УДК 615.07,
615.074,
615.22

ИЗУЧЕНИЕ СРАВНИТЕЛЬНОЙ КИНЕТИКИ РАСТВОРЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА ВАЛСАРТАН II КЛАССА БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ КЛАССИФИКАЦИОННОЙ СИСТЕМЫ В СООТВЕТСТВИИ С ПРОЦЕДУРОЙ «БИОВЕЙВЕР»

Е.Р. Бригас[1]*, Е.В. Успенская[2], В.В. Писарев[3]

1 – ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», факультет фундаментальной медицины, 119192, Россия, г. Москва, Ломоносовский проспект, 31, к. 5

2 – ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», кафедра фармацевтической и токсикологической химии, 117556, Россия, г. Москва, Миклухо-Маклая ул., 8

3 – Научно-производственный центр «Пробиотек», 111024, Россия, г. Москва, ул. 5-я Кабельная, 2Б, стр. 1

1 – M.V. Lomonosov Moscow State University, Faculty of Basic Medicine, 31/5, Lomonosovskii pr., Moscow, 119192, Russia

2 – People Friendship University of Russia, 8, Miklukho-Maklaya str., Moscow, 117556, Russia

3 – Scientific-production center "Probiotech", 2B/1, 5-ya Kabelnaya str., Moscow, 111024, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail:
katekukushkina28@gmail.com

Резюме. Проведено сравнительное исследование кинетики растворения лекарственных препаратов валсартана в трех средах растворения, моделирующих основные разделы ЖКТ, с последующим количественным определением методом УФ-спектрофотометрии при длине волны 254 нм. Исследование проводили на аппарате «Лопастная мешалка», точки отбора соответствовали 5, 10, 15, 30 минутам. Полученные значения факторов подобия f2 подтвердили эквивалентность кинетики растворения и составляют: f2=67 в растворе хлористоводородной кислоты с pH 1,2, f2=57 в фосфатном буферном растворе с pH 4,5. В фосфатном буферном растворе с pH 6,8 через 15 минут в раствор перешло более 85% действующего вещества, поэтому профили эквивалентны без математической оценки.

Ключевые слова: сравнительный тест кинетики растворения, биовейвер, валсартан.

DISSOLUTION PROFILE STUDIES OF BCS CLASS II DRUG VALSARTAN BY BIOWAIVER PROCEDURE

E.R. Brigas[1]*, E.V. Uspenskaya[2], V.V. Pisarev[3]

Abstract. Drug release studies (or *in vitro* release) of valsartan in three dissolution media simulating the main sections of the gastrointestinal tract were conducted. The concentrations were determined using UV/Vis spectrophotometer (Varian Cary 50) at 254 nm. The study was conducted using dissolution apparatus with the paddle assemble; 5-mL sample aliquots were withdrawn at 5, 10, 15, and 30 min. Estimation f2 parameter confirmed the equivalence of valsartan dissolution kinetics: f2=67 in hydrochloric acid solution, pH 1,2; f2=57 in phosphate buffer, pH 4,5, and in phosphate buffer, pH 6,8 – dissolution amount is greater than 85% at 15 min, so the two products are deemed equivalent, and a profile comparison is not necessary.

Keywords: comparative dissolution profile, biowaiver, valsartan.

ВВЕДЕНИЕ

Одной из задач стратегии развития фармацевтической промышленности Российской Федерации на период до 2020 года является совершенствование системы подтверждения соответствия качества лекарственных средств. Основным мероприятием для достижения поставленной цели является стимулирование разработки и производства аналогов импортируемых воспроизведенных и инновационных лекарственных средств [1, 2].

Немаловажной задачей остается оценка их биоэквивалентности, поскольку главной целью стратегии развития фармацевтической промышленности России является создание устойчивой национальной индустрии, способной обеспечить население Российской Федерации доступными, эффективными и безопасными лекарствами в необходимых количествах [1].

На сегодняшний день, согласно рекомендациям ВОЗ, существует 4 способа подтверждения эквивалентности воспроизведенных лекарственных средств оригинальным препаратам. Это сравнительные фармакокинетические исследования с участием людей, фармакодинамические исследования с участием людей и сравнительные клинические исследования [3, 4]. Вышеперечисленные исследования являются дорогостоящими и продолжительными. В связи с этим становится актуальным использование четвертого подхода ВОЗ для оценки эквивалентности ЛС – сравнительных исследований *in vitro* по процедуре «биовейер» [3, 4].

