Л.А. Трухачева, Н.В. Горпинченко, С.П. Дементьев

Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Российская Федерация

Сравнительное исследование *in vitro* эквивалентности двухкомпонентных дозированных аэрозольных ингаляторов с помощью импактора нового поколения

Контактная информация:
Трухачева Людмила Андреевна, кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармацевтической и токсикологической химии Первого МГМУ им. И.М.Сеченова
Адрес: 119019, Москва, Никитский бульвар, д. 13, **тел.:** (495) 691-13-92
Статья поступила: 05.10.2012 г., **принята к печати:** 12.10.2012 г.

Тест на аэродинамическое распределение частиц моделирует in vitro процессы, происходящие при вдыхании пациентом дозы аэрозольного препарата. ***Цель.*** *Сравнить in vitro эквивалентность воспроизведенного (Тевакомб) и оригинального (Серетид) дозированных аэрозольных ингаляторов, содержащих флутиказона пропионат и салметерола ксинафоат по показателю «аэродинамическое распределение частиц».* ***Материалы и методы.*** *Исследуемые дозированные аэрозольные ингаляторы: Серетид, 25/250 (салметерола ксинафоат/флутиказона пропионат) мкг/доза, производство ГлаксоСмитКляйн Фармасьютикалсз, Польша, и Тевакомб, 25/250 (салметерола ксинафоат/флутиказона пропионат) мкг/доза, производство Ципла Лтд, Индия. В исследовании изучали по 6 образцов каждого из наименований ингалятора. Для моделирования in vitro вдоха пациента использовали 7-ступенчатый каскадный импактор нового поколения. Скорость потока воздуха через импактор составляла 30 ± 1 л/мин. Время ввода дозы аэрозоля — 8 с. К фракции мелкодисперсных частиц относили частицы с диаметром < 5 мкм. Количественный анализ частиц флутиказона пропионата и салметерола ксинафоата, собранных на ступенях импактора, проводили в соответствии с методами, описанными в Европейской фармакопее 6-го изд.* ***Результаты.*** *Результаты изучения аэродинамического распределения частиц на единичных ступенях показали статистически достоверное отличие между оригинальным и воспроизведенным дозированными аэрозольными ингаляторами. На всех ступенях, за исключением 5-й (для флутиказона пропионата), 90% доверительные интервалы не укладывались в нормируемый диапазон ± 15% (0,85–1,18). Различия подтвердились при определении таких статистически значимых параметров, как массмедианный аэродинамический диаметр частиц и геометрическое стандартное отклонение от массмедианного аэродинамического диаметра, а также значений фракции мелкодисперсных частиц (ФМЧ) и величины выпущенной дозы. Для салметерола ксинафоата величины ФМЧ составляли 42,06% (оригинальный ингалятор) и 35,53% (воспроизведенный ингалятор), для флутиказона пропионата — 42,94 и 35,44%, соответственно.* ***Заключение.*** *Результаты теста на аэродинамическое распределение частиц показали неэквивалентность обоих дозированных аэрозольных ингаляторов, что может обусловливать различия в фармакологических эффектах данных препаратов.*
Ключевые слова: *флутиказон, салметерол, аэродинамическое распределение частиц, импактор нового поколения, эквивалентность, дженерики.*

(Педиатрическая фармакология. 2012; 9 (5): 70–74)

Печатается по: Клин. фармакол. тер., 2012; 21 (4): 77–81. (Clin. Pharmacol. Ther., 2012; 21 (4): 77–81).

L.A. Trukhacheva, N.V. Gorpinchenko, S.P. Dementyev

Sechenov First Moscow State Medical University, Russian Federation

Comparative analysis of the *in vitro* equivalence of metered aerosol inhalers conducted by the new generation impactor

Aim. *To compare in vitro the aerodynamic particle size distributions of original and generic inhalers, which contain both fluticasone (FP) and salmeterol (SM).* ***Material and methods.*** *The Next Generation Impactor (NGI; Copley Ltd., UK) was used to assess the particle size distribution and aerosol quality of two products to determine the equivalence in the aerosol released from the device. The first formulation was Seretide (SM/FP) 25/250 μg, an original SM/FP fixed combination developed by GlaxoSmithKline. The second formulation tested was Tevacomb 25/250 μg (SM/FP), the generic SM/FP fixed combination produced by Cipla. The mass of FP and SM recovered from each stage of impactor was quantified via high performance liquid chromatography (HPLC). The impactor results were statistically evaluated by log transformation of the single data NGI.* ***Results.*** *Statistically significant differences were seen between the deposition profile of Seretide and Tevacomb obtained using the NGI. Evaluating the single stages results in estimation of nonequivalence for all stages except stage 5 (FP) since their confidence intervals (CI) were out of the range of the tight conventional bioequivalence limits of ± 15% (0,85–1,18). Also differences were observed by number of parameters, including the fine particle dose (FPD), emitted dose (ED), mass median aerodynamic diameter (MMAD), and geometric standard deviation (GSD) of SM and FP.* ***Conclusion.*** *These in vitro findings suggest that the particle size distributions of the generic formulation Tevacomb is not equivalent to that of the original product Seretide.*
Key words: *fluticasone, salmeterol, aerodynamic particle size distribution, next generation impactor, equivalence, generic products.*

