



## Session 5

**Good basic biomedical practice – Надлежащая практика в биомедицинских исследованиях и ранних этапах фармацевтической разработки**

Особенности изучения фармакокинетики и количественной стандартизации препаратов неустановленной структуры

Features of the study of pharmacokinetics and quantitative standardization of drugs of unknown structure

**Фаустова Н.М.**

[www.doclinika.ru](http://www.doclinika.ru)

# Фармакокинетика / Pharmacokinetics

---



- ▶ Раздел фармакологии, изучающий закономерности всасывания, распределения, метаболизма и выделения лекарственных средств.
- ▶ Исследование закономерностей основано на математическом моделировании указанных процессов
- ▶ Фармакокинетические исследования являются обязательными частями доклинических исследований для разработки новых лекарств.
- ▶ Количественная оценка активных веществ в биологических образцах (плазма, ткани, органы и т. д.) необходима для дальнейшей оценки фармакокинетических параметров.

## Фармакокинетические профили лекарственного средства в крови характеризуются следующими основными параметрами:

---

- максимальная концентрация ( $C_{\max}$ ),
- время достижения максимальной концентрации ( $T_{\max}$ ),
- площадь под кривой «концентрация-время» (AUC),
- площадь под кривой «произведение времени на концентрацию фармакологического средства» (AUMC),
- среднее время удерживания (MRT),
- период полувыведения ( $T_{1/2}$ )
- показатель скорости всасывания  $C_{\max}/AUC_t$ .

(Руководство по доклиническим исследованиям лекарственных средств // ФГБУ «НЦЭМСП» Под редакцией Миронова А.Н. том.1. 2012. 942 с)

# Аналитические методы для фармакокинетических и фармакодинамических исследований

Для проведения фармакокинетики наиболее часто используются хроматографические методы (ВЭЖХ). Но они часто не подходят для определения некоторых типов аналитов, например, для иммуно-биологических препаратов пептидной и белковой природы.

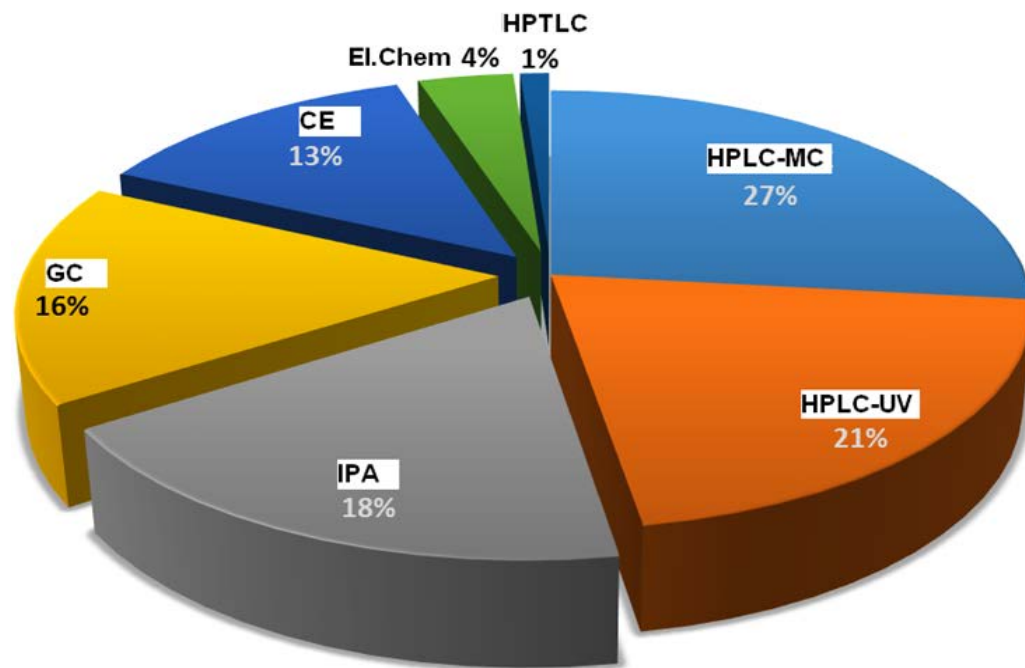


Рисунок 1 - Different methods application for drug assay in plasma in last 10 years (parts from total publications number)

[Ярошенко Д.В. Нивелирование влияния биологической матрицы при определении лекарственных препаратов в плазме крови методом хромато-масс-спектрометрии: дис. ... канд. хим. наук. СПбГУ, Санкт-Петербург. 2014]

# Фармацевтические субстанции (лекарственные препараты)



## Фармакокинетика

Изучает всё, что происходит с лекарством в организме,  
а именно:

- Пути введения в организм
  - Всасывание
  - Распределение
- Биотрансформацию
- Выведение из организма



## ФАРМАКОДИНАМИКА

Изучает всё, что лекарство делает с организмом,  
а именно:

- Фармакологические эффекты
  - Механизмы действия ЛС
- Виды действия лекарственных веществ
  - Виды лекарственной терапии
- Факторы, влияющие на действие лекарств
- Реакцию организма на повторное введение ЛС
  - Комбинированное действие ЛС
  - Побочное и токсическое действие ЛС

**Иммунно-  
ферментные  
методы/  
энзиматические  
методы анализа**

## **Обоснование возможности использования фармакодинамических показателей для изучения фармакокинетических параметров**

---

**”Гетерогенность низкомолекулярных гепаринов не позволяет проведение обычного исследования фармакокинетических свойств. Поэтому оценка всасывания и элиминации низкомолекулярных гепаринов проводится при изучении фармакодинамических свойств по показателям (включая анти-Ха и анти-IIa), которые могут быть использованы в качестве суррогатных маркеров концентрации препарата.”**

- 1) 15.6 Доклинические и клинические исследования биоаналогичных (биоподобных) лекарственных препаратов на основе гепаринов низкой молекулярной массы// Решение Совета Евразийской экономической комиссии №89 от 03.11.2016 г. «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза». Астана. 2016. С. 560 – 561
- 2) Guideline on non-clinical and clinical development of similar biological medicinal products containing low-molecular-weight-heparins. EMEA/CHMP/BMWP/118264/2007

## Обоснование возможности использования фармакодинамических показателей для изучения фармакокинетических параметров

---

"Complex substances materials and drugs derived from traditional fermentation processes (yeast, mold, bacterium, or other microorganisms). For some of these substances, identification of individual motives and / or ingredients is difficult or impossible. In this circumstance. It can be used to identify the magnitude of contribution from individual active moieties."

( Guidance for Industry. Exposure-Response Relationships – Study Design, Data Analysis, and Regulatory. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Center for Biologics Evaluation and Research (CBER) 2003. 25 c)



# Требования, предъявляемые к методу анализа

---

при проведении доклинических  
и клинических исследований:

- ▶ чувствительность,
- ▶ экспрессность,
- ▶ точность,
- ▶ селективность,
- ▶ возможность работы с малым объемом биоматериала,
- ▶ стоимость анализа



# Иммуноферментный анализ (ИФА)

---

## *Преимущества:*

- высокая чувствительность (пг/мл)
- хорошая селективность (специфичность)
- быстрота и удобство проведения реакции
- стабильность при хранении всех ингредиентов, необходимых для проведения ИФА (не менее года);
- возможность использовать минимальные объемы биоматериала;
- отсутствие необходимости предварительной пробоподготовки по очистке и концентрированию анализита



## *Недостатки:*

- Нужны специальные наборы для каждого целевого анализита
- Селективность реакции антитела с конкретным лекарственным веществом не абсолютна: в присутствии соединений, имеющих близкое строение, антитело может вступать с ними в перекрестные реакции

# ИФА – выбор тест-системы

**Рекомбинантный белок / полипептиды/ экстракт тканей**

человек

млекопитающие (КРС)

ИФА-наборы, специфичные  
для человека

ИФА-наборы, специфичные  
для быков (коров)

Животные для проведения кинетики –  
кролики/крысы/минипиги

!!! Запросить у производителя информацию о виде животных («хозяев»), которые использовались для получения антител. Если в тест-системе использованы кроличьи антитела, то для кинетики нельзя использовать кроликов, т.к. присутствие кроличьих IgG в биоматериале будет искажать результаты

**Подготовка модельных смесей с биоматериалом и проведение валидации**

# Нормативные документы

---

- 1) ОФС.1.1.0012.15 Валидация аналитических методик // Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIV изд., М.: МЗ РФ, 2018, Т.1-4. 2019 с.
- 2) ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений». 2002. (соответствует международному стандарту ИСО 5725-1-1994),
- 3) Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств. М., Министерство здравоохранения и социального развития РФ, 2007. 49 с.
- 4) Правила проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза. Приложение № 6 «Требования к валидации биоаналитических методик испытаний и анализу исследуемых биологических образцов (2016)»
- 4) Guidance for Industry: Bioanalytical method for validation. Rockville, MD, U.S. Department of Health and Human Services, FDA, Center for Drug Evaluation and Research, Center for veterinary medicine, 2018. 41 p.
- 5) Guideline on bioanalytical method validation. EMEA/CHMP/EWP192217/2009, London, Committee for medicinal products for human use (CHMP), 2011. – 22 p.

# Обязательные параметры валидации методики количественного определения

---

- ▶ селективность (специфичность) (Specificity (selectivity),
- ▶ предел обнаружения (ПО) (чувствительность, sensitivity)
- ▶ нижний предел количественного определения (НПКО) (lower limit of Quantitation, LLOQ),
- ▶ линейность, аналитический диапазон методики (linearity, calibration range)
- ▶ точность (accuracy)
- ▶ прецизионность (precision)
- ▶ стабильность анализа (stability) (краткосрочная, долгосрочная)
- ▶ *степень экстракции (recovery)*

Точность и прецизионность определяют не менее, чем для 4-х уровней концентраций: верхний предел количественного определения (ВПКО), средний контроль качества (КК), низкий контроль качества

# Иммуноферментный анализ (ИФА)

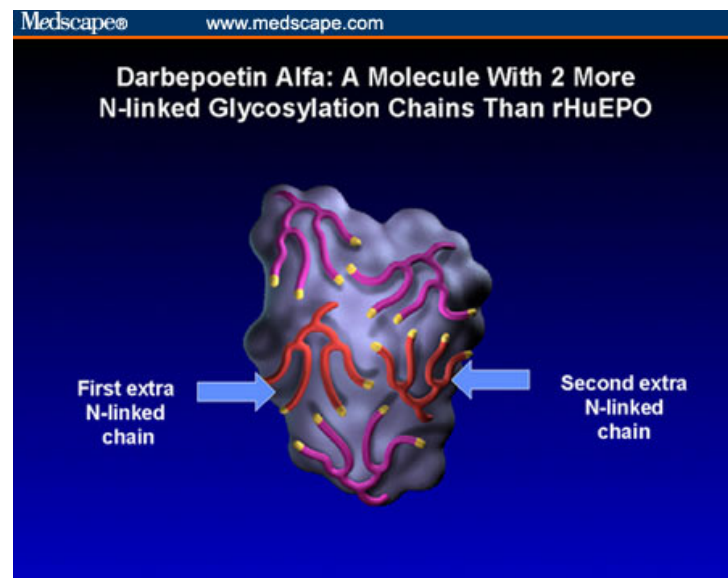
Эндогенный белок	Производные	Наборы для ИФА (пример)
Эритропоэтин	Дарбэпоэтин альфа, Карбамилированный дарбэпоэтин	Эритропоэтин-ИФА-Бест, №А-8776 (Вектор-бест, Россия)
Интерферон альфа-2а (2б)	Пегилированный интерферон альфа-2а	Интерферон-ИФА-Бест, №А-8758 (Вектор-бест, Россия)

# Эритропоэтин / Дарбэпоэтин альфа/ Карбамилированный дарбоэритропоэтин

Эритропоэтин (ЭПО) является одним из важных ферментов, которые регулируют образование эритроцитов. Он популярен в биотехнологии из-за своей терапевтической активности.

Дарбэпоэтин (ДЭПО) имеет незначительные структурные различия в степени гликозилирования. Имеет широкое клиническое применение в терапии анемии.

Карбамилированный дарбэпоэтин (КарбДЭПО) - гипергликозилированный вариант рекомбинантного эритропоэтина человека; Эффективный цитопротектор



# ИФА-набор: Эритропоэтин- ИФА-бест

Соответствие экспериментальных данных техническим характеристикам набора

Наименование показателя	Характеристика и нормы	Результаты эксперимента
Оптические плотности калибровочных образцов	$D_{ст 0} < D_{ст 2} < D_{ст 10} < D_{ст 50} < D_{ст 100} < D_{ст 200}$	$0,139 < 0,148 < 0,179 < 0,334 < 0,574 < 1,049$
D калибровочного образца 0 мМЕ/мл	Не более 0,2	0,139
D калибровочного образца 200 мМЕ/мл	Не менее 0,9	1,049
Чувствительность (НПО), мМЕ/мл	Не более 0,5	0,48
Концентрация ЭПО в контрольном образце, мМЕ/мл	20–30	$23,8 \pm 1,9$
RSD, %	Не более 8	7,01

**Итак, экспериментально полученные данные соответствуют показателям правильности определения концентрации ЭПО. Набор пригоден для дальнейших испытаний**

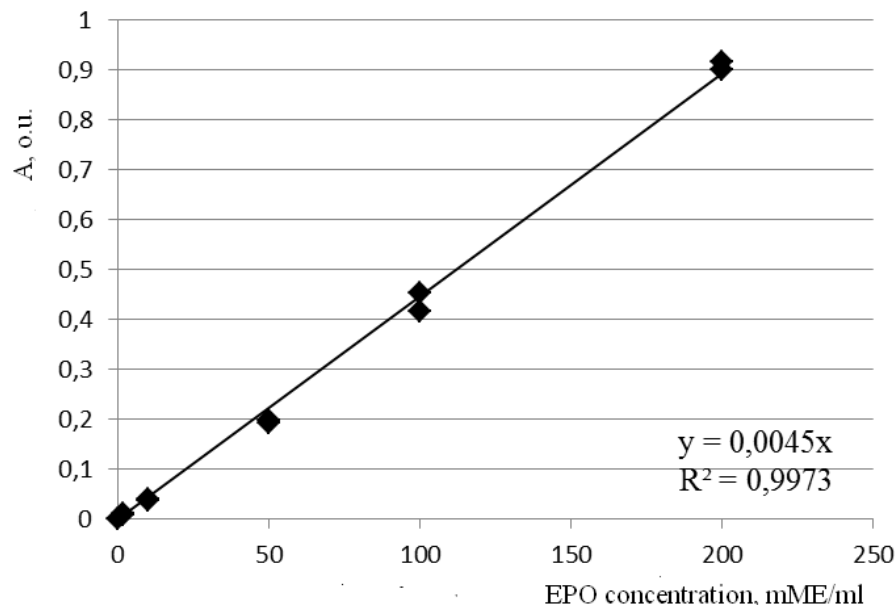




# ИФА-набор: Эритропоэтин- ИФА-бест

## Первый этап - проверка пригодности тест-системы:

- получение корректной калибровочной зависимости – линейная;
- значение концентрации ЭПО в контрольном образце должно соответствовать указанному диапазону 20-30 мМЕ/ml;
- среднее значение оптической плотности калибровочного образца, не содержащего аналита (0 мМЕ/мл) - не более 0,2 о.е.