Сравнительный тест кинетики растворения (СТКР) применяется на различных этапах жизненного цикла ЛС, а именно: на стадиях разработки, при регистрации дополнительных дозировок, при изменении

технологии производства, при посерийном контроле качества и при государственной регистрации воспроизведенного препарата [5]. Согласно руководству FDA установленная корреляция *in vitro – in vivo* (IVIVC) класса А может заменить или сократить количество сравнительных фармакокинетических исследований на этапе разработки ЛС, а также пострегистрационных изменений, но не может заменить регистрационное исследование биоэквивалентности [6]. В случае использования СТКР как замены фармакокинетических исследований следует учитывать такой параметр, как корреляция *in vitro – in vivo*, способный прогнозировать биодоступность *in vivo* на основании данных *in vitro*. В основном IVIVC возможно установить для ЛП с модифицированным высвобождением и для ЛП с немедленным высвобождением при условии, что ЛС принадлежит ко II классу биофармацевтической классификационной системы. Исследование проводилось с лекарственным препаратом валсартан, применение которого в последнее время значительно возросло [7]. На основании данных ВОЗ проведение процедуры «биовейер» возможно для I, II и III класса по БКС [3]. Процедуру «биовейер» допускают также руководства FDA, EMA, ЕАЭС и др [9, 10, 11]. Все перечисленные нормативные документы имеют ряд сходных положений. Так, руководства FDA и EMA допускают процедуру «биовейвер» для I и III класса БКС [9, 10]. Евразийский экономический союз регламентирует проведение теста сравнительной кинетики растворения в целях биовейвера дозировок для I и III класса БКС [11]. Позиция FIP допускает проведение процедуры «биовейвер» для I, III класса БКС и для трех ЛП, принадлежащих ко II классу БКС: диклофенака калия или натрия, ибупрофена, кетопрофена [12]. Данные АФИ проявляют слабые кислотные свойства, при низких значениях pH характеризуются низкой растворимостью, при pH 6,8 растворимость этих веществ увеличивается. В соответствии с руководством ВОЗ вещества, имеющие высокую растворимость при pH 6,8, быстро переходят в раствор в верхних отделах тонкого кишечника и, следовательно, будут доступны для всасывания. При условии высокой проницаемости низкая растворимость АФИ в кислой среде желудка не должна представлять собой значительного барьера для всасывания [12].

На основании литературных данных исследуемый препарат валсартан относится ко II классу по БКС: имеет высокую проницаемость – коэффициент перераспределения log P 5,8 – и низкую растворимость в воде < 0,1мг/мл [8], тогда как растворимость валсартана в буферном растворе с pH 6,8 высокая и составляет 43,5 мг/мл [13]. Используя отношение высшей разовой дозы (320 мг) к растворимости (43,5 мг/мл) при pH 6,8, можно сделать вывод о высокой биофармацевтической растворимости валсартана: АФИ в высшей разовой дозе растворяется в 250 мл [3, 4, 9]. Следовательно, ЛС валсартан можно отнести ко II классу по БКС.

Таким образом, положительные результаты исследования оценки эквивалентности *in vitro* воспроизведенного ЛС валсартан на основании процедуры «биовейвер» могут иметь прогностическую ценность при выборе серий ЛС для последующего проведения исследования биоэквивалентности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования

Валсартан [N-(1-оксопентил)-N-((2′-(1H-тетразол-5-ил)(1,1′-бифенил)-4-ил)метил)-L-валин] – антигипертензивное ЛС, блокатор рецепторов ангиотензина II. Белый или почти белый порошок, малорастворим в воде [14, 15].

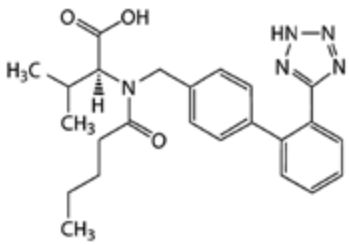

Рисунок 1. Структурная формула валсартана

Исследуемый препарат: таблетки валсартана, покрытые пленочной оболочкой, 40 мг (НПЦ «Пробиотек»); вспомогательные вещества: целлюлоза микрокристаллическая, кросповидон, кремния диоксид коллоидный (аэросил), магния стеарат; состав оболочки: опадрай II, титана диоксид Е171, тальк, макрогол (полиэтиленгликоль-3350), краситель железа оксид желтый Е172, алюминиевый лак; срок годности был действителен.

