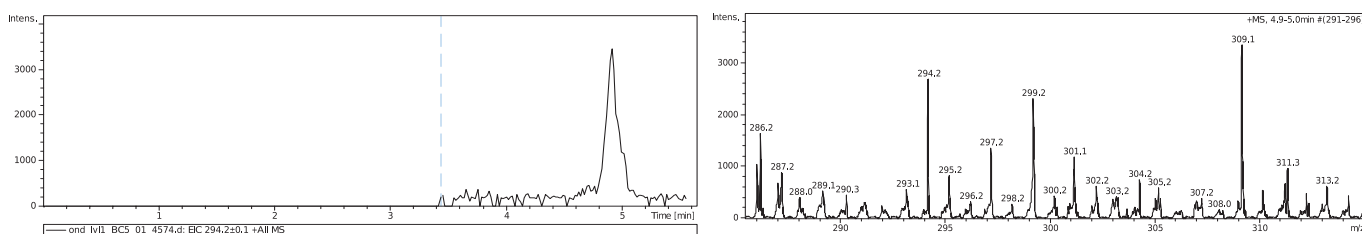


Рис. 3. Хроматограмма и масс-спектр плазмы крови с концентрацией ОНД 1 нг/мл

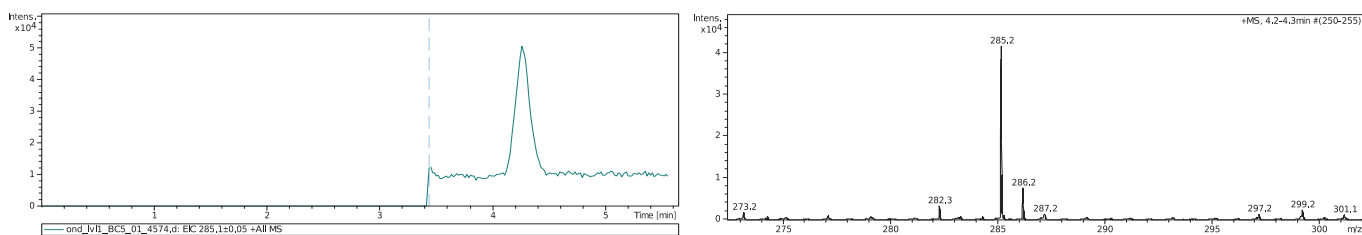


Рис. 4. Хроматограмма и масс-спектр плазмы крови, содержащей внутренний стандарт ТР

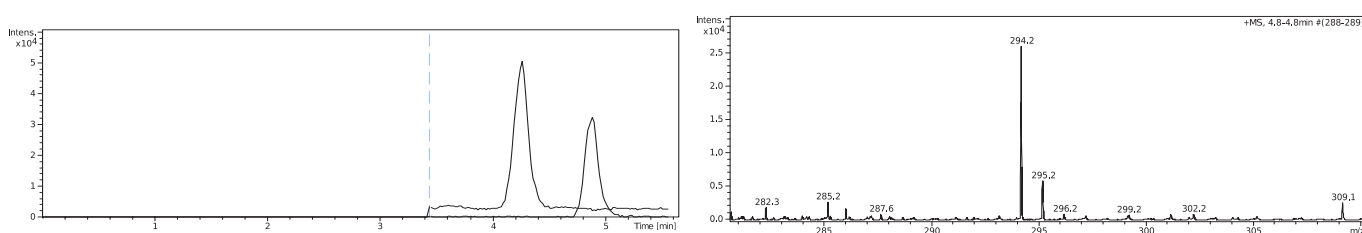


Рис. 5. Типичная хроматограмма и масс-спектр плазмы крови добровольца содержащая ОНД и внутренний стандарт ТР

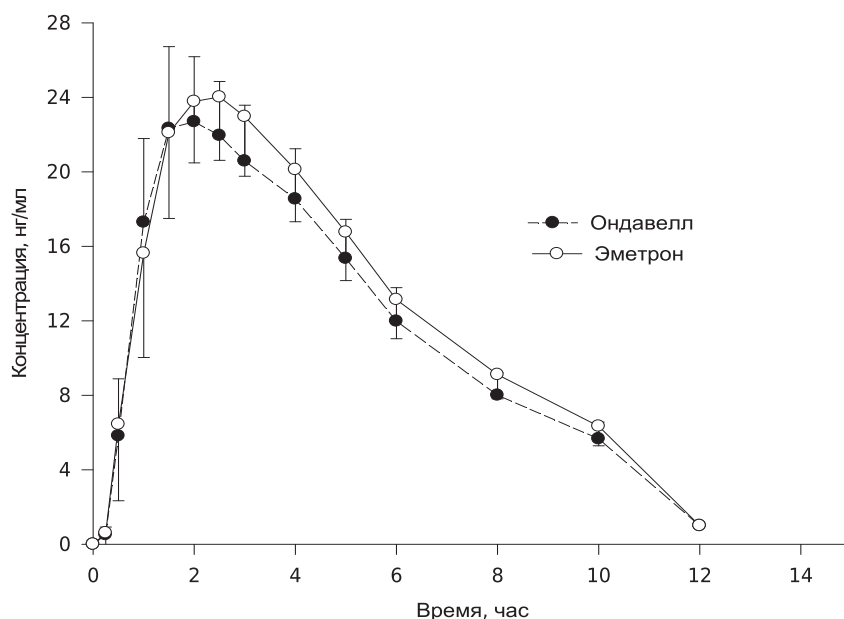


Рис. 6. Усреднённые кинетические кривые ОНД в плазме крови добровольцев после однократного приёма таблеток Ондавел (Т) и Эметронт (Р) (n=18; $\bar{x} \pm C.I. 90\%$)

Таблица 3

Основные фармакокинетические параметры тестируемого и референтного препаратов

		$\bar{x}$	SD	$S_{\bar{x}}$	C.I. 90%	CV, %
C_{max} нг/мл	T	25,42	9,86	4,02	3,82	38,79
	R	27,60	10,65	4,35	4,13	38,59
T_{max} ч	T	2,14	0,74	0,30	0,29	34,77
	R	2,33	0,99	0,40	0,38	42,22
MRT ч	T	4,62	0,45	0,18	0,17	9,74
	R	4,83	0,54	0,22	0,21	11,13
AUC_{0-12} нг/мл×ч	T	138,93	51,52	21,03	19,97	37,08
	R	153,15	56,63	23,11	21,95	36,98
$AUC_{0-\infty}$ нг/мл×ч	T	140,40	52,76	21,53	20,45	37,58
	R	160,19	57,69	23,55	22,37	36,01
C_{max}/AUC_{0-12}	T	0,183	0,025	0,010	0,010	13,71
	R	0,181	0,027	0,011	0,010	14,76

Примечания: $\bar{x}$ — среднее арифметическое; SD — стандартное отклонение; $S_{\bar{x}}$ — стандартная ошибка; C.I. 90% — 90% доверительный интервал; CV — коэффициент вариации.

концентрации регистрируются спустя, в среднем, 2,14-2,33 ч после приёма препаратов и составляют для тестируемого препарата ($\bar{x} \pm C.I. 90\%$) $25,42 \pm 3,82$ нг/мл, для препарата сравнения — $27,60 \pm 4,13$ нг/мл. Параметр среднего времени удерживания (MRT) составил, соответственно, $4,62 \pm 0,17$ и $4,83 \pm 0,21$ ч. Нет достоверных различий и в параметре AUC, отражающем степень всасывания. Для тестируемых таблеток AUC_{0-12}

Таблица 4

Результаты дисперсионного анализа фармакокинетических параметров $\ln AUC_{0-t}$, $\ln C_{max}$ определяющих биодоступность ондансетрона из таблеток

$\ln AUC_{0-12}$				
Источник вариации	SS	DF	MS	F
Препарат	0,106	1	0,106	1,86496
Последовательность	0,083	1	0,083	1,45607
Испытуемые	4,012	17	0,236	4,14688
Остаточная вариация	0,911	16	0,057	-
Общая вариация	5,112	35	-	-

$\ln C_{max}$				
Источник вариации	SS	DF	MS	F
Препарат	0,082	1	0,082	1,47759
Последовательность	0,076	1	0,076	1,37413
Испытуемые	4,814	17	0,283	5,11766
Остаточная вариация	0,885	16	0,055	-
Общая вариация	5,857	35	-	-

Примечания: SS — сумма квадратов отклонений; DF — число степеней свободы; MS — средняя квадратичная ошибка; F — рассчитанное значение F-критерия Фишера (при уровне значимости $\alpha=5\%$).

($AUC_{0-\infty}$) — $138,93 \pm 19,97$ ($140,40 \pm 20,45$), для препарата сравнения — $153,15 \pm 21,95$ ($160,19 \pm 22,37$) нг/мл×ч. Отношения максимальных концентраций к площадям под фармакокинетическими кривыми C_{max}/AUC_{0-12} , отражающие скорость всасывания, для сравниваемых лекарственных препаратов, практически одинаковы и составили $0,183 \pm 0,010$ (тест препарат) и $0,181 \pm 0,010$ (препарат сравнения).

Таблица 5

Значения фармакокинетических параметров после логарифмической трансформации данных

Параметр		Ондавелл	Эметрон®	Отношение T/R, %	Границы 90% CI, %
$AUC_{0-12'}$ нг/мл×ч	GMean	4,845	4,958	97,72	95,07–100,37
	SD	0,407	0,358		
	CV, %	8,383	7,206		
$AUC_{0-\infty'}$ нг/мл×ч	GMean	4,853	5,009	96,88	94,02–99,74
	SD	0,414	0,341		
	CV, %	8,495	6,795		
C_{max} нг/мл	GMean	3,122	3,227	96,75	92,55–100,95
	SD	0,438	0,384		
	CV, %	13,88	11,84		

Примечание: GMean — среднее геометрическое

Для установления статистически значимых различий между препаратами проводили дисперсионный анализ значений C_{max} , AUC_{0-t} после их логарифмического преобразования (табл. 4).

Для установления статистически значимых различий между средними значениями показателя биоэквивалентности сравниваемых препаратов значение F для строки «препарат» (различия между препаратами) должно превышать соответствующее табличное значение (таблица критерия Фишера для числа степеней свободы (1; n-2) и выбранного уровня значимости α).

Критическим значением для оценки вклада факторов типа препарата является значение $F_{0,05;1;16} = 4,49$. Как можно видеть, F-отношение для вклада фактора типа препарата нигде не превосходит этого критического значения.

Оценка биоэквивалентности изучаемых препаратов проводилась по показателям: AUC_{0-t} , $AUC_{0-\infty}$, C_{max} . В табл. 5 приведены границы 90% доверительного интервала для логарифмически преобразованных рас-

считанных фармакокинетических параметров: $AUC_{(0-t)}$ 95,07%-100,37%; для $AUC_{(0-\infty)}$ 94,02%-99,74%, для C_{max} 92,55%-100,95%.

Выводы

Значения всех определяемых параметров статистически достоверно не различались. Дисперсионный анализ значений $\ln AUC_{0-12'}$, $\ln C_{max}$, проведенный после их логарифмического преобразования, не выявил статистически значимых различий между препаратами. Границы оцененного 90% доверительного интервала для индивидуальных отношений логарифмически преобразованных значений (табл. 4) находятся в допустимых пределах: 80-125% для AUC_{0-12} и $AUC_{0-\infty}$ и 75-133% для C_{max} [7].

Таким образом, препарат Ондавелл, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 8 мг («ПТ. Новелл Фармасьютикал Лабораториз», Индонезия) и препарат Эметрон®, таблетки, покрытые оболочкой, 8 мг («Гедеон Рихтер А.О.», Венгрия) биоэквивалентны.

Литература

1. Kris M.G., Hesketh P.J., Herrstedt J., Rittenberg C., Einhorn L.H., Grunberg S. et al. Consensus proposals for the prevention of acute and delayed vomiting and nausea following high — emetic — risk chemotherapy. // Support Care Cancer 2005, Vol. 13:85–96.
2. Oge A., Alkis N., Oge O., Kartum A. Comparison of granisetron, ondansetron and tropisetron for control of vomiting and nausea induced by cisplatin. // J Chemother 2000, Vol. 12(1):105-108.
3. Steven M. Grunberg, and Paul J. Hesketh. Control of Chemotherapy—Induced Emesis. // The New England journal of medicine, 1993, Vol. 329:1790—1796.
4. Stiakaki E., Savvas S., Lydaki E., Bolonaki I., Kouvidi E., Dimitriou H., et al. Ondansetron and tropisetron in the control of nausea and vomiting in children receiving combined cancer chemotherapy. // Pediatr Hematol Oncol. 1999, Vol. 16(2):101-108.
5. Yara Popst Armando, Simone Grigoletto Schramm, Marina de Freitas Silva, Eunice Kazue Kano. Bioequivalence assay between orally disintegrating and conventional tablet formulations in healthy volunteers. // International Journal of Pharmaceutics, 2009, Vol. 366, 149—153.
6. Guideline on bioanalytical method validation. // European Medicines Agency, 2011.
7. Методические рекомендации «Изучение биоэквивалентности воспроизведенных лекарственных средств, гл. 7 в «Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том I. — М.: Гриф и К, 2013.

Исследования биоэквивалентности Нипезама ретард таблетки, 400 мг (АО «Химфарм», Республика Казахстан) и Финлепсина® 400 ретард таблетки, 400 мг («Плива Краков, Фармацевтическая компания С.А.», Польша)

Сариев А.К.¹, Абаимов Д.А.¹, Танкевич М.В.¹, Будач Я.², Курилов О.², Алтынбеков С.А.³,
Джолдыгулов Г.А.³, Серяков В.Н.³, Алтынбеков К.С.³

¹ — ФГБНУ «Научный центр неврологии», г. Москва

² — АО «Химфарм», Республика Казахстан

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

Резюме. В рамках перекрёстного, однократного, открытого, рандомизированного исследования с одномесячным периодом отмывки, с двумя последовательностями была изучена биоэквивалентность двух таблетированных форм карбамазепина на 18 добровольцах (дозировка 400 мг). Образцы плазмы крови анализировали валидированным методом ВЭЖХ-УФ в течение 120 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 0,93693 — 1,10204 и для C_{max} — 0,91045 — 1,12287. По результатам исследования был сделан вывод о биоэквивалентности сравниваемых препаратов карбамазепина.

Ключевые слова: эпилепсия, карбамазепин, нипезам ретард, финлепсин ретард, фармакокинетика, биоэквивалентность

Bioequivalence studies Nipezam retard tablets, 400 mg (JSC «Himfarm», Kazakhstan) and Finlepsin® 400 retard tablets 400 mg («Pliva Krakow, SA Pharmaceutical company», Poland)

Sariev A.K.¹, Abaimov D.A.¹, Tankevich M.V.¹, Budach Y.², Kurilov O.²,
Altinbekov S.A.³, Dzholdygulov G.A.³, Seryakov V.N.³, Altinbekov K.S.³

¹ — FGBNU «Scientific Center of Neurology», Moscow

² — JSC «Himfarm» The Republic of Kazakhstan

³ — State Enterprise «Republican Scientific and Practical Centre of Psychiatry, Psychotherapy and Addiction» MH RK

Abstract. In a single-dose, two-treatment, two-period, two-sequence crossover study with a 1-month washout period was carried out the bioequivalence study of two tablet coated formulation of carbamazepine that given to 18 volunteers in equal doses (400 mg). Drug blood plasma concentrations were determined by validated LC-UV method for 120 hours. There were calculated the followed parameters: AUC_{0-t} , C_{max} , T_{max} , C_{max}/AUC . 90% confidence interval for log-transformed AUC_{0-t} values was 0,93693 — 1,10204 and one for log-transformed C_{max} was 0,91045 — 1,12287, respectively. It was made the conclusion about bioequivalence of compared carbamazepine formulations.

Keywords: epilepsy, carbamazepine, nipezam retard, finlepsin retard, pharmacokinetics, bioequivalence

Автор ответственный за переписку:

Сариев Абрек Куангалиевич — д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории клинической фармакокинетики ФГБУ «Научный центр неврологии» РАМН; тел. +7 (903) 124-82-31; раб. адрес: 125367, г. Москва, Волоколамское шоссе, д. 80; e-mail: sarpharm@mail.ru

Введение

Карбамазепин на сегодняшний день является препаратом первого выбора в терапии фокальных и генерализованных судорожных приступов. По данным большинства исследователей, при криптогенных и

симптоматических формах, связанных с локализацией эпилепсий, карбамазепин в монотерапии эффективен в 70% случаев. Равно эффективным карбамазепин оказывается и при первично генерализованных тонико-клонических припадках с потерей сознания (grand mal) [1, 2, 7, 8]. Помимо достоинств карбамазепина следует

отметить, что карбамазепин отличается довольно узким диапазоном терапевтических концентраций, широкой межиндивидуальной вариативностью фармакокинетических характеристик, для карбамазепина характерны случайные флуктуации уровня действующего вещества в крови. Кроме того, для карбамазепина характерно явление индукции микросомальных ферментов и аутоиндукции. Среди дозозависимых побочных эффектов карбамазепина отмечены: сонливость, диплопия, головокружение, тошнота, нарушения ритма сердца, гипонатриемия и гипокальциемия. Многочисленные исследования позволили определить границы колебания карбамазепина в плазме крови, обозначаемые как рекомендуемые допустимые концентрации (ранее употреблялся синоним — терапевтические): 4–12 мкг/мл [7, 8, 12]. При нахождении значений концентраций внутри обозначенного коридора у большинства больных отмечается сочетание эффективности с хорошей переносимостью. В связи с указанными фармакологическими особенностями карбамазепина именно метод исследования биоэквивалентности представляется оптимальным подходом для определения степени подобия дженерика оригинальному лекарственному препарату.

Таким образом, целью данной работы стало изучение сравнительной биодоступности двух ретардных форм карбамазепина (рис. 1): лекарственного препарата Нипезам ретард (АО «Химфарм», республика Казахстан) и Финлепсин® ретард («Плива Краков, Фармацевтическая компания С.А.», Польша). Оценка биоэквивалентности Нипезама ретард проводилась согласно утверждённому протоколу исследования, посредством изучения его содержания в плазме крови испытуемых.

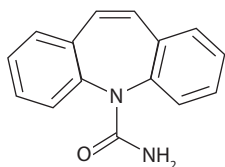


Рис. 1. Структурная химическая формула карбамазепина

Материалы и методы исследования

Исследуемые препараты

В качестве тест-препарата (Тест; Т) использовали Нипезам ретард, таблетки, содержащие 400 мг карбамазепина (производитель — АО «ХИМФАРМ», Республика Казахстан), в качестве препарата-сравнения (Референс; R) использовался препарат Финлепсин® ретард, таблетки, содержащие 400 мг карбамазепина («Плива Краков, Фармацевтическая компания С.А.», Польша).

Дизайн исследования

Дизайн исследования соответствовал утверждённому протоколу исследования (№ KARB BEQ 12-08), а также требованиям «Надлежащей клинической прак-

тики» (GCP) [3, 4, 5, 6, 11]. 18 здоровых волонтеров молодого возраста мужского (№=9) и женского (№=9) пола (возраст — $28,7 \pm 6,6$, массы тела — $65,7 \pm 10,9$) 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 проведён тест на беременность. Общий анализ крови, биохимия и ЭКГ были проведены дважды: до начала исследования и в последний визит (в конце второго этапа исследования). В оба периода исследования участники находились в исследовательском центре непрерывно в течение 120 часов. Период «отмывки» (wash-out) между этапами составлял 30 дней (1 этап — 28.08.2012 г.; 2 этап — 28.09.2012 г.). На обоих этапах исследования отбор образцов крови (5 мл) производился: до введения дозы (0 часов), и в течение 120 часов после введения препарата. Взятие образцов крови для последующего определения содержания карбамазепина в плазме крови осуществлялось в дискретные интервалы времени до (0) и через 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 8,0; 12,0; 24,0; 48,0; 96,0 и 120,0 после приема 400 мг исследуемых препаратов (1 таблетка) согласно схеме рандомизации. Перед каждым отбором крови больной находился в течение 5 минут в лежачем положении. Кровь была взята из локтевой вены (с нулевого фона до 6 часов, путём катетеризации локтевой вены) и с 8 по 120 ч. одноразовыми шприцами в количестве 5–10 мл в стеклянные пробирки с добавлением гепарина. Образцы крови отстаивались в течение 15 минут в условиях комнатной температуры, затем путём центрифугирования (3000 об/мин в течение 10 минут) получали плазму крови. Плазма хранилась при температуре -24°C . Приготовление стандартных растворов карбамазепина осуществлялось в плазме крови.