Пример линейной зависимости оптической плотности от концентрации ЭПО в калибровочных образцах (мМЕ/мл)

По результатам предварительных испытаний для дальнейшей работы была выбрана плазма крови с использованием в качестве антикоагулянта ЭДТА-Na<sub>2</sub>

# Дарбэпоэтин альфа. Оптимизация методики.

---

Выполнение анализа в соответствии с инструкцией к набору приводило к неадекватным результатам :

- чёрный осадок в некоторых лунках,
- отсутствие линейности,
- высокая оптическая плотность для бланков и плацебо( $>0.2$ ),
- внутридневная прецизионность (RSD) $>20\%$ .

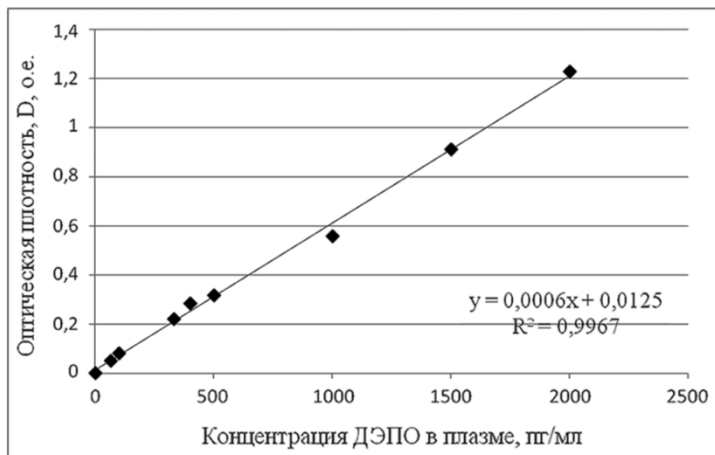
ПОЭТОМУ в методику были внесены изменения :

- увеличено число и длительность промывок;
- промывку лунок проводили в течение 3 мин при температуре 37 °C и с частотой вращения 700 об/мин
- сокращено время инкубации с триметилбензидином (до 10 мин).



# Дарбэпоэтин альфа. Валидация методики

После оптимизации методика определения концентрации ДЭПО в плазме крови кроликов была валидирована в соответствии с официальными рекомендациями. Удовлетворительные результаты были получены для всех параметров валидации.



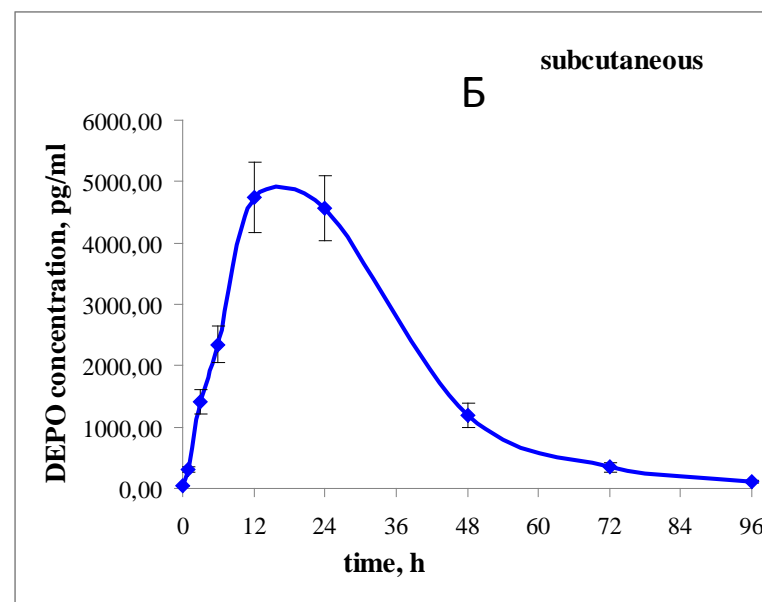
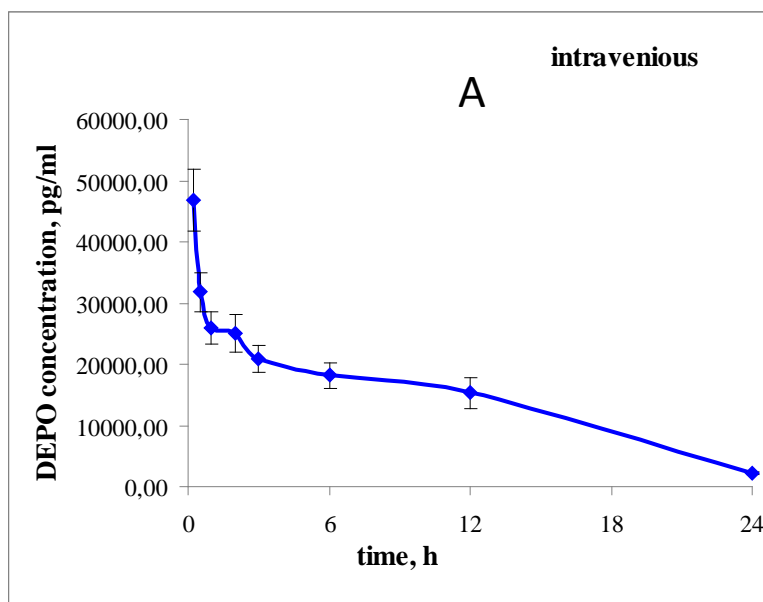
Пример зависимости оптической плотности от концентрации ДЭПО в плазме (пг/мл)

Параметр	Результат
Специфичность - определяется специфичностью антител; подтверждена увеличением D при 450 нм на фоне компонентов плазмы крови кроликов в модельных смесях с добавкой ДЭПО	
Линейность, $r > 0,99$	67 – 2000 пг/мл, $r > 0,995$
НПКО	67 пг/мл
Точность, НПКО < 20%, другие уровни < 15% ВПКО (2000 пг/мл) Средний КК (1000 пг/мл) Низкий КК (201 пг/мл) НПКО (67 пг/мл)	2.0 4.8 6.3 12.9
Внутридневная/междневная прецизионность НПКО < 20%, другие уровни < 15% ВПКО (2000 пг/мл) Средний КК (1000 пг/мл) Низкий КК (201 пг/мл) НПКО (67 пг/мл)	2.4 - 5.2 / 3.3 2.1 - 7.2 / 5.1 4.2 - 8.8 / 6.2 8.3 - 11.3 / 13.0



# Дарбэпоэтин альфа. Применение методики.

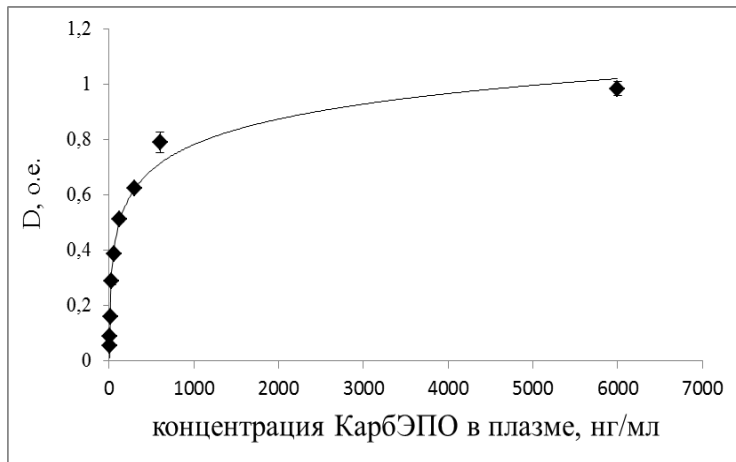
Валидированная методика была использована для определения концентрации ДЭПО в плазме крови кроликов после однократного внутривенного (А) и подкожного (Б) введения препарата “Аранесп, раствор для инъекций” (Amgen Europe B.V., Нидерланды) в терапевтической дозе (1 мг/кг).



Кривая «концентрация-время» дарбэпоэтина при однократном внутривенном (А) и подкожном (Б) введении препарата «Аранесп, раствор для инъекций» ( $n=6$ ,  $X_{cp} \pm S_X$ )

# КарбДЭПО. Валидация методики (крысы)

Методика определения концентрации карбДЭПО в плазме крови крыс была валидирована в соответствии с официальными рекомендациями. Для всех параметров были получены удовлетворительные результаты.

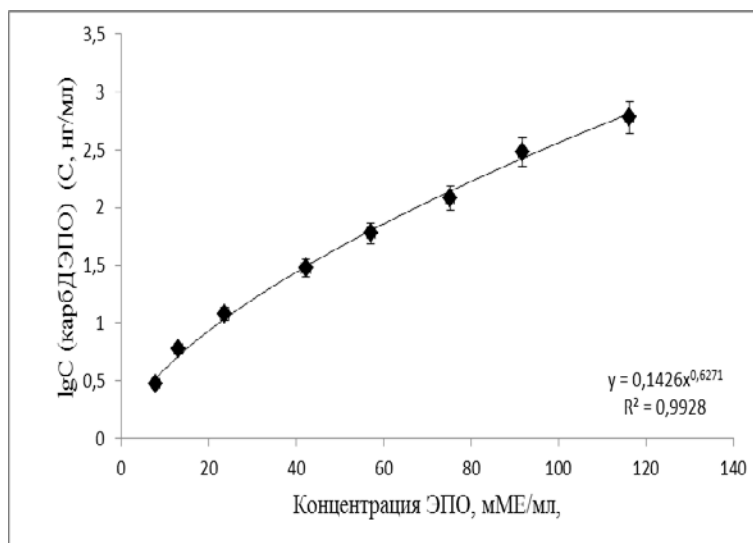


Пример зависимости оптической плотности от концентрации карбДЭПО в плазме крыс (нг/мл)

Параметр	Результат
Специфичность - определяется специфичностью антител; подтверждена увеличением D при 450 нм на фоне компонентов плазмы крови в модельных смесях с добавкой карбДЭПО	
Аналитический диапазон, $r > 0,99$	3,0 – 600 нг/мл, $r = 0,9964$
НПКО	3,0 нг/мл
Точность, НПКО < 20%, другие уровни < 15% ВПКО (600 нг/мл) Средний КК (300 нг/мл) Низкий КК (6,0 нг/мл) НПКО (3,0 нг/мл)	8.3 11.3 14.0 10.4
Внутридневная/междневная прецизионность НПКО < 20%, другие уровни < 15% ВПКО (600 нг/мл) Средний КК (300 нг/мл) Низкий КК (6,0 нг/мл) НПКО (3,0 нг/мл)	4.7 / 7.1 0.5 / 2.0 6.2 / 7.6 15.9 / 17.6

# КарбДЭПО. Применение методики.

Валидированная методика была использована для определения концентрации карбДЭПО в плазме крови крыс после однократного подкожного введения карбДЭПО (раствор для подкожного введения) в дозе 50 мкг/кг.



Зависимость  $\lg C_{\text{карбДЭПО}} = f(C_{\text{ЭПО}})$   
для расчета концентраций  
карбДЭПО в плазме крови крыс

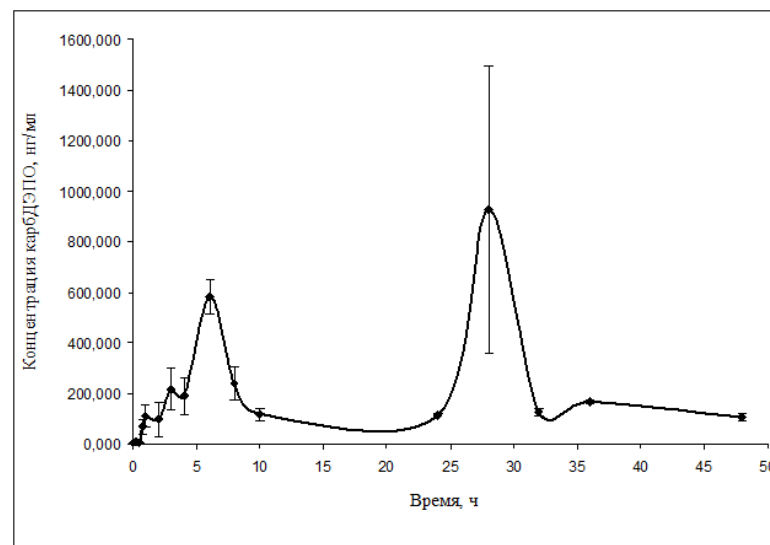


Рисунок 11 – Кривая «концентрация-время» карбДЭПО после однократного подкожного введения крысам в дозе 50 мкг/кг ( $n=3, X_{\text{ср}} \pm S_X$ )

# Дарбэпоэтин альфа и КарбДЭПО.

Показатели фармакокинетики **дарбэпоэтина** альфа при однократном внутривенном и подкожном введениях препарата «Аранесп» (Xcp.±SD)

Путь введения	C <sub>max</sub> , пг/мл	AUC <sub>0-t</sub> , ч·пг/мл	MRT, ч	T <sub>1/2</sub> , ч
Внутривенное	46839±12464	341924±102390	7.77±0.49	5.38±0.34
Подкожное	5348±1102	173637±39045	25.2±3.20	17.69±1.87

Показатели фармакокинетики **карбДЭПО** при однократном подкожном введении исследуемого препарата в дозе 50 мкг/кг

Путь введения	C <sub>max</sub> , пг/мл	AUC <sub>0-t</sub> , ч·пг/мл	MRT, ч	T <sub>1/2</sub> , ч
Подкожное	1123±786	10445±3488	31,4±4.37	13.16±7.52

Таким образом, набор реагентов «Эритропоэтин-ИФА-Бест» («Вектор-Бест», Россия) может быть использован для количественного определения ДЭПО в плазме крови кроликов и карбДЭПО в плазме крови крыс.

Методики были валидированы и применены для фармакокинетического исследования.

