

СОЗДАНИЕ ЛАБОРАТОРНОЙ ТЕХНОЛОГИИ ВОСПРОИЗВЕДЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ ЭПИРУБИЦИНА

О.Л. Орлова, А.П. Полозкова, Н.А. Оборотова, З.С. Шпрах, М.П. Киселева, Л.М. Борисова,
М.В. Дмитриева, Ю.В. Родионова, С.В. Копачевская, Т.Ю. Еськина, **З.С. Смирнова**

ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва,
Каширское шоссе, 24

Контакты: Ольга Львовна Орлова orlovaol@mail.ru

Введение. Правительства разных стран стремятся снизить быстро растущие расходы на здравоохранение. Использование качественных и чаще всего более дешевых, чем оригинальные бренды, препаратов-дженериков существенно сокращает затраты и одновременно обеспечивает надлежащее качество лечения. Поэтому разработка препаратов-дженериков является актуальной задачей.

Цель исследования – воспроизводство лекарственной формы для создания отечественного препарата-дженерика эпирубицина. **Материалы и методы.** В исследованиях использованы субстанция эпирубицина Ph. Eur. действующего издания (Teva, Израиль), фармарубицин (Pfizer Italia Srl для Pfizer Inc., Италия/США) и вспомогательные вещества, соответствующие требованиям нормативной документации. Перевиваемая опухоль мышей: лимфоцитарная лейкемия P-388. Методы: технологические, фармако-аналитические, биологические и фармакологические.

Результаты. Проведенный фармацевтический анализ воспроизведенного препарата-дженерика эпирубицин-РОНЦ® показал, что он по всем показателям качества совпадает с препаратом фармарубицин. Результаты исследования острой токсичности на мышах и крысах и данные наблюдения за экспериментальными животными на протяжении 30 дней после однократного введения позволяют сделать вывод: оба препарата обладают сходными токсикологическими характеристиками и практически идентичны. Воспроизведенный эпирубицин-РОНЦ® и фармарубицин в лиофилизированной лекарственной форме для инъекций 10,0 мг во флаконе, вводимые однократно, проявляют равный противоопухолевый эффект при 2 путях введения на перевиваемой опухоли мышей – лимфоцитарной лейкемии P-388.

Выводы. В ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России воспроизведен препарат-дженерик – эпирубицин-РОНЦ®, который полностью соответствует импортному препарату.

Ключевые слова: дженерик, технология, токсичность, биологическая активность

DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-4-72-77

CREATING LABORATORY TECHNOLOGY OF GENERIC EPIRUBICIN PHARMECEUTICAL DOSAGE FORM

O.L. Orlova, A.P. Polozkova, N.A. Oborotova, Z.S. Shprakh, M.P. Kiseleva, L.M. Borisova,
M.V. Dmitrieva, Y.V. Rodionova, S.V. Kohachevskaya, T.Y. Eskinina, **Z.S. Smirnova**

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashyrskoe Shosse, Moscow, 115478, Russia

Introduction. Governments around the world seek to reduce rapidly rising health care costs. Using the same high quality and often cheaper than the original brands, generics greatly reduces costs while providing an adequate quality of care. Therefore the development of generic medicines is an important task.

The purpose of the study – the reproduction of the pharmaceutical dosage form for creation of national drug-generic epirubicin.

Materials and methods. The study used a substance epirubicin (Ph. Eur current edition, Teva Pharmaceutical Industries Ltd., Israel); “Farmorubicin”, production “Pfizer Italia Srl” for “Pfizer Inc.”, Italy / US and excipients conforming to with relevant regulatory documents. Mice transplanted tumor: lymphocytic leukemia P388. Methods: technological, pharmaco-analytical, biological and pharmacological.