Аналитический метод

Оценка биоэквивалентности Нипезама ретард проводилась посредством изучения содержания карбамазепина в плазме крови испытуемых по методу *Greiner-Sosanko E.* с модификациями [13]. Образцы плазмы крови были доставлены в Москву авиатранспортом в замороженном виде в специальных транспортировочных контейнерах, заполненных хладагентом вместе с сопроводительной документацией.

Растворители, реактивы и материалы

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

Приготовление рабочих стандартных растворов

В качестве стандартного раствора использовали рабочий стандартный раствор карбамазепина с концентрацией 1 мг/мл в метаноле. Из данного раствора методом последовательных разведений готовили рабочие стандартные растворы карбамазепина с концентрациями 20; 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,312 и 0,156 мкг/мл в метаноле. Все приготовленные растворы хранили при 4°C. Приготовленные стандартные растворы карбамазепина были стабильны в течение всего периода исследования, начиная с момента разработки методики и до последнего дня анализа биологических образцов.

Приготовление модельных растворов в плазме крови

Модельные растворы в плазме крови готовили из рабочих стандартных растворов с концентрациями 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 и 1,56 мкг/мл методом внесения 100 мкл аликвоты последних в 900 мкл интактной плазмы крови с таким расчётом, чтобы конечная концентрация карбамазепина в плазме составляла 20; 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,312 и 0,156 мкг/мл.

Приготовление образцов для анализа

Для выделения карбамазепина из плазмы крови и очистки экстракта использовали метод жидкостной экстракции. Количественное определение исследуемого препарата проводили, используя метод внутреннего стандарта. В качестве внутреннего стандарта использовали раствор нордазепам с концентрацией 100 мкг/мл в метаноле. Аликвоту данного раствора объёмом 100 мкл вносили в каждый из исследуемых образцов плазмы карбамазепина (в том числе и в модельные калибровочные образцы). Для повышения процента извлечения карбамазепина к 1 мл плазмы крови добавляли 0,5 мкл 2 М гидроксида натрия и тщательно перемешивали. Затем в экстракционную пробирку добавляли 7,5 мл диэтилового эфира и встряхивали на вортес-миксере в течение 5 минут при 3000 г.р.м., а затем 5 минут на орбитальном шейкере при 250 г.р.м. Далее пробирки центрифугировали в течение 10 минут при 3000 г. Верхний органический слой аккуратно декантировали, переносили в чистые пробирки и упаривали в вакуумном центрифужном концентраторе при температуре 45°C. Сухой остаток растворяли в 1 мл метанола и вводили в петлю хроматографа в объёме 50 мкл. Определение концентрации карбамазепина проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии со спектрофотометрическим детектированием.

Хроматографический анализ

Анализ проводили на жидкостном хроматографе «System Gold» фирмы Beckman Coulter, оборудованном градиентным насосом постоянного давления

System Gold® 127 и спектрофотометрическим детектором System Gold® 166. Детектирование проводили при длине волны спектрофотометра $\lambda = 270$ нм. Разделение осуществляли на хроматографической колонке Luna 5u C₁₈ 100A фирмы Phenomenex, США (250×4,6 мм; 5 мкм). Температура разделения 30°C. Элюирование осуществляли в изократическом режиме. Подвижная фаза состояла из ацетонитрила и 30 мМ фосфатного буфера (pH 3,7), взятых в соотношении 50%:50% (v/v) соответственно. Перед хроматографированием подвижную фазу фильтровали и дегазировали на ультразвуковой бане. Скорость потока подвижной фазы — 1,75 мл/мин. Объём пробы — 50 мкл. Время анализа единичного образца составляло 8±0,5 минут. Время удерживания аналита t_R в среднем составляло 3,4±0,1 мин., время удерживания внутреннего стандарта — 6,0±0,1 мин. На рис. 2а, 2б и 2в представлены хроматограммы экстрактов бланковой (интактной) плазмы крови, плазмы, содержащей добавленный карбамазепин в концентрации 5 мкг/мл и хроматограмма экстракта плазмы крови добровольца, соответственно.

Количественный анализ

Количественное определение карбамазепина проводили методом внутреннего стандарта с использованием программного обеспечения Мультихром 1,5Х фирмы ЗАО «Амперсэнд». Калибровочную кривую получали в результате анализа проб плазмы, содержащих добавки известных количеств стандарта определяемого соединения, а также раствор внутреннего стандарта, взятый в равных количествах для каждого образца. Установлено, что в диапазоне концентраций 0,1–20 мкг/мл калибровочная кривая линейна (рис. 2). Для построения калибровочной кривой и расчёта процента извлечения анализируемого соединения из биоматериала готовили рабочий стандартный раствор карбамазепина в метаноле — 1 мг/мл. Из него далее методом последовательных разведений готовили серию стандартных растворов карбамазепина в метаноле с концентрациями: 20; 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,312 и 0,156 мкг/мл. К каждому из растворов добавляли равные объёмы (100 мкл) внутреннего стандарта, при этом концентрация последнего в полученных калибровочных образцах была одинаковой и составляла 10 мкг/мл. Модельные растворы карбамазепина в плазме крови (для построения внутренней калибровочной кривой) готовили в аналогичных концентрациях. Калибровочная зависимость (рис. 3) была линейной в изучаемом диапазоне концентраций. График описывался линейным уравнением $Y = 0,224585 \cdot X$, где Y — концентрация карбамазепина, нг/мл; X — отношение площадей пиков аналита (карбамазепин) и внутреннего стандарта (нордазепам). Коэффициент корреляции составил 0,9993, что соответствует хорошей аппроксимации [10]. Предел количественного обнаружения в плазме составил 0,156 мкг/мл.

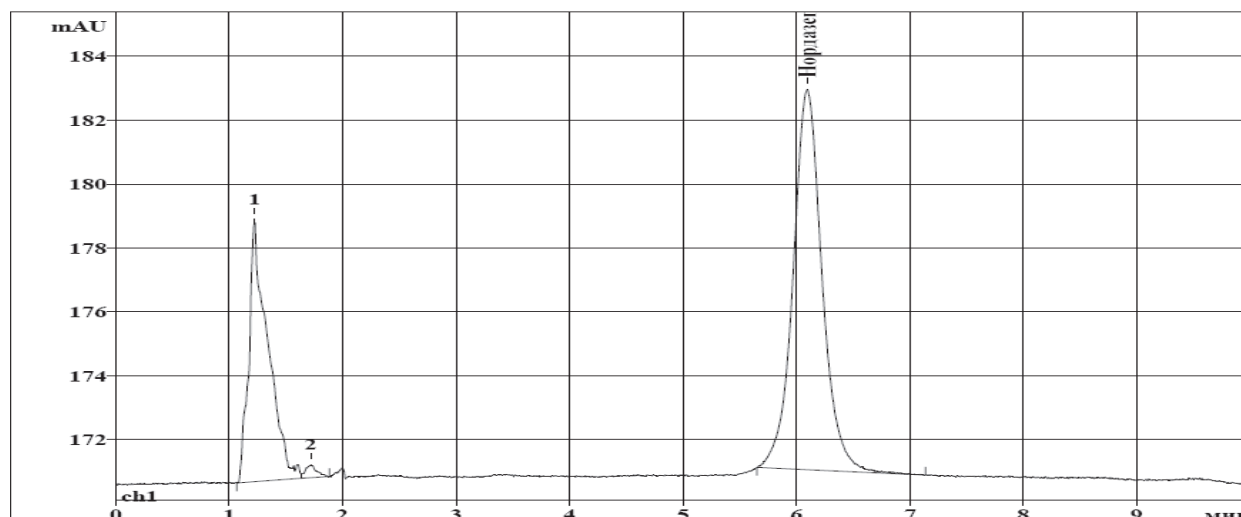


Рис. 2а. Хроматограмма интактной плазмы крови

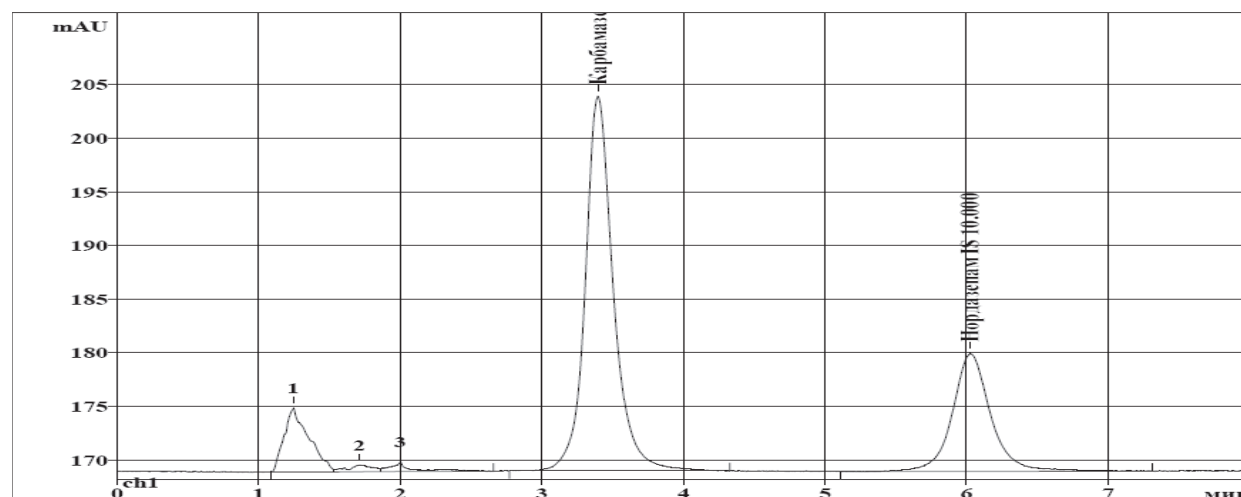


Рис. 2в. Хроматограмма экстракта плазмы крови добровольца. Содержание карбамазепина — 2 мкг/мл. Пик с RT 3,4 мин — пик карбамазепина; пик с RT 6,0 мин — пик внутреннего стандарта (нордазепам)

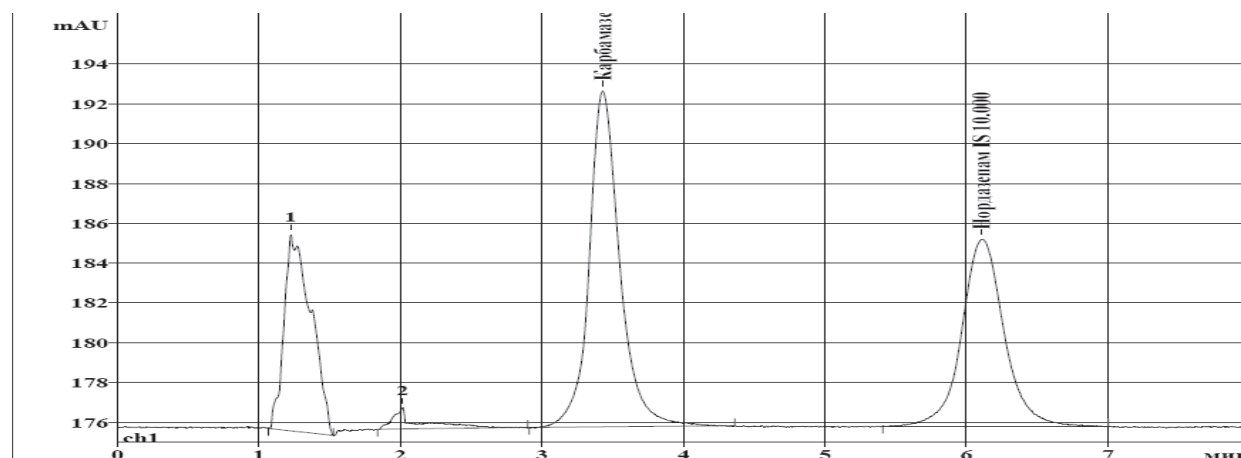


Рис. 2б. Хроматограмма экстракта плазмы крови с добавленной концентрацией карбамазепина 5 мкг/мл. Пик с RT 3,4 мин — пик карбамазепина; пик с RT 6,0 мин — пик внутреннего стандарта (нордазепам)



Рис. 3. Калибровочная кривая зависимости концентрации карбамазепина от площади хроматографических пиков

Прецизионность и правильность методики оценивали по трём концентрационным уровням рабочих стандартных растворов карбамазепина после 6 определений каждого уровня. Полученные данные представлены в табл. 1 и 2.

Точность и воспроизводимость 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.

Таблица 1

Точность определения карбамазепина в плазме крови в течение рабочего дня

Концентрация добавленная (мкг/мл)	0,312	2,5	20,0
Концентрация найденная (мкг/мл)	0,31	2,60	19,79
	0,31	2,55	19,45
	0,31	2,63	19,83
	0,31	2,50	19,54
	0,32	2,62	19,12
	0,31	2,51	19,33
$\bar{x}$	0,31	2,57	19,51
SD	0,00	0,06	0,27
%CV	1,21	2,20	1,40
%dev	-0,64	2,24	-2,90

Метрологические характеристики разработанной методики представлены в табл. 2. Относительная ошибка определения карбамазепина не превышала 10%.

Статистическая обработка полученных результатов

Полученные экспериментальные данные подвергнуты математической статистической обработке с помощью программы «Statistica v.6.0». В табл. 3 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 проведён 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. 4 представлены результаты работы анализа вариации ANOVA для различных показателей биоэквивалентности ($\ln AUC_{0-t}$, $\ln C_{max}$). Условием применения является предположение о нормальном распределении изучаемого показателя. Нулевая гипотеза: между средними значениями показателей биоэквивалентности тест- и референс-препарата отсутствуют статистически значимые различия. В качестве источников вариации изучаются межиндивидуальные различия (испытуемые), последовательность получения препаратов и различия между препаратами. Полученные значения сравниваются со значением остаточной вариации с учётом числа степеней свободы (DF). Результаты сравнения

отражены в столбце F табл. 5. Для установления статистически значимых различий между средними значениями показателя биоэквивалентности сравниваемых препаратов значение F для строки «препарат» должно 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 $0,8 < \mu_T/\mu_R < 1,25$ 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 [8].

Метрологические характеристики методики определения карбамазепина в плазме крови

Таблица 2

Взято	Найдено (мкг/мл)					$\bar{x}$	SD	$S_{\bar{x}}$	$\Delta \bar{x}$	$\varepsilon\%$
0,312	0,309	0,307	0,310	0,315	0,310	0,310	0,003	0,002	0,005	1,591
2,5	2,542	2,622	2,494	2,615	2,505	2,556	0,060	0,050	0,129	5,060
20,0	19,418	19,796	19,507	19,082	19,290	19,419	0,265	0,186	0,479	2,466

Фармакокинетические параметры карбамазепината у добровольцев после однократного приёма 20 мг Нипезам ретарда (Т) и Финлепсин® ретарда (R)

Таблица 3

	AUC_{0-t} (мкг/мл×ч)		C_{max} (мкг/мл)		T_{max} (ч)		C_{max}/AUC (ч ⁻¹)	
	T	R	T	R	T	R	T	R
$\bar{x}$	259,47	258,01	3,79	3,79	16,94	16,22	0,0148	0,0149
SD	76,12	77,10	1,00	0,98	7,58	6,50	0,0019	0,0024
$S_{\bar{x}}$	17,95	18,18	0,24	0,23	1,79	1,53	0,0005	0,0006
C.V.%	29,3	29,9	26,3	25,8	44,7	40,1	13,2	16,4
Размах	289,02	302,07	3,25	4,06	19,0	16,0	0,00726	0,00787

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

Таблица 4

Параметр	Нижнее значение	Среднее значение	Верхнее значение
AUC_{0-t}	0,93693	1,0379	1,10204
C_{max}	0,91045	1,0446	1,12287

Результаты и их обсуждение

На рис. 4 — представлены усреднённые фармакокинетические кривые карбамазепина в плазме крови добровольцев после однократного приёма таблеток Нипезам ретард (Т) и Финлепсин® ретард (R), где анализируемое лекарственное вещество определяется на протяжении 120 часов.

Сравнительный анализ основных фармакокинетических параметров (табл. 3) карбамазепина после однократного прима 400 мг таблеток Нипезам ретард и Финлепсин® ретард показал, что изучаемые препараты почти с одинаковой скоростью всасываются из желудочно-кишечного тракта (параметр C_{max}/AUC_{0-t} — для Т составил $0,0148 \pm 0,019$; для R — $0,0149 \pm 0,024$ ч⁻¹; $\bar{x} \pm SD$). Время достижения максимальной концентрации (T_{max}) составило в среднем для Т — $16,94 \pm 7,58$ и для R — $16,22 \pm 6,50$ час, соответственно. При этом средняя максимальная концентрация карбамазепина, определяемая в плазме крови добровольцев (C_{max}), составила для препарата Нипезам ретард — $3,79 \pm 1,00$ мкг/мл и для Финлепсин® ретард — $3,79 \pm 0,98$ 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 Нипезам ретард составил 289,02 и для препарата Финлепсин® ретард — 302,07 мкг/мл×ч). Среднее значение AUC_{0-t} для тест-препарата составило $259,47 \pm 76,12$ и для референс-препарата — $258,01 \pm 77,10$ мкг/мл×ч. Относительная биодоступность

таблеток Нипезам ретард по отношению к таблеткам Финлепсин® ретард, определяемая отношением соответствующих значений AUC_{0-t} , составила в среднем $1,0379 \pm 0,268$ (усреднённые данные на основании точечных индивидуальных оценок). Доверительный интервал для логарифмически преобразованных значений AUC_{0-t} составил $0,93693 - 1,10204$. Степень биодоступности, определяемая отношением соответствующих значений C_{max} , составила $1,0446 \pm 0,219$, а доверительный интервал для логарифмически преобразованных значений C_{max} — $0,91045 - 1,12287$ (табл. 4). Полученные доверительные интервалы лежат, в установленных «Рекомендациями», пределах, что говорит в пользу биоэквивалентности исследуемых препаратов [5, 6].

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. 5).

Следует подчеркнуть, что для установления статистически значимых различий между средними значениями показателя биоэквивалентности сравниваемых препаратов значение F для строки «препарат» должно превзойти соответствующее табличное значение (таблица критерия Фишера для числа степеней свободы (1, n-2) и выбранного уровня значимости α). В нашем случае, для 18 пациентов табличное значение F критическое равно 4,49 для $P=0,95$. Рассчитанное значение F не превосходит табличное значение (для параметра $\ln AUC_{0-t}$ $F = 0,11859$ и для $\ln C_{max}$ $F = 0,003379$). Следовательно, нулевая гипотеза об отсут-

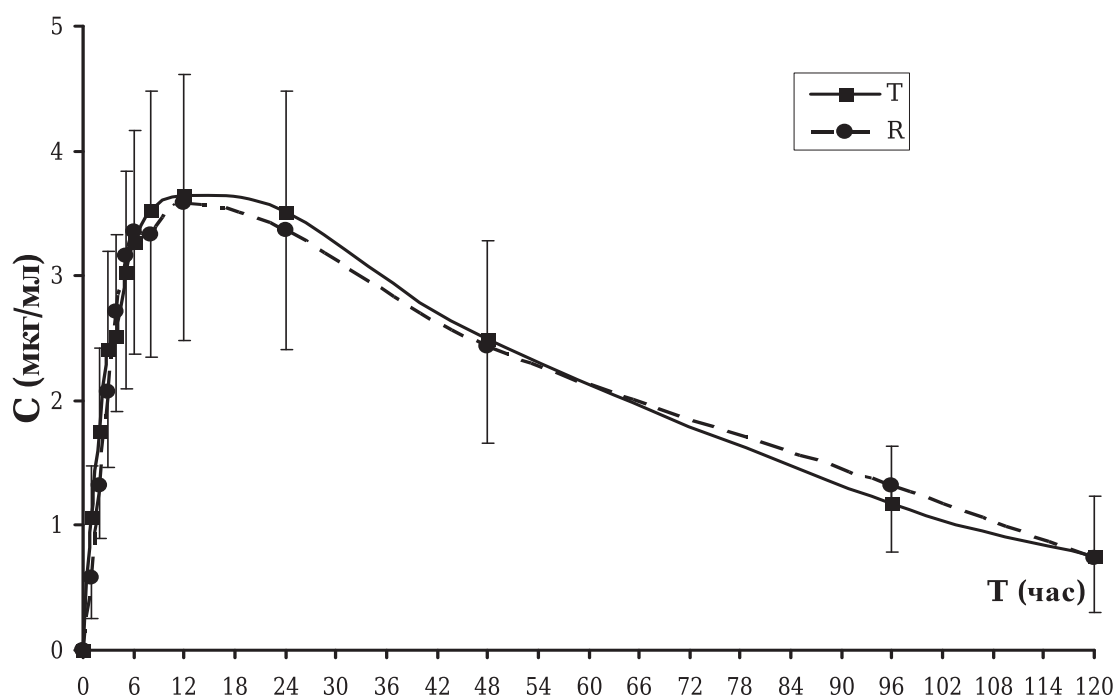


Рис. 4. Усреднённые кинетические кривые карбамазепина в плазме крови добровольцев после однократного приёма таблеток НИПЕЗАМА РЕТАРД (Т) и таблеток ФИНЛЕПСИН® 400 РЕТАРД (R): (n=18; $\pm SD$)

Таблица 5

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

$\ln AUC_{0-t}$

Источник вариации	SS	DF	MS	F
Препарат	0,002	1	0,002	0,11859
Последовательность	0,003	1	0,003	0,15016
Испытуемые	3,143	17	0,185	9,50894
Остаточная вариация	0,311	16	0,019	-
Общая вариация	3,459	35	-	-

$\ln C_{max}$

Источник вариации	SS	DF	MS	F
Препарат	0,001	1	0,001	0,03379
Последовательность	0,007	1	0,007	0,20364
Испытуемые	2,779	17	0,163	5,03662
Остаточная вариация	0,519	16	0,032	-
Общая вариация	3,306	35	-	-

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

ствии значимых различий между средними значениями данного показателя биоэквивалентности подтверждается, а различия не признаются статистически значимыми на соответствующем уровне значимости. Из результатов исследования относительной биологической доступности двух препаратов следует, что исследуемый препарат Нипезам ретард, таблетки 400 мг, производства АО «ХИМФАРМ», Республика Казахстан является биоэквивалентным препарату сравнения Финлепсин® ретард, таблетки 400 мг, производства «Плива Краков, Фармацевтическая компания С.А.», Польша.

