

А.Г. Резников
А.И. Соловьев
О.П. Баула
Л.В. Тарасенко
В.М. Маргитич

*Институт эндокринологии
и обмена веществ
им. В.П. Комиссаренко
АМН Украины*

*Институт фармакологии
и токсикологии АМН Украины*

*Межведомственная
лаборатория доклинического
исследования лекарственных
средств ГФЦ МЗ Украины*

*ГП «Государственный
фармакологический центр»
МЗ Украины*

ОАО «Фармак», Киев, Украина

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЭКВИВАЛЕНТНОСТИ IN VITRO ИНГИБИТОРА АРОМАТАЗЫ ЛЕТРОМАРА. I. ИЗУЧЕНИЕ ПРОНИЦАЕМОСТИ ПРЕПАРАТА НА КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК Caco-2

Резюме. Результаты исследований *in vitro* (в культуре клеток колоректальной аденокарциномы человека Caco-2) показали, что активное вещество генерического препарата Летромара («Фармак», Украина) — летрозол — относится к I классу Биофармацевтической классификационной системы (вещества с высокой растворимостью и высокой проницаемостью). Поэтому биоэквивалентность препарата может быть доказана в опытах *in vitro* без изучения биодоступности на здоровых волонтерах.

Ключевые слова: ингибиторы ароматазы, Летромара, биоэквивалентность, исследование *in vitro*.

На протяжении многих лет в лечении по поводу рака молочной железы (РМЖ) успешно используют тамоксифен, а также прогестины — мегестрола ацетат и медроксипрогестерона ацетат. В последнее время широко применяют ингибиторы ароматазы (ИА) — лекарственные средства (ЛС), подавляющие синтез эстрогенов в периферических тканях. В качестве первого препарата класса ИА был предложен аминоглутетимид, который рекомендован для лечения пациентов с РМЖ. В настоящее время все более активно используют ИА третьего поколения — анастрозол, экземестан и летрозол. В январе 2007 г. в Кокрановской базе данных систематизированных обзоров клинических исследований, проведенных согласно принципам доказательной медицины, размещены результаты метаанализа 25 исследований клинической эффективности и безопасности ИА при метастатическом РМЖ у женщин в постменопаузальный период [1]. Установлено, что ИА обладают более высокой клинической эффективностью в сравнении с другими препаратами гормональной терапии. При этом авторы высказывают предположение, что применение летрозола имеет определенные преимущества в сравнении с анастрозолом [1].

Необходимо отметить, что научные исследования и разработка оригинальных ЛС требует значительных финансовых затрат. На разработку оригинального ЛС уходит до 2 млрд дол. США. Это в определенной степени связано с тем, что многие биологически активные вещества-кандидаты исключаются из дальнейшей разработки по причине недостаточной клинической эффективности или недостаточно благо-

приятного профиля безопасности. При этом наиболее дорогостоящие клинические испытания, на долю которых приходится около 70% финансовых средств, направленных на R & D (Research and Development). Инвестированные средства фармацевтическая компания должна возратить в период действия эксклюзивного права на реализацию оригинального препарата [2]. Поэтому оригинальные препараты, как правило, являются дорогостоящими, вследствие чего их доступность ограничена как для лечебно-профилактических учреждений, в которых лечат больных с РМЖ, так и для самих пациентов. В связи с этим существует большая необходимость в создании эффективных, безопасных, качественных генериков (воспроизведенных препаратов) летрозола по доступной цене.

Недавно в Украине зарегистрировали генерический препарат летрозола — Летромара («Фармак») на основании данных, подтверждающих его биоэквивалентность по отношению к оригинальному препарату. Следует отметить, что в настоящее время в Украине предъявляемые к ЛС требования соответствуют международным. Для того, чтобы надлежащим образом оценить эффективность и безопасность генериков, учеными и экспертами США и Европейского Союза (ЕС) разработаны соответствующие правила контроля и оценки качества воспроизведенных препаратов [3, 4]. В соответствии с ними для получения разрешения на использование генерика в клинической практике компания-заявитель должна, в частности, предоставить доказательства его терапевтической эквивалентности в отношении к референтному инновационному препарату. Препарат

является терапевтически эквивалентным последнему, если он содержит то же действующее вещество или его терапевтически активную часть и клинически проявляет такую же эффективность и безопасность как и ЛС, эффективность и безопасность которого установлена (то есть инновационный препарат). На практике доказательство биоэквивалентности, как правило, наиболее подходящий способ доказательства терапевтической эквивалентности ЛС при условии, что они содержат вспомогательные вещества, не влияющие на безопасность и эффективность [5].

