

Исследование биоэквивалентности препаратов содержащих мемантин

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

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

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

Резюме

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

Ключевые слова: биоэквивалентность, акатинол мемантин, болезнь Альцгеймера

Bioequivalence study drug containing memantine

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

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

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

Summary

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

Keywords: bioequivalence Akatinol memantine, Alzheimer's disease

Введение

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

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

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

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

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

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

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

Материалы и методы исследования

Исследуемые препараты

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

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

Дизайн исследования

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

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

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

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

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

Хромато-масс-спектрометрический анализ

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

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

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

В анализе использован мониторинг 1 выбранного иона: первый анализатор (МС1) настроен на пропускание ионов с одним фиксированным значением m/z 180 (для мемантина), второй анализатор (МС2) фиксирует количество прошедших ионов либо по одному, либо по нескольким (Multiple Reaction Monitoring — MRM) каналам с заданными значениями m/z 163 фрагментов (m/z выбранного дочернего иона мемантина). Параметры работы детектора подбирались для достижения максимального выхода MRM.

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

Количественный анализ

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

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

Статистическая обработка полученных результатов

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

Результаты и их обсуждение

Валидация методики

Специфичность

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

Линейность

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

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

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

Предел количественного определения

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

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

Точность и воспроизводимость

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

Степень извлечения

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

Исследование фармакокинетики

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

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

Таблица 1

Точность и воспроизводимость методики количественного определения мемантина в плазме крови

