

<https://doi.org/10.30857/2786-5371.2023.6.9>

УДК 615.074:
616.72-002.78

¹ТАРАСЕНКО Г. В., ¹ГУРКОВСЬКА О. В., ²БАУЛА О. П., ¹САЛІЙ О. О.

¹Київський національний університет технологій та дизайну, Україна

²Міжнародне агентство професійних кваліфікацій, Україна

ОЦІНКА ЕКВІВАЛЕНТНОСТІ ІN VITRO ГЕНЕРИЧНОГО ЛІКАРСЬКОГО НА ОСНОВІ АЛОПУРІНОЛУ У ФОРМІ ТАБЛЕТОК

Мета. Вивчення кінетики розчинення твердої дозованої лікарської форми препарату на основі алопуринолу для оцінки його еквівалентності в умовах in vitro генеричного лікарського засобу у формі таблеток, порівняння фактору подібності профілів розчинення для оцінки еквівалентності генеричного препарату.

Методика. Досліджено фармацевтично еквівалентні препарат-генерик Алопуринол, таблетки по 100 мг, і референтний препарат Зілорик®, таблетки по 100 мг, фірми «Aspen Pharma GmbH», Німеччина. Аналітичні дослідження проводили методом адсорбційної спектрофотометрії на спектрофотометрі UV-1700 фірми «SHIMADZU» (Японія) та на приладі для розчинення твердих дозованих форм VK 7000 з нагрівачем VK750D (Vankel, США), також використовували аналітичні ваги BP 221S фірми «Sartorius» (Швейцарія), рН метр ADWA AD8000 (Угорщина). Вивчення кінетики розчинення проводили відповідно до вимог ДФУ 2.9.3 «Тест «Розчинення» для твердих дозованих форм», Настанови з дослідження біодоступності та біоеквівалентності, а також Керівництва ВООЗ в трьох буферних середовищах при значеннях рН: рН 1,2 (розчині хлористоводневої кислоти), рН 4,5 (ацетатний буферний розчин) та рН 6,8 (фосфатний буферний розчин). Буферні розчини готували згідно ДФУ (2.9.3). Умови проведення кінетики розчинення: прилад «Vankel VK 7000» із лопаттю; швидкість обертання лопаті – 50 об/хв; об'єм середовища розчинення – 900 мл; температура середовища розчинення – 37±1 °С. Відбір проб проводили через 10, 15, 20, 30 і 45 хв. ручним способом з використанням піпетки об'ємом 5 мл з ділянки посередині між поверхнею середовища розчинення і лопаттю на відстані 1 см від стінки ємкості для розчинення, а потім отримані проби фільтрували крізь шприцевий фільтр «Agilent» (0,45 мкм). Після відбору проб відібраний об'єм компенсували відповідним середовищем розчинення та контролювали рН буферних розчинів. Статистичну обробку результатів проводили з використанням програми Microsoft Office Excel з достовірністю P=95%, а для отримання статистично достовірних результатів визначення проводили на 12 зразках кожного з об'єктів дослідження.

Результати. Проведено оцінку еквівалентності генеричного лікарського засобу на основі алопуринолу 100 мг у формі таблеток шляхом вивчення кінетики розчинення за процедурою біоверифікації відповідно до вимог Настанови СТ-Н МОЗУ 42-7.4:2022 «Лікарські засоби. Дослідження біоеквівалентності» та рекомендацій ВООЗ. Встановлено, що в середовищі з рН 1,2 (хлористоводнева кислота) вивільнення діючої речовини із досліджуваного препарату за 15 хв. становило 94,37%, а в середовищі з рН 4,5 (ацетатний буферний розчин) та з рН 6,8 (фосфатний буферний розчин) вивільнення діючої речовини становило 64,66% та 84,17% відповідно, отже, кінетичні криві розчинення (профілі розчинення) генеричного та референтного препаратів в досліджуваних середовищах подібні, а лікарські засоби є «швидко розчинними». Фактори подібності профілів розчинення генеричного препарату при рН 1,2; 4,5 та 6,8 становили 61,12, 58,25 та 91,07 – відповідно, що дозволило підтвердити подібність профілів розчинення до референтного препарату оскільки фактору подібності $f_2 > 50$.

Наукова новизна. Вперше проведено оцінку еквівалентності in vitro генеричного лікарського засобу на основі алопуринолу у формі таблеток та підтверджено подібність профілів розчинення за процедурою біоверифікації.

Практична значимість. Еквівалентність генеричного та референтного препаратів на основі алопуринолу підтверджено шляхом вивчення кінетики вивільнення діючої речовини та порівняння подібності профілів генеричного та референтного препаратів in vitro. Отримані результати дозволяють підтвердити еквівалентність досліджуваних препаратів без проведення досліджень біоеквівалентності in vivo.