Выводы

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

Литература

1. Зенков Л.Р. Карбамазепин в лечении эпилепсии. // РМЖ. 2000; Том 8: 13-14.
2. Мирошниченко И.И. Рациональное дозирование и мониторинг лекарственных средств. М.: ООО «Издательство «Медицинское информационное агентство», 2011.
3. Надлежащая клиническая практика, основные положения, СТ РК 1616-2006, Астана, 2006; 68.
4. Национальный стандарт Российской Федерации. Надлежащая клиническая практика, ГОСТ Р.52379-2005, Москва, 2005; 26.
5. Оценка биоэквивалентности лекарственных средств. Москва, 2008; 32.
6. Проведение надлежащих исследований биоэквивалентности лекарственных средств в республике Казахстан, Астана, под ред. Сариева А.К., 2007; 44.
7. Сариев А. К., Суслина З.А., Абаимов Д.А., Носкова Т.Ю., Сейфулла Р.Д., Шведков В.В., Прохоров Д.И., Ширяева М.В., Мота Л.А. Новые методы в оптимизации фармакотерапии эпилепсии: опыт внедрения байесовского фармакокинетического моделирования. // Эпилепсия и пароксизмальные состояния, 2012, т.4, №2, С.40-47.
8. Сергиенко В.И., Джеллифф Р., Бондарева И.Б. Прикладная фармакокинетика: основные положения и клиническое применение. Москва, Издательство РАМН, 2003; 208.
9. 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 г. № 1, стр. 43-49.
10. Сычёв К.С. Практическое руководство по жидкостной хроматографии. 2010; с. 216.
11. Handbook For Good Clinical Research Practice (GCP): guidance for implementation, Printed in France, 2005; 132
12. Hallworth M., Watson I. Therapeutic drug monitoring and laboratory medicine: 130-132 Tooley St, London, 2008.
13. Greiner-Sosanko E., Lower D.R., Virji M.A., Krasowski M.D. Simultaneous determination of lamotrigine, zonisamide, and carbamazepine in human plasma by high-performance liquid chromatography. // Biomed Chromatogr. 2007; 21: 225-228.

Исследование сравнительной фармакокинетики и биоэквивалентности препаратов Кардиоприл таблетки, 20 мг (АО «Химфарм», Республика Казахстан) и Моноприл® таблетки, 20 мг («Бристол-Майерс Сквибб С.Р.Л.», Италия)

Сариев А.К.¹, Абаимов Д.А.¹, Танкевич М.В.¹, Алтынбеков С.А.²,
Джолдыгулов Г.А.², Серяков В.Н.², Будах Я.³, Курилов О.³

¹ — ФГБНУ «Научный центр неврологии», г. Москва

² — РГКП «Республиканский научно-практический центр психиатрии, психотерапии и наркологии» МЗ РК

³ — АО «Химфарм», Республика Казахстан

Резюме. В рамках перекрёстного, однократного, открытого, рандомизированного исследования с однонедельным периодом отмычки, с двумя последовательностями была изучена биоэквивалентность двух таблетированных форм фозиноприла на 18 добровольцах (дозировка 20 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 0,9393 — 1,1473 и для C_{max} — 0,8861 — 1,066. По результатам исследования был сделан вывод о биоэквивалентности сравниваемых препаратов фозиноприла.

Ключевые слова: кардиоприл, моноприл, фозиноприл, фозиноприлат, фармакокинетика, биоэквивалентность

A comparative study of pharmacokinetics and bioequivalence of Cardipril tablets 20 mg (JSC «Himfarm», Kazakhstan) and Monopril® tablets of 20 mg («Bristol-Myers Squibb SRL», Italy)

Sariev A.K.¹, Abaimov D.A.¹, Tankevich M.V.¹, Altinbekov S.A.²,

Dzholdygulov G.A.², Seryakov V.N.², Budach Y.³, Kurilov O.³

¹ — FGBNU «Scientific Center of Neurology», Moscow

² — State Enterprise «Republican Scientific and Practical Centre of Psychiatry, Psychotherapy and Addiction» MH RK

³ — JSC «Himfarm» The Republic of Kazakhstan

Abstract. In a single-dose, two-treatment, two-period, two-sequence crossover study with a 1-week washout period was carry out the bioequivalence study of two tablet coated formulation of fosinopril that given to 18 volunteers in equal doses (20 mg). Drug blood plasma concentrations were determined by validated LC-MS method for 48 hours. There were calculated the followed parameters: $AUC_{0-t} C_{max} t_{max} C_{max}/AUC$. 90% confidence interval for log-transformed AUC_{0-t} values was 0,9393 — 1,1473 and one for log-transformed C_{max} was 0,8861 — 1,066, respectively. It was made the conclusion about bioequivalence of compared fosinopril formulations.

Keywords: cardipril, monopril, fosinopril, fozinoprilat, pharmacokinetics, bioequivalence

Автор ответственный за переписку:

Сариев Абрек Куангалиевич — д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории клинической фармакокинетики ФГБУ «Научный центр неврологии» РАМН; тел. +7 (903) 124-82-31; раб. адрес: 125367, г. Москва, Волоколамское шоссе, д. 80; e-mail: sarpharm@mail.ru

Введение

Одним из представителей третьего поколения ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента (АПФ) является фозиноприл, который является пролекарством и действует после всасывания и

трансформации в активный метаболит — фозиноприлат (рис. 1), который циркулирует в связанном с белками плазмы крови (95-98%) состоянии. Фозиноприл трансформируется в активный метаболит в печени и в слизистой желудочно-кишечного тракта. Широкая распространённость антигипертензивных

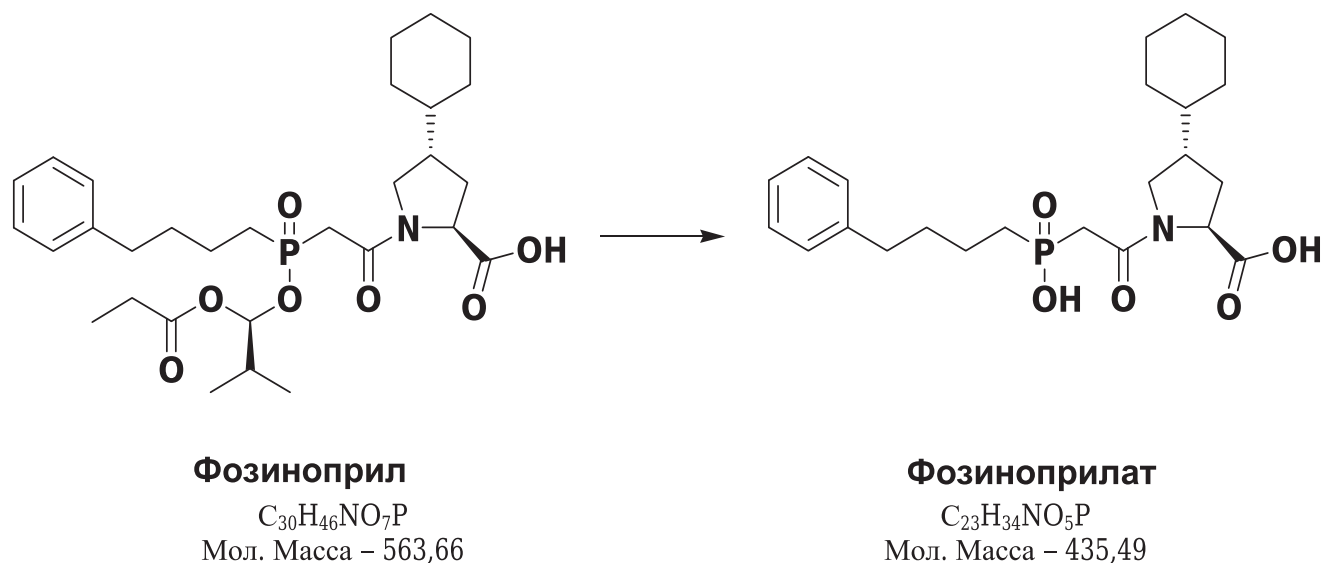


Рис. 1. Структурная химическая формула фозиноприла и активного его метаболита фозиноприлата

средств и дороговизна оригинальных препаратов из группы ингибиторов АПФ обуславливает активный поиск возможностей перевода пациентов на более дешёвые и экономически выгодные варианты терапии: замена препарата внутри одного класса или между классами, замена оригинального препарата на воспроизведённый и т.д. Известно, что в клинической практике даже те препараты, которые содержат одно и то же действующее активное вещество, но разработанные различными фармкомпаниями, могут существенно отличаться по фармакологической активности. Нередко это обусловлено различием ингредиентного состава вспомогательных веществ, содержащихся в твёрдой лекарственной форме [1]. Во всём мире для подтверждения одинаковой терапевтической активности воспроизводимых препаратов проводятся исследования биоэквивалентности. При этом в качестве основного критерия выбирается достаточно «близкая» биодоступность изучаемых лекарственных средств [4, 5, 9]. В этой связи, целью настоящей работы являлось исследование биоэквивалентности воспроизведённого лекарственного препарата Кардиоприл (Т — АО «Химфарм», Республика Казахстан) в сравнении с инноватором Моноприл (R — Бристол-Майерс Сквибб С.р.Л., Италия).

Материалы и методы исследования

Исследуемые препараты

В качестве тест-препарата (Тест; Т) использовали Кардиоприл, таблетки, содержащие 20 мг фозиноприла (производитель — АО «ХИМФАРМ», Республика Казахстан), в качестве препарата-сравнения (Референс; R) использовался препарат Моноприл, таблетки, содержащие 20 мг фозиноприла («Бристол-Майерс Сквибб С.р.Л.», Италия).

Дизайн исследования

Дизайн исследования соответствовал утверждённому протоколу исследования (№ ВEq-Fos-07-2012 от 15.05.2012 г.), а также требованиям «Надлежащей клинической практики» (GCP) [2-5, 9]. 18 здоровых волонтеров молодого возраста мужского (№=6) и женского (№=12) пола (возраст — $30,8 \pm 5,9$, массы тела — $67,1 \pm 8,5$) 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 проведён тест на беременность. Общий анализ крови, биохимия и ЭКГ были проведены дважды: до начала исследования и в последний визит (в конце второго этапа исследования). В оба периода исследования участники находились в исследовательском центре непрерывно в течение 48 часов. Период «отмывки» (wash-out) между этапами составлял 7 дней (1 этап — 26.06.2012 г.; 2 этап — 03.07.2012 г.). На обоих этапах исследования отбор образцов крови (5 мл) производился: до введения дозы (0 часов), и в течение 48 часов после введения препарата. Взятие образцов крови для последующего определения содержания активного метаболита фозиноприла — фозиноприлата в плазме крови осуществлялось в дискретные интервалы времени 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 4,0; 8,0; 12,0; 24,0; 36,0 и 48,0 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 6 часов, путём катетеризации локтевой вены) и с 12 по 48 ч одноразовыми шприцами в количестве 5-10 мл в стеклянные пробирки с добавлени-

ем гепарина. Образцы крови отстаивались в течение 15 минут в условиях комнатной температуры, затем путём центрифугирования (3000 об/мин в течение 10 минут) получали плазму крови. Плазма хранилась при температуре -24°C . Приготовление стандартных растворов фозиноприлата осуществлялось в плазме крови.

Аналитический метод

Для количественного определения фозиноприлата 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

К 1 мл плазмы крови добавляли 200 мкл 1 М соляной кислоты и перемешивали на вортекс-миксере. К полученной смеси долили 5 мл диэтилового эфира и дихлорметана в соотношении 3:1 соответственно. Полученную смесь встряхивали на вортекс-миксере в течение 3 минут. После этого пробирки со смесью центрифугировали в течение 5 минут при 3000 g до полного разделения слоёв. Надосадочный органический слой осторожно декантировали, переносили в упарительную пробирку и упаривали под вакуумом при температуре 60°C . Сухой остаток растворяли в 200 мкл метанола, и полученный раствор использовали для анализа. Объём образца вводимого в петлю инжектора прибора составлял 10 мкл.

Определение концентрации фозиноприлата проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием.

Хромато-масс-спектрометрический анализ

Анализ проводили на жидкостном хроматографе «Surveyor» производства «Thermo Fisher Scientific» (США), оснащённом насосом «Finnigan Surveyor LC Pump Plus», автосамплером «Finnigan Surveyor AS Plus» с колоночным термостатом и масс-спектрометрическим детектором «LCQ Fleet MS» (квадрупольная ионная ловушка). Масс-спектрометр работал в режиме регистрации ионов, положительно заряженных электроспреем (ESI), создаваемым напряжением в 5 кВ. Скорость потока газа-небулайзера (азота): 4 л/мин, давление на распылителе — 100 psi. Температура интерфейса капилляра составляла 300°C , температура нагревателя — 180°C . Амплитуда возбуждения на концевых электродах ловушки 0,1 В. Детектирование проводилось в режиме полного сканирования MC/MC — Full Scan ms^2 , в диапазоне m/z 120-800. Количественное определение проводили по выбранному дочернему иону (m/z 390,1), образующемуся в результате распада молекулярного иона фозиноприлата (m/z 436,2) при нормализованной энергии соударений 70 eV (масс-спектр второго порядка для фозиноприлата представлен на рис. 2а). В качестве демпфирующего газа в ионной ловушке использовался гелий. Данные обрабатывались с помощью Xcalibur 2.1 w/Foundation 1.0.1.

Разделение осуществляли на хроматографической колонке Luna C18 Phenomenex, 5 мкм, $4,6 \times 250$ мм. Температура разделения 25°C . Элюирование осуществляли в изократическом режиме. 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 30%:70% соответственно. Скорость потока подвижной фазы 0,7 мл/мин. Объём пробы 10 мкл. Время анализа единичного образца составляло $6 \pm 0,5$ минут. На рис. 2б, 2в и 2г представлены хроматограммы экстрактов бланковой (интактной) плазмы крови, плазмы, содержащей фозиноприлат в концентрации 31,2 и 125 нг/мл соответственно.

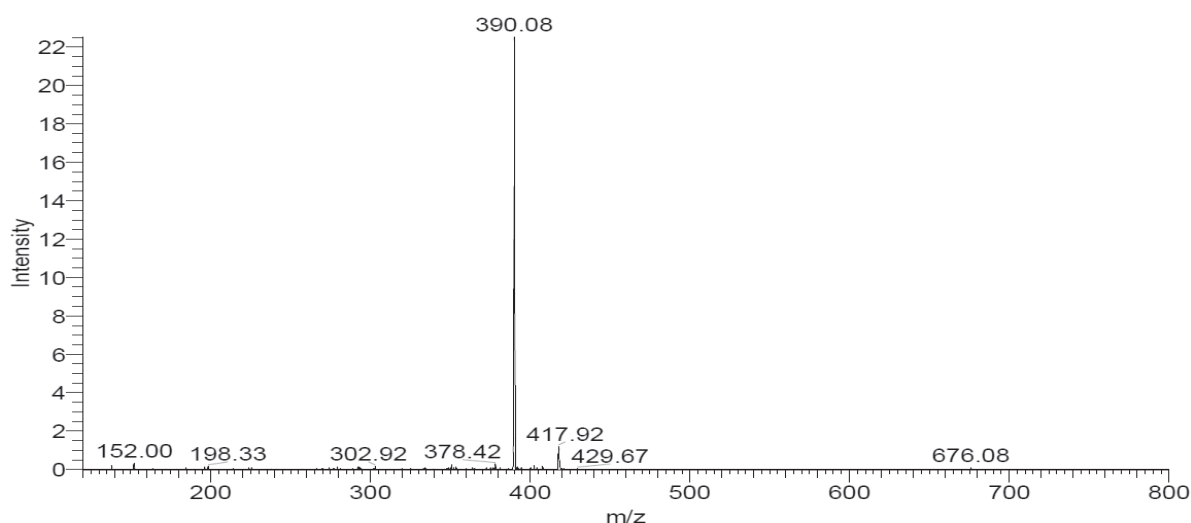


Рис. 2а. Масс-спектр фозиноприлата

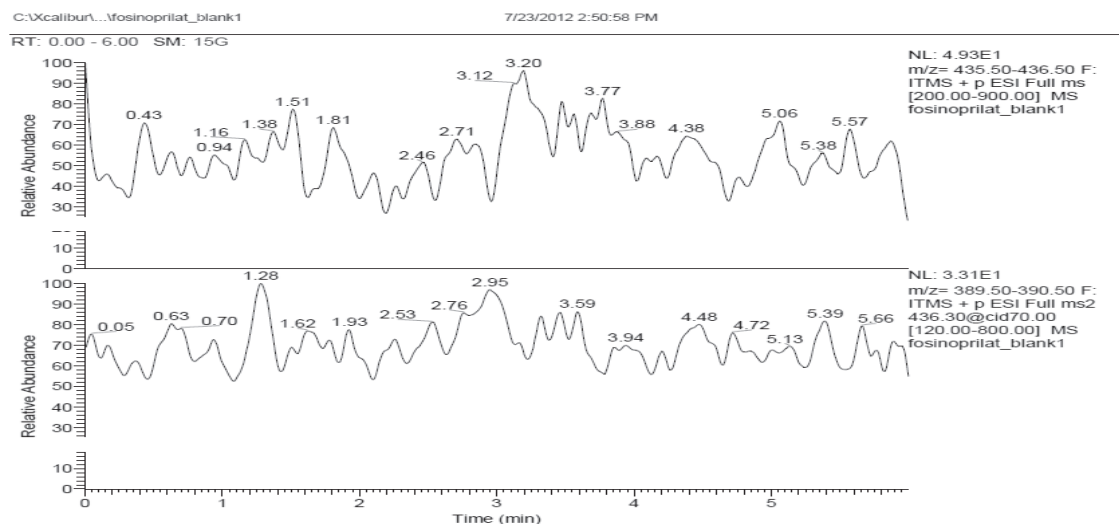


Рис. 26. Хроматограмма интактной плазмы крови

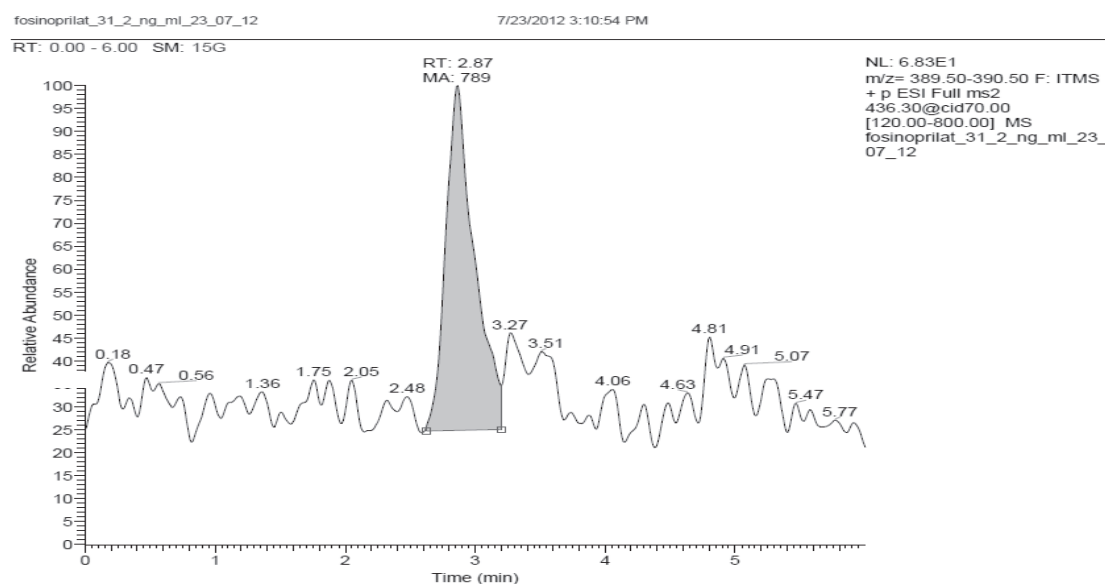


Рис. 2в. Хроматограмма экстракта плазмы крови, содержащей 31,2 нг/мл фозиноприлата. Пик с RT 2,87 мин — пик фозиноприлата

