

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-197-206>
УДК 615.074; 615.31; 615.033



Оригинальная статья / Research article

Разработка и валидация методики определения инновационного препарата DD217 – ингибитора фактора Ха в плазме крови крыс с целью проведения фармакокинетического исследования

Н. С. Дубовик^{1✉}, Д. Ф. Гуранда^{3,5}, Г. В. Раменская², Д. Г. Товбин^{4,6}, Д. Н. Тарасов^{4,6},
А. Ю. Савченко⁷, В. С. Арнаутов⁴

¹ ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ» (НИЯУ МИФИ), 115409, Россия, г. Москва, Каширское шоссе, д. 31

² ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

³ ООО «Фарм ИннТех», 121596, Россия, г. Москва, ул. Горбунова, д. 2

⁴ ООО «ФармаДиол», 121205, г. Москва, тер. инновационного центра Сколково, ул. Нобеля, д. 7, помещение 146

⁵ Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А. Н. Белозерского (НИИФХБ), МГУ имени М. В. Ломоносова, 119992, Россия, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40

⁶ ФГБУН Институт химической физики им. Н. Н. Семёнова Российской академии наук (ИХФ РАН), 119991, Россия, г. Москва, ул. Косыгина, д. 4

⁷ ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУН НЦБМТ ФМБА России), 143442, Россия, Московская область, Красногорский район, пос. Светлые Горы, владение 1

✉ Контактное лицо: Дубовик Наталья Сергеевна. E-mail: NSDubovik@mephi.ru

ORCID: Н. С. Дубовик – <https://orcid.org/0000-0002-6171-2496>; Д. Ф. Гуранда – <https://orcid.org/0000-0001-7500-6122>; Г. В. Раменская – <https://orcid.org/0000-0001-8779-3573>;

Д. Г. Товбин – <https://orcid.org/0000-0002-9917-0469>; Д. Н. Тарасов – <https://orcid.org/0000-0002-8106-9960>; А. Ю. Савченко – <https://orcid.org/0000-0003-2734-5036>;

В. С. Арнаутов – <https://orcid.org/0000-0003-3554-8941>.

Статья поступила: 07.06.2021

Статья принята в печать: 20.05.2022

Статья опубликована: 25.05.2022

Резюме

Введение. В настоящее время актуальной задачей для фармацевтической науки является поиск и разработка инновационных препаратов. Одним из таких является N-(5-хлорпиридин-2-ил)-2-((4-[этанамидоил(метил)амино]бензоил)амино)-5-метилбензамида гидрохлорид (далее – DD217) – инновационный препарат, относящийся к классу антикоагулянтов, ингибиторов фактора Ха.

Цель. Целью настоящего исследования явилась разработка и валидация методики определения DD217 в плазме крови крыс методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) и применение разработанной методики для проведения фармакокинетических исследований.

Материалы и методы. В исследовании были использованы аутбредные крысы Wistar. Крысам вводили раствор субстанции DD217 однократно, внутривенно в дозах 5, 15, 30 мг/кг. Для определения DD217 в плазме крови крыс применяли валидованную методику определения DD217 методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС). В качестве внутреннего стандарта был выбран небиволол. Хроматографическое разделение проводилось с использованием колонки Phenomenex Luna C8 (3 мкм, 50 × 4,6 мм). В качестве подвижной фазы использовали 0,1%-й раствор муравьиной кислоты в деионизованной воде и 0,1%-й раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле. Общее время анализа каждого образца составляло 2,0 мин. DD217 и небиволол детектировали в режиме положительной ионизации электроспреем по ионным переходам m/z 436,1 → 119,9 и 406,0 → 151,0 соответственно. Фармакокинетические параметры и описательную статистику рассчитывали модельно-независимым методом при помощи программного обеспечения IBM SPSS Statistics v27 и Julia v1.6.0 (Mixed Models v3.8.0, ClinicalTrialUtilities v0.5.1).

Результаты и обсуждение. Разработанная методика была валидована по следующим показателям: нижний предел количественного определения, селективность, правильность и прецизионность, допустимость разведения, линейность, эффект матрицы, степень извлечения, эффект переноса и стабильность. Нижний предел количественного определения DD217 в плазме крови крыс составил 2,0 нг/мл. Разработанная методика была успешно применена для определения фармакокинетических параметров субстанции DD217 в плазме крови крыс после внутривенного введения в дозах 5, 15, 30 мг/кг.

Заключение. Методика для количественного определения DD217 в плазме крови впервые разработана, валидована и применена для оценки фармакокинетических параметров субстанции DD217 в плазме крови крыс.

Ключевые слова: DD217, крысы, плазма, ВЭЖХ-МС/МС, валидация, фармакокинетика

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. Д. Г. Товбин, Д. Н. Тарасов планировали эксперимент. Н. С. Дубовик, Д. Н. Тарасов, Д. Г. Товбин участвовали в проведении эксперимента. Н. С. Дубовик, Д. Ф. Гуранда участвовали в разработке и валидации биоаналитической методики. В. С. Арнаутов проводил статистическую обработку данных. Н. С. Дубовик, Д. Н. Тарасов, Д. Г. Товбин, А. Ю. Савченко, Г. В. Раменская участвовали в анализе и описании полученных результатов. Все авторы участвовали в обсуждении результатов и написании текста статьи.

Благодарность. Работа финансировалась О. Е. Балашовым и А. И. Барановым, а также Фондом «Сколково» (грантовый договор № 20/14 от 16 июня 2014 г.) и являлась частью государственного задания 0082-2019-0003, № AAAA.-A20-120021090129-9.