Препарат сравнения: таблетки валсартана, покрытые пленочной оболочкой, 80 мг (НПЦ «Пробиотек»); вспомогательные вещества: целлюлоза микрокристаллическая, кросповидон, кремния диоксид коллоидный, магния стеарат; состав оболочки: гипромеллоза, титана диоксид, макрогол 8000, краситель железа оксид желтый Е172; срок годности был действителен.

СТКР может выполняться как замена исследований биоэквивалентности для дополнительных дозировок. В случае если регистрации подлежат несколько дозировок, то в зависимости от свойств ЛС достаточно провести исследование биоэквивалентности в отношении одной дозировки. Фармакокинетика валсартана является линейной [11], поэтому ис-

следование биоэквивалентности было проведено для наибольшей дозировки воспроизведенного препарата – 80 мг.

Условия проведения испытаний

Исследования проводили на аппарате «Лопастная мешалка» Guoming RC-6 dissolution tester (Китай). Выбор временных точек был сделан на основании ФСП и базы данных FDA [16]. Точки 15 и 30 минут являются обязательными, последняя точка растворения соответствует полному высвобождению действующего вещества (более 85%) в среде растворения с pH 6,8, которая является наиболее подходящей и рекомендованной USP для таблеток валсартана [17, 18]. Согласно базе данных FDA типичная скорость вращения мешалок для ЛП валсартан с использованием аппарата «Лопастная мешалка» составляет 50 об/мин [6]. В отобранных аликвотах определяли содержание действующего вещества методом УФ-спектрофотометрии. Абсорбцию испытуемого и стандартного растворов измеряли на спектрофотометре Varian Cary 50 (США) при длине волны 254 нм (таблица 1). Среды растворения готовили согласно ГФ РФ XIII [9];

Спектрофотометре Agilent Cary 50

Приготовление сред растворения

Фосфатный буферный раствор с pH 6,8

Раствор калия дигидрофосфата (х.ч.) 27,2 г/л объемом 51,0 мл смешивают с 49,0 мл 71,6 г/л раствора динатрия гидрофосфата (ч.д.а.). При необходимости доводят pH до 6,8 исходным раствором калия дигидрофосфата или динатрия гидрофосфата потенциометрически [19].

0,05 М фосфатный буферный раствор с pH 4,5

6,80 г калия дигидрофосфата (х.ч.) растворяют в 1000,0 мл воды дистиллированной [19].

0,1 М раствор хлористоводородной кислоты

100,0 мл 1 М раствора хлористоводородной кислоты доводят водой дистиллированной до объема 1000,0 мл. 1 М раствор хлористоводородной кислоты: 87,0 мл хлористоводородной кислоты концентрированной (х.ч.) доводят водой до объема 1000,0 мл [19].

В стакан для растворения помещали по одной таблетке и проводили растворение. Через указанные промежутки времени отбирали аликвоты объемом 5 мл механическим дозатором Sartorius Biohit Proline (Финляндия) и фильтровали через мембранный фильтр (GS-Tek SN02545 Nylon, США) с диаметром пор 0,45 мкм, отбрасывая первую порцию фильтрата. Исследование проводили на станции с ручным отбором проб. Чтобы не создавать дополнительную вариабельность результатов, изменения объема среды учитывали при расчетах. Для каждого выбранного промежутка времени процент высвободившегося ЛС пересчитывали на уменьшение объема среды, таким образом, формула расчета отличалась для каждой из временных точек отбора (формулы 1, 2).

Таблица 1.

Условия СТКР ЛП валсартан

Среда растворения:	1. 0,1 моль/л раствор хлористоводородной кислоты с pH 1,2 [19]; 2. Фосфатный буферный раствор с pH 4,5 [19]; 3. Фосфатный буферный раствор с pH 6,8 [19];
Объем среды растворения	1000 мл;
Скорость вращения	50 об/мин;
Точки отбора проб	5, 10, 15, 30 минут;
Метод количественного определения	УФ-спектрофотометрия;

Формула для расчёта содержания высвободившегося валсартана:

дозировка 40 мг

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 1 \cdot P(100 - W) \cdot V_n \cdot 10 \cdot 100}{A_0 \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 40 \cdot 2}, \quad (1)$$

дозировка 80 мг

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 1 \cdot P(100 - W) \cdot V_n \cdot 10 \cdot 100}{A_0 \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 80 \cdot 2}, \quad (2)$$

где A_0 и A – абсорбция раствора стандартного образца (СО) валсартана и испытуемого образца; a_0 – навеска СО валсартана, мг; P – содержание АФИ в СО, %; W – содержание воды в СО, %; V_n – объем среды растворения с учетом отбора проб, мл.