Results. Pharmaceutical analysis of reproduced generic-drug “Epirubicin-RONC®” showed that it fully meets the requirements of manufacturer’s monograph. The results of “acute” toxicity study in rats and observations of the experimental animals within 30 days after a single administration suggest that both drugs have similar toxicological properties and are almost identical. Generic “Epirubicin RONC®” and “Farmorubicin” in lyophilized dosage form for injection 10.0 mg/vial, administered once, shows equal antitumor effect at two administration routes in mice with transplantable tumor: lymphocytic leukemia P-388.

Conclusion. N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center Ministry of Health of Russia has been reproduced generic – “Epirubicin-RONC®”, which is fully conform to the imported drug.

Key words: generic, technology, toxicity, biological activity

Введение

Создание нового лекарственного средства – очень сложный и дорогостоящий процесс, затраты на который измеряются подчас сотнями миллионов долларов. Именно поэтому в мире сравнительно немного крупных фармацевтических компаний занимается разработкой новых лекарств; многие из них в последнее время объединяются, чтобы совместными усилиями обеспечить колоссальные расходы на поисковые исследования и внедрение. В среднем для создания нового препарата, от стадии разработки до стадии регистрации, требуется 12–15 лет. Изучаются как физико-химические, так и биологические свойства вещества (в том числе такие крайне важные показатели, как токсичность, мутагенность, канцерогенность и т. д.), затем начинается длительный процесс испытания и тестирования препарата на добровольцах, отслеживания побочных эффектов, вывода лекарства на рынок. Полученный в результате препарат называют оригинальным. В начале своего существования он защищен патентом. Патент и срок его действия обеспечивают фирме, создавшей препарат, право на эксклюзивное распространение без конкуренции со стороны других производителей, компенсацию затрат на разработку препарата, а также получение прибыли [1].

Если высокая эффективность и практическая ценность препарата подтверждены клиническими исследованиями и широкой клинической практикой, после окончания срока действия патента лекарство на законных основаниях может быть воспроизведено другими компаниями. Копия оригинального препарата называется дженериком [2]. Тенденция к широкому использованию высококачественных дженериков отчетливо прослеживается во всем мире, включая экономически развитые страны [3]. Правительства этих стран стремятся снизить быстро растущие расходы на здравоохранение. Использование качественных и чаще всего более дешевых, чем оригинальные бренды, препаратов-дженериков существенно сокращает затраты и одновременно обеспечивает надлежащее качество лечения [4]. На сегодняшний день доля дженериков на фармацевтическом рынке США и Канады составляет 30 % (в 1991 г. – 14 %). В Великобритании, Германии, Дании и Нидерландах доля дженериков достигает 50 %.

Поддержка производства дженериков, их использования в медицинской практике и замещения ими оригинальных препаратов является одной из стратегических целей Всемирной организации здравоохранения при обеспечении доступа к медицинской помощи.

Правительство России поставило цель к 2018 г. довести до 90 % долю лекарственных средств отечественного производства среди жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов. Под

эти цели созданы программы модернизации медицинской и фармацевтической отраслей, выполняющие важную задачу по импортозамещению. Также разработана федеральная целевая программа, предусматривающая совершенствование материальной базы этих отраслей в России. К 2020 г. правительство планирует решить ключевые вопросы отраслей и сделать отечественное производство главным поставщиком лекарственных средств на внутренний рынок. Регистрация воспроизведенных лекарственных средств проводится в соответствии с Федеральным законом от 12.04.2010 № 61-ФЗ [5].

За последние 60 лет в клинической онкологии появилось много новых химиотерапевтических препаратов, однако по-прежнему эпирубицин является важнейшим препаратом при лечении таких заболеваний, как рак молочной железы, рак яичников, немелкоклеточный и мелкоклеточный рак легкого, рак желудка и пищевода, первичный гепатоцеллюлярный рак, переходно-клеточный рак мочевого пузыря, саркома мягких тканей, остеосаркома, неходжкинская лимфома, болезнь Ходжкина, острый лейкоз, множественная миелома, рак поджелудочной железы, рак прямой кишки, рак головы и шеи [6].