# Использование фармакодинамических параметров для изучения фармакокинетики

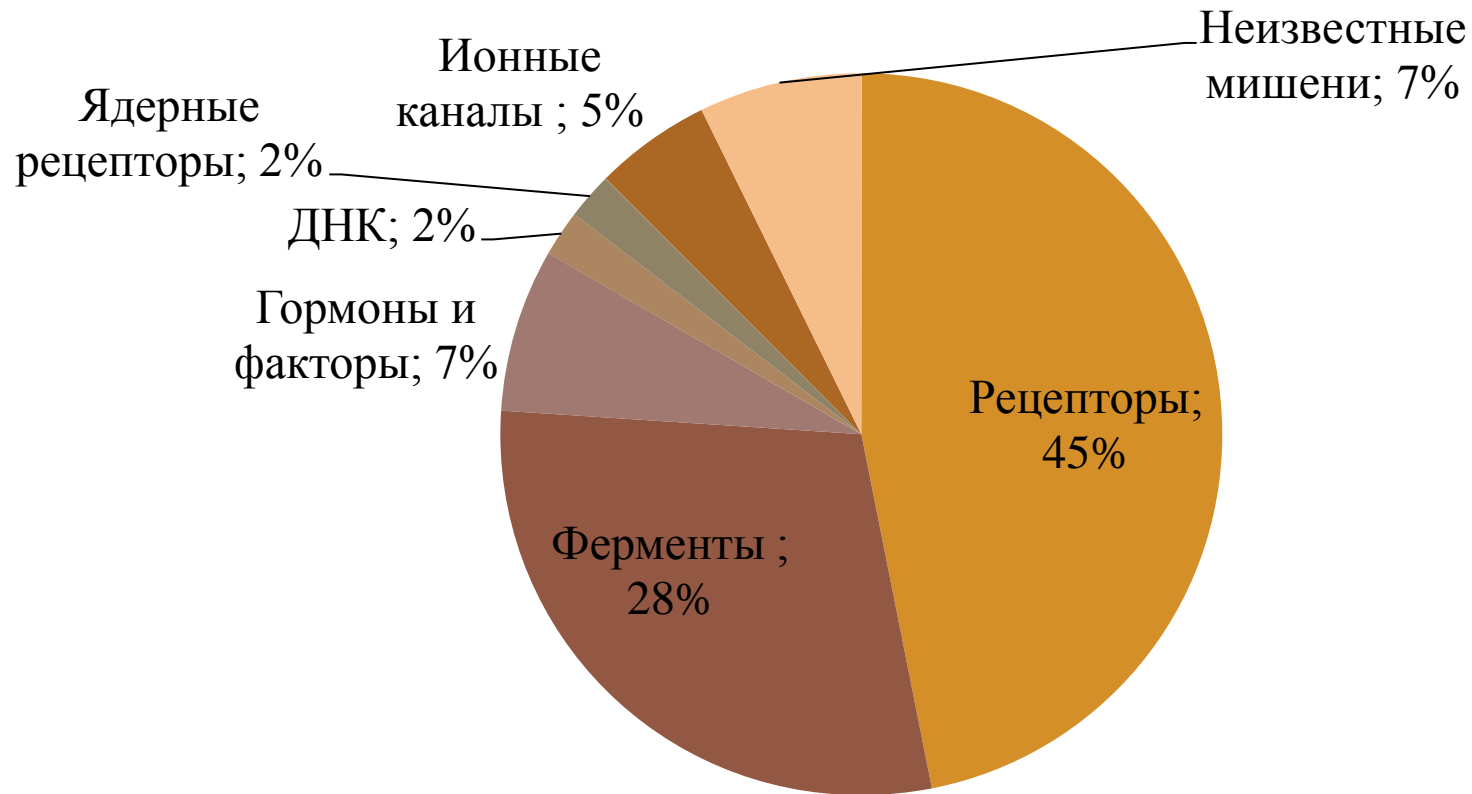
## Этапы выбора «суррогатного» маркера для фармакокинетики

- 1) Анализ литературных данных по биологической (фармакодинамической) активности (*in vitro/in vivo* исследования) субстанции/препарата
- 2) Первичный выбор биологических «мишеней» для тестирования
- 3) Скрининг биологической активности – проведение экспериментов *in vitro*, поиск корреляционной зависимости «концентрация – биологический эффект», сравнение селективности и чувствительности методик, выбор «суррогатного» маркера для фармакокинетики
- 4) Определение чувствительности и аналитического диапазона методики, **валидация** методики определения концентрации фармацевтической субстанции в биоматериале (*in vitro/ex vivo*)
- 5) Проведение пилотного кинетического исследования *in vivo* (3 животных)
- 6) При получении положительного результата – проведение основного фармакокинетического исследования



# Биохимическая классификация биологических мишеней и их численное соотношение

---



L. S. Goodman et al., Eds., Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics (McGraw-Hill, New York, ed. 9, 1996).

---



# «Суррогатный» маркер для фармакокинетики

---

## Критерии выбора

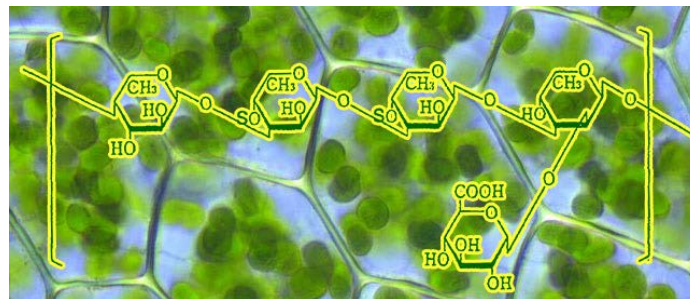
- - наличие корреляционной зависимости «концентрация – биологический эффект» in vitro/ex vivo
- Изменение активности маркера должны быть выраженными у здоровых животных (не подходят маркеры воспаления и т.п.)
- Стабильность измеряемого параметра, возможность хранения образцов (замораживание)

# Изучение фармакокинетики «Фукоидана»

Субстанция «Фукоидан» - экстракт *Fucus vesiculosus* L. (Баренцево море). В составе преобладают фукоиданы – сульфатированные гетерополисахариды (образованы остатками  $\alpha$ -L-фукопиранозы, этерифицированных серной кислотой).

По литературным данным обладает:

- ✓ антикоагулянтной активностью
- ✓ фибринолитической активностью.



По результатам исследований *in vitro/in vivo* установлено дозозависимое влияние на следующие параметры гемостаза:

- на протромбиновое время (ПВ), тромбиновое время (ТВ) и активированное частичное тромбопластиновое (АЧТВ) время;
- на активность фактора свёртывания крови Ха
- на скорость агрегации тромбоцитов

# Использование активности фактора Ха для изучения фармакокинетики Фукоидана

---

В качестве «суррогатного» маркера для фармакокинетики фукоидана было выбрано определение изменения активности **фактора Ха хромогенным методом** (аналогично рекомендациям по изучению кинетики низкомолекулярных гепаринов).

Хромогенные методы характеризуются повышенной точностью по сравнению с коагулологическим тестированием и обладают высокой чувствительностью. Для хромогенного определения анти Ха активности фукоидана использовали набор «Реахром-гепарин» (НПО «Ренам», Россия).

Принцип метода :

- 1) Фукоидан + антитромбин III (АТIII) (избыток) → АТIII-фукоидан
- 2) АТIII-фукоидан + Ха (избыток) → АТIII-фукоидан-Ха + Ха (остаток)
- 3) Ха (остаток) + Субстрат-р-НА → Пептид + рНА

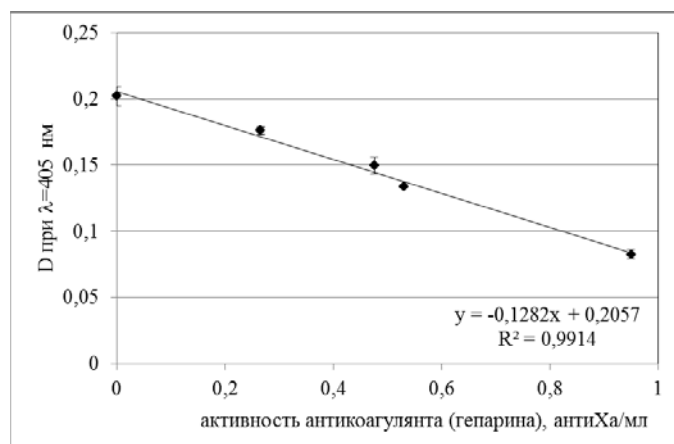
Абсорбция свободного п-нитроанилина (р-НА), определяемая при длине волны 405 нм, обратно пропорциональна концентрации фукоидана в плазме.

# Валидация методики определения «Фукоидана»

## 1 этап – Проверка пригодности тест-системы

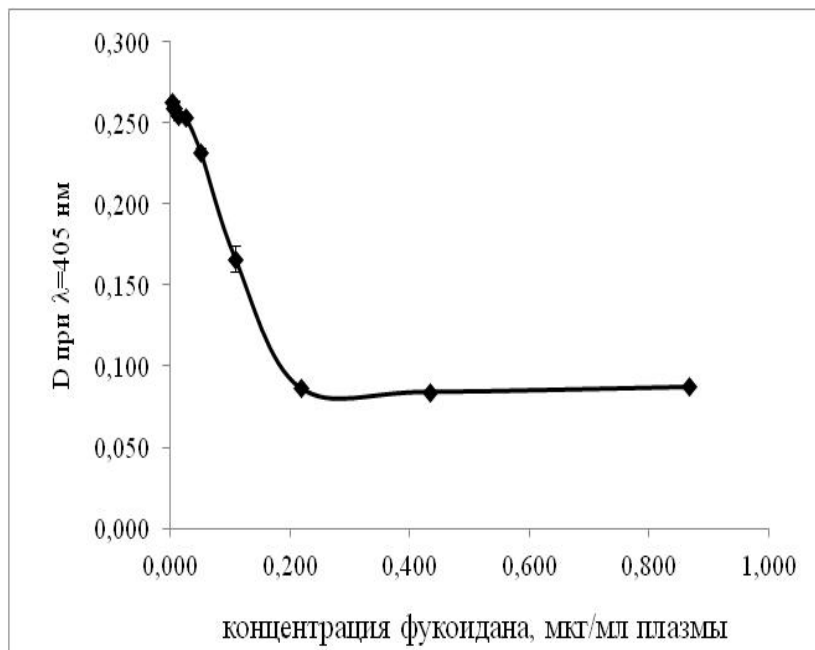
Результаты определения анти-Ха активности гепарина в контрольных плазмах в ходе различных серий анализов

Контрольная плазма	Полученные значения, антиХа/мл ( $X_{cp} \pm SD$ )	Допустимые значения активности, антиХа/мл*	Полученные коэффициенты вариации, %	Допустимый коэффициент вариации*, %
1	0,43±0,03	0,38 – 0,46	6,6 – 7,6	Не более 10
2	0,79±0,02	0,76 – 0,94	2,3 – 3,5	Не более 10

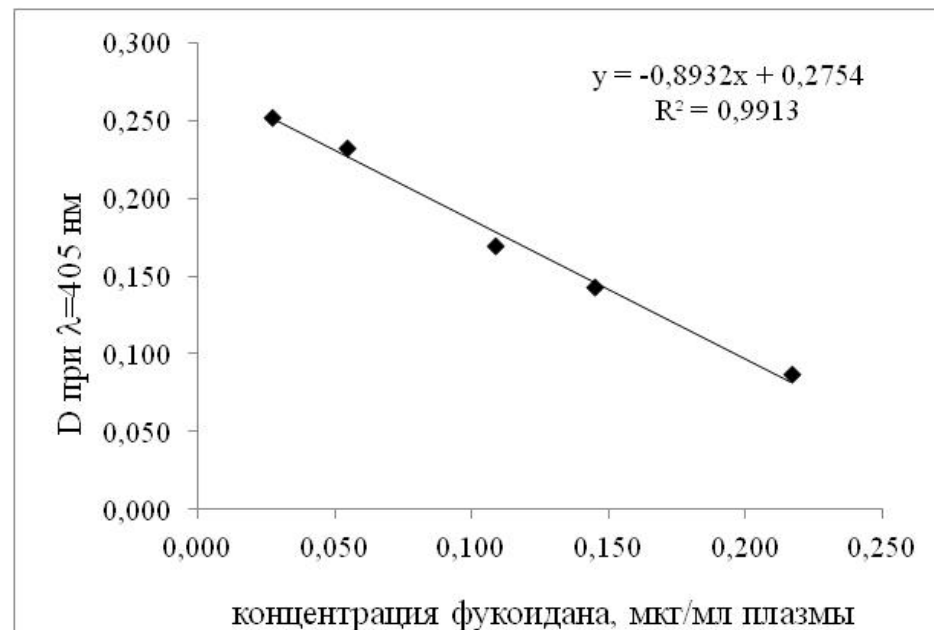


Типичный график зависимости оптической плотности реакционных смесей от концентрации гепарина в плазмах-калибраторах

# Фукоидан. Линейность (аналитический диапазон методики).



Зависимость оптической плотности от концентрации фукоидана в плазме крови

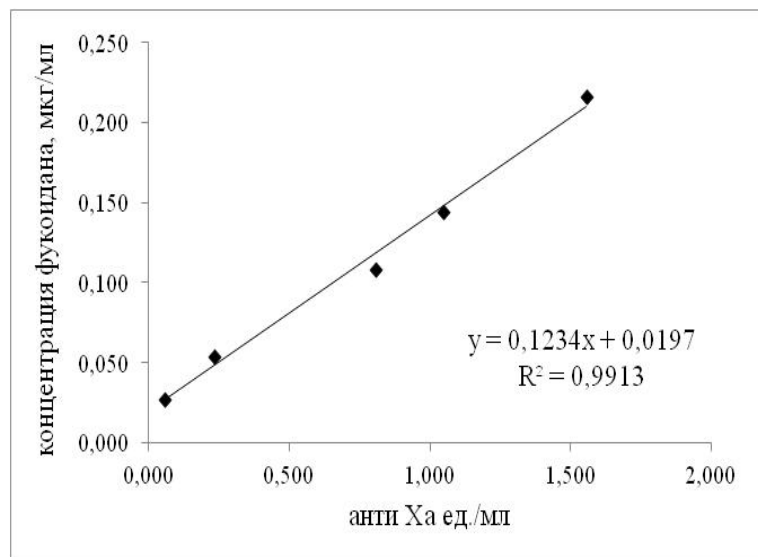


Пример зависимости оптической плотности от концентрации фукоидана в плазме в линейном диапазоне

# Фукоидан. Валидация методики

Методика была валидирована в соответствии с официальными рекомендациями.

Удовлетворительные результаты были получены для всех параметров валидации.



