

В. Г. Белолипецкая<sup>1</sup>, В. С. Арнаутов<sup>2</sup>, Е. К. Захарова<sup>2</sup>, Д. В. Рейхарт<sup>3</sup>,  
А. В. Белостоцкий<sup>3</sup>

## СРАВНЕНИЕ БИОДОСТУПНОСТИ ДВУХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ ФАМПРИДИНА У ЗДОРОВЫХ ДОБРОВОЛЬЦЕВ

<sup>1</sup> ФГБУ "ГНИЦПМ" Минздрава России, 101990, Москва, Петроверигский переулок, д. 10, стр. 3; +7(495)7907172

<sup>2</sup> ГБОУ ВПО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

<sup>3</sup> ОАО "Валента Фармацевтика", 141101, Московская обл, Щелково, ул. Фабричная, д. 2

Сравнение биодоступности двух лекарственных форм фампридина – фампридин, таблетки пролонгированного высвобождения 10 мг (исследуемый препарат, ОАО "Валента Фармацевтика", Россия) и фампира, таблетки пролонгированного высвобождения 10 мг (референтный препарат, Biogen Idec Ltd, Великобритания) было осуществлено при проведении открытого, рандомизированного, перекрестного исследования однократного применения исследуемых препаратов в дозе 10 мг. Средние значения ( $\pm$  SD) показателя  $C_{\max}$  составили ( $27,28 \pm 4,33$ ) нг/мл для референтного препарата и ( $26,63 \pm 3,44$ ) нг/мл для исследуемого препарата. Средние значения для показателя  $AUC$  составили ( $302,56 \pm 56,23$ ) и ( $300,57 \pm 55,24$ ) нг · ч/мл соответственно. 90 % доверительный интервал для отношения средних геометрических параметров  $C_{\max}$  и  $AUC$  находился в диапазоне 91 – 105 % для  $C_{\max}$  и в диапазоне 90 – 109 % для  $AUC$ . Границы рассчитанных 90 % доверительных интервалов находились в пределах допустимых (80 – 125 %), что соответствует требованиям для подтверждения биоэквивалентности исследуемых препаратов.

**Ключевые слова:** фампридин; биодоступность;  $C_{\max}$ ;  $AUC$

Фампридин (4-аминопиридин) применяется как средство, увеличивающее дистанцию ходьбы у пациентов, страдающих рассеянным склерозом с нарушением функции хождения (значение шкалы EDSS 4 – 7) [1]. Являясь блокатором калиевых каналов, фампридин улучшает проводимость демиелинизированных аксонов и обладает доказанной эффективностью как симптоматическое средство, применяемое в рамках лечения рассеянного склероза [2]. Статистически значимая эффективность фампридина по сравнению с плацебо была показана в рамках клинического исследования при изучении средней скорости ходьбы на дистанцию 25 футов (Average Walking Speed on Timed 25-Foot Walk Test) [3 – 5].

При пероральном применении фампридин быстро и полностью всасывается из желудочно-кишечного тракта. Связывание с белками плазмы составляет 97 – 99 %. Выведение фампридина и его метаболитов с мочой практически полностью осуществляется за 24 ч. Период полувыведения составляет 5,2 – 6,5 ч [6].

Настоящее клиническое исследование сравнительной биодоступности проводилось по поручению ОАО "Валента фармацевтика", Россия, компанией Clinigene

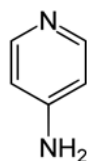


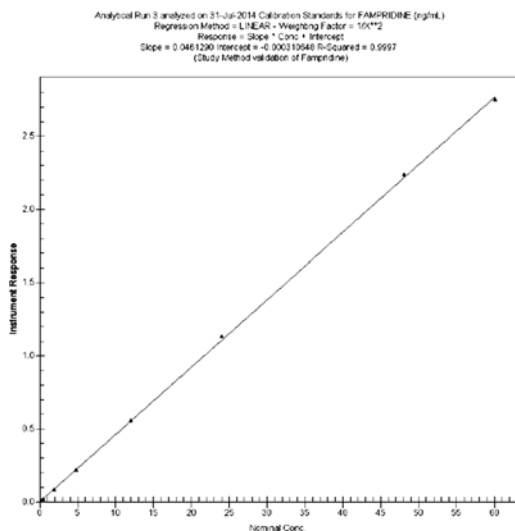
Рис. 1. Структурная формула фампридина

International Limited, Индия. До проведения клинического исследования было получено одобрение Независимого этического комитета в Индии и Министерства здравоохранения и семейного благополучия Индии.