(Pediatricheskaya farmakologiya — Pediatric pharmacology. 2012; 9 (5): 70–74)

На протяжении последних 20–30 лет одной из наиболее обсуждаемых в фармацевтическом сообществе остается проблема взаимоотношений оригинальных (инновационных) и воспроизведенных (дженериков) лекарственных препаратов. Дискуссии продолжаются по многим пунктам, начиная от собственно определения понятий «дженерик» и «оригинальный препарат» и заканчивая их эквивалентностью и взаимозаменяемостью.

В настоящее время существует несколько общепризнанных, в том числе в Российской Федерации, нормативных документов, которыми руководствуются при оценке эквивалентности лекарственных средств [1–3]. В руководстве Европейского агентства по лекарствам (EMA) [4] для оценки эквивалентности двух препаратов предлагается трехступенчатый подход (рис. 1). Первый этап подтверждения эквивалентности ингаляционных лекарственных препаратов предполагает исследование *in vitro* эквивалентности аэродинамического распределения мелкодисперсных частиц. При подтверждении эквивалентности на данном этапе считается возможным не проводить дальнейшие исследования *in vivo*.

Целью настоящего исследования было сравнение аэродинамического распределения частиц комбинированных ингаляционных лекарственных средств для подтверждения возможной эквивалентности препаратов *in vitro* в соответствии с рекомендациями [4, 5]. Исследуемые препараты используются для лечения обструктивных заболеваний легких и содержат в качестве действующих веществ флутиказона пропионат и салметерола ксинафоат. Флутиказона пропионат — это один из самых эффективных ингаляционных глюкокортикостероидов с благоприятным профилем безопасности [6], а салметерола ксинафоат считается одним из наиболее селективных агонистов β_2-адренорецепторов [7]. Два препарата обладают синергизмом действия, а эффективность терапии бронхиальной астмы комбинированным препаратом выше применения двух компонентов по отдельности [8].

На российском фармацевтическом рынке представлены только два препарата указанного состава: оригинальный Серетид (ГлаксоСмитКляйн Фармасьютикалз, Польша), зарегистрированный в 2000 г., прошедший клинические исследования и имеющий патентную защиту, и воспроизведенный аналог Тевакомб (Ципла ЛТД, Индия), зарегистрированный в 2010 г. Показатель «аэродинамическое распределение частиц», по которому сравнивали исследуемые препараты, определяет, в какие отделы дыхательных путей будут распределяться частицы аэрозоля после ингаляции препарата (табл. 1). Считается, что для оседания в легких и, соответственно, проявления надлежащего терапевтического эффекта размер частиц аэрозоля должен находиться в диапазоне от 1 до 5 мкм. Частицы с размерами ниже 5 мкм обычно относят к фракции мелкодисперсных частиц (ФМЧ). Для оценки аэродинамических характеристик исследуемых препаратов использовали импактор нового поколения Next (Copley Scientific Limited, Англия), который был разработан специально для задач фармацевтической индустрии и имеет ряд преимуществ перед другими импакторами, в частности он характеризуется низкими межступенчатыми потерями, удобным извлечением частиц аэрозоля с собирательных поверхностей, а также частичной автоматизацией процесса [9]. Прибор описан в ведущих фармакопеях [10, 11] и считается импактором выбора при анализе фармацевтических аэрозолей.