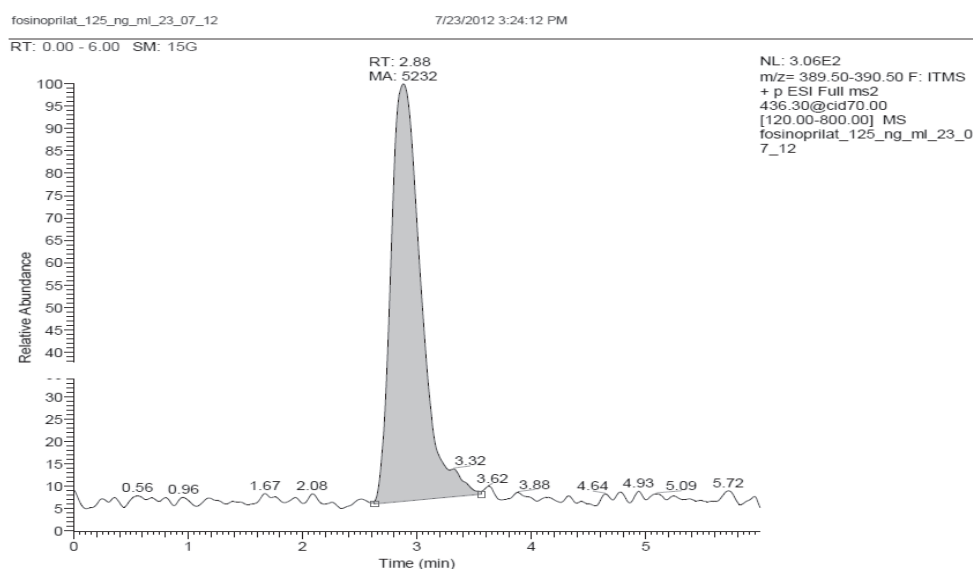


Рис. 2г. Хроматограмма экстракта плазмы крови, содержащей 125 нг/мл фозиноприлата. Пик с RT 2,07 мин — пик фозиноприлата

Количественный анализ

Количественный анализ проводили методом абсолютной калибровки с использованием программного обеспечения «Quan Browser» компании «Termo Fisher Scientific». Калибровочную кривую получали в результате анализа проб плазмы с добавками известных количеств стандарта определяемого соединения. Для построения калибровочной кривой и расчёта процента извлечения анализируемого соединения из биоматериала готовили рабочий стандартный раствор фозиноприлата в метаноле — 1 мг/мл. Из него далее методом последовательных разведений готовили серию стандартных растворов фозиноприлата в 50%-ном водном метаноле с концентрациями: 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,2 и 15,6 нг/мл. Модельные растворы фозиноприлата в плазме крови (для построения внутренней калибровочной кривой) готовили в аналогичных концентрациях. Калибровочная зависимость (рис. 3) была линейной в изучаемом диапазоне концентраций. График описывался линейным уравнением $Y = 63,4706 \times X$, где Y — площадь пика в условных единицах интегрирования; X — концентрация фозиноприлата, нг/мл. Концентрация фозиноприлата рассчитывалась по формуле: $C_{\text{fosinoprilate}} = 0,015755 \times S$, где $C_{\text{fosinoprilate}}$ — концентрация фозиноприлата (нг/мл), S — площадь пика в условных единицах интегрирования. Коэффициент корреляции составил 0,9974, что соответствует удовлетворительной аппроксимации [8]. Предел количественного обнаружения в плазме составил 15,6 нг/мл.

Прецизионность и правильность методики оценивали по трём концентрационным уровням рабочих стандартных растворов фозиноприлата после 6 определений каждого уровня. Полученные данные представлены в табл. 1.1 и 1.2. Для концентрации 31,25 нг/мл ошибка метода не превышала 15%.

Точность и воспроизводимость 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:

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

где $\bar{x}$ — среднее арифметическое значение полученных концентраций;
 $\bar{\mu}$ — 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 (по 6 определений до исследования, во время исследования и после исследования).

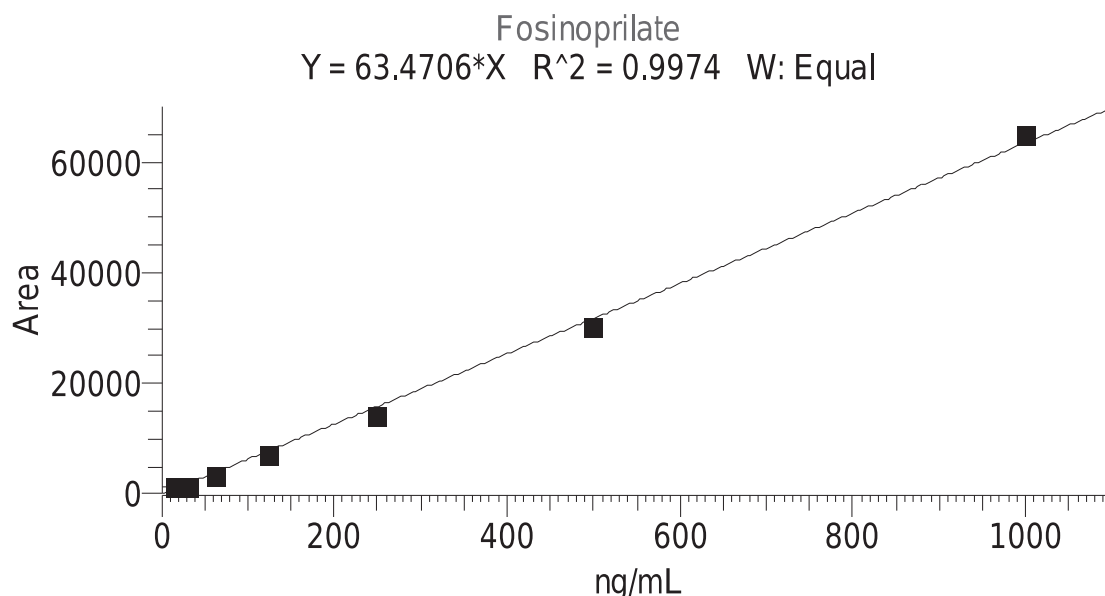


Рис. 3. Калибровочная кривая зависимости концентрации фозиноприлата от площади хроматографических пиков

Таблица 1.1

Точность количественного определения фозиноприлата в течение рабочего дня:

Концентрация нг/мл	%C.V.	%dev	n
31,25	10,79	0,94	6
125,00	3,78	0,77	6
500,00	4,42	4,84	6
Предел количественного определения — 15,6 нг/мл			

Для 31,25 нг/мл средняя точность составила 10,79% C.V. и 0,94% dev. Остальные пробы с концентрациями 125 и 500 нг/мл имели точность от 3,78 до 4,42 %C.V. Воспроизводимость колебалась от 0,77 до 4,84% dev. Результаты представлены в таблице 1.1. Метрологические характеристики разработанной методики представлены в табл. 1.2. Относительная ошибка определения фозиноприлата не превышала 10%.

Степень извлечения: Расчёт степени извлечения фозиноприлата проводили с использованием площадей пиков водно-метанольных растворов стандарта препарата и площадей пиков, полученных при хроматографировании экстрактов образцов бланковой плазмы крови (плацебо) с добавкой препарата. В 1,0 мл бланковой плазмы вносилась добавка стандартных растворов фозиноприлата с таким расчётом, чтобы конечная концентрация препарата в плазме составляла 31;25, 125 и 500 нг/мл. Эти растворы тщательно перемешивались на вибромиксере типа «Вортекс». Затем к пробам добавлялась 1 М соляная кислота в количестве 200 мкл. К подкисленной плазме крови доливали экстракционную смесь — эфир:дихлорметан (3:1) и встряхивали на вортексе в течение 3 минут. Затем смесь центрифугировали при 3000 г.р.м. для разделения слоёв. Верхний органический надосадочный слой осторожно декантировали и переносили в упарительную пробирку. Супернатант упаривали досуха под вакуумом при 60°C, сухой остаток растворяли в 200 мкл 50%-ного водного метанола. 10 мкл полученного раствора вводили в хро-

матограф. Данную процедуру экстракции фозиноприлата с концентрациями 31,25; 125 и 500 нг/мл в плазме повторили трёхкратно для каждой из концентраций. Полученные значения степени извлечения для трёх параллельных экспериментов для концентрации фозиноприлата 31,25; 125 и 500 нг/мл в плазме представлены в таблице 1.3.

Было установлено, что степень экстракции фозиноприлата (среднее из 3-х определений на точку, в %, %) в данных условиях составила: $82,5 \pm 3,6\%$. (см. табл. 1.3).

Содержание фозиноприлата в анализируемых образцах определяли по формуле:

$$C_x = \frac{C \times V_1}{V_2}$$

где C — концентрация вещества, найденная по калибровочной кривой;

V_1 — объём растворителя сухого остатка;

V_2 — объём плазмы крови взятый для анализа.

**Статистическая обработка
полученных результатов**

Полученные экспериментальные данные подвергнуты математической статистической обработке с помощью программы «Statistica v.6.0». В табл. 2. 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 проведён 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 использо-

Таблица 1.2

Метрологические характеристики методики определения фозиноприлата в плазме крови

Взято	Найдено (мкг/мл)						$\bar{x}$	SD	$S_{\bar{x}}$	$\Delta \bar{x}$	$\varepsilon\%$
31,25	33,62	30,46	33,95	32,97	32,52	32,05	32,59	1,26	0,92	2,36	7,23
125,00	124,81	123,60	127,93	121,39	123,04	121,88	123,78	2,38	1,73	4,44	3,59
500,00	499,7	523,8	493,1	485,8	510,2	496,2	501,5	13,57	10,36	26,61	5,31

Таблица 1.3

Определение степени экстракции фозиноприлата из плазмы крови

Взято (нг/мл)	Найдено (%)			Среднее значение	Стандартная ошибка	Стандартное отклонение
31,2	83,3	85,7	78,6	82,5	2,6	3,6
125,0	78,2	80,1	84,5	80,9	1,9	3,2
500,0	76,9	81,4	78,7	79,0	1,3	2,3
				82,5	2,3	3,6

ванием методов параметрической статистики. В табл. 3 представлены результаты работы анализа вариации ANOVA для различных показателей биоэквивалентности ($\ln AUC_{0-t}$, $\ln C_{\max}$). Условием применения является предположение о нормальном распределении изучаемого показателя. Нулевая гипотеза: между средними значениями показателей биоэквивалентности тест- и референс-препарата отсутствуют статистически значимые различия. В качестве источников вариации изучаются межиндивидуальные различия (испытуемые), последовательность получения препаратов и различия между препаратами. Полученные значения сравниваются со значением остаточной вариации с учётом числа степеней свободы (DF). Результаты сравнения отражены в столбце F табл. 4. Для установления статистически значимых различий между средними значениями показателя биоэквивалентности сравниваемых препаратов значение F для строки «препарат» должно превзойти соответствующее табличное значение (таблица критерия Фишера для числа степеней свободы (1, n-2) и выбранного уровня значимости α). В нашем случае, для 18 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 отноше-

ния среднего значения (μ_T/μ_R) логарифмически преобразованных данных AUC составлял $0,8 < \mu_T/\mu_R < 1,20$ и для $C_{\max}$ $0,7 < \mu_T/\mu_R < 1,43$. Границы, этих интервалов, рассчитывались при помощи дисперсионного анализа ANOVA. Расчет 90% доверительных интервалов проводили с использованием программы Bioeqv [6].

Результаты и их обсуждение

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

Сравнительный анализ основных фармакокинетических параметров (табл. 2) фозиноприлата после однократного приёма 20 мг таблеток Кардиоприл и Моноприл® показал, что изучаемые препараты почти с одинаковой скоростью всасываются из желудочно-кишечного тракта (параметр $C_{\max}/AUC_{0-t}$ — для T составил $0,089 \pm 0,016$; для P — $0,095 \pm 0,020$ ч⁻¹; $\bar{x} \pm SD$). Время достижения максимальной концентрации ($t_{\max}$) составило в среднем для T — $3,22 \pm 0,55$ и для P — $3,39 \pm 0,61$ час, соответственно. При этом средняя максимальная концентрация фозиноприлата, определяемая в плазме крови добровольцев ($C_{\max}$), составила для препарата Кардиоприл — $357,65 \pm 135,73$ нг/мл и для Моноприл® — $364,62 \pm 117,58$ нг/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 Кардиоприл составил 5923,62 и для препарата Моноприл® — 6638,93 нг/мл×ч).

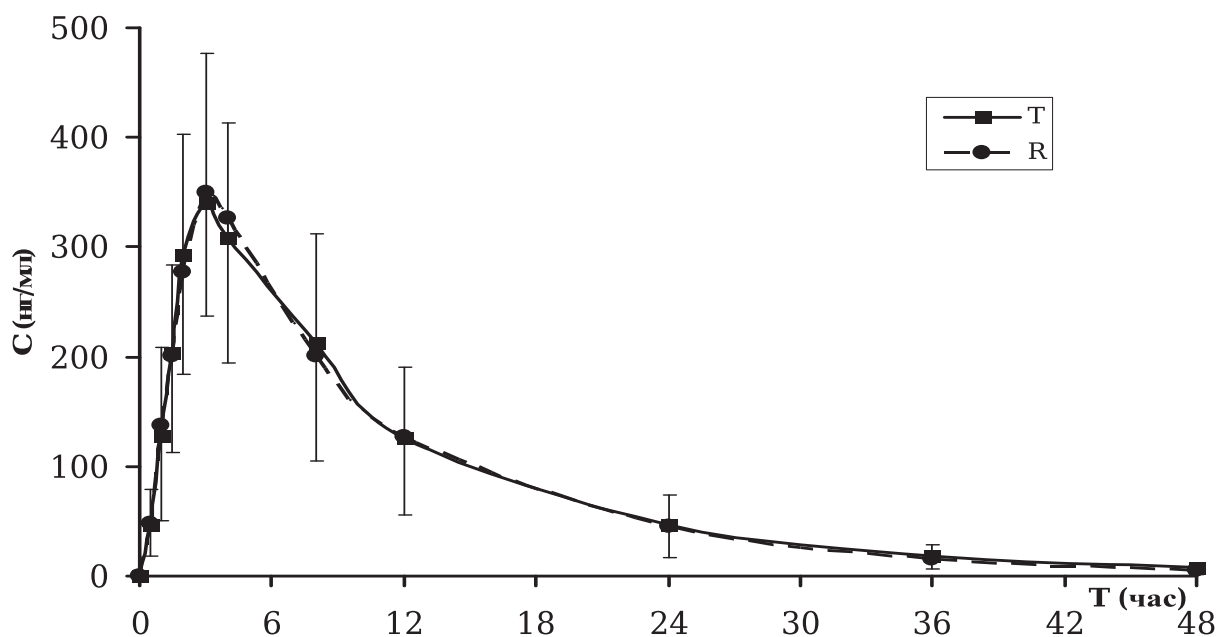


Рис. 4. Усреднённые кинетические кривые фозиноприлата в плазме крови добровольцев после однократного приёма таблеток КАРДИОПРИЛ (Т) и таблеток МОНОПРИЛ (R): (n=18; $\pm SD$)

Таблица 2

**Фармакокинетические параметры фозиноприлата у добровольцев
после однократного приема 20 мг Кардиоприла (Т) и Моноприла® (R)**

	AUC_{0-t} (мкг/мл×ч)		C_{max} (мкг/мл)		T_{max} (ч)		C_{max}/AUC (ч ⁻¹)	
	T	R	T	R	T	R	T	R
$\bar{x}$	4194,74	4142,84	357,65	364,62	3,22	3,39	0,089	0,095
SD	1753,74	1884,20	135,73	117,58	0,55	0,61	0,016	0,020
$S_{\bar{x}}$	413,62	444,39	32,01	27,73	0,13	0,14	0,004	0,005
C.V.%	41,8	45,5	37,9	32,2	17,0	17,9	18,5	20,5
Размах	5923,62	6638,93	562,50	475,50	2,000	2,000	0,05834	0,07291

Таблица 3

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

Параметр	Нижнее значение	Среднее значение	Верхнее значение
AUC_{0-t}	0,93927	1,0701	1,14729
C_{max}	0,88613	0,9956	1,06612

Таблица 4

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

$\ln AUC_{0-t}$

Источник вариации	SS	DF	MS	F
Препарат	0,013	1	0,013	0,42558
Последовательность	0,004	1	0,004	0,13268
Испытуемые	7,997	17	0,470	15,92580
Остаточная вариация	0,473	16	0,030	-
Общая вариация	8,486	35	-	-

$\ln C_{max}$

Источник вариации	SS	DF	MS	F
Препарат	0,007	1	0,007	0,28832
Последовательность	0,004	1	0,004	0,15250
Испытуемые	4,511	17	0,265	10,51495
Остаточная вариация	0,404	16	0,025	-
Общая вариация	4,926	35	-	-

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

Среднее значение AUC_{0-t} для тест-препарата составило $4194,74 \pm 1753,74$ и для референс-препарата — $4142,84 \pm 1884,20$ нг/мл×ч. Относительная биодоступность таблеток Кардиоприл по отношению к таблеткам Моноприл®, определяемая отношением соответствующих значений AUC_{0-t} , составила в среднем $1,0701 \pm 0,3166$ (усреднённые данные на основании точечных индивидуальных оценок). Доверительный интервал для логарифмически преобразованных значений AUC_{0-t}

составил $0,9393 - 1,1473$. Степень биодоступности, определяемая отношением соответствующих значений C_{max} , составила $0,9956 \pm 0,2401$, а доверительный интервал для логарифмически преобразованных значений C_{max} — $0,8861 - 1,066$ (табл. 3). Полученные доверительные интервалы лежат, в установленных «Рекомендациями», пределах, что говорит в пользу биоэквивалентности исследуемых препаратов [5].

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. 4).

Следует подчеркнуть, что для установления статистически значимых различий между средними значениями показателя биоэквивалентности сравниваемых препаратов значение F для строки «препарат» должно превзойти соответствующее табличное значение (таблица критерия Фишера для числа степеней свободы (1, n-2) и выбранного уровня значимости α). В нашем случае, для 18 пациентов табличное значение F критическое равно 4,49 для $P=0,95$. Рассчитанное значение F не превосходит табличное значение (для параметра $\ln AUC_{0-t}$ $F = 0,42558$ и для $\ln C_{max}$ $F = 0,28832$). Следовательно, нулевая гипотеза об отсутствии значимых различий между средними значениями данного показателя биоэквивалентности подтверждается, а различия не признаются статистически значимыми на соответствующем уровне значимости. Из результатов исследования относительной биологической доступности двух препаратов следует, что исследуемый препарат Кардиоприл, таблетки 20 мг, производства АО «ХИМФАРМ», Республика Казахстан является биоэквивалентным препарату сравнения Моноприл®, таблетки 20 мг, производства «Бристол-Майерс Сквибб С.р.Л.», Италия.