Целью экспериментального исследования являлось сравнение 2 препаратов – таблеток пролонгированного высвобождения 10 мг: фампридин (ОАО "Валента Фармацевтика", Россия) и фампира (Biogen Idec Ltd, Великобритания).

### Экспериментальная часть

В исследовании приняли участие 12 здоровых добровольцев, мужчин в возрасте от 18 до 45 лет. У всех добровольцев было получено подписанное информированное согласие на участие в исследовании, в рамках которого добровольцы получили детальную информацию об исследуемых препаратах и процедурах исследования, а также об ограничениях, связанных с проведением эксперимента. Все добровольцы прошли процедуры скрининга, включающие физикальный осмотр, лабораторные анализы (общий анализ крови, биохимический анализ крови, общий анализ мочи), а также ЭКГ в 12 отведениях и рентгенографию грудной клетки в случае, если последняя была сделана более 6 мес назад. Участники эксперимента не принимали каких-либо медицинских препаратов, способных повлиять на результаты исследования, в течение 30 дней до его начала. Все добровольцы были госпитализированы не позже чем за 11 ч до приема препарата. Препарат принимался натощак и запивался 240 мл кипяче-



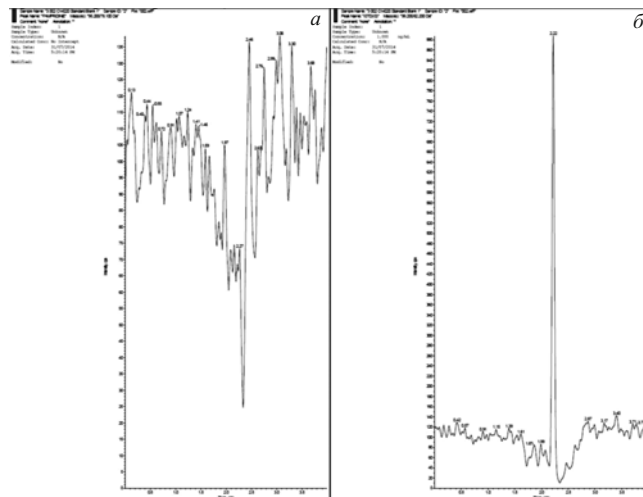
**Рис. 2.** Калибровочная кривая, построенная по 8 калибровочным точкам в диапазоне концентраций 0,24 – 60,00 нг/мл. По оси абсцисс – концентрация, нг/мл, по оси ординат – отклик детектора (cps).

ной воды. Через 4, 8, 12 ч после приема препарата добровольцам был предоставлен стандартный полдник, обед и ужин. Через 24 ч добровольцы были выписаны из стационара. Период “отмывания” между приемом препаратов составил 3 дня.

В каждом периоде отбор образцов крови осуществляли с помощью внутривенного катетера в первые 24 ч, последующий отбор – с помощью венепункции. Объем крови для каждого отбора составил 4 мл; первые 0,5 мл крови отбрасывались для того, что бы исключить забор гепарин-содержащей крови в связи с тем, что для предотвращения свертывания крови в просвете катетера был использован “гепариновый замок”. Общий объем крови на все исследования для каждого добровольца составил приблизительно 205 мл. Кровь отбирали в полипропиленовые пробирки по графику: 2 пробы крови были отобраны до приема препарата и через 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,25, 3,5, 3,75, 4, 4,25, 4,5, 5, 6, 8, 12, 16, 24 и 36 ч после приема препарата. В качестве консерванта использовали  $K_2EDTA$ .