Для цитирования: Дубовик Н. С., Гуранда Д. Ф., Раменская Г. В., Товбин Д. Г., Тарасов Д. Н., Савченко А. Ю., Арнаутов В. С. Разработка и валидация методики определения инновационного препарата DD217 – ингибитора фактора Ха в плазме крови крыс с целью проведения фармакокинетического исследования. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(2):197–206. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-197-206>

© Дубовик Н. С., Гуранда Д. Ф., Раменская Г. В., Товбин Д. Г., Тарасов Д. Н., Савченко А. Ю., Арнаутов В. С., 2022

© Dubovik N. S., Guranda D. F., Ramenskaya G. V., Tovbin D. G., Tarasov D. N., Savchenko A. Yu., Arnautov V. S., 2022

Development and Validation of the HPLC Method for Quantification of the Innovative Drug DD217, Factor Xa Inhibitor, in Rat Plasma for a Pharmacokinetic Study

Natalia S. Dubovik¹✉, Dorel F. Guranda^{3,5}, Galina V. Ramenskaya², Dmitry G. Tovbin^{4,6}, Dmitry N. Tarasov^{4,6}, Alla Yu. Savchenko⁷, Vladimir S. Arnautov⁴

¹ National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute), 31, Kashirskoe highway, Moscow, 115409, Russia

² I. M. Sechenov First MSMU of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

³ LLC "Pharm InnTech", 2, Gorbunova str., Moscow, 121596, Russia

⁴ LLC "PharmaDiall", 7/146, Nobel str., ter. Innovation Center Skolkovo, Moscow, 121205, Russia

⁵ A. N. Belozersky Research Institute of Physical-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 1/40, Leninskiye Gory, Moscow, 119992, Russia

⁶ N. N. Semenov Institute of Chemical Physics, 4, Kosygina str., Moscow, 119991, Russia

⁷ Scientific Center for Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency, possession 1, Svetlye Gory settlement, Krasnogorsk district, Moscow region, 143442, Russia

✉ Corresponding author: Natalia S. Dubovik. E-mail: NSDubovik@mephi.ru

ORCID: Natalia S. Dubovik – <https://orcid.org/0000-0002-6171-2496>; Dorel F. Guranda – <http://orcid.org/0000-0001-7500-6122>; Galina V. Ramenskaya – <http://orcid.org/0000-0001-8779-3573>; Dmitry G. Tovbin – <https://orcid.org/0000-0002-9917-0469>; Dmitry N. Tarasov – <http://orcid.org/0000-0002-8106-9960>; Alla Yu. Savchenko – <http://orcid.org/0000-0003-2734-5036>; Vladimir S. Arnautov – <https://orcid.org/0000-0003-3554-8941>.

Received: 07.06.2021

Revised: 20.05.2022

Published: 25.05.2022

Abstract

Introduction. Nowadays, discovery and development of innovative drugs represent a relevant goal for the pharmaceutical market. One of such drugs is N-(5-chloropyridine-2-yl)-2-((4-[ethanimidoyl(methyl)benzoyl]amino)-5-methylbenzamide hydrochloride (hereinafter DD217), an innovative drug that belongs to the class of anticoagulants, namely factor Xa inhibitors.

Aim. The aim of this study was to develop and validate a method for DD217 determination in rat plasma by means of high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) to carry out pharmacokinetic studies.

Materials and methods. Outbred Wistar rats were used in the study. Rats received a single dose of DD217 substance solution intragastrically at a dose of 5, 15, 30 mg/kg. The validated HPLC-MS/MS method was employed for DD217 determination in rat plasma. Nebivolol was chosen as the internal standard of the method. Chromatographic separation involved the use of Phenomenex Luna C8 column (3 µm, 50 × 4.6 mm) and gradient elution with water-acetonitrile solution containing 0.1 % formic acid. The total run time of each sample was equal to 2.0 min. DD217 and nebivolol were detected in positive electrospray ionization mode, the ion transitions monitored were m/z 436,1 → 119,9 and 406,0 → 151,0, respectively. Pharmacokinetic parameters and descriptive statistics were calculated through model-independent method in IBM SPSS Statistics v27 and Julia v1.6.0 (MixedModels v3.8.0, ClinicalTrialUtilities v0.5.1) software.

Results and discussion. Method was validated by linearity, lower limit of quantification, selectivity, accuracy and precision, dilution integrity, matrix effect, recovery, carry-over, and stability. The lower limit of quantification of DD217 in rat plasma was 2.0 ng/mL. The method was successfully applied for establishing the pharmacokinetic parameters of DD217 substance in rat plasma after intragastric administration at a dose of 5, 15, 30 mg/kg.

Conclusion. HPLC-MS/MS method for DD217 determination in plasma was developed, validated and applied in order to evaluate pharmacokinetic parameters of DD217 substance in rat plasma.

Keywords: DD217, rat, plasma, HPLC-MS/MS, validation, pharmacokinetics

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Dmitry G. Tovbin, Dmitry N. Tarasov planned the experiment. Natalia S. Dubovik, Dmitry N. Tarasov, Dmitry G. Tovbin participated in the experiment. Natalia S. Dubovik, Dorel F. Guranda participated in the development and validation of the bioanalytical methodology. Vladimir S. Arnautov carried out statistical data processing. Natalia S. Dubovik, DN Tarasov, Dmitry G. Tovbin, Alla Yu. Savchenko, Galina V. Ramenskaya participated in the analysis and description of the obtained results. All authors participated in the discussion of the results and writing the text of the article.

Acknowledgment. The work was financed by O. E. Balashov and A. I. Baranov, as well as by the Skolkovo Foundation (grant agreement No. 20/14 dated June 16, 2014) and was part of the state assignment 0082-2019-0003, No. AAAA. -A20-120021090129-9.

For citation: Dubovik N. S., Guranda D. F., Ramenskaya G. V., Tovbin D. G., Tarasov D. N., Savchenko A. Yu., Arnautov V. S. Development and validation of the HPLC method for quantification of the innovative drug DD217, factor Xa inhibitor, in rat plasma for a pharmacokinetic study. *Drug development & registration*. 2022;11(2):197–206. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-197-206>

ВВЕДЕНИЕ

Заболевания сердечно-сосудистой системы являются одними из причин инвалидизации и смертности взрослого населения экономически развитых стран мира [1]. Наиболее распространенными заболеваниями являются заболевания, вызванные нарушением свертываемости крови и образованием тромбов, в

частности инфаркт миокарда и легких, тромботические и эмболические инсульты, тромбофлебиты. Высокая частота осложнений данных заболеваний и их влияние на смертность, увеличение риска летального исхода без надлежащей профилактики, затраты, связанные с лечением, способствуют широкому использованию в клинической практике различных антикоагулянтов [1–4].