Качество готовой лекарственной формы в первую очередь зависит от качества и особенностей физико-химических свойств фармацевтической субстанции. На основании первичных данных проработки технологии, включая изучение свойств эпирубицина, прогнозирование состава лекарственной формы и оценку рисков, проводили отработку состава на модельных образцах и разрабатывали первичные методы анализа. На основании данных литературы и по результатам апробации методов на модельных образцах оформили первичный проект фармакопейной статьи предприятия на готовый продукт.

Цель исследования – воспроизводство лекарственной формы для создания отечественного препарата-дженерика эпирубицина.

Материалы и методы

Препараты и реактивы. Субстанция эпирубицина серии P 3502/10 Ph. Eur. действующего издания (Teva, Израиль), фармарубицин производства Pfizer Italia Srl для Pfizer Inc., Италия/США (ISO 9001:2015), вода для инъекций (ФС. 2.2.0019.15), натрия хлорид (ФС. 2.2.0014.15 или Ph. Eur. / USP действующих изданий), натрия гидроксид (Ph. Eur. / USP действующих изданий), метилпарагидроксibenзоат (Ph. Eur. / USP действующих изданий), лактоза безводная или лактоза моногидрат (Ph. Eur./USP действующих изданий), перевиваемая опухоль мышей – лимфоцитарная лейкемия P-388.

Приборы и аппаратура. Установка двухступенчатого обратного осмоса УВОИ-М-Ф/1812 (НПК

«Медиана-Фильтр», Россия), фильтрующая система «Стерикап» с диаметром пор фильтра 0,22 мкм (Millipore, США), весы лабораторные Sartorius LA1200S (Sartorius AG, Германия), дозатор механический 0,5–10 мл (ВИОНТ, Финляндия), полуавтомат закаточный ПЗР-34-ВИПС-МЕД (ООО «Фирма «ВИРС-МЕД»», Россия), установка для сублимационной сушки Edwards Minifast DO. 2 (Ego Electronic SpA, Италия), флаконы из трубки стеклянной для лекарственных средств из стекла I гидrolитического класса вместимостью 10 мл (10R) по ИСО 8362–1, резиновые пробки для сублимационной сушки по ИСО 8362–2, алюминиевые колпачки с пластмассовой вставкой по ИСО 8362–7.

Воспроизводство лиофилизата эпирубицина гидрохлорида 10 мг во флаконе. Предварительно готовили раствор метилпарагидроксибензоата (парабен), в котором растворяли лактозу безводную. В полученном растворе вспомогательных веществ растворяли эпирубицина гидрохлорид. Измеряли pH полученного раствора эпирубицина гидрохлорида, который должен быть 4,5–6,5. Если pH был меньше 4,5, его корректировали с помощью 1M раствора гидроксида натрия (1–2 капли).

Стерилизующая фильтрация. Для стерилизации раствора в лабораторных условиях использовали фильтрацию под давлением через систему «Стерикап». Стерильный раствор контролировали на содержание эпирубицина гидрохлорида в 1 мл. Далее дозировали по 2 мл во флакон вместимостью 10 мл, предукпоривали пробками для сублимационной сушки и помещали в камеру сублимационной сушилки при 20–22 °C для замораживания и последующей лиофилизации.

Датчики вводили в контрольные флаконы и подключали к гнезду самопишущего регистрирующего прибора в сублимационной камере, дверь камеры плотно закрывали.

Определение криогидратной температуры раствора эпирубицина гидрохлорида. Первая фаза лиофилизации – замораживание является важной операцией, от правильности ее проведения зависит качество препарата. Выбор температуры замораживания и определение уровня самых низких температур высушивания в период сублимации зависят от эвтектической точки – криогидратной температуры вещества. Исследование криогидратной зоны раствора эпирубицина гидрохлорида проводили термометрическим методом.

Токсикологические исследования. Острую токсичность изучали на мышах и крысах (нелинейных самцах и самках) при однократном внутривенном введении препарата. Препараты вводили в возрастающих дозах. Дозы рассчитывали индивидуально для каждого животного, учитывая массу тела.