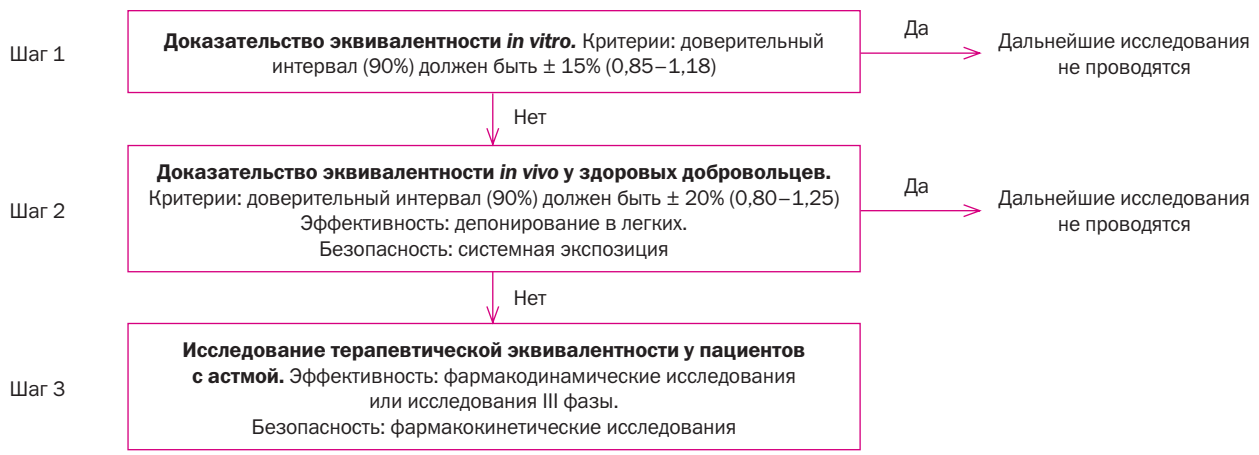
Таблица 1. Депонирование частиц аэрозоля в респираторном тракте в зависимости от диаметра частиц

Диаметр частиц	Область депонирования в дыхательном тракте
> 4,7	Ротоглотка
3,3–4,7	Трахея и главные бронхи
2,1–3,3	Вторичные бронхи
1,1–2,1	Терминальные бронхи
< 1,1	Альвеолы

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектами для исследования были следующие: *аэрозоль для ингаляций дозированный Серетид*. Действующие вещества: салметерола ксинафоат и флутиказона пропионат; производство ГлаксоСмитКляйн Фармасьютикалз,

Рис. 1. Алгоритм оценки эквивалентности ингаляционных препаратов



Польша. Состав: салметерола ксинафоат в пересчете на салметерол — 25 мкг/доза, флутиказона пропионат — 250 мкг/доза, 1,1,1,2-тетрафторэтан — до 75,0 мг/доза.

Аэрозоль для ингаляций дозированный Тевакомб. Действующие вещества: салметерола ксинафоат и флутиказона пропионат; производство Ципла Лтд., Индия. Состав: салметерола ксинафоат в пересчете на салметерол — 25 мкг/доза, флутиказона пропионат — 250 мкг/доза, этанол — 1,56 мг/доза, лецитин — 0,017 мг/доза, 1,1,1,2-тетрафторэтан — 76,4 мг/доза.

Анализ аэродинамических свойств испытуемых препаратов на импакторе проводился согласно методикам Европейской фармакопеи 6-го изд., раздел 2.9.18. «Ингаляционные препараты: оценка аэродинамических свойств мелкодисперсных частиц» [10], а также Фармакопеи США [11] (разделы 1151 «Фармацевтические формы — аэрозоли» и 601 «Аэрозоли, дозированные ингаляторы и ингаляторы сухого порошка»).

В качестве импакционного устройства использовали каскадный 7-ступенчатый импактор нового поколения Next. Скорость потока воздуха через импактор устанавливали на уровне 30 ± 1 л/мин. Время ввода дозы аэрозоля составляло 8 с. Количество активаций аэрозоля — 10 доз. Объем воздуха, проходящего за время ввода дозы, составлял 4 л. Собирательная поверхность не модифицировалась. В качестве растворителя для извлечения действующих веществ со ступеней использовался метанол. Для контроля наличия в системе критического потока фиксировали значение отношения P3/P2. К фракции мелкодисперсных частиц относили частицы с диаметром < 5 мкм. Испытания проводились для 6 образцов каждого из анализируемых препаратов.

Количественное определение концентрации действующих веществ исследуемых препаратов на ступенях импактора проводилось с использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии. За основу были взяты методики количественного анализа флутиказона пропионата и салметерола ксинафоата, описанные в Европейской фармакопее 6-го изд. [10].

Использовали стандартные образцы и реактивы соответствующей градации чистоты, отвечающие требованиям Европейской фармакопеи.