Ключові слова: алопуринол; біоверифікація; кінетика розчинення; in vitro; метод адсорбційної спектрофотометрії; таблетки.

Вступ. Щороку захворюваність населення світу на подагру неухильно зростає. Серед населення країн Європи на подагру хворіють близько 3%, в США – кількість хворих становить близько 5%, а на гіперурикемію – близько 20%. В Україні поширеність захворювання на сольові артропатії залишається на високому рівні протягом останніх років – близько 3% дорослого населення, переважно з яких є чоловіки після 30 років, проте як жінки на подагру чи гіперурикемію страждають значно рідше – до 8% від усіх випадків подагри. Фармацевтична розробка якісних, безпечних та ефективних генеричних лікарських засобів для лікування подагри вітчизняного виробництва з метою для задоволення потреб пацієнтів і розширення асортименту препаратів на фармацевтичного ринку є важливою та актуальною.

Алопуринол є препаратом для зниження концентрації сечової кислоти, і зазвичай призначається для лікування хронічної подагри або гіперурикемії, пов'язаної з лейкемією, променевою терапією та протипухлинними засобами. Алопуринол та його активний метаболіт оксипуринол (алоксантин) діють шляхом інгібування ксантиноксидази, ферменту, який утворює сечову кислоту (урати) з ксантину та гіпоксантину [1].

Постановка завдання. На даний час при розробці генеричних препаратів у твердих лікарських формах загальноприйнятим є визначення терапевтичної еквівалентності на основі фармакокінетичних досліджень (біоеквівалентності). Порівняння профілю розчинення за процедурою біоетейвер має вирішальну роль при прийнятті рішення щодо доведення еквівалентності генеричного лікарського засобу до референтного препарату [2].

В роботі проведено оцінку еквівалентності генеричного лікарського засобу на основі алопуринолу у формі таблеток по 100 мг з використанням тесту «Розчинення» за процедурою біоетейвер. Підтвердження біоеквівалентності генеричного препарату референтному базувалися на результатах трьох основних визначень: 1) розчинність діючої речовини, 2) ступінь проникності діючої речовини, 3) профілі розчинення готового лікарського засобу.

Результати досліджень. Відповідно до Біофармацевтичної системи класифікації (БСК) алопуринол відноситься до I класу, тобто до речовин з високою біофармацевтичною розчинністю та високим ступенем проникнення [3, 4].

Випробування на розчинення, яке проводили відповідно до вимог ДФУ 2.9.3 «Тест «Розчинення» для твердих дозованих форм» [5], має важливу роль при проведенні фармацевтичної розробки лікарських засобів з біологічної точки зору, а також для оцінки якості лікарських засобів для перорального застосування. З біологічної точки зору, активний фармацевтичний інгредієнт повинен пройти сольобілізацію, розчинення в шлунково-кишкових рідинах, перш ніж він почне всмоктуватися. Таким чином, відповідність розчинення генеричного препарату з референтним продуктом є надзвичайно важливою для підтвердження біоеквівалентності та терапевтичної еквівалентності з референтним препаратом [6].

З точки зору якості, під час розробки продукту розчинення *in vitro* використовується як інструмент для оптимізації рецептури для отримання бажаного вивільнення, під час стабільності для оцінки ефективності продукту, для моніторингу якості лікарського засобу.

Для прийняття рішення стосовно рекомендації до реєстрації генеричного лікарського засобу за процедурою біоетейвер необхідно враховувати наступні фактори [7, 8]:

- 1) розчинність та ступінь проникнення діючої речовини;
- 2) профілі розчинення генеричного та референтного препаратів у середовищах розчинення при pH 1,2, 4,5 та 6,8;
- 3) властивості допоміжних речовин, що входять до складу лікарського засобу;
- 4) всі можливі ризики щодо прийняття помилкових рішень на основі результатів процедури біоетейвера з урахуванням випадків доведення біоеквівалентності шляхом проведення дослідження *in vivo*.

Визначення кількісного вмісту алопуринолу, який перейшов у розчин, проводили методом адсорбційної спектрофотометрії в ультрафіолетовій області при довжини хвилі 250 нм з використанням кювети товщиною 1 см.

Для побудови калібрувальних графіків готували серію еталонних розчинів фармакопейних стандартних зразків (ФСЗ) алопуринолу з концентраціями 2, 4, 6, 8 і 10 мкг/мл та проводили вимірювання оптичної густини, використовуючи метод адсорбційної спектрофотометрії в ультрафіолетовій області поглинання при 250 нм. Калібрувальні графіки ФСЗ алопуринолу у середовищах розчинення при рН 1,2; 4,5 та 6,8 наведені на рис. 1–3.