Субхроническую токсичность изучали на половозрелых крысах (нелинейных самцах и самках). Были выбраны 3 дозы (с учетом пересчета с человека на крысу): терапевтическая, деленная на количество введений 3–4,3 мг/кг, в 2 раза больше исходной и в 2 раза меньше исходной. Продолжительность наблюдения – 60 сут.

Дополнительно проведено изучение эффективности воспроизведенного препарата эпирубицин-РОНЦ® на базе лаборатории экспериментальной химиотерапии. Исследование выполняли на перевиваемой опухоли мышей P-388. Штамм опухоли вели на мышах-самках линии DBA₂. В опыте использованы мыши-самки линии F₁ (C₅₇Bl₆ × DBA₂), полученные из питомника «Столбовая». Доклиническое изучение проводилось в соответствии с рекомендациями [7].

Результаты и обсуждение

Технологические исследования. Для определения криогидратной зоны использовали модельный раствор лекарственной формы эпирубицина. Состав препарата эпирубицин-РОНЦ® на 1 флакон был следующим: эпирубицин – 10,0 мг (в пересчете на 100 % вещество), метилпарагидроксибензоат – 2,0 мг, лактоза безводная или лактоза моногидрат – 50,0 или 52,6 мг соответственно.

На кривой замораживания раствора эпирубицина показано, что начало кристаллизации происходит в области –12 °C, однако неярко выраженные зоны замораживания появляются и ниже этой отметки. (рис. 1).

Таким образом, температура эвтектики находится в диапазоне –12...–15 °C.

Замораживание и сублимационная сушка модели лекарственной формы эпирубицина. Для разработки экономически оправданного и научно обоснованного технологического процесса необходимо определить влияние режима замораживания и сушки на качество полученного продукта.



Рис. 1. Кривая замораживания раствора эпирубицина гидрохлорида

Продолжительность «закалки» (время замораживания) и скорость замораживания определяли непосредственно на полке сублимационной установки. Для этого 2 мл раствора эпирубицина гидрохлорида во флаконах вместимостью 10 мл помещали на полку (20 °С) и охлаждали полку до –45 °С. Время выравнивания температуры продукта и температуры полки составило 1,5–2 ч.

Затем препарат выдерживали при этой температуре в течение 2,5–3 ч (закалка) и включали вакуум (0,1–0,5 мм рт. ст.). Продолжительность закалки и температура полки в начале сублимации влияют на качество продукта. Так, малая продолжительность закалки при температурах –40 и –45 °С с последующей сушкой на полке с положительной температурой вызывает вспенивание продукта. Серии, выдержанные менее 3 ч при этих температурах замораживания, в процессе сублимации на полках с температурой от 0 до 8 °С вспенились. В то же время серии, выдержанные при –45 °С в течение 3 ч, не вспенились при сублимации на полке с температурой от 0 до 10 °С.

Анализируя скорости подогрева полки, заданные при сушке ряда лабораторных серий препарата, выбрали нагревание со скоростью 2–5 °С в час, при которой не происходит вспенивание продукта и в то же время увеличивается интенсивность сублимации.

В результате исследования установлен оптимальный режим сушки раствора эпирубицина гидрохлорида, дозированного по 2,0 мл во флаконах вместимостью 10 мл, замороженного на полке сублимационной установки. Изменение температуры продукта в зависимости от температуры полки представлено на графике сушки препарата, вакуум постоянный в пределах 0,01–0,05 мм рт. ст. (рис. 2).

Проведенный фармацевтический анализ воспроизведенного препарата показал, что он полностью соответствует ISO импортного препарата – фармарубицина.