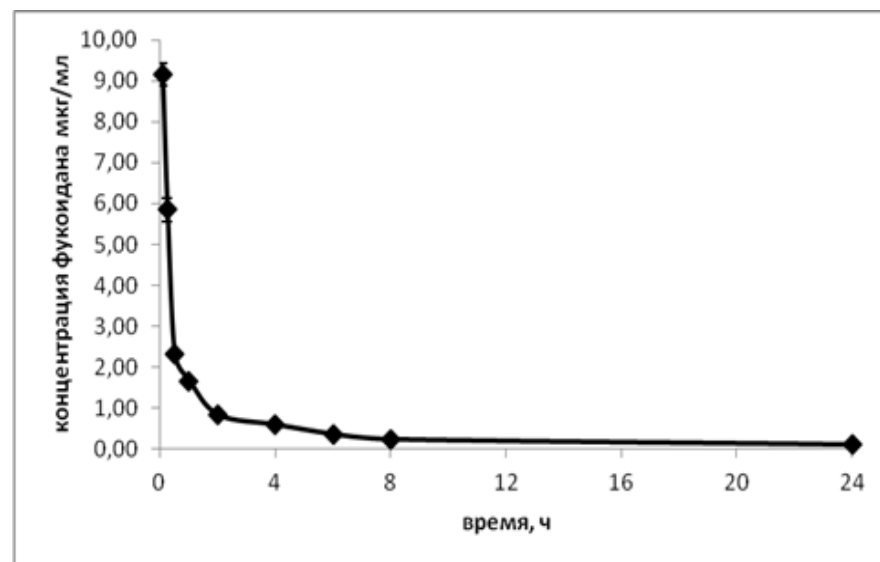
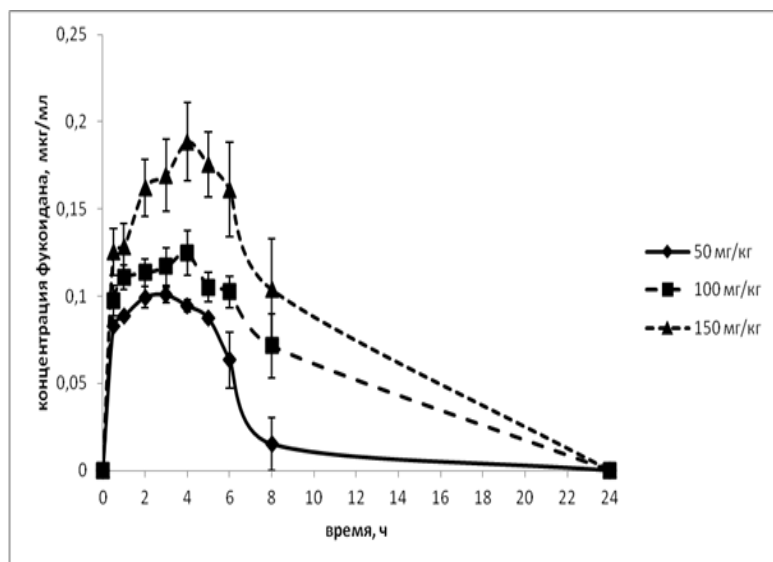
Зависимость анти-Ха активности от концентрации фукоидана в плазме (мкг/мл)

Параметр	Значение
Линейность, мкг/мл	0,027 – 0,217
Пример уравнения регрессии*	$Y=0,1234 \cdot X + 0,0197$
Коэффициент корреляции r	0,992
Точность, НПКО < 20%, другие уровни < 15% ВПКО (0,217 мкг/мл) Средний КК (0,108 мкг/мл) Низкий КК (0,054 мкг/мл) НПКО (0,027 мкг/мл)	0,64 – 3,1 1,12 – 4,2 5,5 – 12,0 3,0 – 7,1
Внутридневная/междневная прецизионность НПКО < 20%, другие уровни < 15% ВПКО (0,217 мкг/мл) Средний КК (0,108 мкг/мл) Низкий КК (0,054 мкг/мл) НПКО (0,027 мкг/мл)	0,8 – 2,5//2,3 4,0 – 4,5//4,6 6,5 – 8,1//8,6 0,7 – 6,2//11,6
Предел обнаружения, мкг/мл	0,01



# Фукоидан. Применение методики.

Валидированная методика была использована для определения концентрации фукоидана в плазме крови крыс после однократного внутрижелудочного (А) и внутривенного (Б)) введения.



Кривая «концентрация-время» фукоидана после однократного внутрижелудочного введения в различных дозировках ( $n=5$ ,  $X_{cp} \pm S_X$ )

Кривая «концентрация-время» фукоидана после однократного внутривенного введения субстанции фукоидана в дозе 100 мг/кг ( $n=5$ ,  $X_{cp} \pm S_X$ )



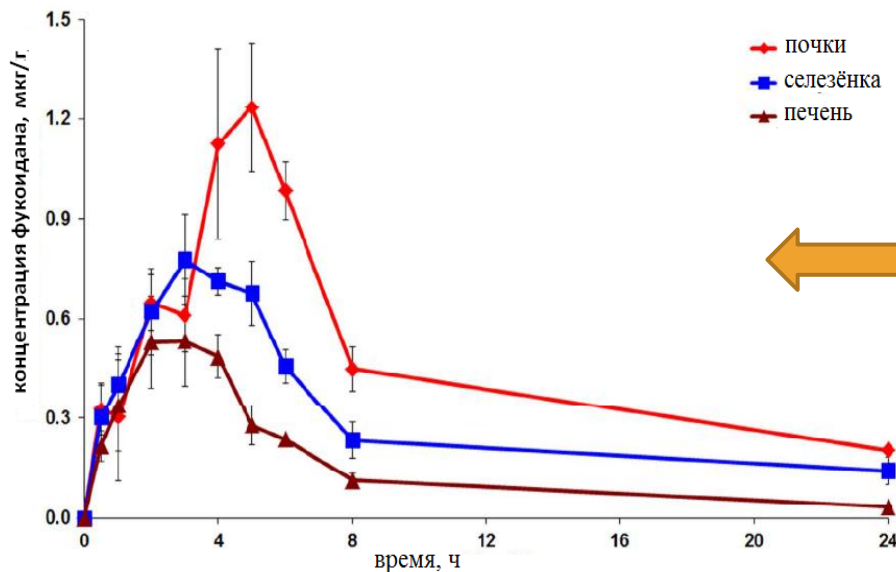
## Показатели фармакокинетики фукоидана при однократном внутрижелудочном и внутривенном введении

---

Доза, мг/кг	$C_{max}$ , мкг/мл	$T_{max}$ , ч	$AUC_{0-24}$ , ч·мкг/мл	$AUC_{0-\infty}$ , ч·мкг/мл	MRT, ч	$T_{1/2}$ , ч	$C_{max}/$ $AUC_{0-24}$
<b>Внутрижелудочное введение</b>							
50	0,11 ±0,01	2,40 ±0,55	0,55 ±0,12	1,85 ±0,54	17,16 ±6,45	11,55 ±4,57	0,20 ±0,03
100	0,14 ±0,02	3,20 ±0,84	0,80 ±0,16	1,75 ±0,44	11,91 ±3,95	7,60 ±2,91	0,17 ±0,02
150	0,20 ±0,04	3,40 ±0,89	1,18 ±0,33	2,08 ±0,62	8,78 ±2,05	5,18 ±1,48	0,18 ±0,02
<b>Внутривенное введение</b>							
100	9,15 ±0,60	10,83 ±0,32	12,17 ±0,79	8,08 ±1,92	9,47 ±2,34	8,25 ±0,55	65,90 ±11,67

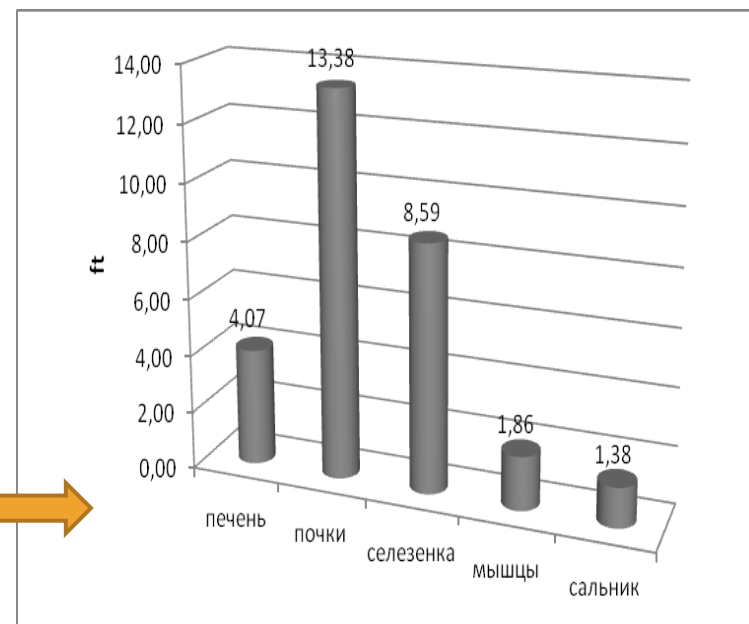
Таким образом, набор реагентов «Реахром-гепарин» (НПО «Ренам», Россия) может быть использован для количественного определения фукоидана в плазме крови крыс. Методика была валидирована и применена для фармакокинетического исследования

# Характеристика распределения фукоидана В ТКАНЯХ



Кривая «концентрация-время» фукоидана в почках, печени и селезёнке после однократного внутрижелудочного введения исследуемого препарата в дозе 100 мг/г

Тканевая доступность фукоидана после однократного внутрижелудочного введения исследуемого препарата в дозе 100 мг/кг



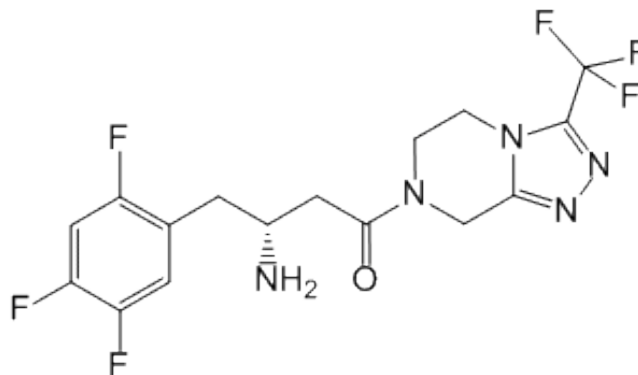


# Фармакокинетика ситаглиптина.

## Сравнение методов количественного определения.

---

Ситаглиптин (Sitagliptin) – первый представитель нового класса лекарственных средств для лечения сахарного диабета 2-го типа, ингибитор дипептидилпептидазы 4 типа.



Для оценки фармакокинетики использовали два способа:

- 1) метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектированием (ВЭЖХ-УФ)
- 2) количественное определение с помощью «суррогатного маркера» - ингибирование активности фермента дипептидилпептидазы 4 типа (ДПП-4)

# Фармакокинетика ситаглиптина.

## Сравнение методов количественного определения.

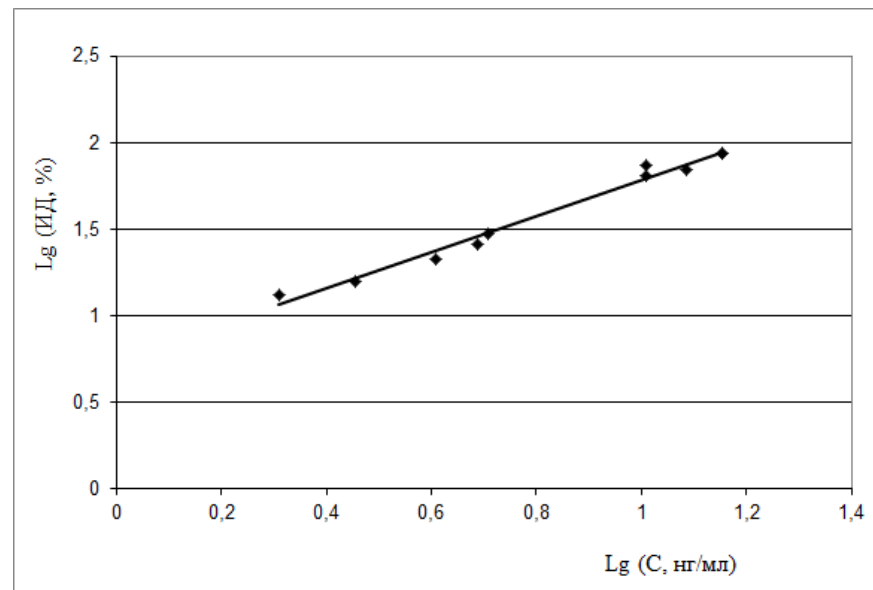
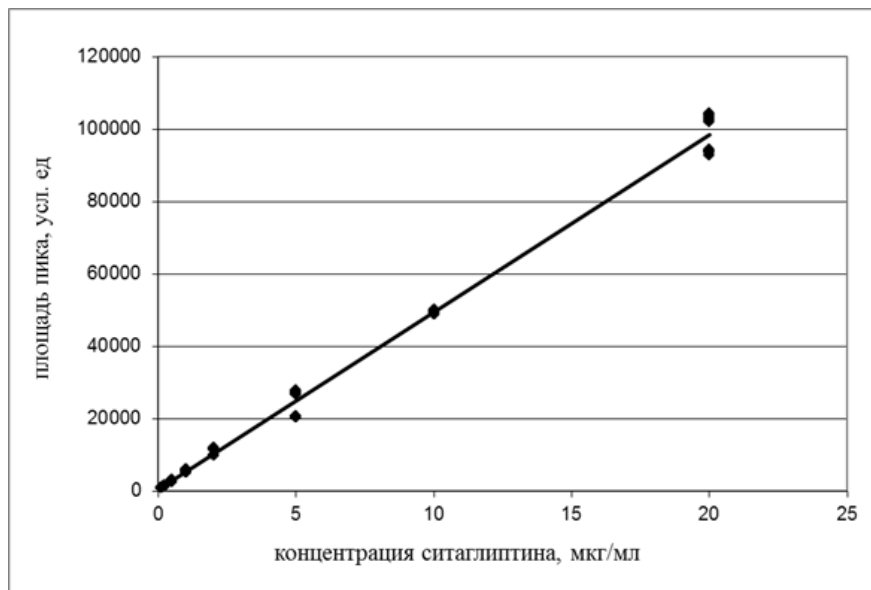


Рисунок 1 – График линейной зависимости площади хроматографического пика от концентрации ситаглиптина в плазме крови кроликов

Рисунок 2 – Зависимость ингибирующего действия (ИД) ситаглиптина на энзиматическую активность ДПП-4 от концентрации ситаглиптина (нг/мл) в плазме крови

Аналитический диапазон:

- 1) ВЭЖХ метод 0,1-20 мкг/мл,
- 2) энзиматический метод (с помощью ИД) - 2,04-14,26 нг/мл