Для обеспечения оптимального терапевтического действия активная часть действующего вещества должна быть доставлена к месту действия в эффективной концентрации в течение определенного периода времени. Сравнение терапевтических свойств ЛС, содержащих одно и то же действующее вещество, является необходимым средством оценки возможности применения генерика в качестве замены инновационного препарата. Если допустить, что у одного и того же лица аналогичная зависимость концентрации в плазме крови от времени введения ЛС обусловит подобную концентрацию в месте его действия (а значит и по существу аналогичный эффект), то для установления биоэквивалентности можно использовать фармакокинетические данные вместо терапевтических результатов. Следует отметить, что практически во всех странах с хорошо регулируемым фармацевтическим рынком используется именно этот подход для оценки терапевтической эквивалентности генериков. Два ЛС считаются биоэквивалентными, если, в частности, их биодоступность после введения в одной и той же молярной дозе подобна, и действие этих препаратов в отношении эффективности и безопасности будут по существу одинаковыми (биодоступность означает скорость и степень, с которой действующее вещество или его активный компонент абсорбируется (всасывается) из лекарственной формы и становится доступным в месте действия). В качестве альтернативы классическим исследованиям биодоступности с использованием фармакокинетических конечных точек для оценки биоэквивалентности, в последнее время все более широко обсуждают другие виды исследований, например, с участием людей с использованием клинических или фармакодинамических конечных точек; на животных с использованием клеточных моделей или исследования *in vitro* [5].

В чем состоит принцип метода исследования биоэквивалентности *in vitro*? Известно, что абсорбционный потенциал ЛС определяется его растворимостью и проницаемостью. Если препарат легко растворяется в пищеварительной системе и абсорбируется из нее, то его биодоступность будет высокой, поскольку эпителий кишечника является основным биологическим барьером, определяющим всасывание ЛС в кровь. Поэтому в качестве альтернативы сложным, дорогостоящим и этически не всегда безупречным исследованиям по изучению биодоступности препарата *in vivo* у добровольцев, в последние годы стало возможным использовать относительно простые и более дешевые тесты *in vitro*. Вопрос обоснования отказа в ряде случаев от исследований биодоступности и биоэквивалент-

ности *in vivo* подробно представлен в ряде документов, изданных ВОЗ [6], регуляторными органами США — FDA [7] и ЕС — ЕМЕА [5]. Обоснование отказа от исследований биодоступности и биоэквивалентности *in vivo*, изложенное в этих документах, основано на Биофармацевтической классификационной системе (БКС) для лекарственных субстанций на основе их растворимости в воде и степени проникновения через стенку кишечника.

Согласно БКС, ЛС подразделены на 4 класса по степени их растворимости и проницаемости через биологические мембраны: класс I — высокая растворимость, высокая проницаемость; II — низкая растворимость, высокая проницаемость; III — высокая растворимость, низкая проницаемость; IV — низкая растворимость, низкая проницаемость. ЛС, которые относят к I классу БКС, не требуют проведения исследований биодоступности и биоэквивалентности *in vivo*, о терапевтической эквивалентности этих препаратов можно судить на основании изучения биоэквивалентности *in vitro*. В настоящее время существует несколько моделей и методов оценки абсорбции ЛС через эпителий кишечника. К ним относятся, например, измерение проницаемости на искусственных мембранах, а также использование экспериментальных моделей в условиях *in vivo*, *in situ* и *in vitro*. Выбор модели полностью зависит от задач, которые ставит перед собой исследователь по отношению к изучаемому препарату.