Выводы

1. Таблетки Кардиоприл с фармакокинетической позиции являются биоэквивалентным к таблеткам Моноприл®.

2. Результаты сравнительного фармакокинетического исследования позволяют утверждать, что

Кардиоприл и Моноприл® имеют одинаковую эффективность и переносимость.

3. С учётом основных положений доказательной медицины и фармации целесообразность проведения генерической замены препарата Моноприл® препаратом Кардиоприл является обоснованной.

Литература

1. Кутишенко Н.П., Марцевич С.Ю., Кобалава Ж.Д., Шаварова Е.К. Значение показателей терапевтической эквивалентности при замене оригинального препарата на воспроизведенный на примере фозиноприла. // Рациональная фармакотерапия в кардиологии, 2011; 7(4): 431-436.
2. Надлежащая клиническая практика, основные положения, СТ РК 1616-2006, Астана, 2006; 68.
3. Национальный стандарт Российской Федерации. Надлежащая клиническая практика, ГОСТ Р.52379-2005, Москва, 2005; 26.
4. Оценка биоэквивалентности лекарственных средств. Москва, 2008; 32.
5. Проведение надлежащих исследований биоэквивалентности лекарственных средств в республике Казахстан, Астана, под ред. Сариева А.К., 2007; 44.
6. Сергиенко В.И., Джеллифф Р., Бондарева И.Б. Прикладная фармакокинетика: основные положения и клиническое применение. Москва, Издательство РАМН, 2003; 208.
7. 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.
8. Сычёв К.С. Практическое руководство по жидкостной хроматографии. 2010; с. 216.
9. Handbook For Good Clinical Research Practice (GCP): guidance for implementation, Printed in France, 2005; 132.
10. Jemal M., Mulvana D.E. Liquid chromatographic—electrospray tandem mass spectrometric method for the simultaneous quantitation of the prodrug fosinopril and the active drug fosinoprilat in human serum. // Journal of Chromatography B, 739 (2000); 255—271.

Сравнение поведенческих и нейрорецепторных эффектов пантогама и бемитила при одно- и многократном введении мышам C57BL/6 и BALB/c

Кондрахин Е.А.¹, Салимов Р.М.¹, Незнамов Г.Г.², Ковалёв Г.И.¹

¹ — Лаборатория радиоизотопных методов исследований
ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», г. Москва

² — Лаборатория клинической психофармакологии
ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», г. Москва

Резюме. Исследовано воздействие режимов однократного и многократного введения пантогама (пантокальцина) и бемитила (метапрота) на динамику развития специфического ноотропного и неспецифического анксиолитического поведенческих эффектов препаратов и их возможную взаимосвязь с NMDA- и бензодиазепиновыми рецепторами в мозге инбредных мышей C57BL/6 и BALB/c. Линия BALB/c характеризуется сниженными по сравнению с мышами C57BL/6 исходными уровнями когнитивного и эмоционального статусов, NMDA- и бензодиазепиновых рецепторов в гиппокампах и префронтальной коре, в связи с чем была использована в качестве неинвазивной модели дефицитарных проявлений указанных функций.

Под воздействием острого, 7- и 14-кратного введения пантогама (200 мг/кг/день, в/б) у мышей BALB/c наблюдалось медленное увеличение NMDA-рецепторов и медленное нарастание специфического эффекта, характерного для ноотропов. Анксиолитический эффект препарата у мышей BALB/c и C57BL/6 обнаружен не был, однако, у линии C57BL/6 выявлено увеличение плотности бензодиазепиновых рецепторов в течение первой недели, а к концу эксперимента снижение плотности ниже контроля наблюдалось у обеих линий.

Под воздействием острого, 7- и 14-кратного введения бемитила (25 мг/кг/день, в/б) у мышей BALB/c на раннем этапе эксперимента наблюдалось быстрое увеличение NMDA-рецепторов и эффективности исследовательского поведения, исчезающее в последующие дни. Наблюдаемая быстро реализуемая динамика вероятнее всего присуща не ноотропному, а психостимулирующему компоненту фармакологического эффекта препарата. Анксиолитический эффект развивался в течение первой недели неизбирательно для обеих линий, однако, снижение бензодиазепиновой рецепции обнаруживалось на 14 день у обеих линий.

Ключевые слова: пантогам, бемитил (метапрот), NMDA-рецептор, бензодиазепиновый рецептор (БДЗ-рецептор), крестообразный лабиринт, радиолигандное связывание, исследовательское поведение, тревожность, C57BL/6, BALB/c

Comparison of behavioral and neuro-receptor effects of pantogam and bemetil with single and multiple injections in mice of C57BL/6 and BALB/c

Kondrakhin E.A.¹, Salimov R.M.¹, Neznamov G.G.², Kovalev G.I.¹

¹ — Laboratory of Radioisotope Research FGBNU «Pharmacology Research Institute named after V.V. Zakusov», Moscow

² — Laboratory of Clinical Psychopharmacology FGBNU «Institute of Pharmacology named V.V. Zakusov», Moscow

Abstract. The effect of single and multiple modes of administration pantogam (pantokaltsina) and bemetil (metaprot) on the dynamics of nootropic specific and nonspecific behavioral effects of anxiolytic drugs and their possible association with NMDA- and benzodiazepine receptors in the brain of inbred C57BL/6 and BALB/c. The line BALB/c is characterized by decreased compared to mice C57BL/6 baseline levels of cognitive and emotional status, NMDA- and benzodiazepine receptors in the hippocampus and the prefrontal cortex, and therefore has been used as a non-invasive model of deficit manifestations of these functions.

Under the influence of acute, 7- and 14-fold administration pantogam (200 mg/kg/day intraperitoneally) in BALB/c mice was observed slow increase in NMDA-receptors and slow rise specific effect characteristic nootropics. Anxiolytic effect of the drug in mice BALB/c and C57BL/6 was not detected, however, the line C57BL/6 showed an increase in the density of benzodiazepine receptor in the first week and by the end of the experiment density reduction below the control was observed in both lines.

Under the influence of acute, 7- and 14-fold bemetil administration (25 mg/kg/day intraperitoneally) in BALB / c mice at an early stage of the experiment there was a rapid increase in NMDA-receptors and efficiency of exploratory behavior, disappearing in the following days. The observed dynamics quickly realized most likely is not unique nootropic and psychoactive component of the pharmacological effect of the drug. Anxiolytic effect developed during the first week indiscriminately for both lines, however, decrease benzodiazepine reception detected at day 14 in both lines.

Keywords: pantogam, bemetil (metaprot), NMDA-receptor-benzodiazepine receptor (BDZ-receptor), plus maze, radioligand binding, exploratory behavior, anxiety, C57BL/6, BALB/c

Автор, ответственный за переписку:

Кондрахин Евгений Анатольевич — научный сотрудник лаборатории радиоизотопных методов исследований ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова»; адрес: г. Москва, 125315, ул. Балтийская, 8; тел. +7 (495) 601-20-51

Введение

Фармакологические эффекты психотропных средств имеют различные динамические характеристики при их применении в клинической практике. К медленно развивающимся эффектам препаратов относятся ноотропный, антидепрессивный и антипсихотический. Быстро проявляющимися эффектами являются психо-стимулирующий, анксиолитический и седативный [1, 2]. В 1960–1970 гг. критерии принадлежности к группе ноотропов ограничивались способностью к активации процессов обучения, к улучшению памяти и умственной деятельности, а также к повышению устойчивости мозга к агрессивным воздействиям [3]. Позже рамки канонических психофармакологических свойств пирацетама были расширены за счёт так называемых «неспецифических» компонентов, в частности, анксиолитического и стимулирующего, что нашло подтверждение и в экспериментальной фармакологии [4]. Более того, с привлечением инбредных мышей C57BL/6 и BALB/c было обнаружено, что характер и темпы развития «специфического» (ноотропного) и «неспецифического» (анксиолитического) составляющих психофармакологических эффектов пирацетама зависят и от базового поведенческого и нейрорецепторного статуса животных [5]. Также установлено, что указанные закономерности характерны для реализации действия и других препаратов с ноотропными свойствами — фенотропила, нооглютила, семакса, ацефена [6], ноопепта [7].

Поэтому с целью углубления понимания характера и механизмов, описанных выше, закономерностей в настоящей работе была предпринята попытка изучить в сравнительном плане психофармакологические и нейрорецепторные эффекты отечественных препаратов — пантогама (ноотропа, обладающего мягким седативным компонентом действия [8]) и бемитила, профиль фармакологического действия которого включает психостимулирующую [9] и ноотропную [10] активность.

Методология

Экспериментальное исследование особенностей реализации действия и нейрорецепторных эффектов пантогама и бемитила проведены на мышах инбредных линий BALB/c и C57BL/6.

1. Исследование эффективности исследовательского поведения по методике крестообразного лабиринта. Исследовательское поведение и тревожность оценивали в крестообразном лабиринте [11]. Исследования проводили на самцах мышей линий BALB/c ($n=45$) и C57BL/6 ($n=43$), полученных из питомника «Столбовая», массой 23–25 г, которых содержали в виварии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» в стандартных условиях при свободном доступе к воде и корму.

Препараты вводили внутривентально, один раз в сутки, в дозах 200 мг/кг (пантогам) и 25 мг/кг (беми-

тил). Каждую линию мышей разделяли на контрольную (физиологический раствор) и опытную группу. После 1-кратного, субхронического (в течение 7 суток) и хронического (14 суток) введения препарата мышам тестировали в крестообразном лабиринте. Подробное описание метода и интерпретации показателей представлены в предыдущих публикациях [12].

Для представления эффективности исследовательского поведения (ЭИП) был введён нормированный параметр, который является совокупностью двух главных параметров ЭИП в крестообразном лабиринте — показателей числа визитов в боковые отсеки во время первого патрулирования и общего числа патрулирований. Нормированный параметр является среднеарифметической суммой данных показателей, при этом вклад каждого из них равноценен. Формула расчёта нормированного параметра = $((100 - (F_{PtrN} - 4) * 11,111) + PatrN * 33,33) / 2$ (где F_{PtrN} — длина первого цикла патрулирования и $PatrN$ — число циклов патрулирования). Тревожность оценивали по латентному периоду первого захода в боковой отсек лабиринта.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с помощью программы Statistica 6.0.

После исследования в лабиринте в 1-й, 7-й и 14-й день введения препаратов мышам декапитировали, извлекали структуры головного мозга и замораживали в жидком азоте для последующего проведения радиолигандного анализа с бензодиазепиновыми и NMDA-рецепторами. Результаты экспериментов *ex vivo* оценивали с помощью рассчитанных величин K_d , отражающей степень сродства рецептора к лиганду (нМ), и B_{max} , представляющей количество мест связывания лиганда (фемтомоль/мг белка), соответственно.

2. Связывание с NMDA рецепторами.

а) Выделение плазматических мембран гиппокампа проводили по методу [13]. Гиппокампы размельчали в гомогенизаторе «тефлон-стекло» в 10 объёмах буфера №1 (5mM HEPES, 4.5 mM Tris, 0.32 M Сахароза, pH 7.6). Гомогенат разбавляли 50 объёмами буфера №2 (5mM HEPES, 4.5 mM Tris, pH 7.6) и центрифугировали при 1000 g 10 минут на ультрацентрифуге Beckman L7-35. Супернатант сливали и повторно центрифугировали при 25000 g 20 мин. Для увеличения выхода белка супернатант центрифугировали дважды. Полученный осадок ресуспендировали в 50 объёмах буфера №2 и вновь центрифугировали при 8000 g 20 мин. Супернатант и верхний коричневый осадочный слой сливали и центрифугировали при 25000 g 20 мин. Осадок ресуспендировали в 50 объёмах буфера №3 (5mM HEPES, 4.5 mM Tris, 1 mM Na_4EDTA , pH 7.6) и троекратно центрифугировали при 25000 g 20 мин. Полученный осадок ресуспендировали в 50 объёмах буфера №2 и однократно центрифугировали при 25000 g 20 мин. Конечный осадок сохраняли в 5 объёмах буфера №2 и замораживали в криопробирках в жидком азоте.

В день анализа ткань размораживали, разбавляли 10 объёмов буфера №2, центрифугировали при 25000 g 20 мин. Осадок ресуспендировали в необходимом количестве буфера №2. Концентрация белка в образцах мембран составляла 2-3 мг/мл.

- б) РадиOLIгандный анализ.** В эксперименте использовали меченный тритием (+)МК-801 с удельной активностью 200 Кюри/ммоль, полученный методом твердофазного катализа в Отделе химии физиологически активных веществ Института молекулярной генетики РАН (рук. — академик Н.Ф. Мясоeдов) [14]. Реакционная смесь (конечный объём 0,5 мл) содержала 200 мкл буфера №2, 50 мкл меченого лиганда (в диапазоне концентраций от 0.1 до 20 нМ) и 250 мкл суспензии мембран. Неспецифическое связывание определяли в присутствии 50 мкл немеченого (+)МК-801 (1 мМ). Специфическое связывание рассчитывали как разницу между общим и неспецифическим связыванием. Реакционную смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов. По окончании инкубации пробы фильтровали через стекловолoкнистые фильтры GF/B (Whatman), предварительно смоченные 0,3% полиэтиленгликолем в течение 2 часов при 4°C. Каждую пробирку промывали один раз холодным буфером №2, затем фильтры промывали три раза тем же объёмом буфера. Фильтры просушивали на воздухе, переносили в сцинтилляционные флаконы, заливали 5 мл сцинтилляционной жидкости на основе толуола.

3. Связывание с бензодиазепиновыми рецепторами.

- а) Выделение плазматических мембран коры.** Ранее замороженные образцы коры мозга гомогенизировали в 16 мл ледяного (0-4°C) 50 mM Tris-HCl буфера (pH 7,4) используя ручной гомогенизатор «тефлон-стекло». Полученную суспензию центрифугировали при 42 000 g в течение 25 мин в ультрацентрифуге Allegra 64k R («Beckman Coulter»). После центрифугирования супернатант сливали, осадок ресуспендировали повторной гомогенизацией в том же объёме буфера, затем вновь центрифугировали. Процедуру отмывки проводили трижды, полученный осадок ресуспендировали в 20 мл Tris-HCl буфера и использовали по 250 мкл в процедуре связывания [³H]-Флунизтазема.
- б) РадиOLIгандный анализ.** Мембранную фракцию структур головного мозга инкубировали с ³H-Флунизтаземам (удельная активность 81 Кюри/ммоль, «NEN») в течение 30 мин при температуре 0-4°C. Неспецифическое связывание определяли в присутствии избытка немеченого диазепам (20 мМ). Специфическое связывание рассчитывали как разницу между общим и неспецифическим связыванием. Процесс связывания останавливали путём добавления ледяного буфера и быстрой фильтрации через стекловолoкнистые фильтры

типа GF/B (Whatman) с последующей двукратной промывкой ледяным буфером общим объёмом 8 мл. Фильтры высушивали в течение 12 часов при комнатной температуре, затем помещали в сцинтилляционную жидкость (реактив Брея) объёмом 5 мл и использовали для счёта радиоактивности.

Радиоактивность каждой пробы измеряли в течение 2 мин на жидкостно-сцинтилляционном счётчике Tri-Carb 2900TR («PerkinElmer») с эффективностью счёта 45%. Неспецифическое связывание составляло не более 10% от общего.

Концентрацию белка измеряли по стандартной методике Лоури. Показатель количества мест связывания (B_{max} , фемтомоль/мг белка) и константу диссоциации лиганд-рецепторных комплексов (K_d , наномоль/л, нМ) рассчитывали с помощью программы GraphPad Prism 5.

Результаты

В предыдущих исследованиях, проведённых по аналогичному протоколу, было установлено, что между линиями мышей C57BL/6 и BALB/c наблюдаются значимые отличия по критерию ЭИП, по общему уровню тревожности, а также по плотности NMDA- и бензодиазепиновых рецепторов в мозге. Так, мыши BALB/c проявляли в условиях незнакомой обстановки в закрытом крестообразном лабиринте большую тревожность (+143%), менее выраженную эффективность исследовательского поведения (-13%), меньшую плотность NMDA-рецепторов в гиппокампе (-22%) и БДЗ-рецепторов в префронтальной коре (-17%) [15].

Результаты изучения влияния пантогама на ЭИП и тревожность мышей обеих линий после острого, субхронического и хронического введений представлены в табл. 1. Характерное для обеих линий животных поведение в группах плацебо сохраняется постоянным при всех режимах введения. Препарат оказал на линию BALB/c эффект увеличения ЭИП (64,2±6,1 баллов в контроле против 83,2±1,8 в опытной группе, $p>0,05$) лишь после 14-кратного введения.

Напротив, под влиянием бемитила увеличение показателя ЭИП в группе мышей BALB/c происходило уже после однократного введения препарата в дозе 25 мг/кг, тогда как в группе сравнения C57BL/6 исследовательское поведение в опытной группе не отличалось от поведения контрольных групп животных. При этом тревожность под влиянием бемитила (латентное время первого захода) немного снижалась после 7-кратного введения бемитила как у мышей BALB/c (на 2 с), так и у C57BL/6 (на 1,6 с).

Сопутствующие изменения показателей радиOLIгандного связывания (т.н. «кривые насыщения») на NMDA- и БДЗ-рецепторах приведены на рис. 1 и рис. 2, соответственно.

Результаты обработки по Скетчарду этих кривых насыщения для обоих рецепторов приведены в табл. 2 и 3.

Надо отметить, что величины K_d в мембранах структур мозга обеих линий мышей практически не различались при различных сроках введения препарата, что указывает на неизменяемость степени сродства мест связывания к лигандам при различных сроках воздействия препаратов.

Что касается плотности мест связывания B_{max} для [3H]-МК-801 с NMDA-рецепторами гиппокампа, то у мышей BALB/c эта величина увеличивалась для пантогама лишь к 14 дню эксперимента с $2036,8 \pm 88,0$ фмоль/мг в контроле до $2593 \pm 73,1$ фмоль/мг в опытной группе. В противоположность этому, бемитил был эффективен исключительно после острого воздействия, увеличивая величину B_{max} с $2271 \pm 35,4$ фмоль/мг

в контрольной группе до $3098 \pm 157,1$ фмоль/мг в опытной группе. Примечательно, что в мозге мышей линии C57BL/6 изменений в плотности этих рецепторов не наблюдалось ни под влиянием пантогама, ни под воздействием бемитила (Табл.2, Рис.1).

Изучение изменений плотности БДЗ-рецепторов в префронтальной коре мозга показало, что у мышей линии BALB/c острое и субхроническое введения пантогама и бемитила не влияли на величину B_{max} , тогда как при хроническом введении препаратов относительно группы плацебо ($3117 \pm 53,5$ фмоль/мг) наблюдалось снижение B_{max} до $2340 \pm 46,4$ фмоль/мг и $2108 \pm 58,8$ фмоль/мг, соответственно (табл. 3, рис. 2).