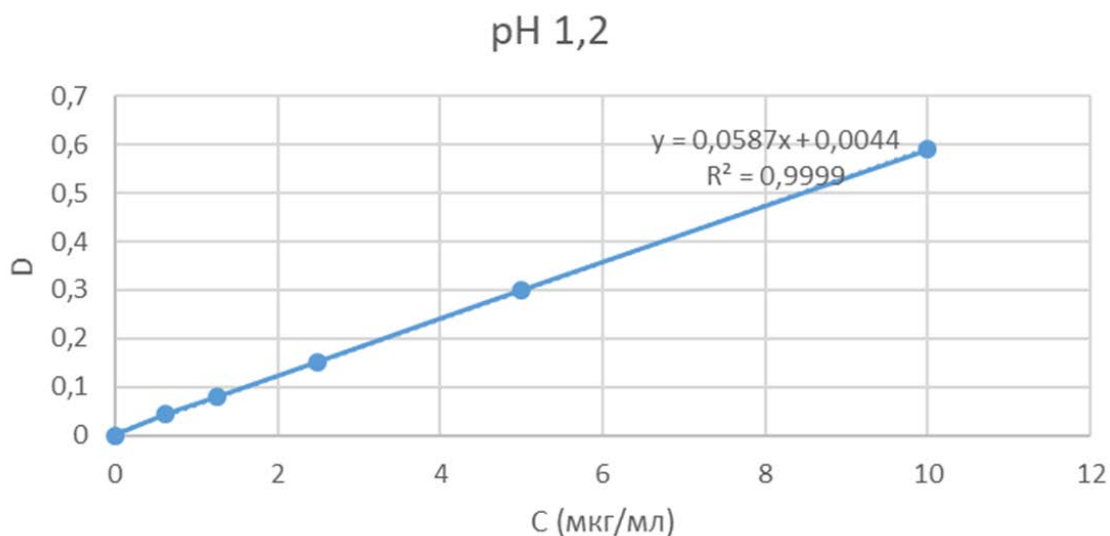


Рис. 1. Калібрувальний графік алопуринолу при рН 1,2

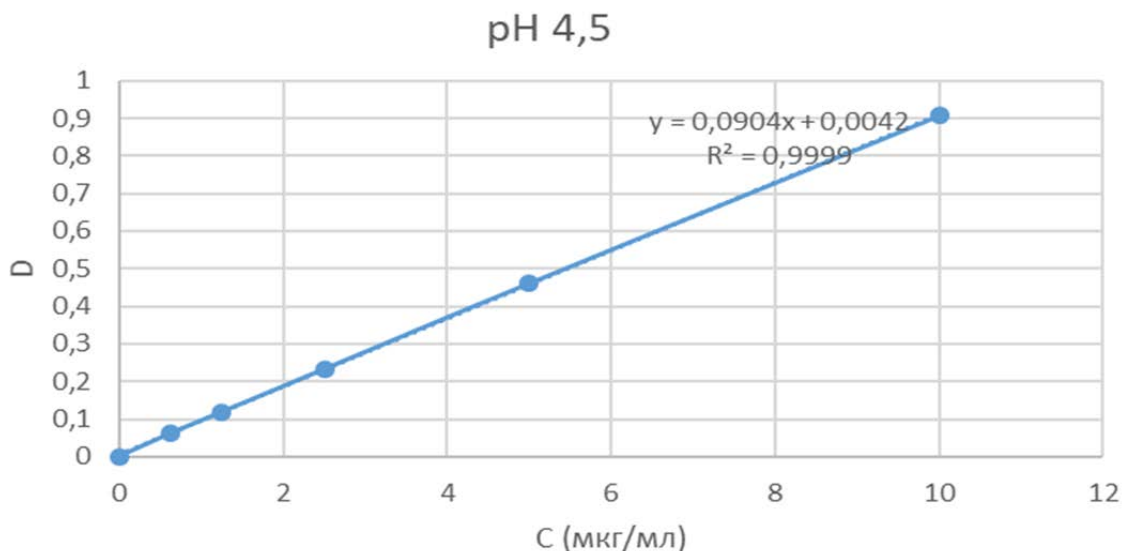


Рис. 2. Калібрувальний графік алопуринолу при рН 4,5

Кінетичні криві розчинення алопуринолу для генеричного препарату, таблетки по 100 мг і референтного препарату «Зілорик®», таблетки по 100 мг, в трьох середовищах розчинення наведені на рис. 4–6.