В последнее время достаточно широкое распространение получили исследования транспорта через моделированный эпителий кишечника *in vitro*. В качестве модели наиболее часто используется культура клеток колоректальной аденокарциномы человека Caco-2, которая с хорошей воспроизводимостью проявляет многие свойства и характеристики дифференцированных эпителиальных клеток кишечника [8–10] и называемую золотым стандартом для изучения биоэквивалентности *in vitro* [11]. Модели клеточной культуры для абсорбции ЛС основаны на предположении, что прохождение препарата через кишечный эпителий (монослой клеток) является главным барьером для ЛС на его пути в систему кровообращения. Такие модели широко используются для быстрого скрининга проницаемости. Достоверность *in vitro* модели зависит от степени воспроизведения ситуации *in vivo*. В условиях *in vivo* энтероциты ответственны за большинство функций, определяющих абсорбцию. Апикальная поверхность слоя энтероцитов обращена к люминальной области (просвету) кишечника, а базолатеральная поверхность контактирует с потоком крови. Клетки Caco-2 при определенных условиях проявляют морфологические и функциональные свойства, аналогичные таковым энтероцитов. Клетки при культивировании образуют плотные контакты и экспрессируют многие ферменты ворсинистого слоя, а также имеют многие транспортные системы, присущие энтероцитам тонкого кишечника, включая системы транспорта аминокислот, дипептидов, витаминов и цитостатиков. Необычно высокая степень дифференцирования вместе со способностью этих клеток дифференцироваться спонтанно при нормальных условиях культивирования делают Caco-2 од-

ной из наиболее популярных клеточных моделей для изучения эпителиальной проницаемости и транспорта веществ [8–11]. Описанный подход к изучению биодоступности может помочь в изучении эффективности препаратов, минимизировав риск нанесения вреда здоровью добровольцев, всегда существующий при проведении исследований биодоступности.

В работе представлены результаты исследования биоэквивалентности *in vitro* Летромары (летрозол) производства ОАО «Фармак» (Украина) — генерического препарата перорального нестероидного ингибиторы ароматазы II–III поколения из группы аналогов триазола (оригинальный препарат — Фемара, «Новартис»). Летрозол был создан на основе данных о молекулярно-биологических особенностях РМЖ, быстро получил практическое применение в клинической практике в связи с большой избирательностью действия, эффективностью, хорошей переносимостью и удобством применения.

РМЖ относится к гормонозависимым опухолям; наиболее четко эта зависимость выражена приблизительно у 1/3 больных, как правило, у тех, у кого опухоль содержит рецепторы эстрогенов свыше 10 фм/мг белка. У таких пациентов эффективность гормонотерапии составляет до 60–65%, в то время как при наличии рецепторотрицательных опухолей эффективность ее значительно ниже (порядка 10%). С учетом показаний и противопоказаний, Летромару рекомендуют назначать ежедневно по 2,5 мг один раз в сутки. Исходя из этого, при расчете концентрации тест-образца субстанции исследуемого препарата Летромара при проведении исследований *in vitro* необходимо учитывать среднюю концентрацию препарата в крови и чувствительность метода его хроматографической детекции.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использованы образцы летрозола (4,4-[1H-1,2,4-триазол-1-yl)-метил]бис-бензонитрил C₁₇H₁₁N₅) компании «IND-SWIFT Laboratories Ltd» (Индия), серийный номер LET-008 (15.07.04), 1 л транспортного буфера (рН 7,4) содержал 10 мл раствора Хенкса (HBSS, 10x), 11 мл HEPES (1 моль), глюкозы моногидрата — 20 моль, натрия гидрокарбоната — 5 моль. Для приготовления маточного раствора 2,85 мг летрозола растворяли в 100 мл транспортного буфера при комнатной температуре (20 °С) в течение 24 ч, последние 20 мин использовали магнитную мешалку. Готовили рабочий раствор с концентрацией летрозола 10⁻⁴ М. Определение показателей термодинамической растворимости образца субстанции проведено согласно методам, подробно описанным ранее [12].

Для проведения исследований биоэквивалентности *in vitro* использовали культуру клеток Сасо-2. Клетки культивировали в 12-луночных планшетах с фильтрами «Millipore» 12 мм. Планшеты помещали в СО₂-инкубатор (37 °С, влажность 90%). Использовали культуральную среду DMEM с 15% FBS, (рН 7,4). Для исследования отобраны четыре монослоя Сасо-2 на пористых фильтрах, сопротивление которых достигло стационарных значений на 18–20 сут. Сопротивления монослоя Сасо-2 измеряли

эпителиальным вольтметром EVOMX с использованием измерительной камеры EndOhm (USA). Субстанцию препарата в заданной концентрации вносили в апикальный отсек экспериментальной камеры (инсерт). Через 30 мин проводили забор проб из базолатерального отсека камеры. В качестве контроля бралась первая точка (раствор летрозола) [12].