# Фармакокинетика ситаглиптина.

## Сравнение методов количественного определения

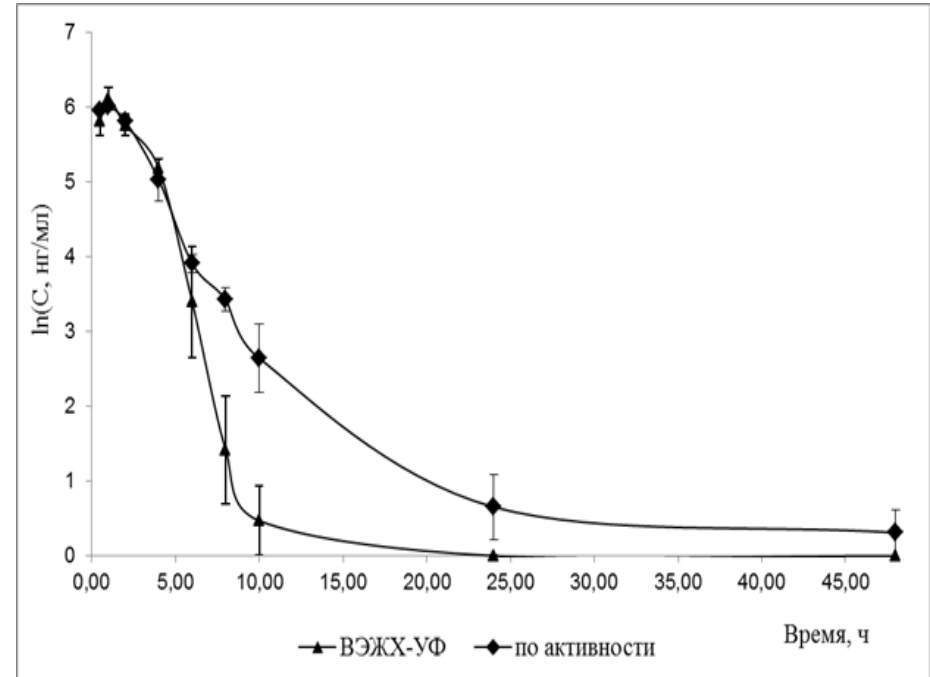
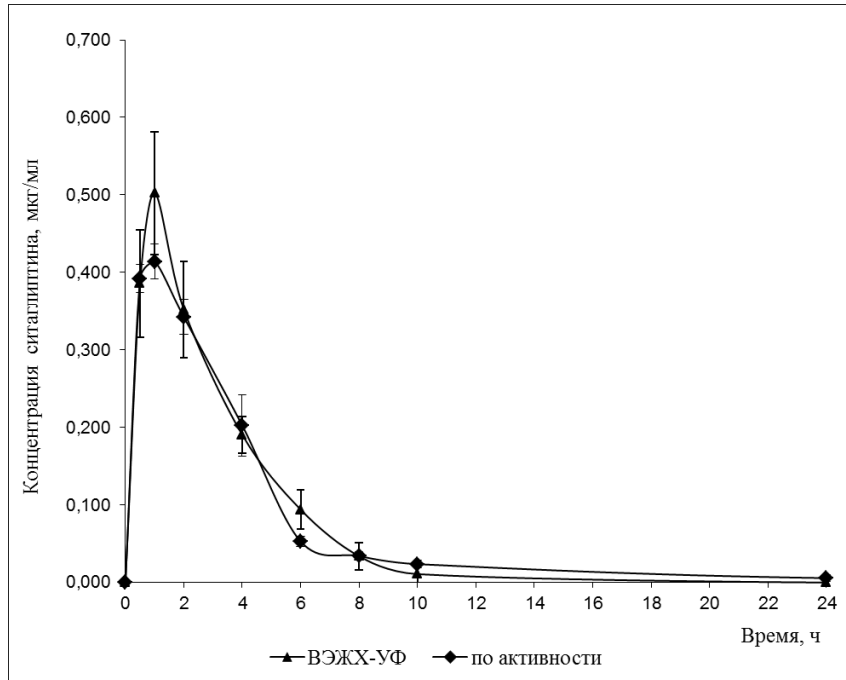


Рисунок – Кривые «концентрация-время» изменения содержания ситаглиптина в плазме крови после однократного перорального введения тестируемого препарата «Янувия®», таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 100 мг» (АО «Акрихин», Россия) в дозе 5 мг/кг по данным двух аналитических подходов в линейных координатах (n=10,  $X_{\text{ср.}} \pm SD$ )

# Фармакокинетика ситаглиптина.

## Сравнение методов количественного определения

Доза, мг/кг	$C_{max}$ , мкг/мл	$T_{max}$ , ч	$AUC_{0-24}$ , ч·мкг/мл	$AUC_{0-\infty}$ , ч·мкг/мл	MRT, ч	$T_{1/2}$ , ч	$C_{max}/$ $AUC_{0-24}$
Метод ВЭЖХ-УФ							
5	0,442± 0,173	1,000± 0,00	1,372± 0,538	1,896± 0,608	4,5321, ±1,169	3,040± 0,939	0,328± 0,059
Энзиматический метод (с помощью ИД)							
5	0,419± 0,039	0,778± 0,264	1,584± 0,472	1,707± 0,516	3,948± 1,828	3,728± 2,737	0,282± 0,069

Несмотря на выявленные различия, особенности и сложности реализации аналитического подхода с использованием биомаркера (суррогатного маркера концентрации аналита) применение такого рода подходов является адекватным.

При изучении многокомпонентных природных смесей, объектов сложного или неустановленного состава, эндогенных или быстро метаболизирующихся соединений, которые затруднительно или невозможно анализировать на основе традиционных хроматографических (ВЭЖХ-УФ/ФЛ/МС, ГХ-МС и др.) методов, применение такого подхода является обоснованным и единственно возможным способом получить информацию о фармакокинетических параметрах такого рода препаратов.

# Ингибиторы дипептидилпептидазы 4 типа (ДПП-4)

---

Потенциальные ингибиторы ДПП-4:

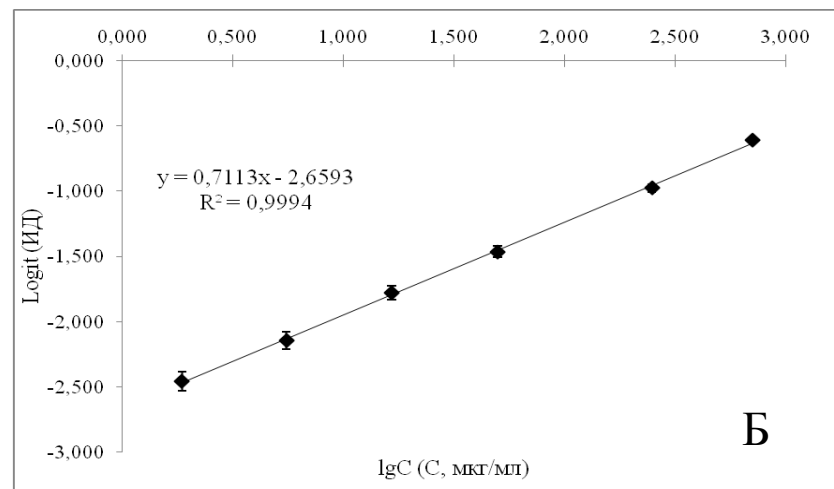
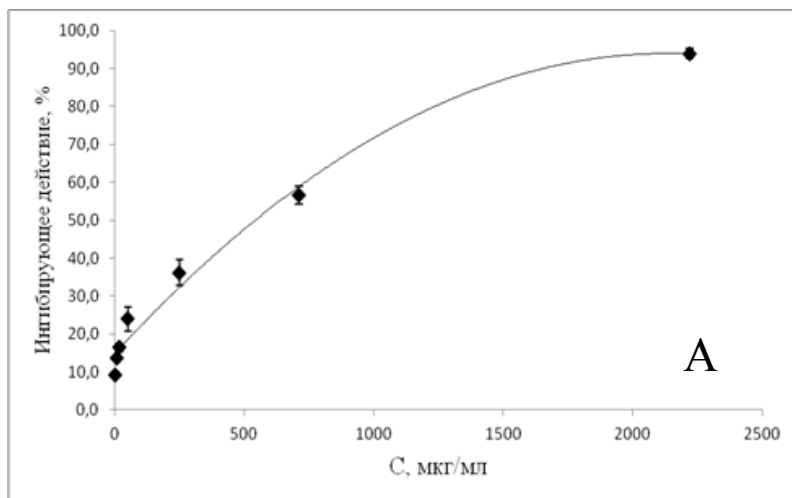
- Этанольный экстракт из икры зелёных морских ежей *Strongylocentrotus droebachiensis*;
- Трипептида миристат

Этапы работы:

- 1) Разработка и валидация методики для скрининга ингибиторов *in vitro* с использованием рекомбинантного фермента ДПП-4
- 2) Валидация методики определения активности ДПП-4 в биоматериале
- 3) Разработка и валидация методик количественного определения аналитов в биологических образцах (*ex vivo*)
- 4) Проведение фармакокинетического пилотного эксперимента *in vivo*
- 5) Изучение фармакокинетики субстанций



# Ингибитор ДПП-4: этанольный экстракт из икры зелёных морских ежей. Валидация методики.



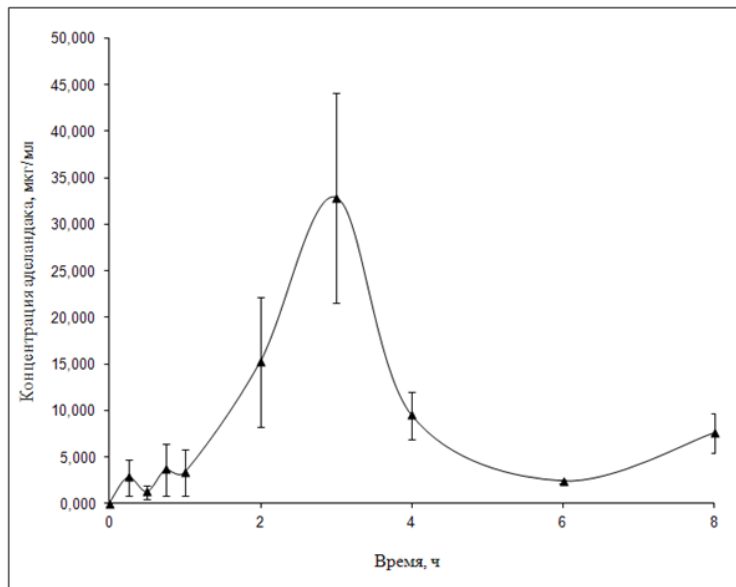
Зависимость ингибирующего действия (ИД) этанольного экстракта из икры на энзиматическую активность ДПП-4 от его концентрации (мкг/мл) в плазме крови крыс в разных координатах:  $C=f(\text{ИД})$  (А) и  $\text{logit}(\text{ИД})=f(\lg C)$  (Б)

Валидация методики определения в плазме крови кроликов в соответствии с нормативными документами:

- Специфичность (селективность) - дозозависимое снижение активности фермента ДПП-4 при внесении в модельную смесь аналита
- аналитический диапазон методики: 1,9 до 710 мкг/мл
- НПКО - 1,9 мкг/мл
- Точность для всех уровней концентраций – 3,6-6,8%
- Прецизионность для всех уровней концентраций 3,5-13,1%



# Ингибитор ДПП-4: этанольный экстракт из икры зелёных морских ежей. Фармакокинетика (пилотный эксперимент).

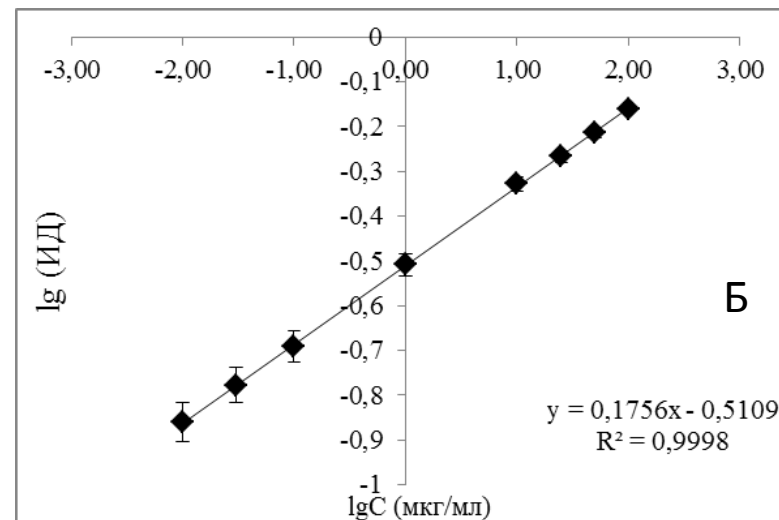
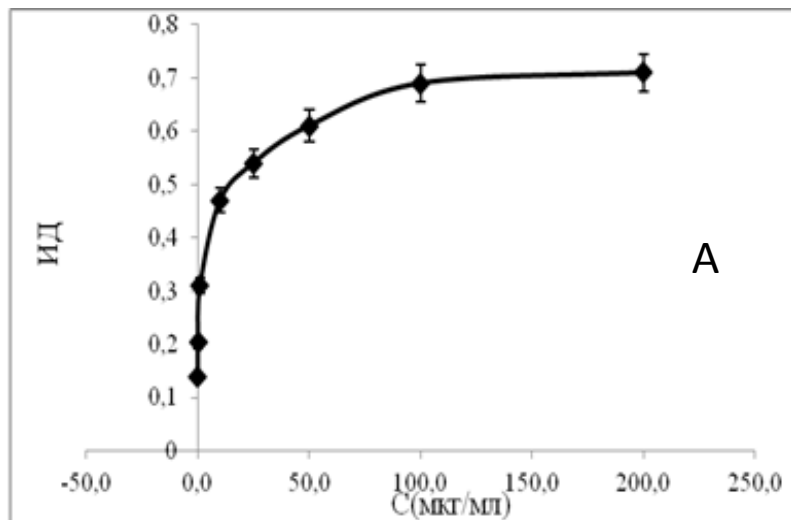


Кривая «концентрация-время» этанольного экстракта из икры зелёных морских ежей в плазме крови после однократного перорального введения препарата (капсулы) «Аделандак, в дозе 5 мг/кг (n=4, X<sub>ср.</sub>±S<sub>x</sub>)»

Показатели фармакокинетики этанольного экстракта из икры зелёных морских ежей в плазме крови после однократного перорального введения препарата (X<sub>ср.</sub>±SD).