После отбора пробы пробирки с кровью помещали на ледяную баню и далее центрифугировали при 3500 оборотов в минуту в течение 10 мин при температуре 4 °С. Далее образцы крови были разделены на 2 аликвоты и заморожены при температуре  $-(70 \pm 10)$  °С. Промежуток времени между отбором образцов и началом центрифугирования составлял не более 30 мин.

Для оценки биодоступности препаратов определяли фармакокинетические параметры:  $AUC_{0-t}$  – площадь под кривой концентрация – время, рассчитанная методом трапеций;  $C_{max}$  – максимальная концентрация;  $AUC_{0-\infty}$  – рассчитывали как сумму отношения  $C_t/K_{el}$  и площади под кривой концентрация – время. Константу элиминации ( $K_{el}$ ) определяли методом наименьших квадратов с использованием логарифмически преобразованных данных на терминальном участке фармакокинетической кривой с включением по-



**Рис. 3.** Хроматограмма образца плазмы (без ISTD): а) хроматограмма аналита (фампридин 95.20 → 78.10); б) хроматограмма ISTD (фампридин D6 99.20 → 82.20); по оси абсцисс – время, минуты, по оси ординат – отклик детектора (cps).

следней измеренной концентрации. Также были определены период полувыведения ( $T_{1/2}$ ),  $T_{max}$  – время до достижения максимальной концентрации и MRT – среднее время удержания.

Статистическую оценку сравнительной биодоступности проводили путем определения 90 % доверительных интервалов для отношения средних значений логарифмов показателей  $AUC_{0-t}$ ,  $AUC_{0-\infty}$  и  $C_{max}$ .

В экспериментальном исследовании использовали реактивы: далфампридин (Фампридин) рабочий стандарт; далфампридин D6 (Фампридин D6) рабочий стандарт, используемый в качестве внутреннего стандарта (ISTD); метанол (HPLC Grade), Sigma Aldrich Co., USA; ацетонитрил (HPLC Grade), Merck Specialities Pvt. Ltd., India; аммония формиат (SQ), Fischer scientific., India; муравьиная кислота (GR grade/Empar-ta)-Merck Specialities Pvt. Ltd., India; вода (дистиллированная системой Milli-Q).

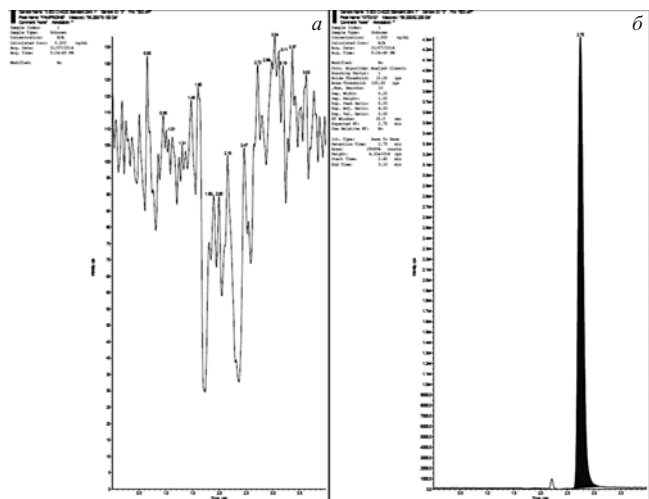
#### Описание метода

Метод определения фампридина в плазме крови включал в себя процедуру осаждения белков ацетонитрилом. Для хроматографирования использовали хроматографическую колонку Zorbax Eclipse XDB-CN, 150 × 4,6 мм, 3,5 мкм при температуре 40 °С. Концентрации определяли по методу внутреннего стандарта.