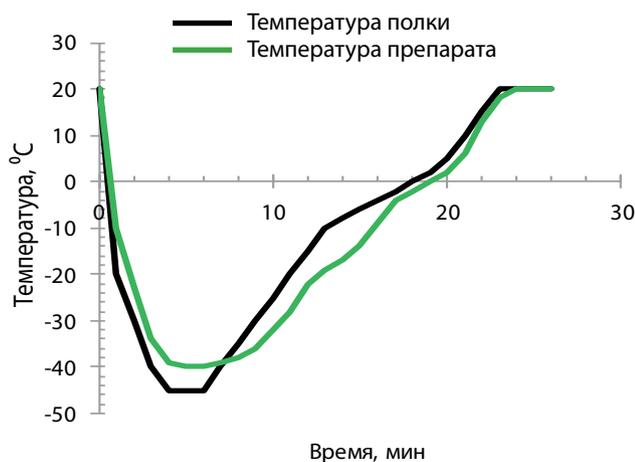


Рис. 2. Температура полки и препарата при лиофилизации раствора эпирубицина

Доклиническое исследование безопасности эпирубицина-РОНЦ® в сравнении с коммерческим препаратом фармарубицином производства Pfizer Italia Srl для Pfizer Inc. В соответствии с руководством [5] были проведены токсикологические испытания воспроизведенного препарата эпирубицин-РОНЦ®. Исследование острой токсичности эпирубицина-РОНЦ® проводилось относительно препарата сравнения – фармарубицина серии 1FN0018 производства Pfizer Italia Srl для Pfizer Inc. (Италия/США).

При изучении острой токсичности на мышах методом пробит-анализа были рассчитаны летальные и токсические дозы. Для обоих препаратов ЛД₅₀ для мышей равнялась 25 мг/кг. Смертность мышей при введении эпирубицина-РОНЦ® и фармарубицина была одинаковой. Данные представлены в табл. 1.

Таблица 1. Гибель животных в эксперименте при применении экспериментального и оригинального препаратов

Показатель	Эпирубицин-РОНЦ®			Фармарубицин		
	30	15	8	30	15	8
Доза, мг/кг	30	15	8	30	15	8
Lg D	1,5	1,2	0,9	1,5	1,2	0,9
Пробит	5,33	4,19	0	5,33	4,19	0
Погибло, абс.	3	1	0	3	1	0
Погибло, %	60	20	0	60	20	0

При изучении острой токсичности на крысах все животные оставались живы на протяжении исследования.

При исследовании некропсийного материала сравниваемых групп не было установлено статистически значимых отличий массовых коэффициентов внутренних органов, динамики массы тела животных, макроскопических характеристик. Таким образом, результаты исследования и данные наблюдений за экспериментальными животными на протяжении 30 дней после однократного введения позволяют сделать вывод о том, что оба препарата обладают сходными токсикологическими характеристиками и практически идентичны.

При проведении исследования субхронической токсичности отмечена смертность части животных при введении препарата в дозе 8,6 мг/кг (суммарная доза 25,8 мг/кг). По интегральным показателям крысы отличались от контрольной группы (без введения препаратов). При введении эпирубицина-РОНЦ® и фармарубицина в дозах 4,3 и 2,2 мг/кг соответственно не было обнаружено никаких изменений со стороны внутренних органов и системы крови. Таким образом, можно сделать вывод: эпирубицин-РОНЦ® может вызвать некоторые системные токсические эффекты, типичные для противоопухолевых препаратов,

Таблица 2. Противоопухолевая активность воспроизведенной лекарственной формы эпирубицин-РОНЦ® в сравнении с фармарубицином на перевиваемой опухоли мышей – лимфоцитарной лейкемии P-388

№	Группа	Доза (мг/кг)/ интервал (ч) × число введений	Путь введения	СПЖ (дни)	УПЖ, %	Гибель от токсичности*
	Контроль	–	–	8,9	–	0/12
1	Эпирубицин – РОНЦ®	15 × 1	в/в	26,1	193	0/8
2		15 × 1	в/бр	20,8	134	0/8
3		4/24 × 5	в/бр	19,4	118	0/8
4	Фармарубицин	15 × 1	в/в	26,0	192	0/8
5		15 × 1	в/бр	22,9	157	0/8
6		4/24 × 5	в/бр	14,7	65	2/8