Доза, мг/кг	C <sub>max</sub> , мкг/мл	T <sub>max</sub> , ч	AUC <sub>0-24</sub> , ч·мкг/мл	AUC <sub>0-∞</sub> , ч·мкг/мл	MRT, ч	T <sub>1/2</sub> , ч	C <sub>max</sub> /AUC <sub>0-24</sub>
5	36,4 ±16,5	3,25 ±0,50	80,3 ±36,7	113,7 ±50,0	5,96 ±2,69	2,51 ±1,39	0,45 ±0,06

# Ингибитор ДПП-4: трипептида миристат

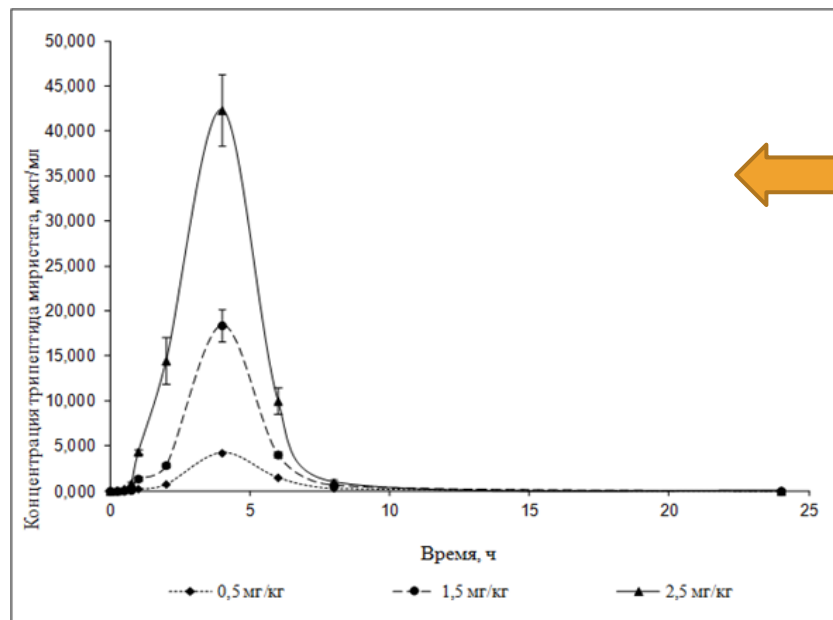


Зависимость величины ингибирующего действия трипептида миристата от его концентрации (мкг/мл) в **плазме крови** крыс в разных координатах:  
 $C=f(\text{ИД})$  (А) и  $\text{logit}(\text{ИД})=f(\lg C)$  (Б)

Валидация методики определения в плазме крови крыс в соответствие с нормативными документами:

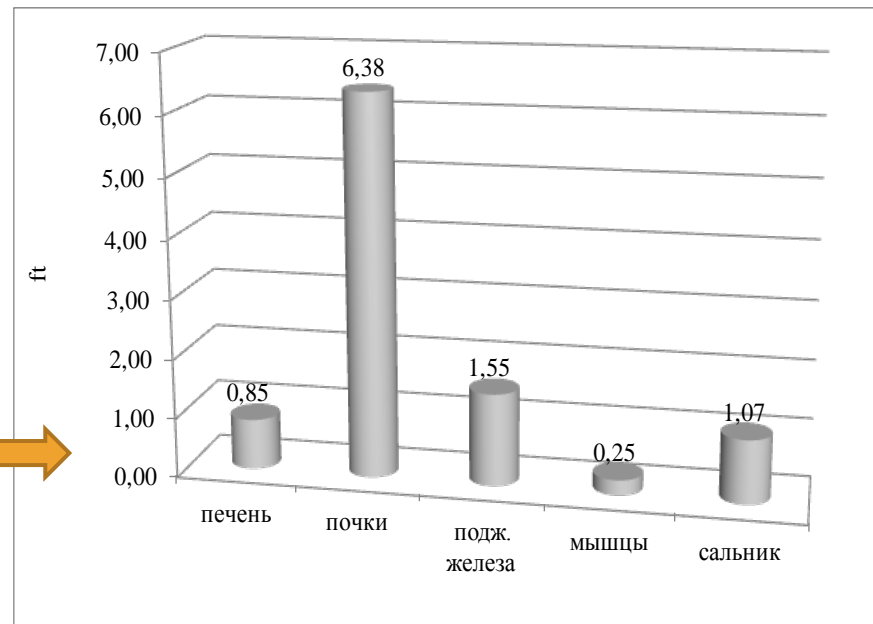
- Специфичность (селективность) - дозозависимое ингибирование активности фермента ДПП-4 при внесении в модельную смесь аналита
- аналитический диапазон методики: 0,01 до 100 мкг/мл; НПКО - 0,01 мкг/мл
- Точность для всех уровней концентраций – 0,3-2,6%
- Прецизионность для всех уровней концентраций 5,4-11,8%

# Трипептида миристат. Фармакокинетика



Кривая «концентрация-время» трипептида миристата после однократного внутрижелудочного введения исследуемого препарата крысам в различных дозах ( $n=5$ ,  $X_{cp} \pm S_x$ )

Тканевая доступность трипептида миристата после однократного внутрижелудочного введения исследуемого препарата в дозе 0,006 мг/кг ( $n=5$ ,  $X_{cp} \pm S_x$ )



# Определение концентрации трипептида миристата в экскретах

---

Проблема: ДПП-4 отсутствует в моче и кале



Решение: разработана и валидирована методика с внесением рекомбинантного фермента в реакцию с биоматериалом.

Для приготовления модельных смесей аналита был использован пул мочи интактных животных (крыс).



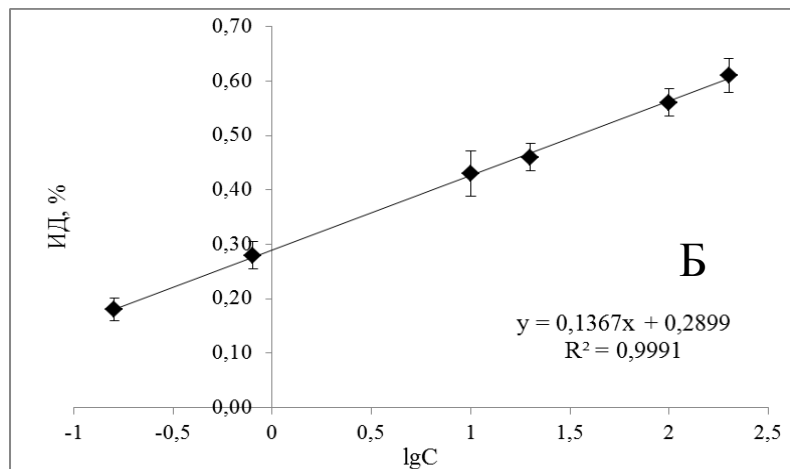
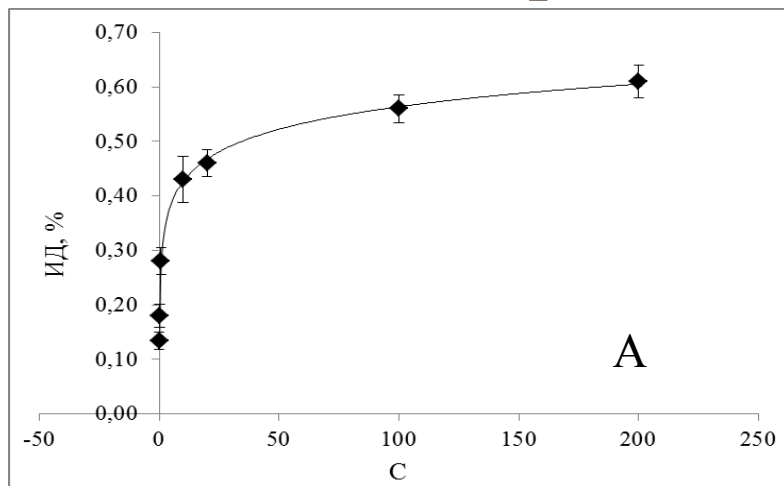
Проведение энзиматической реакции:

модельные растворы с аналитом + реакционный буферный раствор (0,1М Трис-НСl, рН=8.0)  
+ рабочий раствор фермента ДПП-4 (рекомбинатный)  
+ 1 мМ раствора субстрата



Калибровочная зависимость, валидация методики

# Определение концентрации трипептида миристора в экскретах. Валидация методики.



Зависимость величины ингибирующего действия (ИД, %) трипептида миристора от его концентрации (мкг/г) в моче

Параметр	Результат
Специфичность - дозозависимое ингибирование активности фермента ДПП-4 при внесении в модельную смесь аналита	
Линейность, $r > 0,99$	0.08-200 мкг/мл, $r > 0,999$
НПКО	0.08 мкг/мл
Точность, НПКО < 20%, другие уровни < 15% ВПКО (200 мкг/мл) Средний КК (100 мкг/мл) Низкий КК (0.016 мкг/мл) НПКО (0.08 мкг/мл)	9.8 5.4 1.8 9.5
Внутридневная/междневная прецизионность НПКО < 20%, другие уровни < 15% ВПКО (200 мкг/мл) Средний КК (100 мкг/мл) Низкий КК (0.016 мкг/мл) НПКО (0.08 мкг/мл)	5.1/5.3 4.5/4.6 11.4/13.1 10.7/12.4

# Гликозилированный полипептид (ГПП). Субстанция.

---

- Биоактивный ГПП был выделен из внутренних органов зелёных морских ежей *Strongylocentrotus droebachiensis* и является перспективным для доклинических исследований по созданию нового препарата с противовоспалительной и иммуномодулирующей активностью для лечения побочных эффектов гриппа.
- Фармацевтическая субстанция гликополипептид представляет собой соединение с молекулярной массой  $\approx 3,5$  кДа;
- Содержит около 35% аминокислот и 10% сахаров. Глутаминовая и аспарагиновая кислоты были основными компонентами аминокислот, глюкоза - среди сахаров.

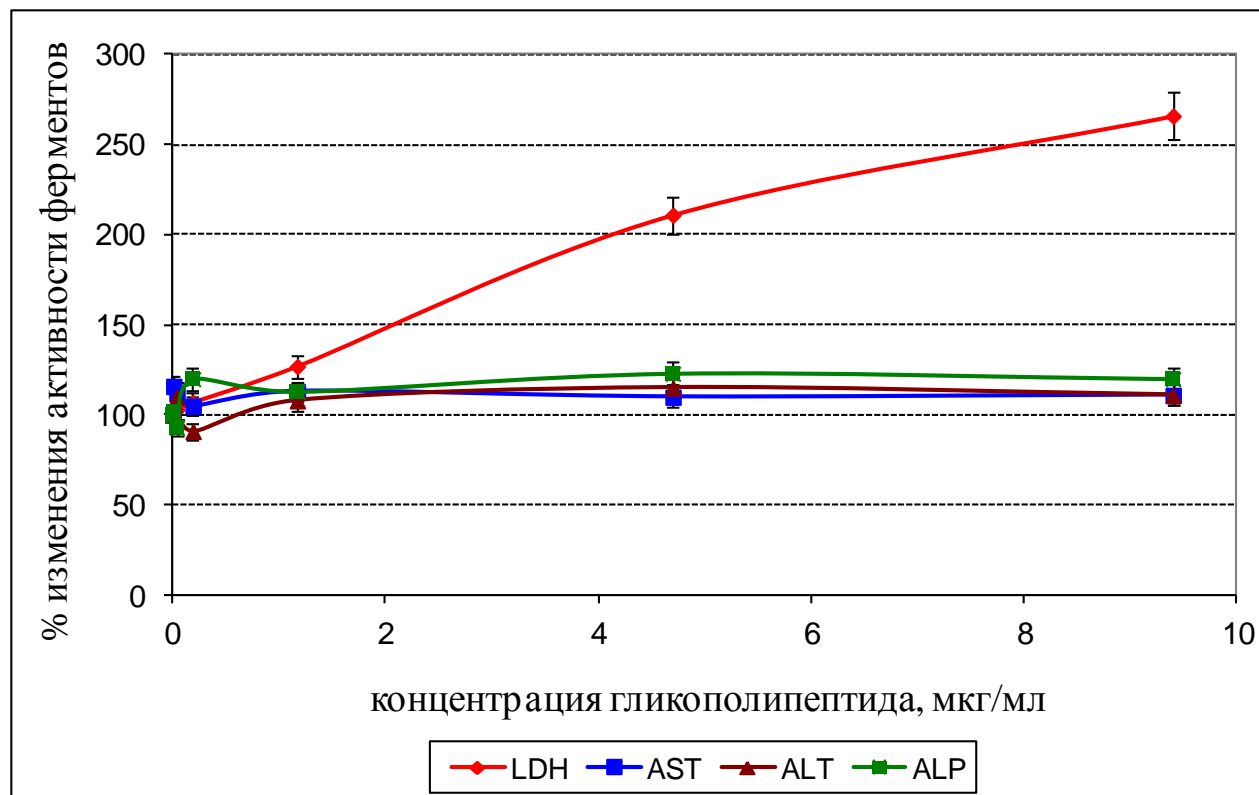
# Основная проблема: неизвестна точная структура – нет биоаналитической методики?

---

- Из-за отсутствия точной химической структуры ГПП не возможно использовать классические методы и подходы к фармакокинетическому исследованию.
- Была изучена корреляция между концентрацией ГПП и активностью нескольких ферментов в модельных образцах.
- Для скрининга были выбраны лактатдегидрогеназа (ЛДГ, LDH), аспаратаминотрансфераза (АСТ, AST), аланинаминотрансфераза (АЛТ, ALT), щелочная фосфатаза (ЩФ, ALP).
- Модельные образцы крови (плазмы), печени и почек гомогенатов с добавками различных уровней гликопептида были подготовлены и проанализированы с помощью биохимического анализатора А-25 (Biosystems, Испания).
- Базовые уровни каждого фермента в холостом образце приняты за 100%, рассчитаны изменения активности фермента (в% к базовому уровню).

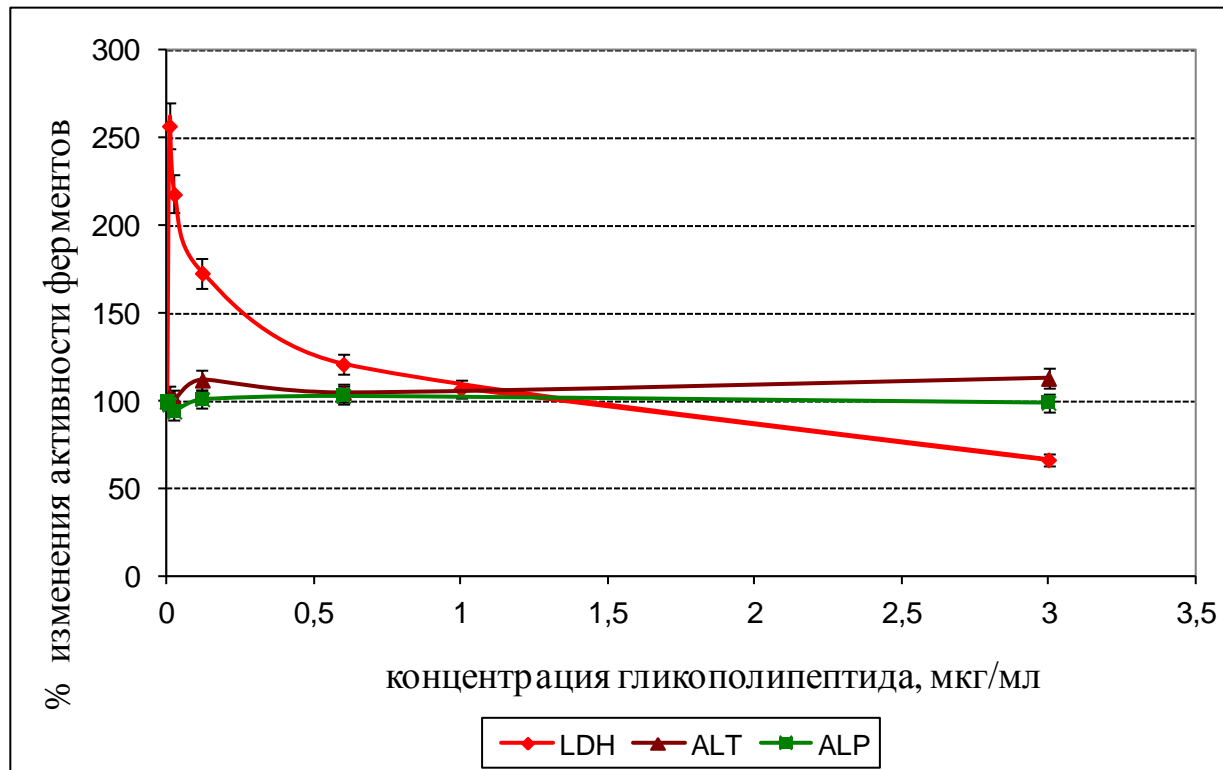


# Влияние гликополипептида на активность ферментов в модельных смесях с кровью крыс *ex vivo*



Корреляция между % изменения энзиматической активности ферментов в плазме и концентрации гликополипептида в модельных смесях с кровью крыс