Долгое время в клинической практике применялись пероральные антикоагулянты из группы антагонистов витамина К («Варфарин» и «Аценокумарол»). К недостаткам данных препаратов относят необходимость регулярного контроля уровня международного нормализованного отношения (МНО) в пределах 2,0–3,0, а также зависимость эффективности от приема ряда лекарственных препаратов и пищи [5, 6].

К 2008–2010 годам были созданы новые пероральные антикоагулянты, селективно ингибирующие один фактор свертывания: прямые ингибиторы тромбина (например, дабигатрана этексилат) и прямые ингибиторы активированного фактора X (Ха) (например, ривароксабан, апиксабан). Однако, как показали исследования, и их применение приводит к развитию многих нежелательных реакций со стороны различных органов и систем организма, а также вызванных взаимодействием с другими препаратами [5, 7–11].

В связи с этим чрезвычайно важным является поиск и разработка новых пероральных антикоагулянтов, которые бы обладали большей эффективностью, безопасностью и удобством применения.

Одним из таких препаратов может стать инновационный препарат DD217, разработанный компанией ООО «ФармаДиол» (г. Москва) [производство ФГУП НПЦ Фармзащита ФМБА России (г. Химки)] [12].

DD217 относится к классу пероральных антикоагулянтов, прямых ингибиторов фактора Ха [12]. Доклинические исследования, проведенные компанией ООО «ФармаДиол», продемонстрировали перспективность DD217. По некоторым показателям (например, концентрация, удваивающая протромбиновое время на человеческой плазме) препарат может претендовать на место лучшего в классе оральных антикоагулянтов, прямых ингибиторов фактора Ха. В результате анализа токсикологических и фармакокинетических данных DD217 был рекомендован для дальнейших исследований.

Внедрение в клиническую практику препарата DD217 может повысить приверженность пациентов терапии и снизить частоту и выраженность побочных эффектов.

Целью нашего исследования явилась разработка высокочувствительной методики количественного определения DD217 в плазме крови крыс с целью оценки фармакокинетических параметров субстанции DD217.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оборудование

Хроматографическое разделение и детектирование проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Agilent 1290 Infinity (Agilent Technologies, Германия) с масс-спектрометрическим детектором Agilent 6490 Triple Quad LC/MS (Agilent Technologies, Германия).

Реактивы и растворы

В работе были использована субстанция N-(5-хлорпирдин-2-ил)-2-({4-[этанамидоил(метил)амино]бензоил}амино)-5-метилбензамида гидрохлорид (субстанция-порошок, производитель ФГУП НПЦ «Фармзащита», ФМБА Россия) (рисунок 1). Внутренний стандарт (BC): небиволола гидрохлорид (серия 1, Tocris Bioscience, Великобритания) (рисунок 2). Используемые реактивы: метанол (Gradient grade, J.T. Baker, Нидерланды); муравьиная кислота (pure, PanReac AppliChem, Испания, Германия); этилацетат (Gradient grade, Sigma-Aldrich, США); ацетонитрил (Gradient grade, Scharlau, Испания); натрия бикарбонат (pure, PanReac AppliChem, Испания, Германия); вода очищенная.

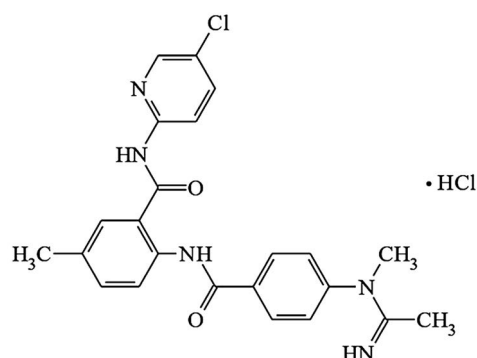


Рисунок 1. Структурная формула DD217

Figure 1. Structural formula of DD217

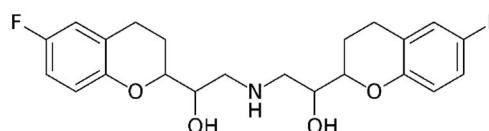


Рисунок 2. Структурная формула небиволола

Figure 2. Structural formula of nebivolol

Маточный раствор DD217 получали путем растворения точной навески вещества в 100 мл водно-ацетонитрильного раствора (1:1). Исходные маточные растворы разбавляли смесью ацетонитрила и воды (1:1) для получения рабочих стандартных растворов с необходимыми концентрациями.

Приготовление калибровочных образцов и образцов для контроля качества (QC)

Калибровочные образцы готовили в полипропиленовых пробирках объемом 1,5 мл (Greiner Bio-One GmbH, Германия). Аликвоты рабочих стандартных растворов DD217 помещали в полипропиленовые пробирки вместимостью 1,5 мл, высушивали в токе азота. К сухому остатку добавляли по 200 мкл интакт-

ной плазмы. Пробирки плотно закрывали, перемешивали на вибрационном шейкере VORTEX (IKA®, Германия) при 1500 об/мин в течение 0,5 мин. Концентрация DD217 в калибровочных образцах составила 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 нг/мл. Дальнейшая процедура пробоподготовки калибровочных растворов была идентична процедуре подготовки испытуемых образцов.

Образцы для контроля качества (QC) готовили аналогично калибровочным образцам другой навески DD217. Концентрация DD217 в образцах для контроля качества была выбрана равной 5, 50, 1000 нг/мл с целью наиболее полного и равномерного охвата аналитического диапазона методики. В качестве матрицы использовали интактную плазму крови крыс, которую предварительно проверили на наличие мешающих пиков при времени удерживания DD217 и небиволола. Все калибровочные и образцы для контроля качества были приготовлены непосредственно перед анализом.