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

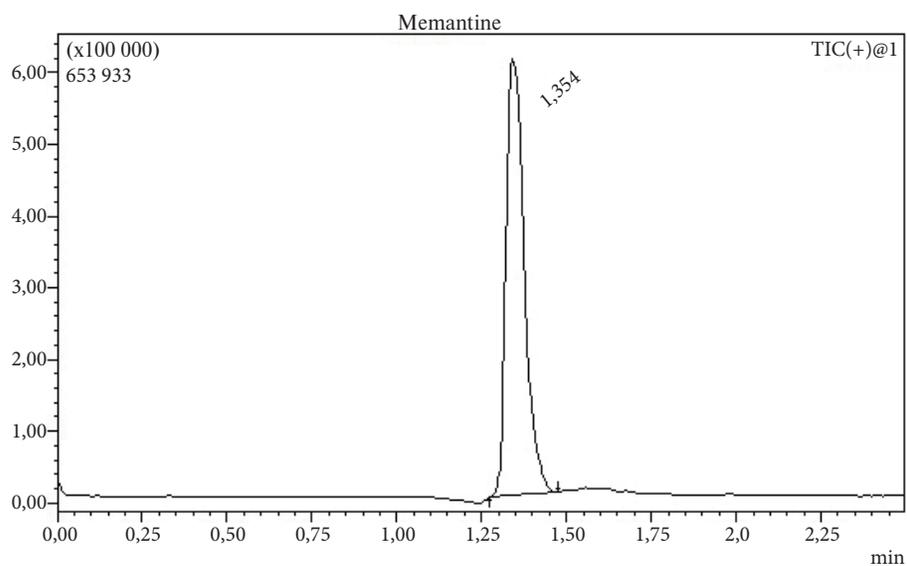


Рис. 1. Типичная хроматограмма стандартного раствора мемантина в метаноле

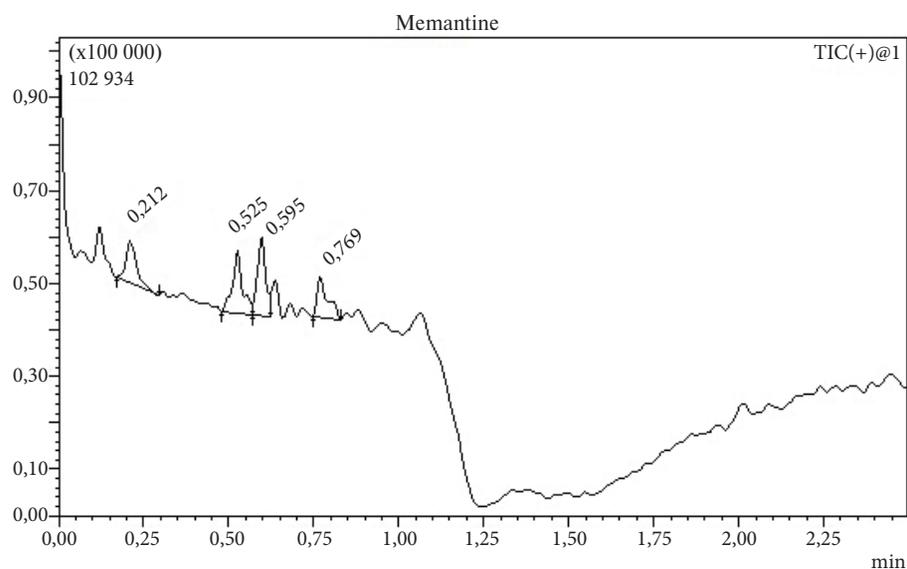


Рис. 2. Типичная хроматограмма пробы плазмы крови, не содержащей мемантин

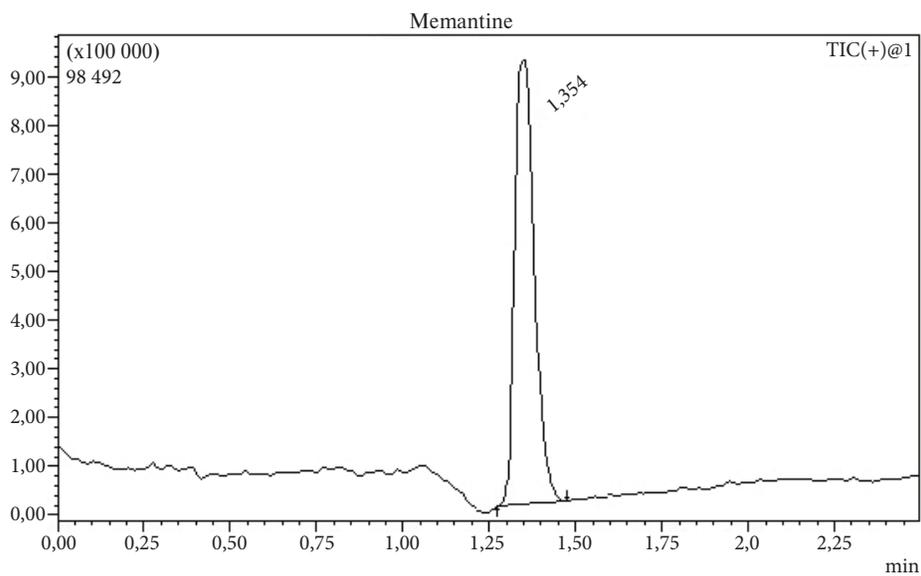


Рис. 3. Типичная хроматограмма пробы плазмы крови, содержащей мемантин

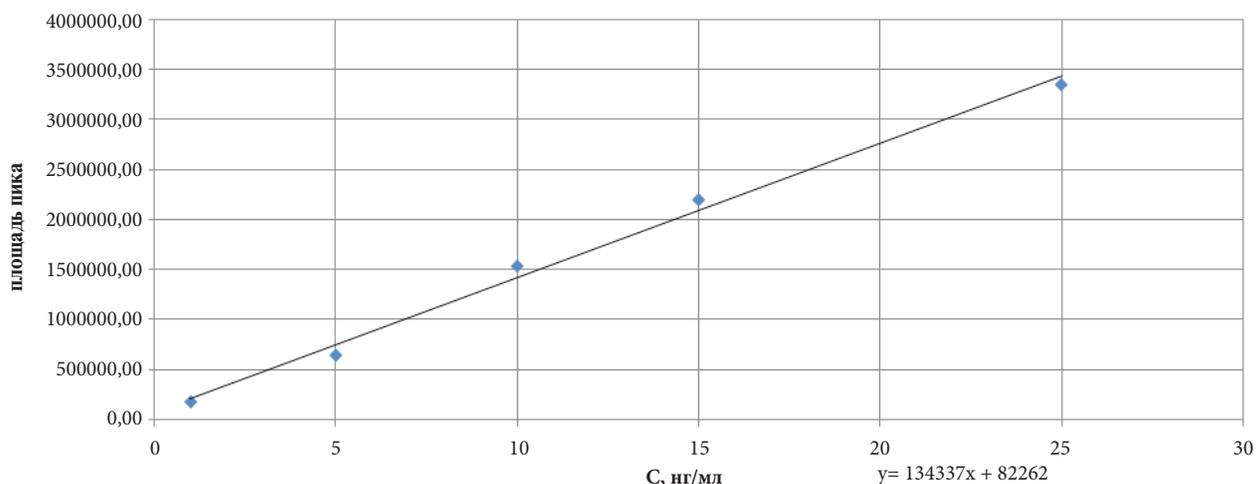


Рис. 4. Калибровочная зависимость площади пика от концентрации мемантина

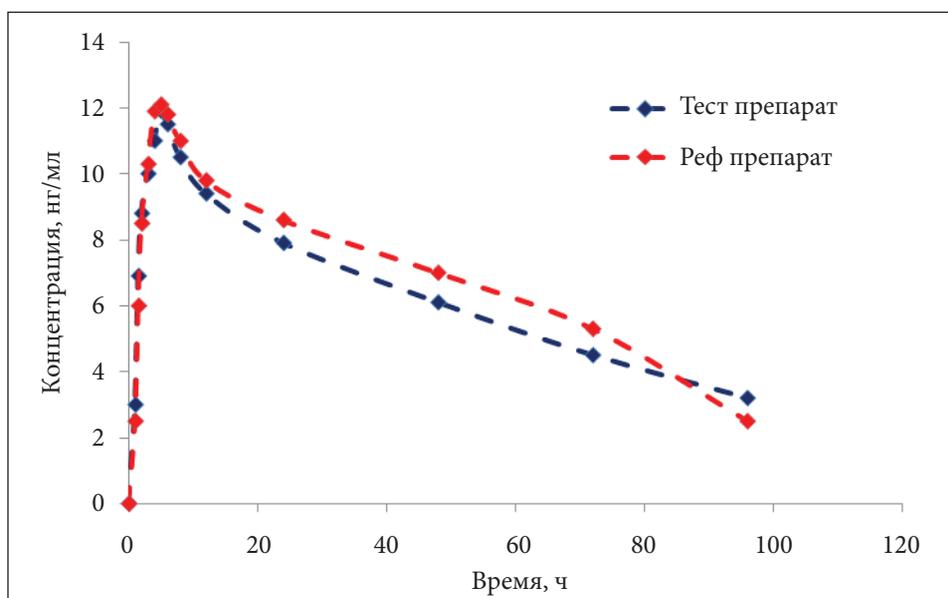


Рис. 5. Усреднённые кинетические кривые мемантина в плазме крови добровольцев (n=18) после однократного приёма внутрь препаратов Т и R

Сравнительная фармакокинетика препаратов мемантина

Таблица 2

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

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

Индивидуальная вариабельность концентрации мемантина в обоих случаях примерно одинакова.

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

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

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

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

Таблица 3

Значение отношений максимальной концентрации к площади под фармакокинетической кривой

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

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

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

Таблица 4

Параметры относительной биодоступности
Тест препарата мемантина по отношению к Референс препарату

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

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

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

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

Таблица 5

Результаты дисперсионного анализа

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

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

Заключение

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

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

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

Литература

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