Приготовление испытуемых и стандартных растворов

Испытуемый раствор для дозировки 40 мг

2,0 мл полученного фильтрата помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объем раствора средой растворения до метки и перемешивают.

Испытуемый раствор для дозировки 80 мг

1,0 мл полученного фильтрата помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объем раствора средой растворения до метки и перемешивают.

Базовый раствор СО валсартана

Около 10,0 мг (с точностью 0,00005 г) СО валсартана (USP RS) помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 30 мл спирта 96%, доводят объем раствора спиртом 96% до метки и перемешивают.

Раствор СО валсартана

1,0 мл базового раствора СО валсартана помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора средой растворения до метки и перемешивают.

Для всех данных применена описательная статистика: рассчитаны среднее арифметическое, стандартное отклонение и относительное стандартное отклонение результатов анализа.

Выполнены требования по вариации данных 12 испытуемых единиц за один временной интервал отбора пробы.

Статистическую обработку проводили с помощью программы MS Excel. Рассчитанное относительное стандартное отклонение (RSD) должно быть не более 20% для первой точки отбора и не более 10% для последующих точек отбора [20].

Для сравнения профилей растворения рассчитывали коэффициент подобия f2 по формуле [20]:

$$f_2 = 50 \cdot \log\left\{\left[1 + (1/n)\sum_{i=1}^{n} |R_i - T_i|^2\right]^{-0,5} \cdot 100\right\}, \quad (3)$$

где n – число временных точек; R_i – содержание лекарственного вещества в растворе, перешедшего в раствор из препарата сравнения в i-й временной точке (в среднем, %); T_i – содержание АФИ в растворе, перешедших в раствор из таблетки в i-й временной точке (в среднем, %).

Значения f2, принадлежащие интервалу от 50 до 100, свидетельствуют об эквивалентной кинетике растворения ЛП.

В случае, когда через 15 минут в раствор переходит более 85% действующего вещества, профили высвобождения считаются эквивалентными и коэффициент подобия f2 не рассчитывают [21].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Усредненные значения содержания валсартана, высвободившегося в раствор из лекарственных препаратов в разных средах, приведены на рисунке 2 и в таблице 2.

На рисунке 2 видно, что только профиль растворения в среде с pH 6,8 выходит на плато со значением высвобождения, превышающим 85%, то есть в этих условиях достигается полное высвобождение АФИ. Это свидетельствует о влиянии среды растворения на профиль высвобождения при pH 1,2 и 4,5.

Валсартан в своей химической структуре содержит два кислотных центра с pKa=3,9 и pKa=4,73 [22]. Нами было отмечено, что за счет проявления кислотных свойств валсартан имеет низкую растворимость в 0,1 моль/л растворе хлористоводородной кислоты с pH 1,2, высвобождение действующего вещества в этой среде низкое. В диапазоне pH от 4 до 6 преобладает анионная форма валсартана, в результате увеличивается его растворимость, поэтому в фосфатном буферном растворе с pH 4,5 количество действующего вещества, перешедшего в раствор, заметно увеличивается (рисунок 2) [23]. Время исследования было ограничено 30 минутами согласно требованиям ФСП на ЛП валсартан.

В таблице 2 представлены усредненные значения высвобождения валсартана в раствор из лекарственного препарата.

Как видно из таблицы 2, рассчитанные факторы подобия свидетельствуют об эквивалентности профилей растворения лекарственных препаратов валсартана, так как укладываются в интервал от 50 до 100. В среде с pH 6,8 в раствор переходит более 85% действующего вещества через 15 минут, следовательно, профили эквивалентны без математической оценки.

Результаты исследования можно считать достоверными, исходя из величин стандартного отклонения (см. таблицу 2).