Обработку импакционных данных проводили с помощью программного обеспечения Copley Citdas version 2.00 (Copley Scientific Limited, Англия). Результаты обрабатывали статистически с использованием программного обеспечения Microsoft Excel 2002. Для статистической оценки было выбрано логарифмическое преобразование в качестве общепринятого и утвержденного метода [12], основанного на расчете доверительного интервала разницы двух средних. В руководстве EMA [4] в качестве достаточного критерия для подтверждения эквивалентности ингаляционных препаратов рекомендуется для каждой единичной ступени импактора определение доверительного интервала разницы средних, который должен составлять ± 15% (0,85–1,18), доверительная вероятность 90%.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты изучения аэродинамического распределения частиц испытуемых препаратов, а также основные показатели, характеризующие распределение, приведены в табл. 2–4.

ОБСУЖДЕНИЕ

Как видно из табл. 1, частицы размером более 5 мкм в основном осаждаются в ротоглотке. При моделировании вдоха с помощью импактора нового поколения такие частицы задерживаются на индукционном порте, а также на 1-й и 2-й ступенях импактора, на которых оседают частицы, имеющие средний минимальный аэродинамический диаметр более 5 мкм (табл. 5). Таким образом, считается, что на верхних ступенях импактора осаждается в основном нереспирабельная фракция частиц, ответственная в большей мере за безопасность и побочные эффекты препарата, чем за его эффективность. На 3–5-й ступенях импактора нового поколения задерживаются частицы размером от 1,36 до 6,4 мкм. Эта фракция частиц относится к респирабельной. Считается, что именно она отвечает за эффективное действие препарата при попадании в легкие. На нижних 6–7-й ступенях и собирательном фильтре накапливаются частицы размером менее 1,36 мкм. Такой размер соответствует частицам, которые оседают в альвеолах либо выдыхаются пациентом.

Таблица 2. Аэродинамическое распределение частиц флутиказона пропионата по отдельным ступеням импактора

Ступень импактора	Оригинальный ДАИ, мкг/доза	Воспроизведенный ДАИ, мкг/доза	D, мкг	Отношение	Нижний предел ДИ	Верхний предел ДИ	Эквивалентность
Индукционный порт	106,50	138,46	31,96	1,30	1,27	1,33	Нет
1	7,96	3,9	4,06	0,50	0,42	0,59	Нет
2	10,00	1,91	8,09	0,19	0,17	0,23	Нет
3	28,03	7,08	20,95	0,25	0,22	0,29	Нет
4	51,53	31,20	20,33	0,61	0,57	0,64	Нет
5	27,81	32,28	4,47	1,16	1,13	1,20	Да
6	5,91	11,00	5,09	1,86	1,81	1,92	Нет
7	1,13	2,74	1,61	2,42	2,35	2,49	Нет
Фильтр	0,36	0,92	0,56	2,60	2,41	2,79	Нет

Примечание. ДИ — доверительный интервал, ДАИ — дозированный аэрозольный ингалятор..

Таблица 3. Аэродинамическое распределение частиц салметерола ксинафоата по отдельным ступеням импактора

Ступень импактора	Оригинальный ДАИ, мкг/доза	Воспроизведенный ДАИ, мкг/доза	D, мкг	Отношение	Нижний предел ДИ	Верхний предел ДИ	Эквивалентность
Индукционный порт	9,97	12,32	2,35	1,24	1,21	1,26	Нет
1	0,81	0,34	0,47	0,43	0,36	0,51	Нет
2	1,03	0,15	0,88	0,15	0,13	0,18	Нет
3	2,85	0,53	2,32	0,19	0,17	0,21	Нет
4	4,98	2,46	2,52	0,49	0,46	0,53	Нет
5	2,35	3,01	0,66	1,28	1,21	1,35	Нет
6	0,45	1,22	0,77	2,69	2,60	2,78	Нет
7	0,09	0,35	0,26	3,77	3,65	3,89	Нет
Фильтр	0,03	0,12	0,09	3,74	3,51	3,99	Нет

Примечание. ДИ — доверительный интервал, ДАИ — дозированный аэрозольный ингалятор.