Пробоподготовка

Образцы плазмы обрабатывали следующим образом: в отдельную пробирку вместимостью 2,0 мл помещали 200 мкл испытуемого образца плазмы и 50 мкл раствора внутреннего стандарта (2,0 нг/мл). Пробирку плотно закрывали, ее содержимое перемешивали на вибрационном шейкере VORTEX (IKA®, Германия) при 2500 об/мин в течение 0,5 мин. Затем к содержимому пробирки добавляли 50 мкл раствора 1 М карбонат натрия. Пробирку плотно закрывали, ее содержимое перемешивали на шейкере при 2500 об/мин в течение 1 мин. К полученному раствору добавляли 1300 мкл этилацетата. Пробирку плотно закрывали, ее содержимое перемешивали на шейкере при 2500 об/мин в течение 10 мин. Пробирку центрифугировали при 15 000 g в течение 10 мин. Органический слой переносили в пробирку вместимостью 5 мл. К оставшейся водной фракции добавляли 50 мкл раствора карбонат натрия и повторяли процедуру экстракции. Объединенный слой экстрагента выпаривали в вакууме при 0,2 мбар при 35 °С. Далее сухой остаток растворяли в 200 мкл метанола. Полученный раствор центрифугировали при 15 000 g в течение 3 мин. Раствор над осадком переносили во флаконах для последующего анализа.

Фармакокинетическое исследование

Разработанная методика количественного определения DD217 была применена для изучения фармакокинетики субстанции DD217 у крыс. Работа с лабораторными животными проводилась в соответствии с «Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» [13]. В эксперименте использовали аутбредных крыс Wistar массой 200 ± 30 г ($n = 128$). Раствор субстанции DD217 в 1%-м крахмальном геле вводили внутривенно в дозах 5, 15, 30 мг/кг с

помощью металлического зонда. Отбор крови производили из хвостовой вены с помощью устройства для вливания в малые вены (игла-бабочка 24G SFM, Hospital Products GmbH, Германия) в пластиковые пробирки типа «Эппендорф», содержащие антикоагулянт – цитрат натрия (3,8 %) в соотношении 1:9 к отбираемой в пробирку крови. Далее кровь центрифугировали 7 мин при 1000 об/мин (240 g), плазму переносили в другую пробирку и повторно центрифугировали 15 мин при 3000 об/мин (1200 g). Время хранения образцов плазмы при комнатной температуре составляло не более 1 ч. Образцы помещали в промаркированные и укупоренные пробирки типа «Эппендорф», затем замораживали при температуре -40 °С до проведения анализа. Фармакокинетические параметры и описательную статистику рассчитывали модельно-независимым методом при помощи программного обеспечения IBM SPSS Statistics v27 и Julia v1.6.0 (MixedModels v3.8.0, ClinicalTrialUtilities v0.5.1).

Условия хроматографического разделения и детектирования

Хроматографическое разделение определяемого вещества и внутреннего стандарта от компонентов плазмы крови достигалось при использовании колонки Luna C8 (3 мкм, $50 \times 4,6$ мм, Phenomenex США). В качестве элюента А использовали 0,1%-й раствор муравьиной кислоты в деионизованной воде, в качестве элюента Б использовали 0,1%-й раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле. Хроматографический анализ проводили в градиентном режиме (0 мин – 45 % Б; 0,40 мин – 45 % Б; 0,45 мин – 75 % Б; 0,65 мин – 75 % Б; 0,70 мин – 95 % Б; 0,80 мин – 95 % Б; 0,85 мин – 45 % Б; 0,9 мин – 45 % Б) при постоянной скорости потока 1,5 мл/мин. Объем ввода составлял 5 мкл, а общее время анализа одного образца составляло 2,0 мин.

Условия масс-спектрометрического детектирования были определены на основе масс-спектров DD217 в положительном и отрицательном режимах ионизации электроспреем. Для детектирования были выбраны материнский молекулярный ион DD217 в протонированной форме (m/z 436,1) и наиболее интенсивный фрагмент его расщепления (m/z 119,9). Были оптимизированы масс-спектрометрические параметры с целью достижения наилучшей чувствительности детектирования DD217. Условия детектирования представлены в таблице 1.

В качестве внутреннего стандарта был выбран небиволол по причине близкой молекулярной структуры с DD217 и одинакового поведения с DD217 на стадиях экстракции, хроматографии и детектирования (рисунок 2). DD217 и небиволол в равной степени экстрагируются в условиях пробоподготовки, элюируют в идентичных условиях (время элюирования пиков DD217 и небиволола составляет 0,63 и 0,65 мин соответственно) и детектируются в одинаковых условиях, имеют близкую чувствительность в условиях детектирования.

Таблица 1. Условия детектирования ВЭЖХ-МС/МС

Table 1. HPLC-MS/MS detection conditions

Параметр Parameter	DD217	Внутренний стандарт (небиволол) Internal standard (neбиволол)
Тип сканирования Type of scanning	Мониторинг множественных реакций Multiple reaction monitoring	
Полярность Polarity	Положительная Positive	Положительная Positive
Источник ионизации Ionization source	Электроспрей Electrospray	
Напряжение на источнике (IS), кВ Voltage source (IS), kV	3	
Q1/Q3, m/z	436,1 → 119,9	406,0 → 151,0
Разрешение Q1 и Q3 Q1 and Q3 resolution	1,1	
Энергия соударений, В Collision energy, B	25	30
Газ-завеса, азот Curtain gas, nitrogen	350 °C / 11 л/мин 350 °C / 11 l/min	
Газ-распылитель, азот Nebulizer gas, nitrogen	200 °C / 14 л/мин 200 °C / 14 l/min	

Валидация методики

Валидация биоаналитической методики была проведена на основе правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза¹, а также руководств FDA² и EMA³ по следующим параметрам: селективность, линейность и нижний предел количественного определения (НПКО), правильность и прецизионность, эффект матрицы, стабильность, допустимость разведения, степень извлечения, эффект переноса.

Селективность

Селективность методики была оценена путем анализа 6 образцов интактной плазмы крови крыс и образцов интактной плазмы крови с введенным точ-

¹ Правила проведения исследований биоэквивалентности в рамках Евразийского экономического союза. Решение Совета ЕЭК от 3 ноября 2016 г. № 85. Доступно по: <https://www.alta.ru/tamdoc/16sr0085/> Ссылка активна на 21.06.2021.

² Guidance for Industry: Bioanalytical method validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM). U.S. Washington: Government Printing Office; 2018. Available at: <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf>. Accessed: 15.09.2021.

³ Guideline on bioanalytical method validation. London: European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP); 2011. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf. Accessed: 15.09.2021.

ным количеством DD217 на уровне нижнего предела количественного определения – 2,00 нг/мл и небиволола (BC) – 500 нг/мл.