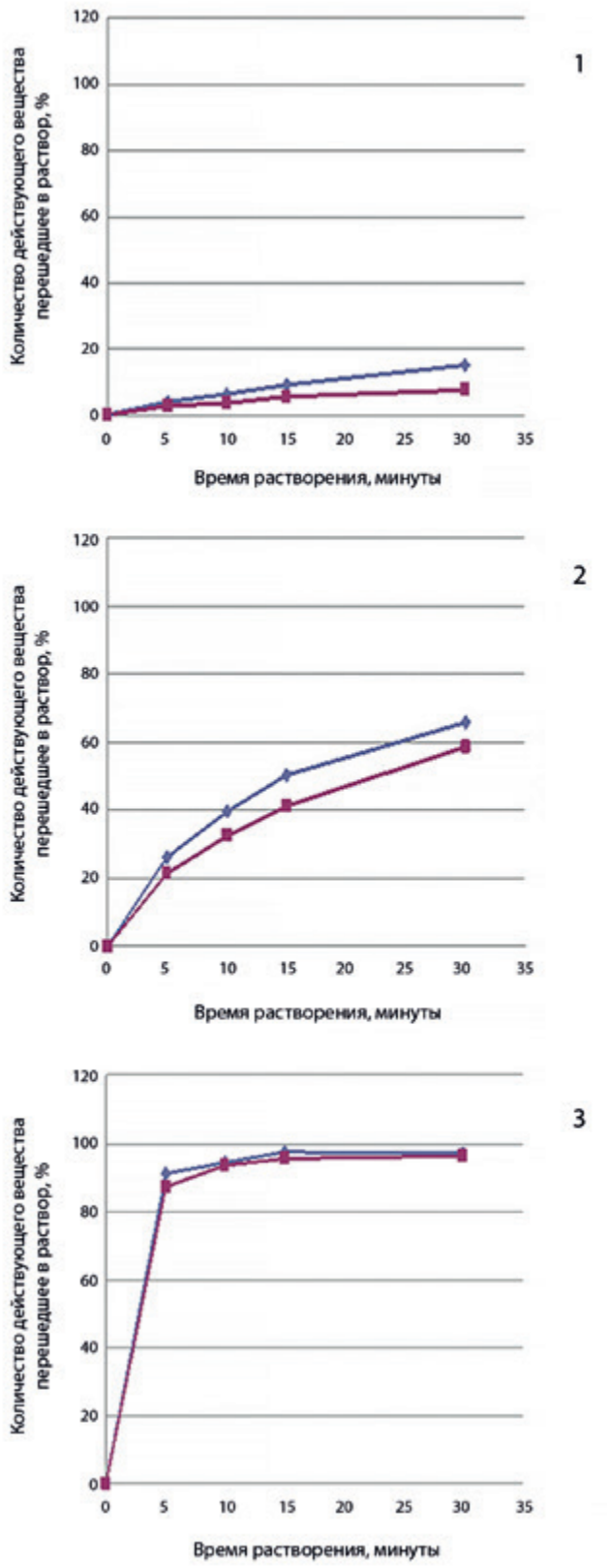

Рисунок 2. **Усредненные профили высвобождения валсартана (n=12) в трех средах растворения: 1 – 0,1 моль/л раствор хлороводородной кислоты с pH 1,2; 2 – фосфатный буферный раствор с pH 4,5; 3 – фосфатный буферный раствор с pH 6,8**

Таблица 2.

Содержание действующего вещества, перешедшего в раствор в разных средах, %

0,1 М раствор хлороводородной кислоты с pH 1,2	Время, минуты							
	Таблетки валсартана, п/п/о, 40 мг Воспроизведенный ЛП				Таблетки валсартана, п/п/о, 80 мг Оригинальный ЛП			
	5	10	15	30	5	10	15	30
Среднее арифметическое	4	7	9	15	3	4	5	7
RSD	15	9	9	9	17	9	8	8
Фактор подобия f_2	**67**							
Фосфатный буферный раствор с pH 4.5	**Время, минуты**							
	Таблетки валсартана, п/п/о, 40 мг Воспроизведенный ЛП				**Таблетки валсартана, п/п/о, 80 мг Оригинальный ЛП**			
	5	**10**	**15**	**30**	**5**	**10**	**15**	**30**
Среднее арифметическое	26	40	50	66	21	32	41	59
RSD	15	8	4	7	9	7	4	2
Фактор подобия f_2	**57**							
Фосфатный буферный раствор с pH 6.8	**Время, минуты**							
	Таблетки валсартана, п/п/о, 40 мг Воспроизведенный ЛП				**Таблетки валсартана, п/п/о, 80 мг Оригинальный ЛП**			
	5	**10**	**15**	**30**	**5**	**10**	**15**	**30**
Среднее арифметическое	91	94	97	97	87	93	95	96
RSD	7	6	3	5	11	7	7	6
Контроль уровня >85%	>85	>85	>85	>85	>85	>85	>85	>85

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Доказана эквивалентность воспроизведенного и оригинального препаратов валсартана для всех исследуемых дозировок ЛС. Показано, что оптимальной средой растворения препаратов валсартана является фосфатный буферный раствор с pH 6,8, для которого наблюдается наилучшее высвобождение действующего вещества, что подтверждает рекомендации USP о выборе среды растворения для таблеток валсартана.