# Влияние гликополипептида на активность ферментов в гомогенатах печени



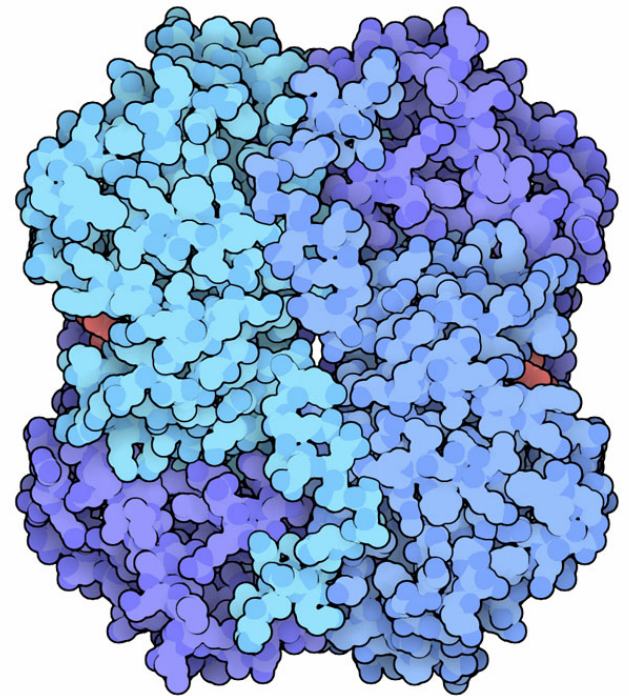
Корреляция между % изменения активности ферментов и концентрацией гликополипептида в модельных смесях с гомогенатами печени



# Решение проблемы для оценки фармакокинетики

---

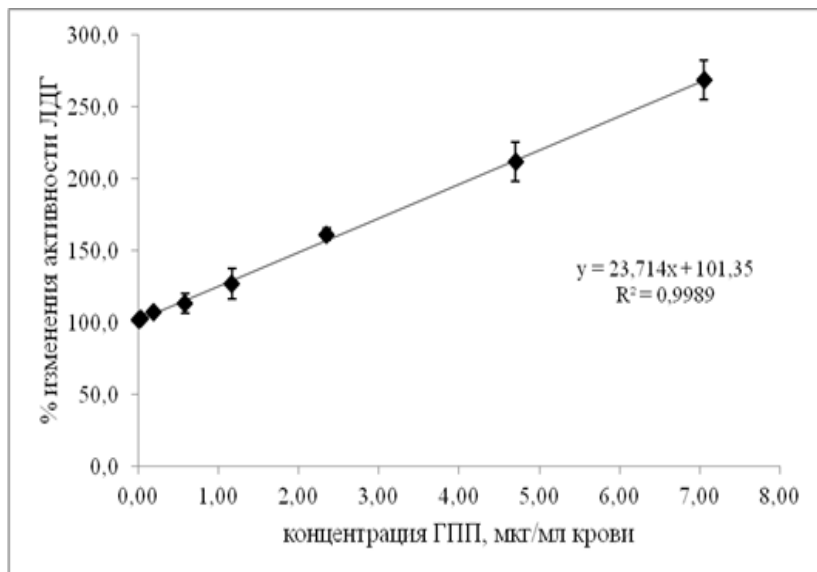
На основании корреляции между концентрацией гликопептида и активностью ЛДГ был предложен, валидирован и апробирован для фармакокинетического исследования назального спрея, содержащего в качестве активной субстанции гликополипептид, после однократного применения у крыс, включая линейность дозы, абсолютную биодоступность, распределение в тканях и органах, экскрецию.



# Гликополипептид в плазме крови крыс.

## Валидация методики

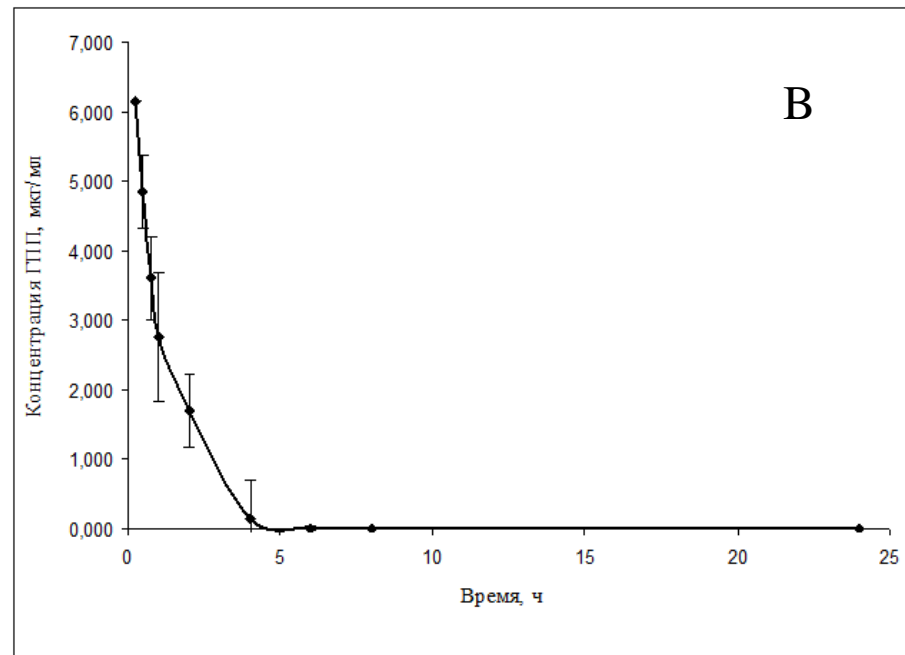
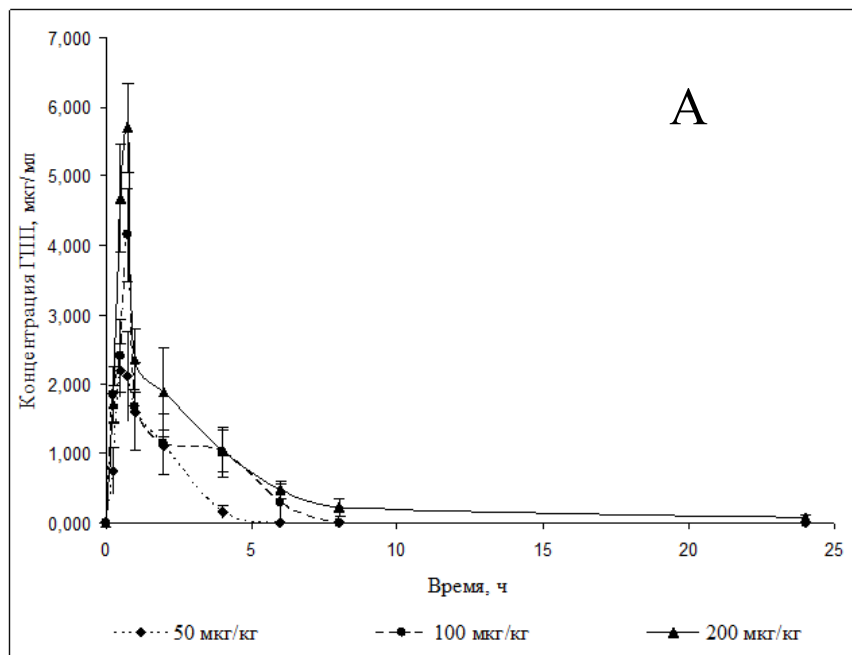
Методика определения концентрации ГПП в плазме крови крыс была валидирована в соответствии с официальными рекомендациями. Для всех параметров были получены удовлетворительные результаты.



Зависимость % изменения активности ЛДГ от концентрации ГПП в плазме крови крыс.

Параметр	Результат
Специфичность - Дозозависимое изменение активности ЛДГ после внесения ГПП	
Аналитический диапазон (линейность), $r > 0,99$	0.01-7.05 мкг/мл, $r > 0,999$
НПКО	0.01 мкг/мл
Точность, НПКО < 20%, другие уровни < 15% ВПКО (7.05 мкг/мл) Средний КК (2.35 мкг/мл) Низкий КК (0.024 мкг/мл) НПКО (0.01 мкг/мл)	1.7-1.8 3.1-11.1 0.3-13.6 3.3-13.4
Внутридневная/междневная прецизионность НПКО < 20%, другие уровни < 15% ВПКО (7.05 мкг/мл) Средний КК (2.35 мкг/мл) Низкий КК (0.024 мкг/мл) НПКО (0.01 мкг/мл)	5.0/3.7 6.6/2.6 2.8/1.6 0.7/1.6

# Гликополипептид. Фармакокинетика.



Кривая «концентрация-время» ГПП после однократного интраназального введения (А) тестируемого препарата в различных дозах и внутривенного введения (Б) субстанции гликополипептида в дозе 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ( $n=5$ ,  $X_{\text{cp}} \pm S_X$ )

Было установлено, что фармакокинетика ГПП после однократного интраназального применения является линейной в диапазоне доз 50-200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

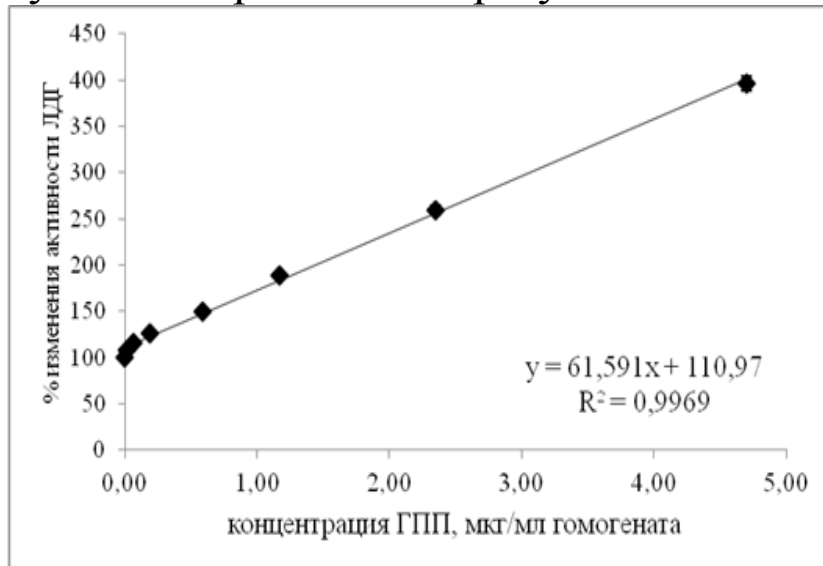
# Основные показатели фармакокинетики гликополипептида при однократном интраназальном введении

Доза, мкг/кг	C <sub>max</sub> , µg/ml	T <sub>max</sub> , h	AUC <sub>0-24</sub> , h· µg/ml	MRT, h	T <sub>1/2</sub> , h
50	2.90±0.35	0.67±0.08	3.93±0.73	1.54±0.14	0.77±0.14
100	4.15±0.66	0.75±0.00	7.14±2.25	5.58±2.04	3.53±1.34
200	6.22±0.62	0.70±0.04	12.64±2.44	4.62±1.88	4.03±1.59

- Время достижения максимальной концентрации для крыс составило 0,67-0,75 ч и не имеет статистически значимых различий, среднее время удержания (MRT) и период полувыведения (T<sub>1/2</sub>) для крыс составили 1,54-4,62 ч и 0,77-4,03 ч.
- Абсолютная биодоступность гликозилированного полипептида из исследуемого препарата для составила более 80%.

# Гликополипептид. Валидационные параметры определения гомогенатах тканей

Методика определения концентрации ГПП в гомогенатах слизистой оболочки носа крыс в соответствии с официальными рекомендациями. Для всех параметров были получены удовлетворительные результаты

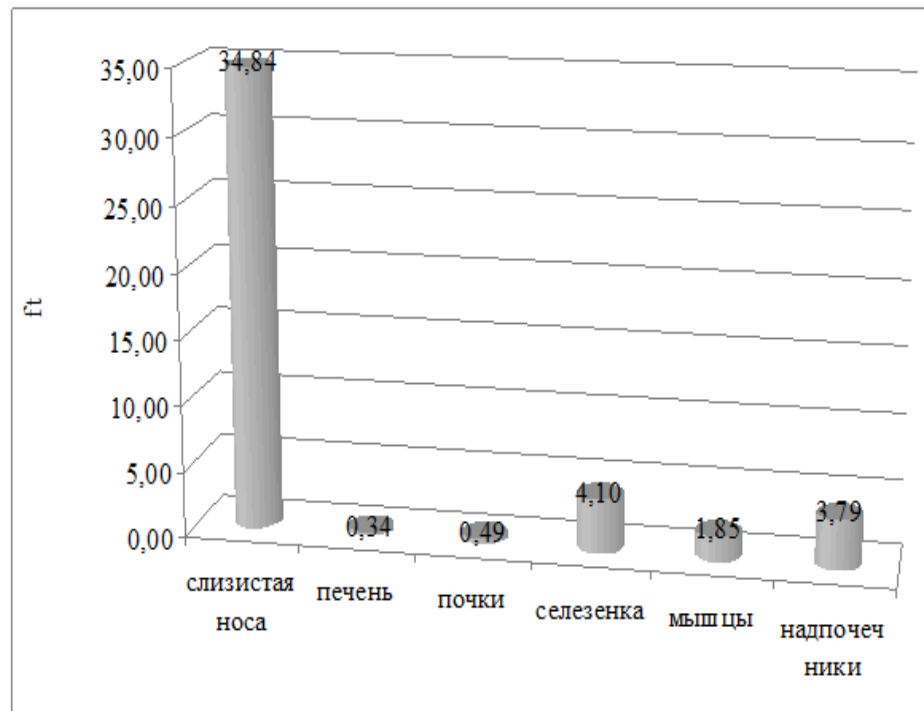


Зависимость % изменения активности ЛДГ от концентрации ГПП в гомогенате слизистой оболочки носа, мкг/мл

Параметр	Результат
Специфичность - Дозозависимое изменение активности ЛДГ после внесения ГПП	
Линейность, $r > 0,99$	0.06-4.7 мкг/мл, $r > 0,999$
НПКО	0.06 мкг/мл
Точность, НПКО < 20%, другие уровни < 15% ВПКО (4.7 мкг/мл) Средний КК (2.35 мкг/мл) Низкий КК (0.019 мкг/мл) НПКО (0.06 мкг/мл)	1.3-3.1 1.0-3.2 4.6-12.3 3.5-8.5
Внутридневная/междневная прецизионность НПКО < 20%, другие уровни < 15% ВПКО (4.7 мкг/мл) Средний КК (2.35 мкг/мл) Низкий КК (0.019 мкг/мл) НПКО (0.06 мкг/мл)	1.7/5.1 0.7/4.2 2.4/10.3 2.4/7.5