Линейность

Зависимость функции отклика от концентрации определяемого вещества оценивалась в диапазоне концентраций 2–1000 нг/мл методом внутреннего стандарта. Калибровочная зависимость представлена функцией отношения площади пика аналита к площади пика ВС от отношения концентрации аналита к концентрации ВС в плазме крови. Калибровочные образцы готовили путем добавления DD217 и ВС в известных концентрациях к холостой матрице.

Правильность и прецизионность

Для оценки правильности и прецизионности внутри одного аналитического цикла приготовили и анализировали по 5 образцов для контроля качества для каждого уровня концентраций DD217 2, 5, 50, 1000 нг/мл. Правильность методики рассчитывали по среднему значению рассчитанных концентраций относительно номинального значения. Прецизионность методики рассчитывали по величине относительного стандартного отклонения рассчитанных концентраций DD217 в образцах для контроля качества.

Правильность и прецизионность между аналитическими циклами оценивали по результатам, полученным для трех аналитических циклов, проведенных в 2 разных дня.

Эффект матрицы

Влияние биологической матрицы на количественное определение DD217 в плазме крови оценивали по нормализованному относительно ВС фактору матрицы для низкой и высокой области концентраций определяемого вещества при постоянной концентрации внутреннего стандарта. Фактор матрицы рассчитывали путем деления площади пика аналита в присутствии матрицы (аналит добавляли к экстрагированному образцу матрицы) на площади пика аналита в отсутствии матрицы (раствор сравнения), содержащего такое же количество вещества. Аналогичным образом рассчитывали фактор матрицы для ВС. Нормализованный фактор матрицы рассчитывали как частное от деления фактора матрицы DD217 к фактору матрицы ВС.

Стабильность

Стабильность DD217 оценивали методом бреккетинга в образцах плазмы крови в условиях пробоподготовки и долгосрочного хранения, а также в анализируемых растворах при низком и высоком уровне концентрации. Стабильность в ходе замораживания-размораживания оценивали после трехкратного замораживания в течение 12 часов и размораживания образцов для контроля качества (QC). Кратковременную стабильность DD217 в испытуемых растворах

оценивали в образцах QC после выдерживания в автосэмплере в течение 24 часов при температуре $\pm 5^\circ\text{C}$. Исследования долговременной стабильности проводили после хранения при температуре не выше -60°C в течение 30 дней.

Стабильность DD217 оценивали путем сравнения свежеприготовленных образцов для контроля качества с соответствующими образцами после хранения в определенных условиях. Образцы плазмы крови крыс считались стабильными, если концентрация DD217, измеренная после хранения, была в диапазоне от -15% до $+15\%$ от номинальной концентрации.

Допустимость разведения

Допустимость разведения оценивали на основании правильности и прецизионности определения концентрации DD217 на примере пяти модельных образцов с концентрацией в 10 раз больше уровня верхнего предела количественного определения содержания DD217 в образце плазмы крови после их разбавления в 10 раз интактной плазмой крови крыс.

Степень извлечения

Степень извлечения DD217 определяли как отношение площади пика, полученного от добавленного и затем извлеченного из биологической матрицы количества вещества в сравнении с сигналом детектора, полученного от раствора сравнения, содержащего такое же количество вещества, когда аналит добавляется к экстрагированному образцу матрицы. Степень извлечения определяли при низком и высоком уровне концентрации DD217.

Эффект переноса

Перенос пробы определяли по отношению площади пика на хроматограмме холостого образца, анализируемого непосредственно после анализа калибровочного образца или образца для контроля качества с уровнем содержания DD217, равном верхнему пределу количественного определения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка методики

Количественное определение DD217 в плазме крови проводили посредством валидированной методики на основе ВЭЖХ с tandemным масс-спектрометрическим детектированием. Процедура пробоподготовки включала две последовательные стадии экстракции: высушивания объединенного слоя экстрагента, растворения сухого остатка перед анализом. Хроматографическое разделение проводили на обращенно-фазовой колонке C8. Аналитический сигнал детектировали методом tandemной масс-спектрометрии с ионизацией электроспреем. DD217 детек-

тировали по расщеплению молекулярного иона с величиной m/z 436,1 $\rightarrow$ 119,9. Концентрацию DD217 в испытуемых образцах рассчитывали методом внутреннего стандарта. В качестве внутреннего стандарта использовали небиволола гидрохлорид. Небиволол детектировали по расщеплению молекулярного иона с величиной m/z 406,0 $\rightarrow$ 151,0.

Валидация

Селективность

На хроматограммах интактной плазмы крови не наблюдалось пиков с временами удерживания, соответствующих DD217 и небивололу. На рисунке 3 представлены хроматограммы интактной плазмы и плазмы с добавлением DD217 до 20 мг/мл и небиволола до 500 мг/мл.

Линейность и НПКО

НПКО для DD217 был определен на уровне 2,0 нг/мл. Отношение сигнал/шум на хроматограмме испытуемого раствора модельного образца с концентрацией DD217, равной 2,0 нг/мл, было равно 10. Средние значения концентраций калибровочных образцов были в пределах $\pm 15\%$ от номинального значения для уровня концентраций выше НПКО и в пределах $\pm 20\%$ для уровня НПКО. Все три исследованные калибровочные зависимости были линейными в диапазоне концентраций 2–1000 нг/мл для DD217. Коэффициенты корреляции (R) были выше 0,9980.

Правильность и прецизионность

Значения внутрисерийной и межсерийной правильности и прецизионности приведены в таблицах 2, 3. Полученные результаты свидетельствуют о том, что разработанная методика является точной, по показателям правильности и прецизионности, для определения концентраций DD217 в плазме крови крыс.