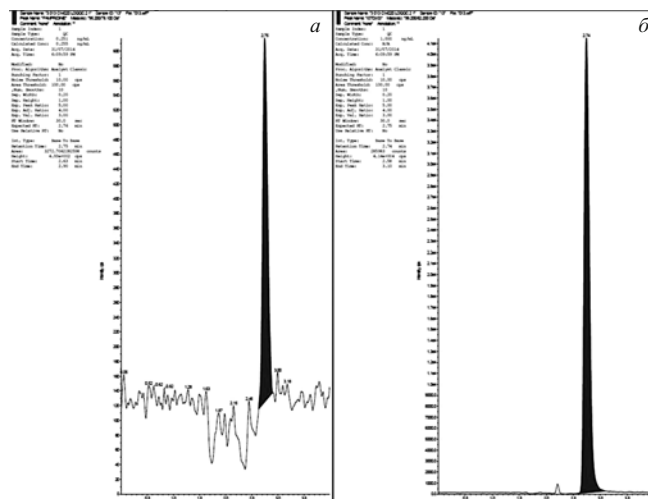
Подвижную фазу готовили смешиванием 30 частей ацетонитрила и 70 частей 10 мМ раствора аммония формиата, содержащего 0,005 % муравьиной кислоты. Далее подвижную фазу обрабатывали ультразвуком и хранили при комнатной температуре не более 3 дней после приготовления.

#### Пробоподготовка

После разморозки образцов 100 мкл плазмы перемещали в полипропиленовую пробирку, далее к ним последовательно добавляли 50 мкл раствора внутреннего стандарта и 300 мкл ацетонитрила. Образцы перемешивали на вортексе, после чего центрифугиро-



**Рис. 4.** Хроматограмма образца плазмы (с ISTD): *а*) хроматограмма аналита (фампридин 95.20 → 78.10); *б*) хроматограмма ISTD (фампридин D6 99.20 → 82.20); по оси абсцисс – время, мин; по оси ординат – отклик детектора (cps).



**Рис. 5.** Хроматограмма образца контроля качества LLOQ (нижний предел определения): *а*) хроматограмма аналита (фампридин 95.20 → 78.10); *б*) хроматограмма ISTD (фампридин D6 99.20 → 82.20); по оси абсцисс – время, мин; по оси ординат – отклик детектора (cps).

вали со скоростью 4500 оборотов в минуту при температуре 4 °C в течение 10 мин. Супернатант анализировали методом ВЭЖХ (Shimadzu Prominence), детектор-API 4000 and API 4000 QTrap, MDS Sciex, Applied.

#### Валидация

Метод определения фампридина в плазме крови был валидирован в соответствии с рекомендациями FDA [7] по следующим критериям: правильность (точность), прецизионность, воспроизводимость, чувствительность, специфичность, линейность, оценка влияния матрицы (матрикс-эффект). Также была проведена оценка эффекта переноса пробы, стабильность при повторном размораживании, стабильность пробы при хранении в автосемплере и стабильность растворов.

Нижняя граница определения для фампридина составила 0,240 нг/мл, верхняя граница – 60 нг/мл. Валидационные хроматограммы и хроматограммы образца плазмы добровольца 09 в точке 2 и 2,5 ч представлены на рис. 2 – 7.

Таблица 1

#### Средние значения фармакокинетических параметров сравниваемых препаратов фампридина

Параметр	Среднее ± стандартное отклонение	
	Исследуемый препарат фампридин (Т)	Референтный препарат фампира (R)
$C_{max}$ , нг/мл	26,632 ± 3,439	27,278 ± 4,327
$AUC_{0-t}$ , нг·ч/мл	300,572 ± 55,236	302,559 ± 56,234
$AUC_{0-\infty}$ , нг·ч/мл	308,733 ± 53,276	309,261 ± 56,57
$T_{max}$ , ч*	4,00 (2,50, 5,00)	3,00 (1,00, 4,50)
$K_{el}$ , 1/ч	0,1371 ± 0,0147	0,1427 ± 0,0148
$t_{1/2}$ , ч	5,11 ± 0,568	4,9 ± 0,5090
MRT, ч	8,82 ± 1,19	8,81 ± 1,33

\* Для  $T_{max}$  приведены медианные значения и диапазон значений.

Концентрация фампридина соответствовала границам критерия приемлемости при 5 циклах заморозки-разморозки.