# Гликополипептид. Распределение в тканях.

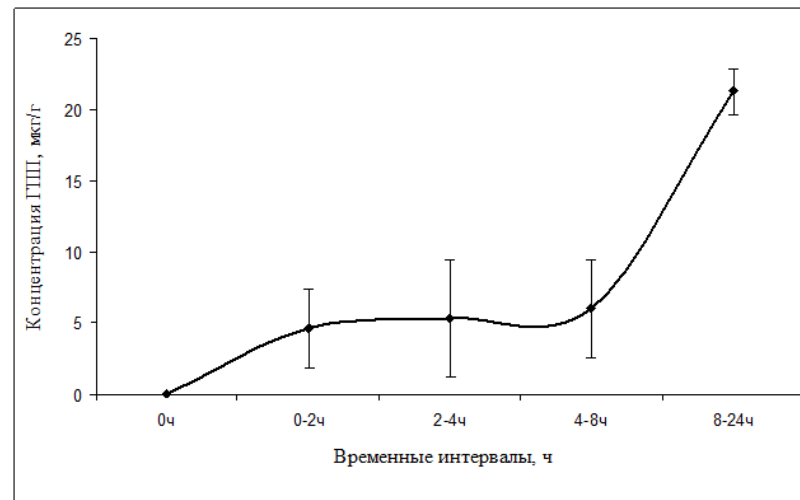
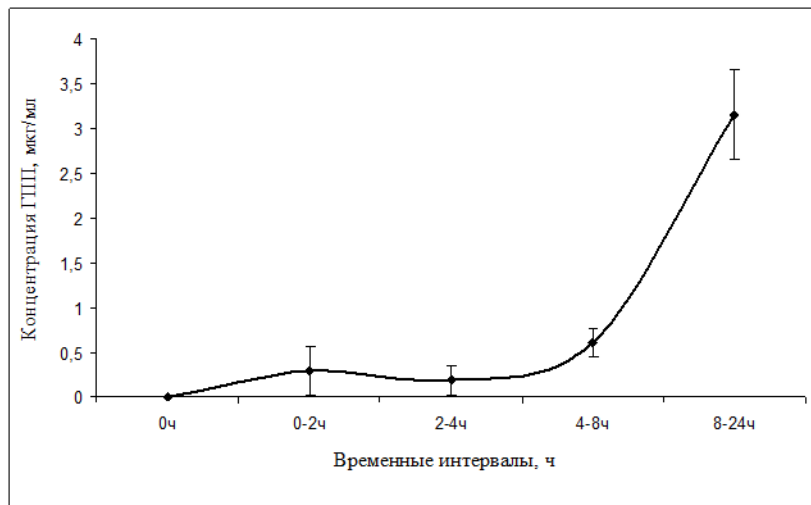
Наибольшая концентрация ГПП наблюдалась в тканях слизистой оболочки носа, являющихся зоной введения и терапевтического действия препарата, а также в селезенке и надпочечниках. Для органов, обеспечивающих метаболизм и выведение (печень, почки), тканевая доступность препарата наименьшая.



Тканевая доступность гликозилированного полипептида после однократного интраназального введения исследуемого препарата в дозе 100 мг/кг



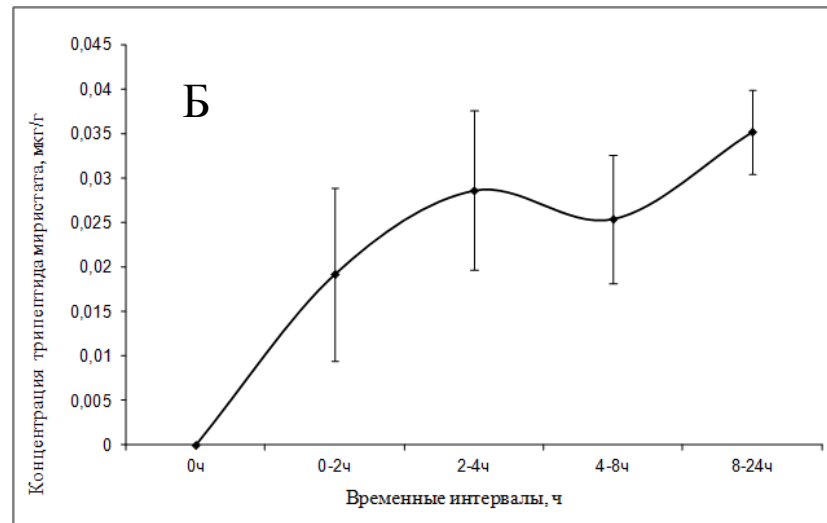
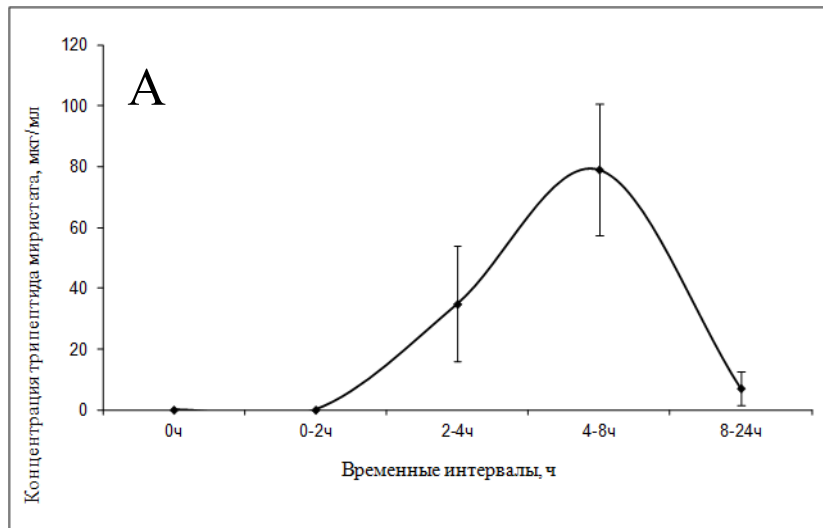
# Гликополипептид. Фармакокинетика



Кривые экскреции гликопептида с мочой (слева) и калом (справа) после однократного интраназального введения назального спрея гликопептид в дозе 100 мкг / мл.

С мочой выводится около 28 %, с калом – около 53% действующего вещества

# Трипептида миристат. Фармакокинетика.



Кривые экскреции трипептида миристата с мочой (А) и калом (Б) после однократного

После введения препарата на основе трипептида миристата с мочой выводится около 33 % трипептида миристата, с калом – менее 0,1% действующего вещества

# Выводы

---

- ▶ Биоаналитические методы анализа препаратов неустановленной структуры, основанные на изменении активности ферментов или других фармакодинамических маркерах, были разработаны, валидированы и применены для фармакокинетических исследований.
- ▶ Этот подход может быть эффективен для соединений, которые трудно или невозможно обнаружить методами хроматографии (ВЭЖХ-УФ / ФЛ / МС, ГХ-МС) и иммуноанализа, обычно используемыми для анализа биологических образцов в исследованиях фармакокинетики и биоэквивалентности.

# Стандартизация биологических препаратов

---

Биологическая стандартизация проводится с целью определения качества и эффективного количества лекарственного препарата

Биологической стандартизацией называют определение качества лекарственных препаратов с помощью биологических методов. В задачу биологической стандартизации входит определение количества действующего вещества в препарате путем установления его активности и испытание на отсутствие в нем недопустимых или нежелательных примесей.

Биологическая стандартизация проводится

- при невозможности найти и выделить в чистом виде действующее начало препарата;
- при использовании препаратов, которые получают из растительного или животного сырья.

В этих случаях прямое количественное измерение лекарственного препарата нерационально, так как в нем содержатся сложные активные вещества, биологическая эффективность определенного количества сырья в разных партиях будет различаться.

# Выбор параметров для биологической стандартизации лекарственных препаратов

---

- ✓ Анализ литературных данных
  - ✓ Выбор методик *in vitro/ex vivo* для скрининга должен формироваться с учетом многих факторов:
    - Изучение 1, 2 или более возможных механизмов действия, биологических мишеней; мишени выбираются в соответствии с его лечебной ценностью
    - Чувствительность и селективность используемых методик *in vitro*
    - Возможность использования тестов для стандартизации лекарственного средства
    - При дальнейших испытаниях *in vivo* желательно выбрать фармакологические модели, соответствующие изученным биологическим мишеням *in vitro*
- 



# Стандартизация биологических препаратов

---

Представленный пример:

Субстанция животного происхождения – экстракт голов лососёвых рыб (ЭГЛ), обладающий противовоспалительными свойствами.

Для стандартизации субстанции использована методика оценки ингибирующего действия по отношению к ферменту циклооксигеназа 2 (ЦОГ-2) с помощью коммерчески доступного набора «COX (human) inhibitor screening assay kit» (Cayman Chemical, США).

Анализ проводится в два этапа:

- 1) Проведение энзиматической реакции, в ходе которой происходит получение простагландинов H<sub>2</sub> с последующей редукцией H<sub>2</sub> в более стабильный метаболит простагландин F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>);
- 2) Оценка количества PGF<sub>2α</sub> методом ИФА

В присутствии ингибиторов количество PGF<sub>2α</sub> снижается

# Этапы валидации

1. Проверка пригодности тест-системы (точность, сходимость, прочность)

2. Валидация методики для стандартного образца (положительного контроля, препарата сравнения)

3. Валидация методики для исследуемого объекта

3.1

Валидация  
энзиматической  
реакции

3.2

Валидация  
этапа ИФА

▶ Разделение на этапы условное, могут выполняться, параллельно

# Стандартизация биологических препаратов

Данные по ингибированию ЦОГ-2 (% ингибирования) под влиянием ЭГЛ,

Варируемый параметр	% ингибирования ЦОГ-2
Концентрация ЭГЛ, мкг/мл	
1	31,2±0,4
10	44,5±1,7
20	69,0±7,0
Время инкубации, мин	
10	33,9±3,1
15	47,8±5,3
Серия	
1	38,4±2,3
2	44,7±1,2
3	48,3±1,3

Выбраны:

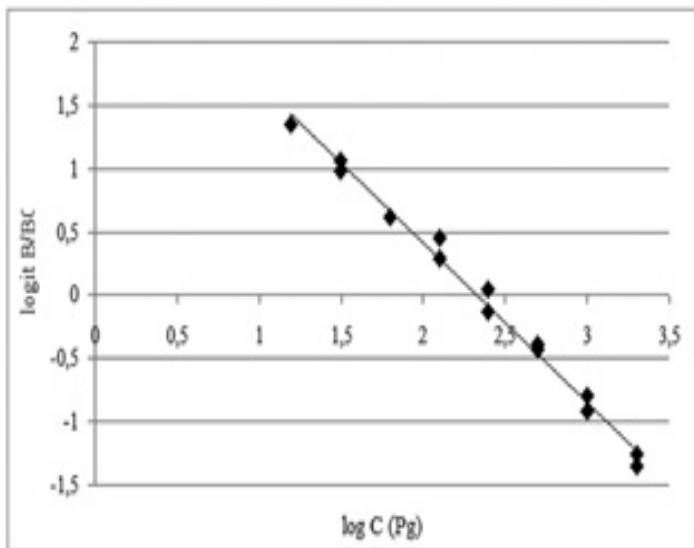
- 1) концентрация испытуемого раствора ЭГЛ - 10 мкг/мл, обеспечивающая «средний» (оптимальный) уровень ингибирования,
- 2) время инкубации фермента с образцом (15 мин).

Для оценки качества субстанции может предложен критерий нормирования не менее 30%.



# Валидация методики

Параметры: специфичность (Specificity), линейность (Linearity), точность (или правильность, Accuracy), прецизионность (precision) и прочность (Robustness).



Пример калибровочной зависимости аналитического сигнала от концентрации простагландинов в координатах logit-log

Статистические параметры для координат logit-log при определении концентрации простагландинов

Параметр	Получено	Требования *
Уравнение регрессии	$Y = -1,2587 * X + 2,9318$	-
Значение остаточного стандартного отклонения ( $S_0$ ), %	1,29	1,58
Значение коэффициента корреляции $r$	0,9952	Не менее 0,9933
Значение свободного члена в уравнении регрессии ( $a$ ), %	2,93	Не более 4,8

Примечание: \* - приведены данные для теста «Количественное определение при допустимом отклонении  $\pm 3\%$  для субстанции.

# Валидация методики

Параметр	Значение
Аналитический диапазон, нг/мл	31 – 800 (1000) нг/мл
Точность, НПКО < 20%, другие уровни < 15% ВПКО (800 нг/мл) Средний КК (500 нг/мл) Низкий КК (100 нг/мл) НПКО (31 нг/мл)	0,4 – 6,3 0,2 – 0,8 0,1 – 5,5 3,5 – 6,7
Внутридневная/междневная прецизионность НПКО < 20%, другие уровни < 15% ВПКО (800 нг/мл) Средний КК (500 нг/мл) Низкий КК (100 нг/мл) НПКО (31 нг/мл)	4,3 – 6,3//7,4 3,2 – 4,3//4,6 2,6 – 4,3//5,7 1,6 – 2,1//9,2
Прочность (варьирование реактива Элмана 90- 110%) (RSD < 5%)	RSD = 1,8%

Заключение:  
Методика оценки % ингибирования активности фермента ЦОГ-2 субстанцией ЭГЛ валидирована в соответствии с современными требованиями; получены удовлетворительные результаты по всем валидационным параметрам.

Требования Руководства по валидации методик анализа лекарственных препаратов необходимо адаптировать к валидации количественных методов оценки биологического действия

# Литература

---

- ▶ Карлина М.В., Фаустова Н.М., Пожарицкая О.Н., Косман В.М., Макаров В.Г., Шиков А.Н. Определение дарбэпоэтина альфа в плазме крови кроликов методом ИФА.// Разработка и регистрация лекарственных средств.2016. №4 (17). С. 204 – 210
- ▶ Косман В.М., Фаустова Н.М., Пожарицкая О.Н., Шиков А.Н., Макаров В.Г. Разработка, валидация и применение методики иммуноферментного анализа для стандартизации биопрепарата//Разработка и регистрация лекарственных средств. 2015. №2 (11). С. 176 – 182
- ▶ Pozharitskaya O.N., Shikov A.N., Faustova N.M., Obluchinskaya E.D. et al. Pharmacokinetic and Tissue Distribution of Fucoidan from Fucus vesiculosus after Oral Administration to Rats //Mar. Drugs. 2018. Vol.16. №4. 132. (doi: 10.3390/md16040132).
- ▶ Shikov A.N., Pozharitskaya O.N., Faustova N.M, Kosman V.M. , Makarov V.G., Razzazi+Fazeli E., Novak J. Pharmacokinetic Study of Bioactive Glycopeptide from Strongylocentrotus droebachiensis After Intranasal Administration to Rats Using Biomarker Approach// Mar. Drugs **2019**. Vol. 17. №10. 577 (<https://doi.org/10.3390/md17100577> )



*СПАСИБО ЗА  
ВНИМАНИЕ!*