Таблица 2. Внутрисерийная правильность и прецизионность методики определения концентраций DD217 в плазме крови крыс (n = 5)

Table 2. Intrabatch accuracy and precision of the method for determination of DD217 concentrations in plasma of rats (n = 5)

Введено (нг/мл) Injected (ng/ml)	Найдено (нг/мл), среднее значение Found (ng/ml), mean value	Относительное стандартное отклонение (%) Relative standard deviation (%)	Правильность (%) Accuracy (%)
2	2,07 $\pm$ 0,16	7,49	103,5
5	5,21 $\pm$ 0,43	8,29	104,2
50	50,01 $\pm$ 2,13	4,26	100,0
1000	998,85 $\pm$ 5,58	0,56	99,9

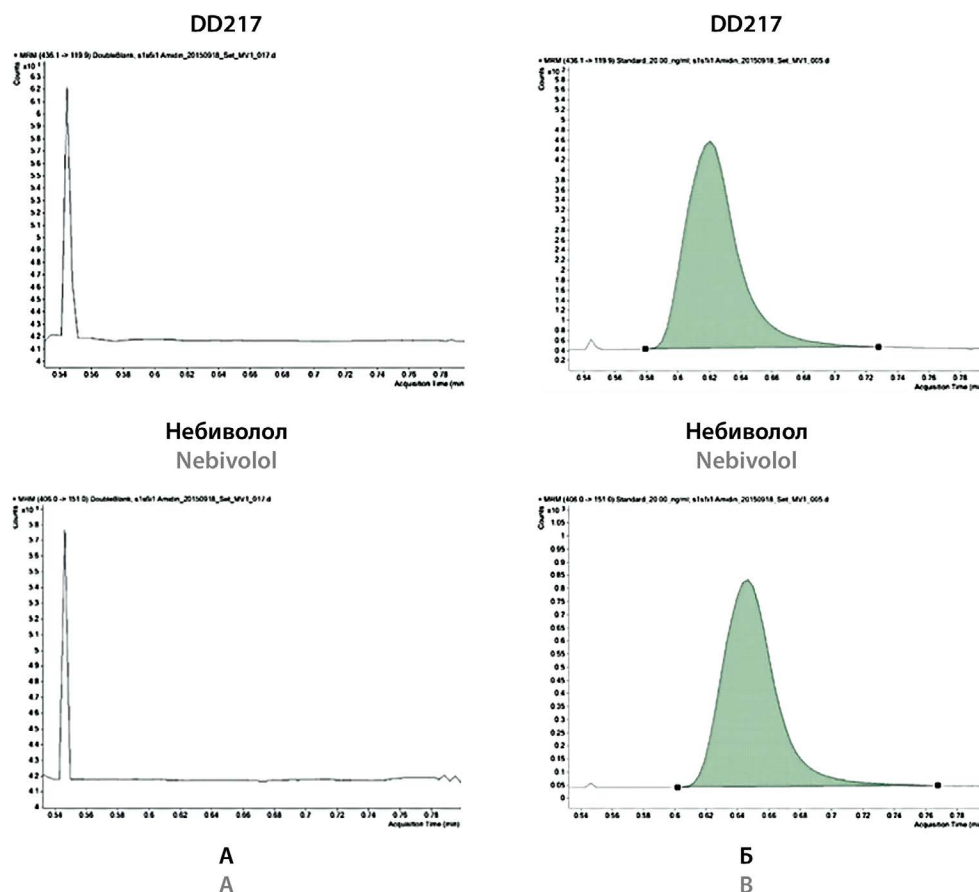


Рисунок 3. Хроматограммы intactной плазмы и плазмы с добавлением DD217

А – хроматограмма образца intactной плазмы крови; **Б** – хроматограммы образцов плазмы крови, содержащие DD217 (20,00 нг/мл) и небиволола (BC)

Figure 3. Chromatograms of Intact Plasma and Plasma Supplemented with DD217

A – chromatogram of a blank plasma sample; **B** – chromatograms of plasma samples containing DD217 (20.00 ng/ml) and nebivolol (IS)

Таблица 3. Межсерийная правильность и прецизионность методики определения концентраций DD217 в плазме крови крыс ($n = 15$)

Table 3. Interbatch accuracy and precision of the method for determination of DD217 concentrations in plasma of rats ($n = 15$)

Введено (нг/мл) Injected (ng/ml)	Найдено (нг/мл), среднее значение Found (ng/ml), mean value	Относительное стандартное отклонение (%) Relative standard deviation (%)	Правильность (%) Accuracy (%)
2	2,02 ± 0,18	9,03	101,4
5	5,15 ± 0,49	9,56	103,0
50	49,79 ± 2,30	4,62	99,6
1000	992,95 ± 14,10	1,42	99,3

Эффект матрицы

Фактор матрицы, нормализованный по ВС, находится в диапазоне 0,85–1,04. Таким образом, коэффициент вариации фактора матрицы, нормализованный по ВС, находится в пределах ±15 % (таблица 4).

Стабильность

Проведенные исследования стабильности показали, что DD217 был стабильным в образцах плазмы крови при различных условиях хранения на низком и высоком уровне концентрации. Было доказано, что DD217 стабилен после выдерживания в автосэмплере в течение 24 часов. Исследования показали, что концентрации DD217 оставались в пределах ±15 % от номинальных концентраций после хранения при –60 °C в течение 30 дней и после трехкратной заморозке-разморозке в течение 30 минут (–80 °C; +5 °C). Результаты приведены в таблицах 5–7.

Допустимость разведения

Значения правильности и прецизионности методики в разведенном модельном образце относительно введенного количества с учетом разбавления отвечали требованиям правильности и прецизионности методики (таблица 8).

Таблица 4. Эффект матрицы DD217 в плазме крови крыс (n = 6)

Table 4. Matrix effect of DD217 in plasma in rats (n = 6)

Уровень содержания, нг/мл Drug level, ng/ml	Введено, нг/мл Injected, ng/ml	Модельный образец Modeling sample		Раствор сравнения Reference solution		Матричный фактор нормализованный Normalized matrix factor				
		Площадь пика DD217 Peak area of DD217	Площадь пика ВС Peak area of IS	Площадь пика DD217 Peak area of DD217	Площадь пика ВС Peak area of IS	Найдено Found	Среднее Mean	Коэффициент вариации, % Coefficient of variation	Критерий пригодности Suitability criterion	Соответствие критерию Compliance with the criterion
5	5	11,51	75,6	6,48	50,4	1,04	0,997	4,2	Не более 15 % Not more than 15 %	Соответствует Corresponds
		10,68	77,0	11,21	72,6	0,95				
		10,68	73,6	11,81	84,5	0,99				
		10,38	66,5	11,39	70,8	1,06				
		10,83	77,1	11,06	80,9	0,96				
		11,20	77,9	11,17	71,5	0,98				
1000	1000	1981	78,64	2106	80,64	0,98	0,981	1,4	Не более 15 % Not more than 15 %	Соответствует Corresponds
		2168	86,74	2103	79,95	0,97				
		1870	72,28	2001	76,80	1,01				
		1585	63,64	2155	85,21	0,97				
		1934	78,20	2028	82,76	0,96				
		2148	85,07	3570	138,91	0,98				