Примечание. СПЖ – средняя продолжительность жизни, УПЖ – увеличение продолжительности жизни, в/в – внутривенное введение, в/бр – внутрибрюшинное введение. *В табл. 1 показано, что доза эпирубицина 15 мг вызвала гибель 20 % здоровых животных, тогда как при изучении противоопухолевой активности эта доза не вызвала гибели животных. Возможная причина – использование разных линий мышей в экспериментах по изучению сравнительной токсичности и противоопухолевой активности препарата.

и не отличается по воздействию на организм от препарата сравнения фармарубицина.

Сравнительное изучение противоопухолевой активности. При сравнительной оценке противоопухолевой активности эпирубицина-РОНЦ® и фармарубицина показано, что продолжительность жизни мышей с лимфоцитарной лейкемией P-388 при однократном внутривенном введении воспроизведенной лекарственной формы эпирубицин-РОНЦ® составляет в среднем 26,1 дня, а при внутрибрюшинном введении – 20,8 дня. Увеличение продолжительности жизни составляет 193 % при внутривенном введении и 134 % – при внутрибрюшинном введении. Эти результаты статистически не отличаются от эффективности коммерческой лиофилизированной лекарственной формы для внутривенных инъекций фармарубицина (табл. 2).

Независимо от пути введения лекарственных форм эпирубицина в дозе 15 мг/кг при однократном введении препарата мыши линии F₁(C₅₇Bl₆ × DBA₂) с перевиваемой опухолью P-388 проявляли одинаковую продолжительность жизни ($p > 0,05$).

Заключение

Разработана технология препарата-дженерика эпирубицин-РОНЦ®.

На основании проведенных исследований отобран оптимальный режим сушки раствора эпирубицина.

Проведенный фармацевтический анализ воспроизведенного препарата показал, что его качество полностью соответствует импортному препарату фармарубицину производства Pfizer Italia Srl для Pfizer Inc. (Италия/США).

В результате изучения острой токсичности установлено, что препараты обладают сходными токсикологическими характеристиками и практически идентичны.

При проведении исследования субхронической токсичности показано, что эпирубицин-РОНЦ® может вызвать некоторые системные токсические эффекты, типичные для противоопухолевых препаратов, и не отличается по воздействию на организм от препарата сравнения фармарубицина производства Pfizer Italia Srl для Pfizer Inc. (Италия/США).

При сравнительном исследовании противоопухолевой активности на перевиваемой опухоли мышей – лимфоцитарной лейкемии P-388 показано, что воспроизведенный эпирубицин-РОНЦ® и фармарубицин производства Pfizer Italia Srl для Pfizer Inc. (Италия/США) проявляют равный противоопухолевый эффект.

В настоящее время эпирубицин-РОНЦ® прошел государственную регистрацию в Минздраве России и выпускается филиалом «Наукапрофи» ФБГУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Григорьев В. Ю. Дженерики и бренды в химиотерапии. Антибиотики и химиотерапия 2006;51(8):38–47.
2. Соколов А. В. Оригинальные препараты и дженерики: качество, возможные пути решения проблемы. Медицинские технологии. Оценка и выбор 2012;3(9):52–6.
3. Ишмухаметов А. Дженерики в Европе. Генерическая экспансия на фармрынке ЕС. Ремедиум. Журнал о российском рынке лекарств и медицинской технике 2011;1:7–13.
4. Соколов А. В., Липатова В. С. Оригинальные препараты и дженерики: проблема выбора. Рецепт 2011;3:28–35.
5. Федеральный закон от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» (с изм. и доп.). Глава 6. Осуществление государственной регистрации лекарственных препаратов.
6. Регистр лекарственных средств России® РЛС®. 2014–2015.
7. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. Под ред. А. Н. Миронова. М.: Гриф и К, 2012. 944 с.