Таблица 1

Влияние пантогама (200 мг/кг/день) и бемитила (25 мг/кг/день) при остром, 7- и 14-дневном введении на поведенческие характеристики у мышей линий BALB/c и C57BL/6 ($m \pm S.E.M.$)

Группы	ЭИП			Тревожность		
	Контроль	Пантогам	Бемитил	Контроль	Пантогам	Бемитил
Balb/c Острое	65,4 $\pm$ 4,1	66,7 $\pm$ 4,1	75,8$\pm$4,1*	13,1 $\pm$ 1,2	12,9 $\pm$ 0,7	13,4 $\pm$ 1,2
Balb/c субхроническое	66,7 $\pm$ 5,7	76,1 $\pm$ 6,3	74,3 $\pm$ 5,7	13,3 $\pm$ 1,2	14,2 $\pm$ 1,4	11,3$\pm$1,2*
Balb/c хроническое	64,2 $\pm$ 6,1	83,2$\pm$1,8*	70,37 $\pm$ 6,1	13,5 $\pm$ 0,9	14,0 $\pm$ 1,99	14,0 $\pm$ 0,9
C57Black Острое	74,0 $\pm$ 5,0	72,0 $\pm$ 3,8	76,7 $\pm$ 5,0	5,7 $\pm$ 0,4	5,9 $\pm$ 0,5	5,9 $\pm$ 0,4
C57Black субхроническое	74,3 $\pm$ 3,7	77,9 $\pm$ 3,0	82,1 $\pm$ 3,7	5,5 $\pm$ 0,5	5,7 $\pm$ 0,4	3,9$\pm$0,5*
C57Black хроническое	73,0 $\pm$ 4,1	72,22 $\pm$ 4,5	73,7 $\pm$ 4,1	5,8 $\pm$ 0,6	6,1 $\pm$ 0,3	5,8 $\pm$ 0,6

Примечание. * — достоверное отличие от контрольной группы по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$

Таблица 2

Влияние пантогама (200 мг/кг/день) и бемитила (25 мг/кг/день) при остром, 7- и 14-дневном введении на характеристики рецепторного связывания [3H]-МК-801 ex vivo в мозге мышей BALB/c и C57BL/6 ($m \pm S.E.M.$)

Группы	Параметр	NMDA-рецепторы		
		Контроль	Пантогам	Бемитил
Balb/c Острое	B_{max}	2271 $\pm$ 35	2078 $\pm$ 138	3098 $\pm$ 157*
	K_d	12,07 $\pm$ 0,36	13,88 $\pm$ 1,66	11,86 $\pm$ 1,14
Balb/c 7 дней	B_{max}	2051 $\pm$ 49	1871 $\pm$ 75	1955 $\pm$ 71
	K_d	10,26 $\pm$ 0,60	8,74 $\pm$ 0,9	9,09 $\pm$ 0,84
Balb/c 14 дней	B_{max}	2037 $\pm$ 88	2593 $\pm$ 73*	1824 $\pm$ 78
	K_d	8,4 $\pm$ 0,78	10,58 $\pm$ 0,58	9,1 $\pm$ 0,82
C57Black Острое	B_{max}	2659 $\pm$ 270	2526 $\pm$ 113	2645 $\pm$ 120
	K_d	8,9 $\pm$ 1,06	11,1 $\pm$ 0,96	10,17 $\pm$ 0,92
C57Black 7 дней	B_{max}	2724 $\pm$ 44	2319 $\pm$ 51	2589 $\pm$ 60
	K_d	9,7 $\pm$ 0,39	8,97 $\pm$ 0,5	9,14 $\pm$ 0,73
C57Black 14 дней	B_{max}	2602 $\pm$ 57	2767 $\pm$ 64	2652 $\pm$ 71
	K_d	8,34 $\pm$ 0,39	7,63 $\pm$ 0,39	9,23 $\pm$ 0,51

Примечание * — достоверное отличие от контрольной группы по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$

Таблица 3

Влияние пантогама (200 мг/кг/день) и бемитила (25 мг/кг/день) при остром, 7- и 14-дневном введении на характеристики рецепторного связывания [3H]-Флунитразепама ex vivo в мозге мышей BALB/c и C57BL/6 ($m \pm S.E.M.$)

Группы	Параметр	Бензодиазепиновые рецепторы		
		Контроль	Пантогам	Бемитил
Balb/c Острое	B_{max}	2915 $\pm$ 25	2735 $\pm$ 75	2949 $\pm$ 66
	K_d	1,87 $\pm$ 0,05	1,96 $\pm$ 0,19	1,89 $\pm$ 0,15
Balb/c 7 дней	B_{max}	3015 $\pm$ 44	3167 $\pm$ 71,9	3259 $\pm$ 66
	K_d	2,02 $\pm$ 0,1	1,83 $\pm$ 0,15	2,22 $\pm$ 0,15
Balb/c 14 дней	B_{max}	3117 $\pm$ 54	2340 $\pm$ 46*	2108 $\pm$ 59*
	K_d	1,57 $\pm$ 0,1	1,89 $\pm$ 0,13	2,02 $\pm$ 0,19
C57Black Острое	B_{max}	3656 $\pm$ 94	3789 $\pm$ 61	3761 $\pm$ 33
	K_d	1,98 $\pm$ 0,18	1,91 $\pm$ 0,1	2,02 $\pm$ 0,06
C57Black 7 дней	B_{max}	3603 $\pm$ 27	4039 $\pm$ 59*	3048 $\pm$ 111*
	K_d	2,1 $\pm$ 0,05	2,5 $\pm$ 0,24	2,56 $\pm$ 0,3
C57Black 14 дней	B_{max}	3613 $\pm$ 103	3241 $\pm$ 106*	2616 $\pm$ 87*
	K_d	1,89 $\pm$ 0,15	1,99 $\pm$ 0,18	1,96 $\pm$ 0,18

Примечание. * — достоверное отличие от контрольной группы по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$

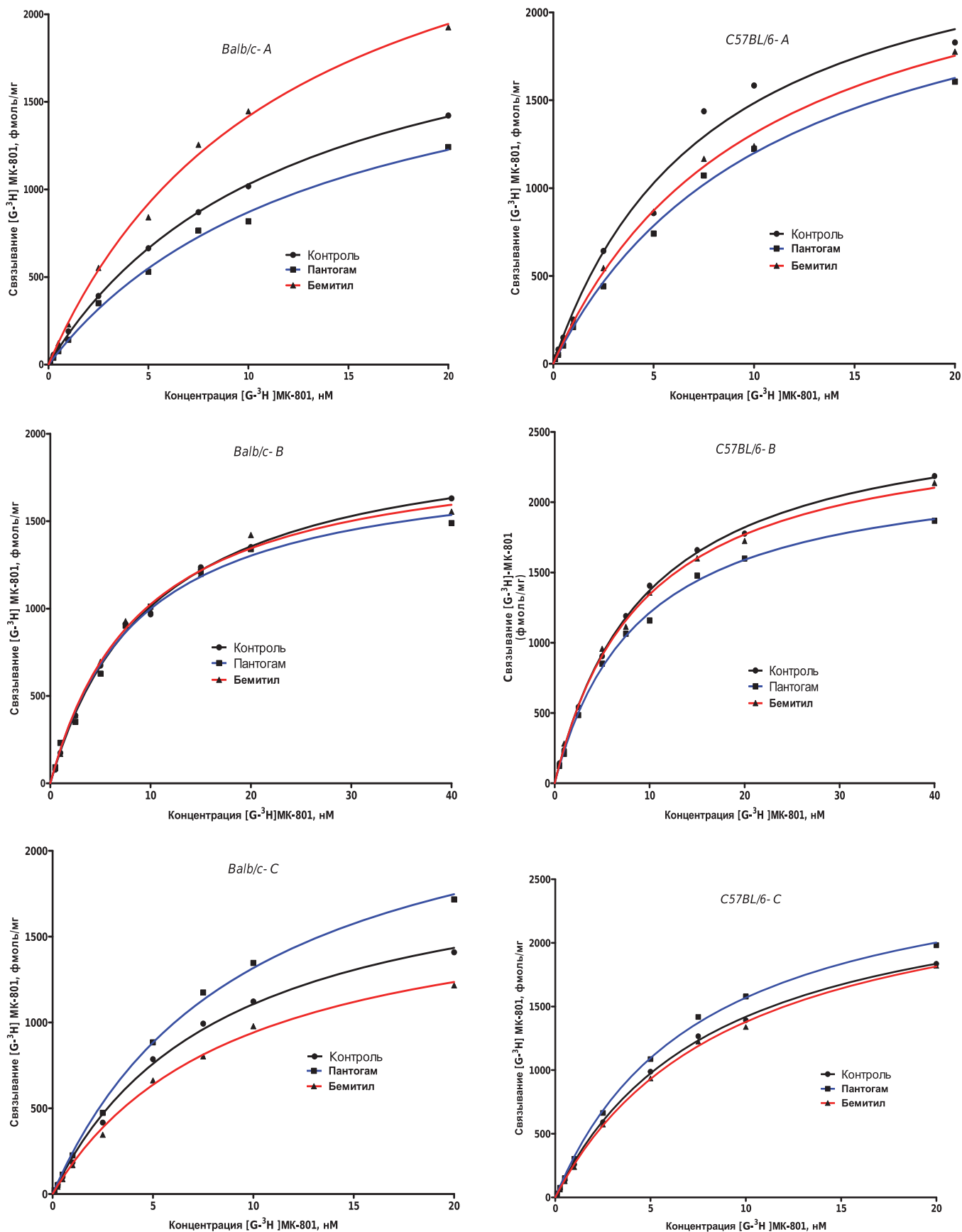


Рис. 1. Влияние пантогама (200 мг/кг/день) и бемитила (25 мг/кг/день) при различной продолжительности введения острое (А), 7 дней (В), 14 дней (С) на связывание с NMDA-рецепторами в мозге мышей BALB/с и C57BL/6

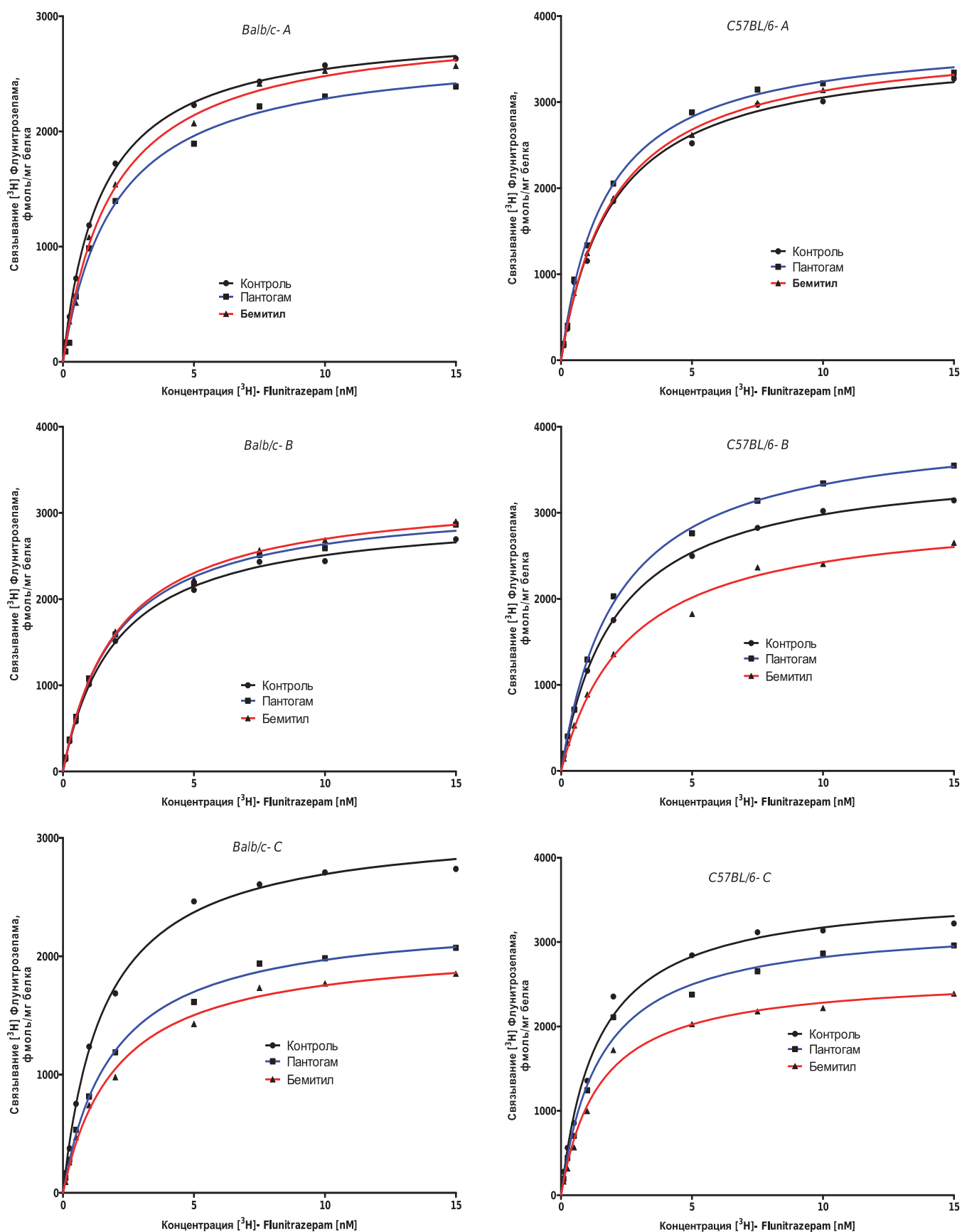


Рис. 2. Влияние пантогама (200 мг/кг/день) и бемитила (25 мг/кг/день) при различной продолжительности введения острое (А), 7 дней (В), 14 дней (С) на бензодиазепиновые рецепторы в мозге мышей BALB/c и C57BL/6

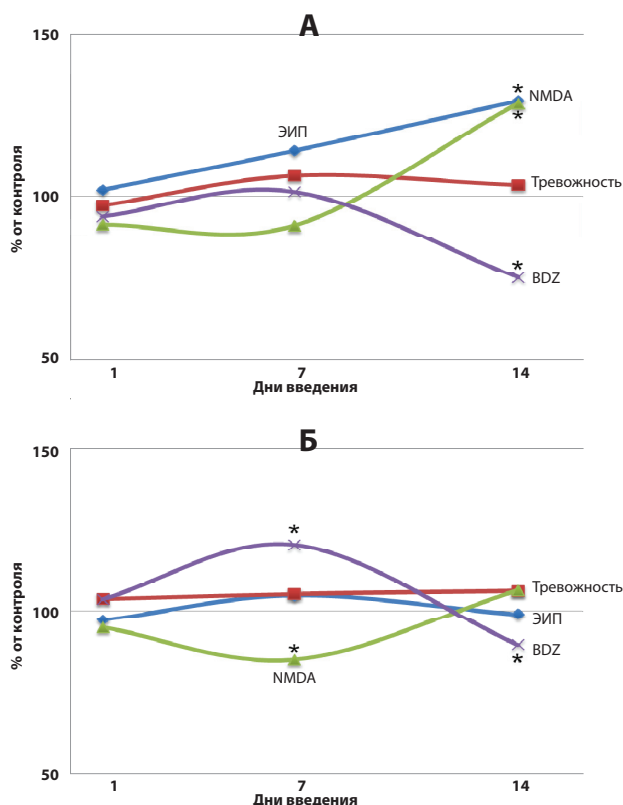


Рис. 3. Динамика выраженности поведенческих и рецепторных характеристик мышей BALB/c (А) и C57BL/6 (Б) под влиянием пантогама (200 мг/кг/день)

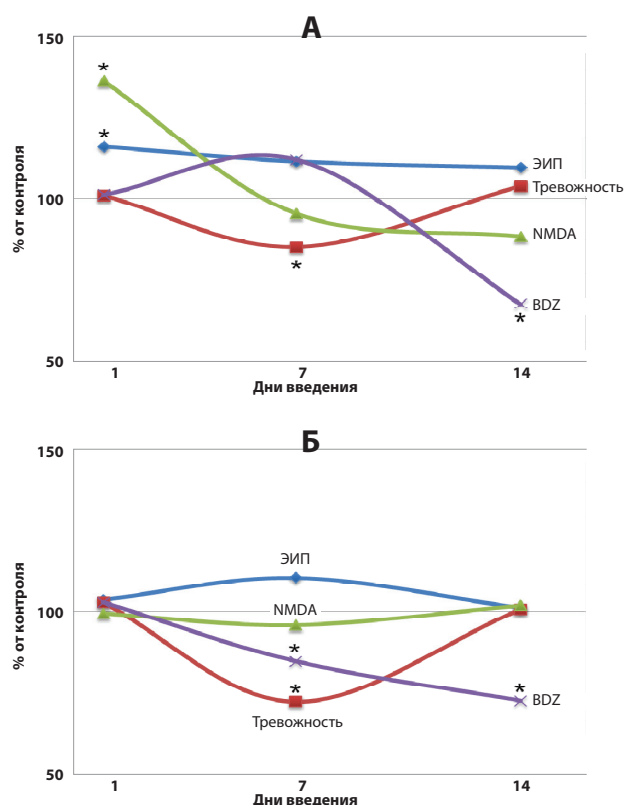


Рис. 4. Динамика выраженности поведенческих и рецепторных характеристик мышей BALB/c (А) и C57BL/6 (Б) под влиянием бемитила (25 мг/кг/день)

В группе мышей C57BL/6 плотность мест связывания [^3H]-флунизтапеама после острого введения не изменилась по сравнению с контролем под действием обоих исследуемых препаратов. При субхроническом и хроническом введениях бемитил приводил к уменьшению V_{max} с $3602,5 \pm 27,2$ фмоль/мг до $3047,5 \pm 111,0$ фмоль/мг и с $3613 \pm 102,7$ до $2616 \pm 86,7$ фмоль/мг, соответственно. Под влиянием пантогама у мышей C57BL/6 наблюдалась разнонаправленная динамика: увеличение плотности мест связывания BDZ-рецепторов с $3602,5 \pm 27,2$ фмоль/мг до $4039 \pm 58,6$ фмоль/мг при субхроническом введении и уменьшение мест связывания с $3613 \pm 102,7$ фмоль/мг до $3241 \pm 106,4$ фмоль/мг при хроническом введении (табл. 3, рис. 2).

Обсуждение

В соответствии с концепцией о составляющих фармакологических эффектов психотропных препаратов [16] у пиратама обнаруживаются медленно развивающийся ноотропный («специфический») и быстро проявляющиеся «неспецифические» анксиолитический и психостимулирующий [4, 5, 17]. С помощью методов нейровизуализации рецепторов *in vivo*, в частности, позитронно-эмиссионной томографии, обнаружено снижение BDZ-рецепторов в префронтальной коре мозга больных с проявлениями тревоги и паническими расстройствами [18]. Аналогичные данные

получены при модельной патологии эмоциональной и когнитивной сфер в экспериментах на животных, в которых показана связь поведенческих компонентов с BDZ- и NMDA-рецепторами мозга мышей [5, 6, 15].

В продолжение изучения механизмов действия ноотропных препаратов была изучена динамика эффектов пантогама и бемитила. Пантогам (пантокальцин) — первый отечественный ноотроп, внедрённый в клиническую практику в 1977 году, мишенью первичного действия которого являются рецепторы γ -аминомасляной кислоты (ГАМК). Кроме ноотропной активности, препарат обладает мягким седативным эффектом [8]. Бемитил (метапрот) отечественный актопротектор, положительно влияющий на условно-рефлекторное поведение в норме и при стрессорном воздействии в тесте УРПИ [10], а также антиастеническим (психостимулирующим) компонентом в клинике [9]. Влияние этого препарата на нейрорецепторы мозга ранее не изучалось.

В настоящей работе мыши BALB/c были использованы в качестве модели с повышенной тревожностью и с дефицитом исследовательского поведения в тесте открытого крестообразного лабиринта, а также меньшей плотностью NMDA-рецепторов в гиппокампе и BDZ-рецепторов в префронтальной коре мозга в сравнении с инбредными мышами C57BL/6 [15]. Кроме того, в недавно опубликованной работе было показано, что исследовательское поведение мышей этих линий в лабиринте и уровень проявленной при этом тре-

возможности существуют статистически независимо друг от друга, на основании чего было предположено, что и механизмы их регуляции могут различаться [19].

Сравнительная динамика влияния пантогама на поведение и рецепторы представлена на рис. 3. Обращает внимание, что выраженность ЭИП и величина $V_{\max}$ для NMDA-рецепторов нарастают постепенно, достигая уровней статистической значимости к 14-му дню эксперимента. Аналогичная зависимость для ЭИП была характерна и для пираретама [5], но плотность NMDA-рецепторов была выше уже после острого и 7-кратного введения пираретама. Возможно, быстрое изменение плотности этих рецепторов в случае пираретама объясняет наличие у него стимулирующего компонента действия, тогда как более поздний подъём $V_{\max}$ лежит в основе ноотропного эффекта. Дополнительным свидетельством в пользу данного предположения могут служить полученные данные о динамике эффектов бемитила (рис. 4): на мышах BALB/c препарат способствовал росту плотности NMDA-рецепторов и ЭИП лишь после однократного введения, тогда как длительное воздействие оказалось малоэффективным.

Таким образом, динамика эффективности исследовательского поведения в крестообразном лабиринте и количества NMDA-рецепторов в гиппокампе отражают специфические «медленные» эффекты пантогама как ноотропного препарата. Напротив, быстрый и не-

продолжительный подъём этих показателей после введения бемитила демонстрирует наличие скорее психостимулирующего, чем ноотропного компонента его психофармакологического профиля.