Таблица 4. Показатели, характеризующие распределение частиц действующих веществ в изучаемых дозированных аэрозолях (ДАИ)

Показатели	Салметерол		Флутиказон	
	Оригинальный ДАИ	Воспроизведенный ДАИ	Оригинальный ДАИ	Воспроизведенный ДАИ
Массмедианный аэродинамический диаметр частиц, мкм	3,5 ± 0,06	2,1 ± 0,07	3,4 ± 0,06	2,2 ± 0,07
Геометрическое стандартное отклонение от массмедианного диаметра	1,9 ± 0,02	1,7 ± 0,03	1,9 ± 0,03	1,7 ± 0,01
ФМЧ, %	42,06 ± 0,71	35,53 ± 0,64	42,94 ± 0,59	35,441 ± 0,71
Выпущенная доза (мкг)	23,46 ± 0,57	20,06 ± 0,64	250,05 ± 4,23	225,415 ± 5,23

Примечание. M ± SD, ДАИ — дозированный аэрозольный ингалятор, ФМЧ — фракции мелкодисперсных частиц.

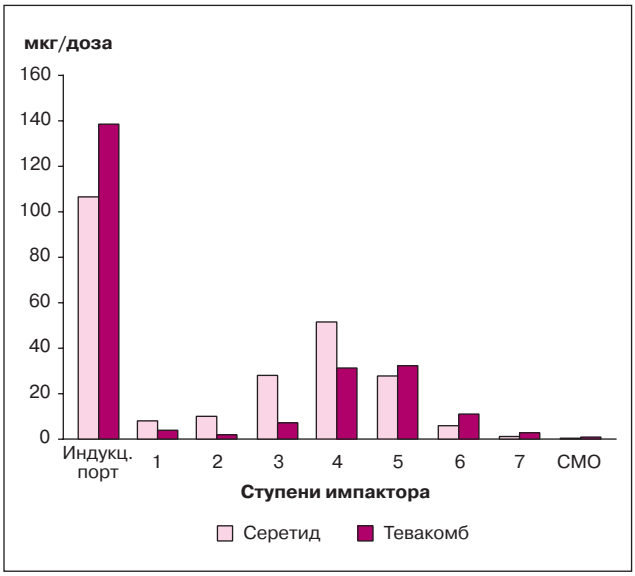
Таблица 5. Средний минимальный диаметр частиц, осаждающихся на каждой ступени импактора нового поколения Next (при 30 мл/мин) [10]

Ступень	1	2	3	4	5	6	7
Средний минимальный диаметр частиц, мкм	11,70	6,40	3,99	2,30	1,36	0,83	0,54

При анализе испытуемых препаратов было показано, что большая часть действующих веществ теряется в индукционном порте импактора. Причем при анализе распределения частиц флутиказона пропионата после ингаляции оригинального ДАИ эта фракция оказалась практически на 30% меньше, чем после ингаляции дженерика. В то же время количество частиц, осевших на ступенях импактора 1, 2, 3 и 4, после ингаляции оригинального ДАИ было значительно больше, чем после ингаляции воспроизведенного препарата (на 50, 19, 25 и 40%, соответственно). На 5–7-й ступенях ситуация меняется на противоположную, а значения масс частиц, осевших на каждой из ступеней, после ингаляции дженерика больше, чем после применения оригинального препарата.

Таким образом, сравнение данных по всем ступеням импактора показывает существенные отличия между испытуемыми препаратами (см. табл. 2 и 3, рис. 2). И если неэквивалентность на 1, 2, 6 и 7-й ступенях может быть обусловлена малыми абсолютными значениями, то различия на 3, 4 и 5-й ступенях импактора, которые считаются самыми значимыми и задерживают респирабельную фракцию частиц, подтверждают неэквивалентность препаратов.

Рис. 2. Профиль распределения частиц флутиказона пропионата на ступенях импактора нового поколения для испытуемых препаратов



Примечание. СМО — сборник с микроотверстиями.

Результаты статистической обработки, проведенной согласно рекомендациям EMA [4], также свидетельствуют о неэквивалентности аэродинамического распределения частиц исследуемых комбинированных аэрозолей. Лишь на одной стадии (5-я ступень, распределение флутиказона пропионата) доверительный интервал оказался в допустимом диапазоне 0,85–1,18, в остальных случаях найденные доверительные интервалы находились за его пределами (см. табл. 2, 3).