#### Результаты и их обсуждение

Фармакокинетический профиль для каждого препарата фампридина представлен на рис. 7.

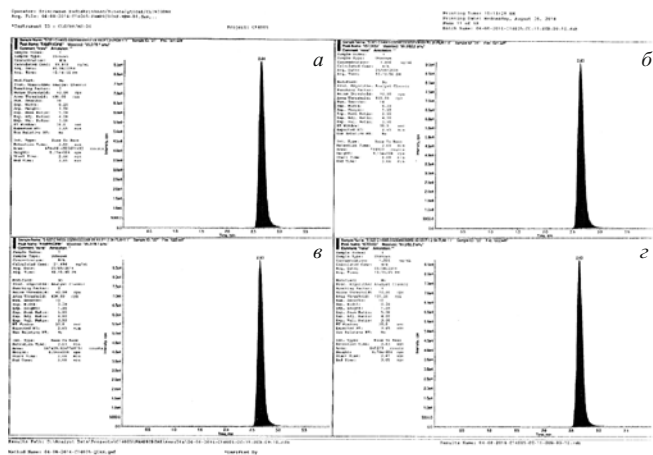
В результате расчета фармакокинетических параметров препаратов фампридина  $C_{max}$  для исследуемого препарата составила (26,632 ± 3,439) и (27,278 ± 4,327) нг/мл для препарата сравнения (табл. 1). Площадь под кривой концентрация – время была рассчитана методом трапеций и составила (300,572 ± 55,236) и (302,559 ± 56,234) нг·ч/мл соответственно.

При расчете 90 % доверительного интервала для отношения средних значений логарифмически преобразованных показателей использовали значение внутригрупповой остаточной вариации, полученное в ходе дисперсионного анализа. Для показателя  $C_{max}$  доверительный интервал составил (91 – 105) % (табл. 2), для показателя  $AUC_{0-t}$  – (90 – 109) %, для показателя

Таблица 2

#### 90 % Доверительные интервалы для отношения средних значений логарифмически преобразованных показателей фармакокинетики сравниваемых препаратов фампридина

Фармакокинетический параметр	Соотношение (Т/R), %	90 % доверительный интервал (Т относительно R)	Интраиндивидуальный коэффициент вариации (CV), %	Статистическая мощность, %
$\ln(C_{max})$ , нг/мл	98,00	91,27, 105,22	9,63	99,85
$\ln(AUC_{0-t})$ , нг·ч/мл	99,51	90,44, 109,49	12,97	98,20
$\ln(AUC_{0-\infty})$ , нг·ч/мл	100,17	90,81, 110,48	13,31	97,83



**Рис. 6.** Хроматограммы анализа плазмы крови добровольца 09, период 1, точки отбора крови 2 и 2,5 ч: а) хроматограмма аналита (фампридин 95.20 → 78.10) точка 2 ч; б) хроматограмма ISTD (фампридин D6 99.20 → 82.20) точка 2 ч; в) хроматограмма аналита (фампридин 95.20 → 78.10) точка 2,5 ч; г) хроматограмма ISTD (фампридин D6 99.20 → 82.20) точка 2,5 ч; по оси абсцисс – время, мин, по оси ординат – отклик детектора (cps).

$AUC_{0-\infty}$  – (90 – 110) %, что полностью укладывается в конвенциональный интервал 80 – 125 % [8, 9].

Значения внутрииндивидуальной вариабельности для параметров  $\ln(C_{\max})$  и  $\ln(AUC_{0-t})$  составили 9,63 и 12,97 % (табл. 2), что позволяет считать фампридин низковариабельным лекарственным веществом.

Биодоступность препарата фампридин, таблетки пролонгированного высвобождения 10 мг (ОАО “Валента Фармацевтика”, Россия) составила 98 % (91,27, 105,22) для показателя  $\ln(C_{\max})$  и 99,51 % (90,44, 109,49) для показателя  $\ln(AUC_{0-t})$  по отношению к препарату фампира, таблетки пролонгированного высвобождения 10 мг (Biogen Idec Ltd, Великобритания), что соответствует принятым интервалам (80, 125 %) для доказательства биоэквивалентности исследуемых продуктов.