Таблица 5. Стабильность DD217 в условиях хранения

Table 5. Stability of DD217 in the storage conditions

Введено, нг/мл Injected, ng/ml	Найдено в модельном образце после 30 дней хранения при температуре не выше –60 °C Found in a modeling sample after 30 days at temperature not above –60 °C	Найдено в свежеприготовленном модельном образце Found in a freshly prepared modeling sample	Средняя раскрываемость, % Mean recovery, %	Критерий пригодности Suitability criterion	Соответствие критерию Compliance with the criterion
5	4,75	4,51	99,5	Не менее 85 % и не более 115 % Not less than 85 % and not more than 115 %	Соответствует Corresponds
	4,37	5,04			
	4,41	4,65			
	4,70	4,47			
	4,82	4,52			
1000	987,54	972,72	99,3	Не менее 85 % и не более 115 % Not less than 85 % and not more than 115 %	Соответствует Corresponds
	988,44	981,37			
	957,71	960,26			
	975,74	990,23			
	963,79	1002,97			

Степень извлечения

Отклонение значения степени извлечения при низком (5 нг/мл) и высоком (1000 нг/мл) уровне содержания DD217 от среднего значения не превышало 15 %. Таким образом, методика удовлетворяет критерию пригодности по показателю степень извлечения.

Эффект переноса

На хроматограммах холостых образцов для определения переноса пробы отклик сигнала аналита составлял не более 20 % от отклика сигнала DD217 с со-

держанием на уровне нижнего предела количественного определения, а отклик сигнала ВС составил не более 5 % от отклика сигнала пика ВС на хроматограмме холостого образца, что удовлетворяет критерию пригодности по показателю эффект переноса.

Таким образом, валидация разработанной методики была успешно проведена по следующим параметрам: селективность, линейность и нижний предел количественного определения (НПКО), правильность и прецизионность, эффект матрицы, стабильность, допустимость разведения, степень извлечения, эффект переноса.

Таблица 6. Стабильность DD217 в условиях пробоподготовки

Table 6. Stability of DD217 in the conditions of sample preparation

Введено, нг/мл Injected, ng/ml	Найдено в модельном образце после трехкратной заморозке-разморозке Found in a modeling sample after a three-fold freezing-thawing	Найдено в свежеприготовленном модельном образце Found in a freshly prepared modeling sample	Средняя раскрываемость, % Mean recovery, %	Критерий пригодности Suitability criterion	Соответствие критерию Compliance with the criterion
5	4,81	4,51	102,7	Не менее 85 % и не более 115 % Not less than 85 % and not more than 115 %	Соответствует Corresponds
	4,39	5,04			
	5,06	4,65			
	5,11	4,47			
	4,43	4,52			
1000	1019,39	972,72	101,9	Не менее 85 % и не более 115 % Not less than 85 % and not more than 115 %	Соответствует Corresponds
	983,92	981,37			
	971,51	960,26			
	1013,33	990,23			
	1013,53	1002,97			

Таблица 7. Стабильность аналитических растворов в условиях анализа

Table 7. Stability of test solutions in the analysis conditions

Введено, нг/мл Injected, ng/ml	Найдено в модельном образце после 24 ч хранения в автоинжекторе при +5 °C Found in a modeling sample after 24 h storage in an auto-injector at +5 °C	Найдено в свежеприготовленном модельном образце Found in a freshly prepared modeling sample	Средняя раскрываемость, % Mean recovery, %	Критерий пригодности Suitability criterion	Соответствие критерию Compliance with the criterion
5	4,36	4,51	94,6	Не менее 85 % и не более 115 % Not less than 85 % and not more than 115 %	Соответствует Corresponds
	4,35	5,04			
	4,41	4,65			
	4,36	4,47			
	4,44	4,52			
1000	981,82	972,72	102,0	Не менее 85 % и не более 115 % Not less than 85 % and not more than 115 %	Соответствует Corresponds
	996,28	981,37			
	1013,74	960,26			
	993,35	990,23			
	1021,31	1002,97			

Таблица 8. Правильность и прецизионность при десятикратном разведении

Table 8. Accuracy and precision in a ten-fold dilution

Введено (нг/мл) Injected (ng/ml)	Найдено (нг/мл), среднее значение Found (ng/ml), mean value	RSD (%)	Раскрываемость (%) Recovery (%)
10000	1006,73 ± 24,42	2,43	100,7

Фармакокинетическое исследование

Разработанная и валидированная методика ВЭЖХ-МС/МС применялась для определения концентраций DD217 в плазме крови крыс после однократного внутривенного введения субстанции в дозах 5, 15, 30 мг/кг.

Фармакокинетический анализ проводился на основе разреженных данных (sparse sample design). Профили DD217 и основные фармакокинетические параметры представлены на рисунке 4 и в таблице 9 соответственно.

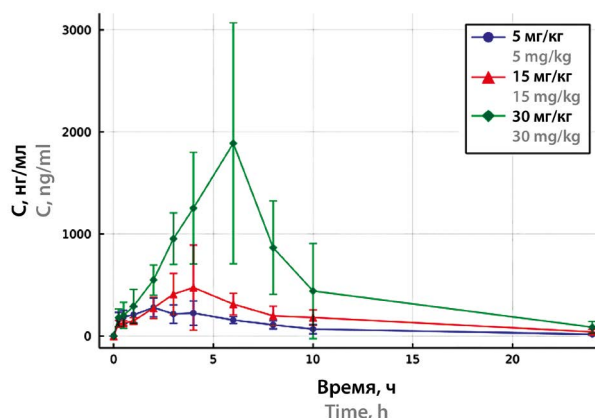


Рисунок 4. Усредненные фармакокинетические профили DD217 после внутривенного введения субстанции DD217 крысам. DD217 вводили в дозах 5 (●), 15 (▲), 30 (◆) мг/кг