Выводы

1. Одно-, семи- и четырнадцатикратное введение пантогама в ежедневной дозе 200 мг/кг (в/б) мышам BALB/c вызывает медленное увеличение плотности NMDA-рецепторов в гиппокампе и постепенное нарастание специфического ноотропного эффекта. У мышей C57BL/6 количество NMDA-рецепторов и ЭИП не изменялись.
2. Бемитил в ежедневной дозе 25 мг/кг (в/б) при тех же режимах введения увеличивает ЭИП и плотность NMDA-рецепторов у мышей BALB/c лишь в результате однократного введения, что можно отнести к психостимулирующему компоненту его действия.
3. В данных условиях пантогам не воздействует на уровень тревожности мышей обеих линий, хотя плотность БДЗ-рецепторов снижалась к 14-му введению.
4. Неспецифичное локальное снижение тревожности в обеих линиях мышей к 7-му дню эксперимента не сопутствует поступательному уменьшению плотности БДЗ-рецепторов в коре мозга к 14-му дню наблюдения.

Литература

1. Банищев В.М., Березин Ф.Б. О механизме действия психотропных веществ (быстрый и медленный компонент психофармакологического эффекта). // Журнал невропатологии и психиатрии. 1966. №10. С. 1561 — 1565.
2. Незнамов Г.Г., Сбытов Ю.Г. Клинико-математический анализ быстрого и медленного компонентов действия психотропных препаратов у больных с невротическими и неврозоподобными расстройствами. // Пограничные нервно-психические расстройства. Ставрополь. 1989. С. 46–8.
3. Середенин С.Б., Воронина Т.А. Ноотропные и нейропротективные средства. // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2007. Т.70, №4. С. 44– 58.
4. Незнамов Г.Г., Кошелев В.В., Воронина Т.А., Трофимов С.С. Экспериментальное и клиническое обоснование комплексного применения пираретама и глутамата при лечении психических расстройств у ликвидаторов катастрофы на чернобыльской АЭС. // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2002. Т.65, №2. С. 12 — 16.
5. Ковалёв Г.И., Кондрахин Е.А., Салимов Р.М., Незнамов Г.Г. Действие пираретама на поведение и рецепторы мозга мышей C57BL/6 и BALB/c — ноотропный и анксиолитический эффекты. // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2013. Т.76, №9. С. 3 — 10.
6. Ковалёв Г.И., Фирстова Ю.Ю. Ноотропные препараты: разные мишени — общий эффект. // Клиническая фармакология и терапия. 2010. С. 72–73.
7. Ковалёв Г.И., Кондрахин Е.А., Салимов Р.М., Незнамов Г.Г. Динамика поведенческих и нейрорецепторных эффектов при остром и многократном введении ноопепта мышам C57BL/6 и BALB/c. // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2014. Т.77, №12. С. 9–15.
8. Копелевич В.М. Пантогам и пантогам актив. Клиническое применение и фундаментальные исследования. Сборник научных статей. Москва. Трида-фарм, 2009. — 188 с.
9. Александровский Ю.А. Пограничные психические расстройства. / Москва. Медицина, 2000. — 495 с.
10. Прагина Л.Л., Тушмалова Н.А., Иноземцев А.Н., Смирнов А.В. Влияние бемитила на условнорефлекторную память крыс в норме и при стрессорных воздействиях. // Экспериментальная и клиническая фармакология. 1999. Т.62, №24. С. 9 — 10.
11. Салимов Р.М. Оценка упорядоченности пути в процессе исследовательского поведения у мышей. // Журнал ВНД. 1988. Т.38, №3. С. 569–571.
12. Салимов Р.М., Ковалёв Г.И. Влияние лигандов никотиновых холинорецепторов и ноотропных веществ на спонтанное поведение обследования лабиринта у мышей. // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2008. Т.71, №3. С. 3 — 5.
13. Zhou L.M., Gu Z.Q., Costa A.M., et al. (2S,4R)-4-methylglutamic acid (SYM 2081): a selective, high-affinity ligand for kainate receptors. // J.Pharmacol.Exp.Ther. 1997, Vol. 280, №1, P 422–427.
14. Золотарев Ю.А., Фирстова Ю.Ю., Абаимов Д.А. и др. Равномерно меченные изотопами водорода лиганды глутаматного и дофаминового рецепторов. // Биоорганическая химия. 2009. Т.35, №3. С. 323–333.
15. Ковалёв Г.И., Кондрахин Е.А., Салимов Р.М. Поведенческие и нейрорецепторные различия мышей линий C57BL/6 и BALB/c. // Нейрохимия. 2013. Т.30, №2. С. 128–134.
16. Незнамов Г.Г., Сюняков С.А., Давыдова И.А., Телешова Е.С. «Быстрые» и «медленные» компоненты психотропного действия препаратов с ноотропными свойствами. // Журнал неврологии и психиатрии. 2000. Т.100, №6. С. 33 — 37.
17. Незнамов Г.Г., Телешова Е.С. Результаты сравнительного изучения ноопепта и пираретама при лечении больных с легкими когнитивными нарушениями при органических заболеваниях мозга сосудистого и травматического генеза. // Журнал неврологии и психиатрии. 2008. Т.108, №3. С. 33–42.
18. Hasler G., Nugent A.C., et al. Altered cerebral gamma-aminobutyric acid type A-benzodiazepine receptor binding in panic disorder determined by [11C]flumazenil positron emission tomography. // Arch Gen Psychiatry. 2008, Vol. 65, №10, P 1166–1175.
19. Collingridge G.L., Volianskis A., Bannister N., et al. The NMDA receptor as a target for cognitive enhancement. // Neuropharmacology. 2013, Vol. 64, №1, P 13–26.

Доклиническое изучение фармакокинетики нового анксиолитика дипетидной структуры ГБ-115

*Жердев В.П., Бойко С.С., Бlynская Е.В.,
Турчинская К.Г., Гудашева Т.А., Иванникова Е.В.*
ФБГНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», г. Москва

Резюме. В работе представлены результаты исследования экспериментальной фармакокинетики дипептидного анксиолитика ГБ-115 после перорального введения кристаллической и микронизированной субстанций и 4-х его новых лабораторных образцов фармацевтических композиций, отличающихся по технологии приготовления и составу вспомогательных веществ. Показано, что различные вспомогательные вещества, входящие в состав фармацевтических композиций, и технология приготовления существенно влияют на фармакокинетику изучаемого дипептида и следствием её оптимизации является улучшение фармакокинетических свойств разрабатываемого соединения, а именно увеличения полноты всасывания, максимальной концентрации, скорости и степени всасывания и в конечном итоге биодоступности ГБ-115. На основе полученных экспериментальных данных две лекарственные композиции рекомендованы для дальнейшего фармакологического изучения.

Ключевые слова: фармакокинетика, лекарственная композиция, дипептид ГБ-115, микронизированная субстанция, вспомогательные вещества

Preclinical study the pharmacokinetics new anxiolytic drug of dipeptide structure GB-115

Zherdev V.P., Boyko S.S., Blynskaya E.V., Turchinskaya K.G., Gudasheva T.A. Ivannikova E.V.

FGBNi «Research Institute of Pharmacology V.V. Zakusov», Moscow

Abstract. The paper presents the results of experimental studies of pharmacokinetics GB-115 after oral administration of crystalline and micronized substances and 4 new laboratory samples pharmaceutical compositions which differ in the technology of preparation and composition of excipients. It is shown that different excipients and preparation technology significantly affect the pharmacokinetics and effect of studied dipeptide; its optimization is improve the pharmacokinetics properties of the developed compound, namely increasing completeness of absorption, maximum concentration, rate and extent of absorption in the final result in bioavailability GB-115. On the basis of experimental data obtained two pharmaceutical compositions recommended for further pharmacological study.

Keywords: pharmacokinetics, drug composition, dipeptide GB-115, micronized substance

Автор, ответственный за переписку:

Жердев Владимир Павлович — д.м.н., профессор, зав. лабораторией фармакокинетики ФГБУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» РАН, г. Москва; адрес: 125315, г. Москва, ул. Балтийская, 8; тел.: +7 (495) 601-21-57; e-mail: zherdevpharm@mail.ru

Введение

При создании новых лекарственных средств необходимым этапом является изучение их фармакокинетики на доклиническом уровне. Результаты доклинического изучения дают возможность оценить скорость и степень всасывания лекарственных соединений из места введения, проницаемости через гистогематические барьеры и доставки их к месту действия, тканевой биодоступности, их биотрансформации с выявлением основных «мажорных» метаболитов, а также активных метаболитов, обладающих такой же или иной фармакологической активностью и выведения из организма лекарственного вещества, и продуктов его превраще-

ния. Кроме того, эти исследования позволяют установить взаимосвязь между фармакокинетикой и фармакодинамикой изучаемых лекарственных веществ, что в дальнейшем может играть важную роль при переносе данных с животных на человека, выбора оптимального пути введения лекарственного вещества с учётом его метаболизма в результате «первого прохождения» через печень, а также его биологической доступности. Особо значимым и в практическом отношении являются исследования фармакокинетики различных лекарственных форм изучаемых препаратов и выбор на этой основе оптимальных, обладающих большей биодоступностью, позволяющих рекомендовать их для дальнейшего изучения и внедрения в медицинскую практику.

В ФБГНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» создан новый дипептидный ретроаналог холецистокинина — ГБ-115 (амид N-фенил-гексаноил-глицил-L-триптофана), обладающий анксиолитической, антиалкогольной, антидепрессивной и анальгетической активностью [1].

Целью работы являлось изучение экспериментальной фармакокинетики и биодоступности субстанции ГБ-115 и четырёх его фармацевтических композиций для перорального применения, отличающихся по технологии приготовления и составу вспомогательных веществ, а также выбор оптимальной лекарственной формы с большей скоростью и степенью всасывания.

Экспериментальная часть

Материалы и методы исследования. В качестве стандартных веществ была использована фармацевтическая субстанция ГБ-115, содержание основного вещества в которой было не ниже 99%.

В работе использовались кристаллическая и микронизированная субстанции ГБ-115, а также 4-х лабораторных образца фармацевтических композиций ГБ-115, предоставленные опытно-технологическим отделом ФБГНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова», отличающихся по составу и технологии приготовления:

1. фармацевтическая композиция №1: Субстанция ГБ-115, неусиллин, лудипресс;
2. фармацевтическая композиция №2: Микронизированная субстанция ГБ-115, твёрдая дисперсная система с поливинилпирролидоном;
3. фармацевтическая композиция №3: Микронизированная субстанция ГБ-115, неусиллин, лудипресс;
4. фармацевтическая композиция №4: Микронизированная субстанция ГБ-115, лактоза, микрокристаллическая целлюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза.

Экспериментальные животные. Фармакокинетику ГБ-115 изучали после перорального введения кристаллической и микронизированной субстанций и фармацевтических композиций в виде водной суспензии белым беспородным крысам самцам (массой 180-220 г), полученных из питомника «Столбовая». Животных содержали в стандартных условиях вивария при 12 часовом световом режиме и свободном доступе к корму и воде. Исследования проводили на здоровых, бодрствующих животных. До проведения исследования животные находились в течение 12 ч на водной диете.

Масс-спектрометрический анализ соединения ГБ-115 в плазме крови крыс. Анализ биологических проб ГБ-115 проводили с использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором для точной идентификации структуры пептида. Разделение проводили с помо-

щью хроматографа Agilent 1200 Series LC-MSD TRAP (Agilent Technologies, Palo Alto, США) с автоматическим вводом проб, детектора Agilent 6300 series ion-trap (США) и компьютера с соответствующим пакетом для обчёта хроматограмм. Мобильная фаза состояла из 1 л водного раствора с добавлением 50 мл 0.1 М раствора аммония ацетата и 5 мл муравьиной кислоты (А) и 100% ацетонитрила (В). ВЭЖХ анализ проводился в режиме градиентного элюирования: 0 мин — 5% (В), 5 мин — 60% (В), 7 мин — 80% (В), 12 мин — 80% (В), 15 мин — 10% (В). Скорость потока подвижной фазы составляла 0,25 мл/мин. Температура колонки составила 30°C. Объём вкола: 1 мкл.

Масс-спектры были получены с использованием ионизации электрораспылением (ИЭР) и регистрацией как положительных, так и отрицательных ионов. В результате позитивной ионизации образуется ряд положительных ионов с m/z 473, 457, 435, 418, которые предположительно соответствуют катионированным молекулярным ионам $[M+K]^+$, $[M+Na]^+$, $[MH]^+$ и $[MH-NH_3]^+$ соответственно. Наличие большого количества пиков затрудняет количественное определение анализируемого вещества. Поэтому была выбрана негативная ионизация, посредством которой образуется один отрицательный ион с $m/z=434$, который в дальнейшем подвергается фрагментации с образованием ионов с массовыми числами — 286 и 304, что предположительно соответствует следующим фрагментам: ацетат глицил-L-триптофана и гидроксильированный ацетат глицил-L-триптофана, соответственно.

В качестве распыляющего газа использовали азот со скоростью — 9 л/мин.

Методика количественного определения соединения ГБ-115 в плазме крови крыс с применением метода высокоэффективной хроматографии с УФ-детектором. Разделение проводили на жидкостном хроматографе, состоящем из изократической помпы SYSTEM COLD 127 (США), ультрафиолетового детектора и компьютера с соответствующим пакетом программ для обчёта хроматограмм «Амперсэнд» (Россия).

Хроматографическое разделение проводили на аналитической колонке — Luna 5μ C 18(2), 250×4,6 мм, детектирование проводили при длине волны 282 нм, что позволило избежать влияния коэкстрактивных веществ, которые мешали бы определению ГБ-115. При использовании диапазона длин волн 200-230 нм наблюдается совпадение максимумов поглощения ГБ-115 и примесей, что и обусловило выбор максимума поглощения в УФ-свете при длине волны 282 нм.

Подвижная фаза — ацетонитрил:вода (400:450), трифторуксусная кислота. Скорость потока подвижной фазы — 1,0 мл/мин. рН раствора составлял 3,2.

Хроматографический анализ проводили при комнатной температуре (22-24°C). Перед хроматографированием подвижную фазу дегазировали на ультразвуковой бане. Пробу вводили при помощи микрошприца в петлю хроматографа объёмом 100 мкл.

Обработка биологических проб, экстракция ГБ-115 из биологических образцов. Подготовка плазмы крови крыс к хроматографическому анализу. Экстракцию ГБ-115 из биологических образцов проводили следующим образом: к 1 мл плазмы крови, содержащей ГБ-115, добавляли двукратный объём ацетонитрила для осаждения белков. Водно-ацетонитрильный раствор центрифугировали при $T = -2^{\circ}\text{C}$ со скоростью 4000 об/мин в течение 10 мин. Далее отбирали очищенную от белков плазму, добавляли 5 мл эфира, встряхивали в течение 15 мин, отделяли эфирный слой и высушивали в токе азота до суха, остаток растворяли в элюенте и вводили в систему ВЭЖХ-УФ.

Фармакокинетические параметры, используемые для интерпретации экспериментальных данных. Основные фармакокинетические параметры рассчитаны модельно-независимым методом (программа «M-IND») [3]:

$AUC_{0 \rightarrow \infty}$ (нг/мл×мин) — площадь под кривой «концентрация лекарственного вещества — время», рассчитывается от момента введения до бесконечности;

$AUC_{0 \rightarrow t}$ (нг/мл×мин) — площадь под фармакокинетической кривой, рассчитывается от момента введения до момента последней регистрации концентрации исследуемого соединения;

C (нг/мл) — концентрация препарата в плазме крови после перорального введения;

$T_{\max}$ (мин) — время достижения максимальной концентрации препарата в плазме крови после перорального введения;

$C_{\max}$ (нг/мл) — максимальная концентрация лекарственного вещества в плазме крови после перорального введения;

$C_{\max}/AUC$ (мин⁻¹) — параметр, характеризующий скорость всасывания препарата в системный кровоток;

MRT (мин) — среднее время пребывания лекарственного вещества в организме;

$K_{\text{эл}}$ (мин⁻¹) — константа скорости элиминации, параметр, характеризующий скорость выведения препарата из организма;

$T_{1/2}$ (мин) — период, за который выводится половина введённой и всосавшейся дозы лекарственного вещества;

$V_{\text{зр}}$ (л) — гипотетический объём распределения;

F (%) — относительная биодоступность: $(AUC_{0 \rightarrow t}(A)/AUC_{0 \rightarrow t}(B) \times 100\%)$.

Статистическая обработка полученных результатов. Полученные экспериментальные данные были обработаны с помощью программы «Excel v.11.0». Достоверность различий для сравниваемых концентраций исследуемых соединений оценивали с помощью критерия Стьюдента [4].

Поскольку представленные фармакокинетические кривые были построены по усреднённым значениям 5-8 полученных данных на каждую временную точку, то при расчётах фармакокинетических параметров отсутствует статистическая обработка результатов. На всех графиках представлены средние значения $\bar{X} \pm SD$ (SD — стандартное отклонение).

Результаты исследований и их обсуждение

Фармакокинетика ГБ-115 у крыс после перорального введения кристаллической и микронизированной субстанции в дозе 100 мг/кг. Фармакокинетические кривые ГБ-115 после перорального введения крысам микронизированной и кристаллической субстанций в дозе 100 мг/кг представлены на рис. 1. Время регистрации ГБ-115 в плазме крови крыс колеблется от 45 до 60 мин для кристаллической и микронизированной субстанций, соответственно. Максимумы концентраций ГБ-115 наблюдаются через 10 мин после введения кристаллической и через 20 мин после введения микронизированной субстанции. Исходя из данных рис. 5, можно сделать вывод, что после введения кристаллической субстанции, регистрируются более высокие концентрации ГБ-115 в течение первых 15 мин, но в последующие интервалы времени концентрации соединения снижаются и их значения становятся ниже, чем концентрации после введения микронизированной субстанции.

Кроме того, можно отметить, что после перорального введения ГБ-115 как в виде микронизированной, так и кристаллической субстанций неизменённое соединение быстро всасывается и поступает в системный кровоток, и уже через 5 мин в плазме крови крыс регистрируются значительные концентрации анализируемого вещества.

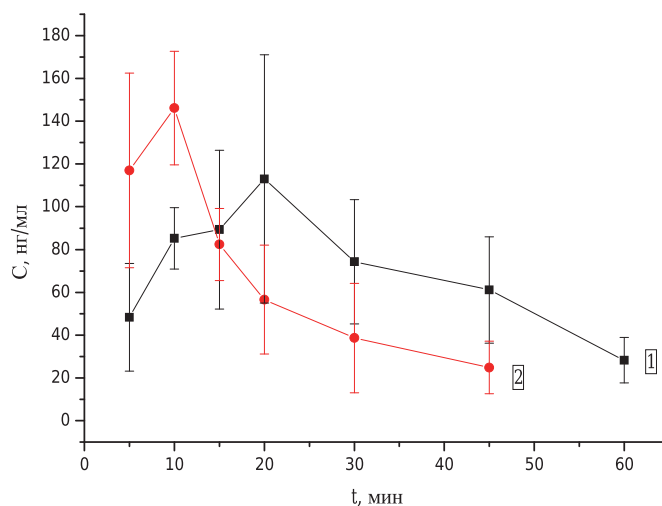


Рис. 1. Фармакокинетические кривые ГБ-115 после перорального однократного введения в дозе 100 мг/кг микронизированной (1) и кристаллической (2) субстанций

Средние концентрации ГБ-115 в различные интервалы времени и его фармакокинетические параметры после введения кристаллической и микронизированной субстанций вещества представлены в табл. 1 и 2, соответственно.

Как видно из приведённых выше таблиц, время достижения максимальной концентрации ГБ-115 после введения кристаллической субстанции в дозе 100 мг/кг в плазме крови крыс составило 10 мин, а её вели-

Таблица 1

**Средние концентрации ГБ-115 после перорального введения
кристаллической и микронизированной субстанций ГБ-115 крысам в дозе 100 мг/кг**

Анализируемое вещество	Показатель	Концентрация, нг/мл						
		5	10	15	20	30	45	60
Микр. субст.	Время	5	10	15	20	30	45	60
	Хср	48,35	85,21	89,30	113,02	74,32	61,10	28,26
	SD	25,163	14,336	37,126	58,039	29,036	24,892	10,600
Крист. субст.	Время	5	10	15	20	30	45	60
	Хср	116,93	146,16	82,36	56,60	38,64	24,84	-
	SD	45,502	26,600	16,908	25,500	25,558	12,320	-

чина — 146,16 нг/мл. Максимальная же концентрация ГБ-115 после введения микронизированной субстанции в той же дозе составила 113,02 нг/мл, и достигалась через 20 мин.