Как и ожидалось, различия между оригинальным и воспроизведенным препаратом подтвердились при определении таких параметров, как массмедианный аэродинамический диаметр частиц, характеризующий средний геометрический диаметр частиц аэрозоля, и геометрическое стандартное отклонение от массмедианного аэродинамического диаметра (см. табл. 4). Средний массмедианный аэродинамический диаметр при распределении действующих веществ воспроизведенного ДАИ составил 2,2/2,1 мкм (флутиказона пропионат/салметерол), а геометрическое стандартное отклонение от массмедианного аэродинамического диаметра — 1,7. Это значит, что 50% частиц имеют размер в диапазоне от 0 до 2,2/2,1 мкм (максимально), а 84,13% частиц — от 0 до 3,9/3,8 мкм (максимально). Средний массмедианный аэродинамический диаметр при распределении действующих веществ оригинального ДАИ составил 3,4/3,5 мкм (флутиказона пропионат/салметерол), а геометрическое стандартное отклонение от массмедианного аэродинамического диаметра — 1,9. Это означает, что 50% частиц имеют размер в диапазоне от 0 до 3,4/3,5 мкм (максимально), а 84,13% — от 0 до 5,3/5,4 мкм (максимально).

Одной из причин различий в аэродинамическом распределении частиц аэрозоля может быть состав изученных препаратов. В препарате Тевакомб, в отличие от Серетида, содержатся вспомогательные вещества лецитин, являющийся поверхностно-активным агентом, и этиловый спирт, использующийся как сорастворитель. Известно, что оба эти вещества, особенно этанол, способны существенно влиять на эффективность высвобождения аэрозоля. Так, например, этанол применяется для улучшения растворимости поверхностно-активных веществ и получения более стабильных суспензий во многих ингаляционных формах. H. Smyth и соавт. [13] изучали влияние концентрации этилового спирта на содержание действующего вещества в выпущенной дозе. Оказалось, что процентное содержание этанола менее 10% приводило к снижению дозирующей способности ингалятора, в то время как содержание спирта более 20% способствовало увеличению размера капель аэрозоля.

Аэродинамическое распределение частиц является одним из наиболее важных критериев, которые рекомендуется определять при изучении качества аэрозольных лекарственных средств, а также при проведении исследований на эквивалентность фармацевтических аэрозолей. Тест на аэродинамическое распределение частиц признается достаточно информативной моделью вдоха дозы аэрозольного препарата пациентом. Таким образом, результаты проведенного исследования продемонстрировали неэквивалентность *in vitro* изученных препаратов по данному показателю, что может обусловливать различия в их фармакологических эффектах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Федеральный закон Российской Федерации от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств».
2. EMEA, The rules governing medicinal products in the European Union. Investigation of Bioavailability and Bioequivalence. 1998; 3C: 231–244.
3. WorldHealth Organization, 1996, WHO Expert Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations: thirty-fourth report. *WHO Technical Report Series No. 863*, Geneva. 1996. P. 114–154.
4. European Medicines Agency (EMA), Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP): Guideline on the requirements for clinical documentation for orally inhaled products (OIP) including the requirements for demonstration of therapeutic equivalence between two inhaled products for use in the treatment of asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in adults and for treatment of asthma in children and adolescents. January 22, 2009. Available at: http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/ewp/415100enfin.pdf
5. Health Canada: Guidance to establish equivalent or relative potency of safety and efficacy of a second entry short-acting eta2-agonist metered dose inhaler (April 1999). Available at: http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/prodpharma/applicdemande/guide-ld/inhal-aerosol/mdi_bad-eng.php (Accessed August 3, 2011).
6. Derendorf H. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of inhaled corticosteroids in relation to efficacy and safety. *Respir. Med.* 1997; 91: 22–28.
7. Johnson M. The pharmacology of salmeterol. *Life Sciences*. 1993; 52: 2131–2143.
8. Elkout H. A retrospective observational study comparing rescue medication use in children on combined versus separate long-acting beta-agonists and corticosteroids. *Arch. Dis. Child.* 2010; 95 (10): 817–821.
9. Marple V., Roberts D., Romay F. Design of the next generation pharmaceutical impactor. *Drug Delivery to the Lungs*. 2000, 11, 127–130.
10. European Pharmacopoeia 5.0: Chapter 2.9.18. Preparations for inhalation: Aerodynamic assessment of fine particles.
11. United States Pharmacopiea: General Chapter < 601 > Aerosols, nasal sprays, metered dose inhalers and dry powder inhalers. *USP*. 34: 218.
12. Weda M., Geuns E., Vermeer R., Buiten N. et al. Equivalence testing and equivalence limits of metered dose inhalers and dry powder inhalers measured by in vitro impaction. *Eur. J. Pharm. Biopharm*. 2000; 49: 295–302.
13. Smyth H., Beck V., Williams D., Hickey A. The Influence of formulation and spacer device on the in vitro performance of solution chlorofluorocarbon-free propellant-driven metered dose inhalers. *AAPS PharmSciTech*. 2004; 5 (1): 235–241.