Определение коэффициента проницаемости субстанции летрозола осуществляли по классической формуле: $P = [V_a/A(C_d - C_a)] \cdot dC_a/dt$, где P — коэффициент проницаемости монослоя Сасо-2, V_a — объем акцепторной части, A — площадь мембраны инсерт (в данном случае 0,6 см²), C_d — концентрация летрозола в донорной части, C_a — концентрация летрозола в акцепторной части, t — время экспозиции.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование термодинамической растворимости и проницаемости летрозола — активного вещества генерического лекарственного средства Летромары в условиях *in vitro* через монослой клеточной линии Сасо-2 проводилось с учетом требований GLP и Директивы 2004/10/ЕС Европейского парламента и Совета Европейского Союза от 11 февраля 2004 г. о гармонизации законов, правил и административных положений, относящихся к применению принципов надлежащей лабораторной практики и проверке их применения при изучении химических веществ, руководства FDA «Guidance for Industry Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms on a Biopharmaceutics Classification System (BCS)» [4]. Результаты сравнивали с данными изучения специфической активности *in vivo* биоэквивалентности Летромары и оригинального препарата (Фемара) в сертифицированной лаборатории Института эндокринологии и обмена веществ им. В.П. Комиссаренко АМН Украины.

Термодинамическая растворимость летрозола в зависимости от рН среды растворения колеблется от 45 до 64 мкг/мл (табл. 1), поэтому он относится к категории высокорастворимых субстанций. Это означает, что высвободившееся из таблетки Летромара активное действующее вещество, содержащееся в ней в количестве 2,5 мг, способно легко и полностью раствориться в пищеварительной системе пациента.

Таблица 1
Термодинамическая растворимость активного фармацевтического ингредиента летрозола

рН среды растворения	Концентрация в надосадочной жидкости, мкг/мл
1,2	45,48
4,5	64,40
6,8	45,48

Для определения оптимального времени измерения проницаемости монослоя Сасо-2 для летрозола проводили исследование (с использованием инсерт № 1) по такой схеме. В донорский отсек инсерт добавляли раствор летрозола в концентрации 28,5 мкг/мл, что соответствует молярной концентрации 10⁻⁴ М. Измеряли концентрацию летрозола в акцепторной камере при экспозиции 1, 5, 30, 60 мин (рисунок).

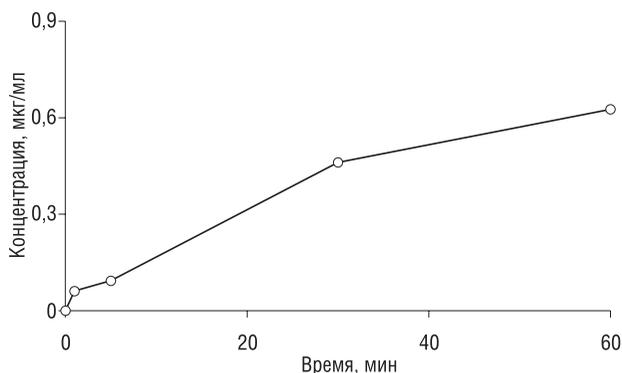


Рисунок. Динамика повышения концентрации летрозолола в акцепторной камере в зависимости от времени экспозиции

За полное время эксперимента (1 + 5 + 30 + 60 = 96 мин) концентрация летрозолола в донорском отсеке снизилась с 27,65 до 16,33 мкг/мл, при этом максимальная концентрация в акцепторном отсеке составила 0,626 мкг/мл, что значительно ниже как исходной, так и конечной концентрации в донорской части. В течение первых 30 мин отмечали линейное нарастание концентрации в акцепторной камере, при более длительной экспозиции выявлено отклонение кривой от линейности, что связано со снижением концентрации летрозолола в инсерте.

Для последующего измерения проницаемости монослоя для летрозолола выбрали время экспозиции 30 мин. Полученные данные представлены в табл. 2.