Figure 4. Averaged pharmacokinetic profiles of DD217 following intragastric administration of substance DD217 to rats. DD217 was administered in doses 5 (●), 15 (▲), 30 (◆) mg/kg

Таблица 9. Усредненные значения фармакокинетических параметров субстанции DD217 при внутрижелудочном введении крысам

Table 9. Averaged values of pharmacokinetic parameters of substance DD217 following intragastric administration to rats

Параметр Parameter	Значение Value		
	5 мг/кг 5 mg/kg	15 мг/кг 15 mg/kg	30 мг/кг 30 mg/kg
$C_{\max}$ (нг/мл) $C_{\max}$ (ng/ml)	279,00	475,36	1889,19
$T_{\max}$ (ч) $T_{\max}$ (h)	2,0	4,0	6,0
$T_{1/2}$ (ч) $T_{1/2}$ (h)	5,52	6,76	5,18
MRT (ч) MRT (h)	7,79	9,76	8,45
AUC_{0-t} (ч · нг/мл) AUC_{0-t} (h · ng/ml)	2290,17	4343,22	13371,01
$AUC_{0-\infty}$ (ч · нг/мл) $AUC_{0-\infty}$ (h · ng/ml)	2423,61	4736,05	14019,05
Cl (л/ч/кг) Cl (l/h/kg)	2,06	3,17	2,14
V_d (л/кг) V_d (l/kg)	16,42	30,90	16,00

Полученные данные показали, что субстанция DD217 постепенно всасывается в системный кровоток ($T_{\max} = 2-6$ ч). Величины объема распределения (16–30 л/кг) свидетельствуют о том, что DD217 накапливается в тканях органов. Период полувыведения DD217 составляет около 5–6 ч, среднее время удержания препарата в крови – 7–9 ч, общий клиренс – 2–3 л/ч/кг. В связи с тем, что дизайн исследования не предполагал получения индивидуальных фармакокинетических профилей, описательная статистика не вычислялась.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методика ВЭЖХ-МС/МС для количественного определения DD217 в плазме крови впервые разработана и валидирована по следующим параметрам: нижний предел количественного определения, селективность, правильность и прецизионность, допустимость разведения, линейность, эффект матрицы, степень извлечения, эффект переноса, стабильность биообразцов в условиях хранения и пробоподготовки, стабильность аналитических растворов в условиях анализа. Методика была успешно применена для оценки фармакокинетических параметров субстанции DD217 в плазме крови крыс.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Glushchenko V. A., Irklienko E. K. Cardiovascular morbidity is one of the most important public health problems. *Medicine and Health Organization*. 2019;4(1):56–63. (In Russ.)
- Mensah G. A., Roth G. A., Fuster V. The Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors: 2020 and Beyond. *J Am Coll Cardiol*. 2019;74(20):2529–2532. DOI: 10.1016/j.jacc.2019.10.009.
- Weitz J. I., Harenberg J. New developments in anticoagulants: Past, present and future. *Thrombosis and Haemostasis*. 2017;28;117(7):1283–1288. DOI: 10.1160/TH16-10-0807.

- McGrath E. R., Go A. S., Chang Y., Borowsky L. H., Fang M. C., Reynolds K., Singer D. E. Use of Oral Anticoagulant Therapy in Older Adults with Atrial Fibrillation After Acute Ischemic Stroke. *Journal of the American Geriatrics Society*. 2017;65(2):241–248. DOI: 10.1111/jgs.14688.
- Di Minno A., Frigerio B., Spadarella G., Ravani A., Sansaro D., Amato M., Baldassarre D. Old and new oral anticoagulants: Food, herbal medicines and drug interactions. *Blood Reviews*. 2017;31(4):193–203. DOI: 10.1016/j.blre.2017.02.001
- Marzec L. N., Wang J., Shah N. D., Chan P. S., Ting H. H., Gosch K. L., Hsu J. C., Maddox T. M. Influence of Direct Oral Anticoagulants on Rates of Oral Anticoagulation for Atrial Fibrillation. *Journal of the American College of Cardiology*. 2017;69(20):2475–2484. DOI: 10.1016/j.jacc.2017.03.540.
- Lippi G., Gosselin R., Favaloro E. J. Current and Emerging Direct Oral Anticoagulants: State-of-the-Art. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. 2019;45(05):490–501. DOI: 10.1055/s-0039-1692703.
- Shimada K., Hasegawa S., Nakao S., Mukai R., Sasaoka S., Ueda N., Kato Y., Abe J., Mori T., Yoshimura T., Kinoshita Y., Nakamura M. Adverse reaction profiles of hemorrhagic adverse reactions caused by direct oral anticoagulants analyzed using the Food and Drug Administration Adverse Event Reporting System (FAERS) database and the Japanese Adverse Drug Event Report (JADER) database. *Int J Med Sci*. 2019;16(9):1295–1303. DOI: 10.7150/ijms.34629
- de Candia M., Lopopolo G., Altomare C. Novel factor Xa inhibitors: A patent review. *Expert Opin Ther Pat*. 2009;19(11):1535–1580. DOI: 10.1517/13543770903270532.
- Kozielec M., Lip G. Y. H. Estimating individual lifetime benefit and bleeding risk of adding oral anticoagulation to aspirin for patients with stable cardiovascular disease: directions from COMPASS? *European Heart Journal*. 2019;7;40(46):3779–3781. DOI: 10.1093/eurheartj/ehz517.
- Vranckx P., Valgimigli M., Heidbuchel H. The significance of drug-drug and drug-food interactions of oral anticoagulation. *Arrhythmia Electrophysiol Rev*. 2018;7:55–61. DOI: 10.15420/aer.2017.50.1.
- Tarasov D. N., Tovbin D. G., Malakhov D. V., Aybush A. V., Tserkovnikova N. A., Savelyeva M. I., Savchenko A. Y. The Development of New Factor Xa Inhibitors Based on Amide Synthesis. *Current Drug Discovery Technologies*. 2018;15(4):335–350. DOI: 10.2174/1570163815666180215114732.
- Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Official Journal of the European Union / Luxembourg: Publications Office of the European Union*. 2010;53:33–79.