Анализ параметров кинетики позволяет заключить, что ГБ-115 быстро выводится из организма после перорального введения микронизированной и в большей степени кристаллической субстанций, на что указывают значения констант скорости элиминации из плазмы крови (K_e), которые составили 0,0323 и 0,0471 мин⁻¹ соответственно. Быстрое выведение ГБ-115 из плазмы крови животных также характеризуется такими фармакокинетическими параметрами, как среднее время удерживания препарата в организме, которое почти в 2 раза выше для ГБ-115 после введения микронизированной субстанции 39,87 мин, чем после введения кристаллической — 23,83 мин. Соответственно это нашло отражение и для периода полувыведения, значения которого ниже для кристаллической субстанции — 14,73 мин, чем для микронизированной субстанции — 21,49 мин.

Подводя итоги, следует отметить, что ГБ-115 в 1,5 раза более продолжительное время находится в организме испытуемых животных после его введения в виде микронизированной субстанции, чем при введении в той же дозе кристаллической субстанции. На это также указывают полученные значения плазменного клиренса ГБ-115 (4,013 л/мин для микронизированной и 6,099 л/мин для кристаллической субстанции).

Значения гипотетического объёма распределения ГБ-115 после введения анализируемых субстанций незначительно отличается, что указывает на сходный характер распределения активного вещества в органах и тканях.

Скорость всасывания и площадь под фармакокинетической кривой ГБ-115 существенно отличается после введения крысам двух субстанций. Так, площадь под фармакокинетической кривой ГБ-115 после введения микронизированной субстанции в 1,5 раза выше, чем после введения кристаллической, что свидетельствует о более высокой относительной биодоступности ГБ-115 после введения микронизированной субстанции. Однако, скорость всасывания ГБ-115 после

введения микронизированной субстанции, судя по времени достижения C_{max} , происходит медленнее, чем после введения кристаллической субстанции, что может рассматриваться как преимущество данного технологического приёма — микронизации и более продолжительно определяться в плазме крови животных после введения микронизированной субстанции. Это может сопровождаться более продолжительным фармакологическим действием вещества. Надо отметить, что микронизация, которая должна способствовать увеличению скорости всасывания, 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. Одной из причин отсутствия желаемого эффекта (увеличение скорости растворения и абсорбции) от изучаемого технологического приёма микронизации является наличие процессов агломерации и агрегации. При микронизации происходит резкое увеличение удельной поверхности частиц и вместе с тем усиление притяжения Ван-дер-Ваальсовых сил между неполярными молекулами, что и лежит в основе процессов агломерации и агрегации.

Возможно, вследствие одной из приведённых причин, ГБ-115 более медленно всасывается в организме подопытных животных после введения микронизированной субстанции и неизменное соединение регистрируется в плазме крови животных более продолжительное время. С целью проверки фармакокинетических закономерностей ГБ-115, полученных после перорального введения крысам различных субстанций изучаемого соединения, в опытно-технологическом отделе ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова» были созданы 4 лабораторных образца фармацевтических композиций ГБ-115 с использованием кристаллической и микронизированной субстанций, а также различных вспомогательных веществ. Результаты проведённых исследований фармакокинетики и биодоступности четырёх фармацевтических композиций изучаемого соединения представлены на рис. 2 и в табл. 3.

Таблица 2

Фармакокинетические параметры ГБ-115 у крыс
после перорального введения кристаллической и микронизированной субстанций

Параметры	Кристаллическая субстанция	Микронизированная субстанция
$AUC_{0 \rightarrow \infty}$, нг/мл×мин	2821,050	4019,415
$AUC_{0 \rightarrow t}$, нг/мл×мин	3279,311	4983,617
T_{max} , мин	10	20
C_{max} , нг/мл	146,16	113,022
C_{max}/AUC , мин ⁻¹	0,052	0,028
C_{pro} , л/мин	6,099	4,013
K_{el} , мин ⁻¹	0,0471	0,0323
$T_{1/2}$, мин	14,73	21,49
MRT, мин	23,83	39,87
Vz_{pro} , л	129,60	124,40
F , %		142,48

Сравнительная фармакокинетика и биодоступность четырёх фармацевтических композиций ГБ-115

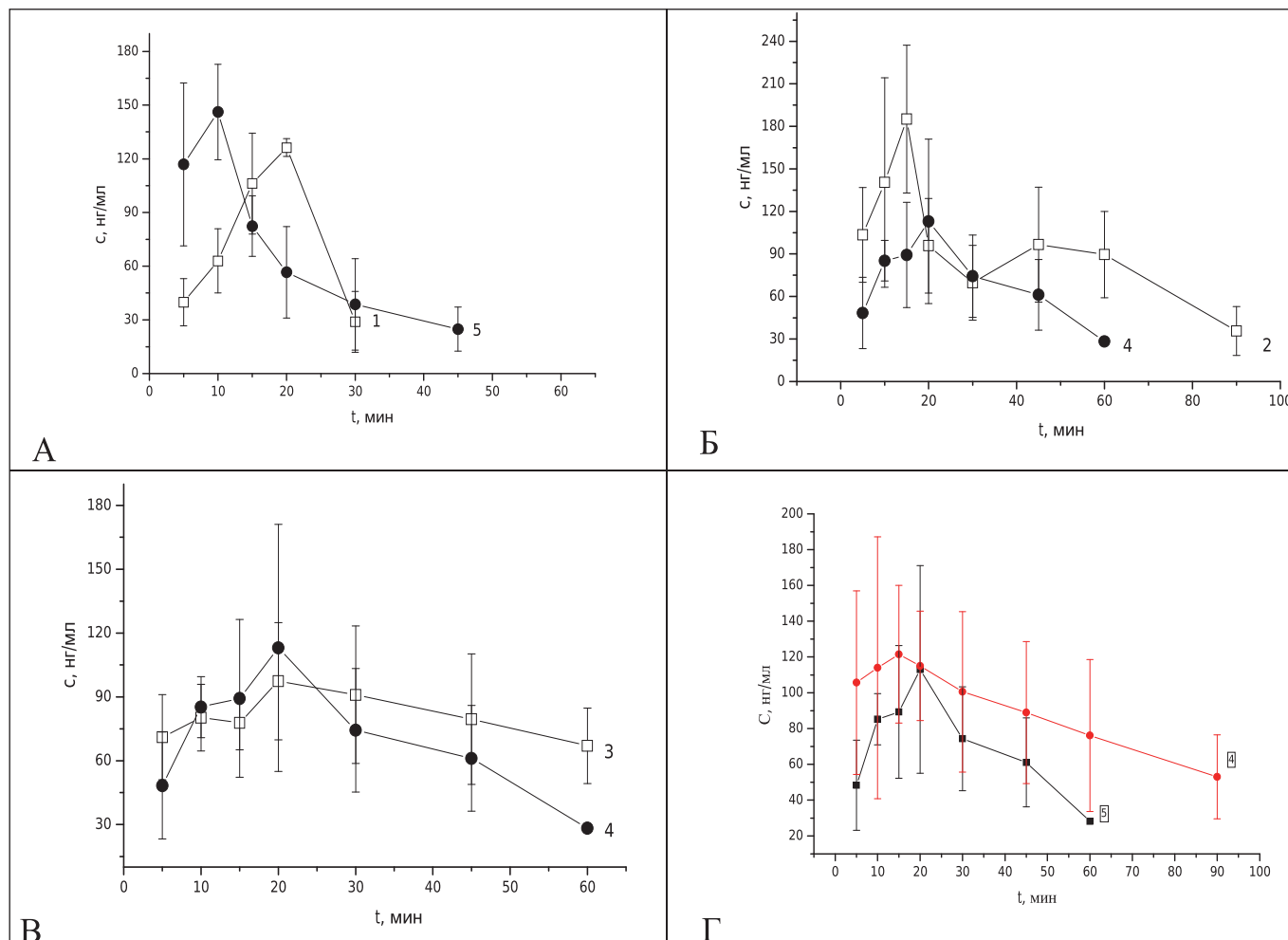


Рис. 2. Фармакокинетические кривые ГБ-115 после перорального однократного введения в дозе 100 мг/кг а) фармацевтической композиции №1 (1) и кристаллической субстанции (5) б) фармацевтической композиции №2 (2) и микронизированной субстанции (4) в) фармацевтической композиции №3 (3) и микронизированной субстанции (4) г) фармацевтической композиции №4 (4) и микронизированной субстанции (5).

На рис. 2 представлены фармакокинетические кривые ГБ-115 в плазме крови крыс после однократного перорального введения ГБ-115 в виде водного раствора кристаллической и микронизированной субстанции, а также его четырёх фармацевтических композиций в дозе 100 мг/кг. Как видно из рис. 2 ГБ-115 быстро всасывается в ЖКТ, поступает в системный кровоток и определяется в плазме крови крыс уже через 5 мин после введения как субстанции, так и 4-х фармацевтических композиций.

Однако на стадии абсорбции препарата отмечаются значительные различия как в количественном содержании ГБ-115, так и в динамике изменения его концентраций после введения анализируемых фармацевтических композиций. Для фармацевтической композиции №1 характерно постепенное увеличение концентрации активного соединения с достижением максимальной концентрации через 20 мин после введения, которая составляет 126,25 нг/мл. Фармацевтическая композиция №2 отличается резким подъёмом концентрации фармакологически активного соединения: уже через 5 мин после введения она составляет 103,41 нг/мл и достигает максимума через 15 мин — 185,10 нг/мл. В последующие интервалы времени концентрация ГБ-115 постепенно снижалась на протяжении 1,5 ч и в конечный период времени составила — 35,61 нг/мл. Максимальная концентрация ГБ-115 после введения фармацевтической композиции №3 была самой низкой и составила 97,36 нг/мл через 20 мин после введения. Для данной фармацевтической композиции характерно наличие достаточно высоких концентраций в последующие интервалы времени. Концентрация ГБ-115 после введения фармацевтической композиции №4 достигает своего максимального значения через 15 мин и составляет 121,5 нг/мл.

Значительные различия в кинетике ГБ-115 наблюдались и на стадии его элиминации из плазмы крови крыс. Так, для фармацевтической композиции №1 от-

мечалось быстрое снижение концентрации ГБ-115 в период 20–30 мин и через 45 мин активное вещество в плазме крови крыс не обнаруживалось. Для фармацевтической композиции №2 и №4 концентрация ГБ-115 в плазме крови крыс снижалась более медленно и через 90 мин соединение регистрировалось в достаточно высоком количестве. Характер элиминации ГБ-115 после перорального введения фармацевтической композиции №3 более медленный, причём, высокая его концентрация сохранялась в течение 60 мин и составила в этот интервал времени 66,35 нг/мл.

На основании полученных экспериментальных данных рассчитаны основные фармакокинетические параметры ГБ-115, которые представлены в сводной табл. 3.

Для сравнения длительности пребывания активного вещества в неизменном виде в организме испытуемых животных после введения каждой из предложенных фармацевтических композиций необходимо сравнить следующие параметры: K_{el} , $T_{1/2}$, MRT, C_{max}/AUC . ГБ-115 быстрее выводится из организма после введения фармацевтической композиции №1. Для неё характерны высокое значение константы скорости элиминации — 0,1475 мин⁻¹, короткий период полувыведения — 4,7 мин и небольшое среднее время удержания лекарственного вещества в плазме крови крыс — 18,26 мин. Фармацевтическая композиция №3 (K_{el} — 0,0323 мин⁻¹, $T_{1/2}$ — 74,01 мин, MRT — 113,20 мин), отличается от фармацевтической композиции №1 более медленным выведением неизменённого вещества в течение 60 мин, что является хорошим показателем для фармацевтических композиций, содержащих пептидные соединения. Однако величина C_{max} у неё самая низкая и к 90 мин после введения концентрация активного вещества ГБ-115 стремится к нулю. Кроме того, для фармацевтической композиции №2 в отличие от других регистрируется 2-ой максимум концентраций вещества (между 40 и 60 мин после введения), что может быть

Таблица 3

**Фармакокинетические параметры (ФК) ГБ-115
после введения четырёх разработанных фармацевтических композиций в дозе 100 мг/кг**

Параметры	ФК_1	ФК_2	ФК_3	ФК_4
$AUC_{0 \rightarrow \infty}$, нг/мл×мин	2136,225	7731,801	4708,205	7664,125
$AUC_{0 \rightarrow t^*}$, нг/мл×мин	2332,120	10399,650	11962,190	12615,99
T_{max} , мин	20	15	20	15
C_{max} , нг/мл	126,250	185,098	97,364	121,5
C_{max}/AUC , мин ⁻¹	0,059	0,024	0,021	0,016
$C_{пр0}$, мл/мин	8,576	1,923	1,672	1,585
K_{el} , мин ⁻¹	0,1475	0,0155	0,0094	0,0109
$T_{1/2}$, мин	4,70	44,75	74,01	63,86
MRT, мин	18,26	68,32	113,20	95,75
$V_{пр0}$, мл	58,15	124,20	178,50	146,00
F, %	53,15	192,36	117,14	190,68

связано с эффектом энтерогепатической рециркуляции. Оптимальные фармакокинетические характеристики получены для фармацевтических композиций №2 и №4: для них характерны более медленное снижение концентраций вещества в плазме крови крыс с K_{el} — 0,0155 мин⁻¹ и 0,0109 мин⁻¹, невысокие значения клиренса Cl_{po} 1,923 мл/мин и 1,585 мл/мин, длительные периоды полувыведения — 44,75 мин и 63,86 мин и значительные показатели среднего времени удержания ГБ-115 в плазме крови крыс — MRT — 68,32 мин и 95,75 мин, соответственно.

Кроме того, для фармацевтических композиций №2 и №3, а также для фармацевтической композиции №4 характерны высокие значения гипотетического объёма распределения — 178,50 мл, 124,20 мл и 146,00 мл, соответственно, что значительно выше объёма распределения фармацевтической композиции №1 — 58,15 мл.

После введения животным фармацевтических композиций №2 и №4 определяются самые высокие площади под фармакокинетической кривой ГБ-115 (табл. 3) и, соответственно, самые высокие величины относительной биодоступности, составляющие 192,36% и 190,68% соответственно, что указывает на их преимущество по сравнению с другими исследуемыми фармацевтическими композициями. При анализе скорости всасывания (C_{max}/AUC) существенных различий для фармацевтических композиций №2 и №4 не обнаружено.

Заключение

При разработке любого оригинального лекарственного средства важным и необходимым являются фармакокинетические и биофармацевтические исследования. Они, помимо расчёта основных фармакокинетических характеристик вещества, позволяют определить перспективность того или иного пути его введения, а также выбрать оптимальную лекарственную форму изучаемого фармакологического соединения. Для соединения ГБ-115 эти исследования показали возможность использования перорального пути его введения для дальнейшего использования и внедрения его в медицинскую практику. При этом, проанализировав различные субстанции ГБ-115, были найдены существенные отличия их фармакокинетических характеристик и получено значительное преимущество микронизированной субстанции, относительная биодоступность которой превышала таковую для кристаллической субстанции в 1,5 раза. Это послужило основанием для рекомендации этой субстанции при изготовлении различных фармацевтических композиций ГБ-115 для перорального применения. Фармакокинетическое и биофармацевтическое изучение различных фармацевтических композиций показало, что фармацевтические композиции №2 и №4, изготовленные с применением микронизированной субстанции ГБ-115 и вспомогательных веществ, имели преимущество перед другими представленными на анализ фармацевтическими композициями.

Во-первых, они определялись более продолжительное время в плазме крови крыс, а во-вторых, была достигнута высокая относительная биодоступность, что позволило выделить эти две фармацевтические композиции и рекомендовать их для дальнейшего фармакологического изучения. Фармацевтическая композиция №2 отличалась самой высокой максимальной концентрацией. В её состав вошли следующие вспомогательные вещества: микронизированная субстанция ГБ-115, твёрдая дисперсная система с поливинилпирролидоном. Такие положительные фармакокинетические характеристики были связаны, с одной стороны, с микронизацией, с другой, с положительным влиянием матрицы поливинилпирролидона, на основе которой была создана фармацевтическая композиция №2. Многочисленными исследованиями доказано, что скорость и продолжительность действия лекарственного вещества в качестве моносоставляющего, диспергированного в матрице поливинилпирролидона, может быть повышена в 2-3 раза [5-8].

Фармацевтическая композиция №4 (в её состав входят микронизированная субстанция ГБ-115, лактоза, микрокристаллическая целлюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза) характеризовалась самой высокой площадью под фармакокинетической кривой, ввиду того, что концентрации сохранялись на высоком уровне в течение всего периода наблюдения. Это можно объяснить присутствием в фармацевтической композиции №4 вспомогательного вещества гидроксипропилметилцеллюлозы — гидрофильной матрицы с контролируемой доставкой активного вещества, которая существенно повышает продолжительность высвобождения действующего вещества, что может в значительной степени пролонгировать фармакологический эффект лекарственного препарата [9, 10].

Поэтому эти две фармацевтические композиции рекомендованы для дальнейшего проведения фармакологических исследований.

Основные выводы

1. Разработаны высокочувствительные методики качественного (на основе хроматомасс-спектрометрии) и количественного (на основе ВЭЖХ) определения ГБ-115 в биоматериале.
2. Методика экстракции и количественного определения ГБ-115 в биоматериале, основанная на ВЭЖХ с УФ-детектором, обладала высокой чувствительностью и селективностью и была адаптирована для изучения фармакокинетики ГБ-115 у крыс.
3. Сравнительное изучение фармакокинетики и относительной биодоступности кристаллической и микронизированной субстанции ГБ-115 у крыс показало преимущество микронизированной субстанции и перспективность создания на её основе пероральной лекарственной формы.

4. Показано, что из всех вспомогательных веществ, используемых при приготовления фармацевтических композиций ГБ-115, поливинилпирролидон в форме твёрдой дисперсной системы и гидроксипропилметилцеллюлоза оказывают существенное влияние на скорость и степень всасывания изучаемого соединения у крыс.
5. Изучение фармакокинетических характеристик ГБ-115 после перорального введения крысам его четырёх разработанных фармацевтических композиций, отличающихся как по составу, так и по технологии приготовления позволили выявить две оптимальные фармацевтические композиции и рекомендовать их для дальнейшего фармакологического изучения.

Литература

1. Середенин С.Б., Гудашева Т.А., Зайцева Н.И., Колик Л.Г., Брилинг В.К., Константинопольский М.А. // Пат РФ №2227144 С1 от 15.11.2001. «Замещённые триптофансодержащие дипептиды с холецистокининнегативной и холецистокининпозитивной активностью». Оpubл. 20.04.2004; Бюл. №11.
2. Гудашева Т.А., Кирьянова Е.П., Колик Л.Г., Константинопольский М.А., Середенин С.Б. Дизайн и синтез дипептидных аналогов холецистокинина-4 с анксиолитическими и анксиогенными свойствами. // Биоорганическая химия.-2007.-Т.33.-№4, — С.413-420.
3. Агафонов А.А., Пиотровский В.К. Метод статистических моментов и внемоделные характеристики распределения и элиминации лекарственных средств. // Хим-фарм. журн. — 1984, №.7, — С. 845-849.
4. Сергиенко В.И., Бондарева И.Б. Математическая статистика в клинических исследованиях — М.; ГЕОТАР-МЕД, 2001, — с. 256.
5. Craig D.Q.M. The mechanism of drug release from solid dispersion in water-soluble polymers. // Int. J. of Pharmaceutics.-2002, -V. 231, — P. 131-144.
6. Anupama K., Poddar M. Solid dispersion: an approach toward enhancing dissolution rate. // International J. of Pharm. and Pharm.Sci.-2011, - V. 3(4), — P. 22-23.
7. Tiwari R., Tiwari G., Srivastava B. et al. Solid dispersion: An Overview To Modify Bioavailability of Poorly Water Soluble drugs. // International J. of Pharmtech Research, — 2009,— V.4(1), — P. 1338-1349.
8. 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.
9. Li C.L. Martini L.G. Ford G.L. et al. The use of hipromellose in oral drug delivery. // J. Pharm. Pharmacol. — 2005, -V. 57(5), — P. 533-546.
10. Mitchell S.A., Balwinski K.M. A frame to investigate drug release variability arising from hypromellose viscosity specifications in controlled release matrix tablets. //J. Pharm. Sci.-2008, -V. 97(6), — P. 2277-2285.