Таблица 2
Проницаемость монослоя клеток Сасо-2 для летрозолола

Инсерт	C_0 (мкг/мл)	$C_{30 \text{ мин}}$ (мкг/мл)	$C_{\text{ср}}$ (мкг/мл)	ΔC (мкг/мл)	P (см/с)
№ 2	27,71	21,52	24,615	1,06	5,98E-05
№ 3	27,71	23,62	25,665	1,06	5,73E-05
№ 4	27,71	22,57	25,140	0,99	5,45E-05

Так, среднее значение проницаемости для летрозолола составляет $5,72 \pm 0,16 \cdot 10^{-5}$ см/с, что свидетельствует о высокой проницаемости монослоя Сасо-2 для исследуемого препарата [3, 7]. Поскольку летрозолол характеризуется высокой термодинамической растворимостью и проницаемостью, данный активный фармацевтический ингредиент можно отнести к I классу БКС (высокая растворимость, высокая проницаемость). К тому же профиль растворения (Dissolution Testing) Летромары является подобным Фемаре (данные не представлены). Это означает, что активное вещество сразу же после освобождения из Летромары и растворения в пищеварительной системе, немедленно абсорбируется энтероцитами и поступает в циркулирующую кровь. Согласно требованиям, действующим в ЕС, США и некоторых других экономически развитых странах, в подобных случаях исследования биодоступности *in vivo* на здоровых добровольцах можно избежать.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о принадлежности активного вещества Летромары (летрозолол) к классу ЛС с высокой растворимостью и высокой проницаемостью, — к I классу БКС.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gibson LJ, Dawson C, Lawrence DJ, Bliss J. Aromatase inhibitors for treatment of advanced breast cancer in postmenopausal women. *Cochrane Database Syst Rev* 2007; 1: CD003370.

2. BIO's editors' and reporters' guide to biotechnology — a new link to hope /LM Baron & A Massey, Eds/ 2004. — Washington, DC, Biotechnology Industry Organization. — 138 p.

3. Council Directive 75/318/EEC of 20 May on the approximation of the laws of Member States relating to analytical, pharmacotoxicological and clinical standards and protocols in respect of the testing of medicinal products-part 3, section II. A.1. (May 1976).

4. Directive 2004/10/EC of the European Parliament and of the Council of 11 February 2004 on the harmonization of laws, regulations and administrative provisions relating to the application of the principles of good laboratory practice and the verification of their applications for tests on chemical substances (2004).

5. Note for Guidance on the Investigation of Bioavailability and Bioequivalence. London, EMEA: CPMP/EWP/QWP/1401/98. — 2001. — 19 p.

6. Proposal to waive *in vivo* bioequivalence requirements for WHO model list of essential medicines immediate release, solid oral dosage forms working document qas/04.109. 11 October, 2004.

7. Waiver of *in vivo* bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system (2000) US Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER). August 2000.

8. Ferrec E, Chesne C, Arturson P, *et al.* In Vitro Models of the Intestinal Barrier. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 46. *ATLA* 29, 649–668, 2001.

9. Sambay Y, De Angelis I, Ranaldi G, *et al.* The Caco-2 cell line model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol Toxicol* 2005; 21: 1–26

10. Stewart BH, Chan OH, Lu RH, *et al.* Comparison of intestinal permeabilities determined in multiple *in vitro* and *in situ* models: relationship to absorption in humans. *Pharmaceutical Research* 1995; 2: 693–9.

11. Camenish G, Alsen J, van de Waterbeemd H, Folkers G. Estimation of permeability by passive diffusion through Caco-2 cell monolayers using the drugs' lipophilicity and molecular weight. *Eur J Pharm Science* 1998; 63: 13–319

12. Соловьев АИ, Резников АГ, Тарасенко ЛВ, Маргитич ВМ. Первый в Украине успешный опыт применения биоивейвера для экспертной оценки лекарственного средства (Летромара). *Журн АМН України* 2006; 12 (4): 781–93.

AROMATASE LETROMARA INHIBITOR BIOEQUIVALENCY ASSAY *IN VITRO*.

I. THE STUDY OF PERMEABILITY OF Caco-2 CELLS TO REGIMENT

A.G. Reznikov, A.I. Solov'ev, O.P. Baula,
L.V. Tarasenko, V.M. Margitich

Summary. Recently *in vitro* methods has been developed to confirm the bioequivalency of generic of Letromara (Letrozol, «Farmac», UA) that belong to the Class I of the Biopharmaceutical Classification System and exert both high solubility and permeability, to avoid further pharmacokinetic studies on healthy volunteers.

Key Words: aromatase inhibitors, Letromara, bioequivalency, *in vitro* methods.

Адрес для переписки:

ОАО «Фармак»

04080, Киев, ул. Фрунзе, 63

Тел.: (044) 239-19-40, факс: 417-10-55