ЛИТЕРАТУРА

1. Стратегия развития фармацевтической промышленности Российской Федерации на период до 2020 года. Москва, 2009 г.
2. И.Е. Шохин. База данных по растворению FDA – незаменимый инструмент для разработчиков воспроизведенных ЛС (обзор) // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2012. № 1(1). С. 3–12.
3. Multisource (generic) pharmaceutical products: guidelines on registration requirements to establish interchangeability. WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. WHO Technical Report Series 937, 2006, annex 7.
4. И.Е. Смехова, Ю.М. Перова. Тест «Растворение» и современные подходы к оценке эквивалентности лекарственных препаратов (обзор) // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2013. № 1(2). С. 50–61.
5. Д.Ю. Гребёнкин, Я.М. Станишевский, И.Е. Шохин. Современные подходы к проведению сравнительного теста кинетики растворения // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2016. № 14.
6. Guidance for Industry. Bioavailability and Bioequivalence. Studies for Orally Administered Drug. Products – General Considerations. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), March 2003.
7. Н.А. Румянцев, А.С. Румянцев. Динамика потребления антигипертензивных препаратов в 2007–2013 гг. на территории Российской Федерации // Журнал прикладной фармакологии и персонализированной фармакотерапии. 2014. № 3. С. 18–26.
8. S. Beg, S. Swain. Development, Optimization, and Characterization of Solid Self-Nanoemulsifying Drug Delivery Systems of Valsartan Using Porous Carriers // AAPS PharmSciTech. 2012. № 13(4): P. 1416–1427.
9. Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System Guidance for Industry, U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Biopharmaceutics Revision 1. U.S. Government Printing Office: Washington, DC, May 2015.
10. Guideline on the investigation of bioequivalence, Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), European Medicines Agency, London, 20 January 2010.
11. Правила проведения исследований биоэквивалентности лекарственных средств Евразийского экономического союза. Версия 2.0 от 20.02.2015.
12. International Pharmaceutical Federation (FIP), Biowaiver Monographs 2004–2012.
13. B.N. Nalluri, M.R. Krishna. Effect of Recrystallization on the Pharmaceutical Properties of Valsartan for Improved Therapeutic Efficacy // Journal of Applied Pharmaceutical Science (JAPS). 2012. № 2(10). P. 126–132.
14. Technical Support Forum // Chemicalize.org. URL: http://www.chemicalize.org/structure/#!mol=valsartan&source=fp (дата обращения 08.06.2016).
15. Энциклопедия лекарств и товаров аптечного ассортимента. URL: http://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_2478.htm (дата обращения 29.05.2016).
16. База данных методик теста «Растворение» FDA. URL: http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/dissolution/index.cfm (дата обращения 10.06.2016).
17. Тест «Растворение» в разработке и регистрации лекарственных средств. Научно-практическое руководство для фармацевтической отрасли / Под ред. Шохина И.Е. – М.: Перо, 2015. 320 с.
18. Official Monographs. Valsartan // First Supplement to USP 35-NF 30.
19. ОФС.1.3.0003.15. // Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд.
20. Оценка биоэквивалентности лекарственных средств. Методические указания. Приложение 4. – М.: МЗСР РФ, 2008.
21. General notes on Biopharmaceutics Classification System (BCS)-based biowaiver applications. WHO Prequalification of Medicines Programme. November 2011.
22. G. Flesch, Ph. Muller, P. Lloyd. Absolute bioavailability and pharmacokinetics of valsartan, an angiotenin II receptor antagonist in man // Eur J Clin Pharmcol. 1997. № 52. P. 115–120.
23. N. Siddiqui, A. Husain. Pharmacological and Pharmaceutical Profile of Valsartan: A Review // Journal of Applied Pharmaceutical Science. 2011. № 1(4); P. 12–19.