## COMPARATIVE BIOAVAILABILITY OF TWO MEDICINAL FORMS OF FAMPRIDINE IN HEALTHY VOLUNTEERS

V. G. Belolipetskaya<sup>1</sup>, V. S. Arnautov<sup>2</sup>, E. K. Zakharova<sup>2</sup>, D. V. Reikhart<sup>3</sup>, and A. V. Belostotskii<sup>3</sup>

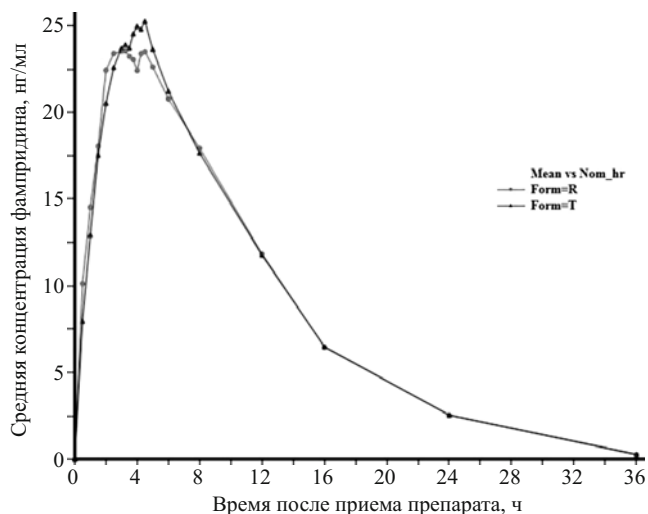
<sup>1</sup> National Center for Preventive Medicine, Moscow, 101990 Russia

<sup>2</sup> Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, 119991 Russia

<sup>3</sup> Valenta Pharm Company, Shchelkovo, Moscow oblast, 141101 Russia

The bioavailability of fampridine in two medicinal forms of 10 mg prolonged release tablets – tested preparation of Valenta Pharm (Russia) and reference preparation of Biogen Idec Ltd. (United Kingdom) – has been compared in an open randomized crossover trial for single administration in healthy volunteers. The average values of  $C_{\max}$  ( $\pm$  SD) amounted to  $(27.28 \pm 4.33)$  ng/mL for the reference preparation and  $(26.63 \pm 3.44)$  ng/mL for the drug tested. The average values of AUC were  $(302.56 \pm 56.23)$  and  $(300.57 \pm 55.24)$  ng · h/mL, respectively. The 90% confidence intervals for the ratio of average geometric pharmacokinetic parameters  $C_{\max}$  and AUC were within 91 – 105% and 90 – 109%, respectively. The boundaries of 90% confidence intervals also fell within permissible limits (80 – 125%), which correspond to requirements for certification of the bioequivalence of two drugs.

**Keywords:** fampridine; bioavailability; pharmacokinetic parameters.



**Рис. 7.** Средние значения концентрации фампридина в плазме крови здоровых добровольцев.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Fampyra: EPAR - Product Information (24/10/2014 Fampyra – EMEA/H/C/002097-N /0020)
2. S. Judge, C. Bever, *Pharmacol. Ther.*, **111** (1), 224–259 (2006).
3. NELM. UKMi London New Drugs Group APC / DTC Briefing Document Fampridine (2011).
4. Safety and Efficacy Study of Oral Fampridine-SR in Patients With Multiple Sclerosis: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00053417>
5. Study of Oral Fampridine-SR in Multiple Sclerosis: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00127530>
6. Product Monograph FAMPYRA, Biogen Idec Canada Inc, 26 November (2014).
7. FDA. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation
8. FDA. Guidance for Industry: Bioavailability and Bioequivalence Studies for Orally Administered Drug Products — General Considerations
9. FDA. Guidance for Industry: Bioequivalence Studies with Pharmacokinetic Endpoints for Drugs Submitted Under an ANDA

Поступила 02.07.15