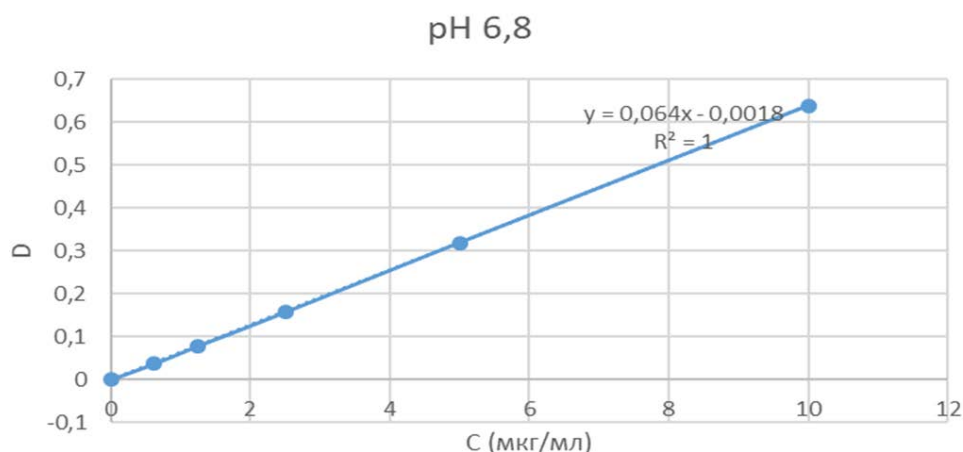


Рис. 3. Калібрувальний графік алопуринолу при pH 6,8

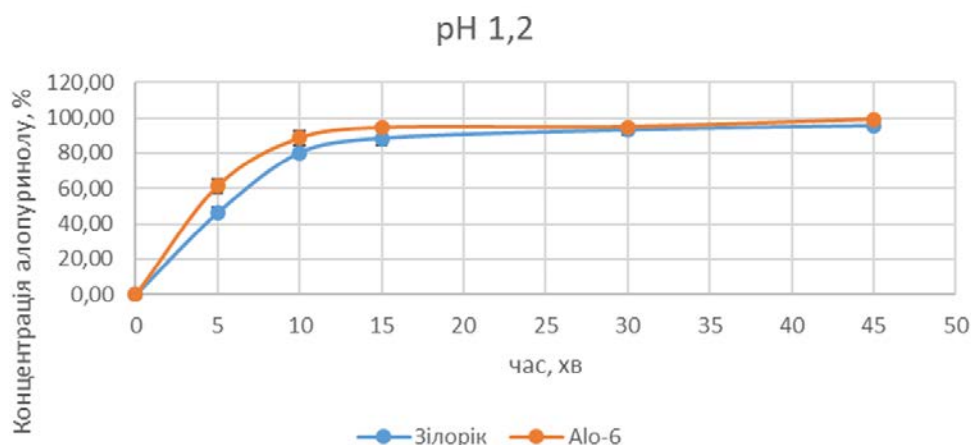


Рис. 4. Профілі розчинення досліджуваного препарату Алопуринол, таблетки по 100 мг і референтного препарату «Зілорик®», таблетки по 100 мг в середовищі з хлористоводневою кислотою pH 1,2 (n = 12)

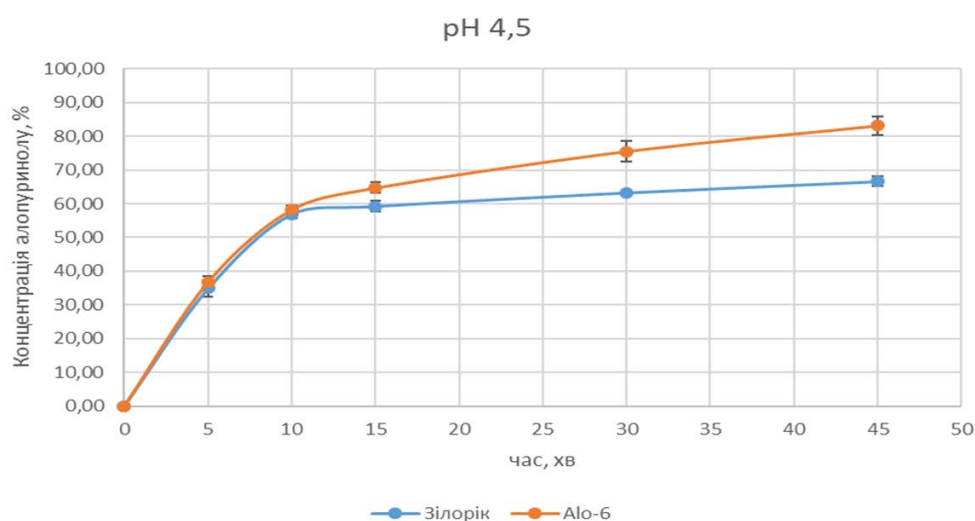


Рис. 5. Профілі розчинення досліджуваного препарату Алопуринол, таблетки по 100 мг і референтного препарату «Зілорик®», таблетки по 100 мг в середовищі ацетатного буферного розчину pH 4,5 (n = 12)

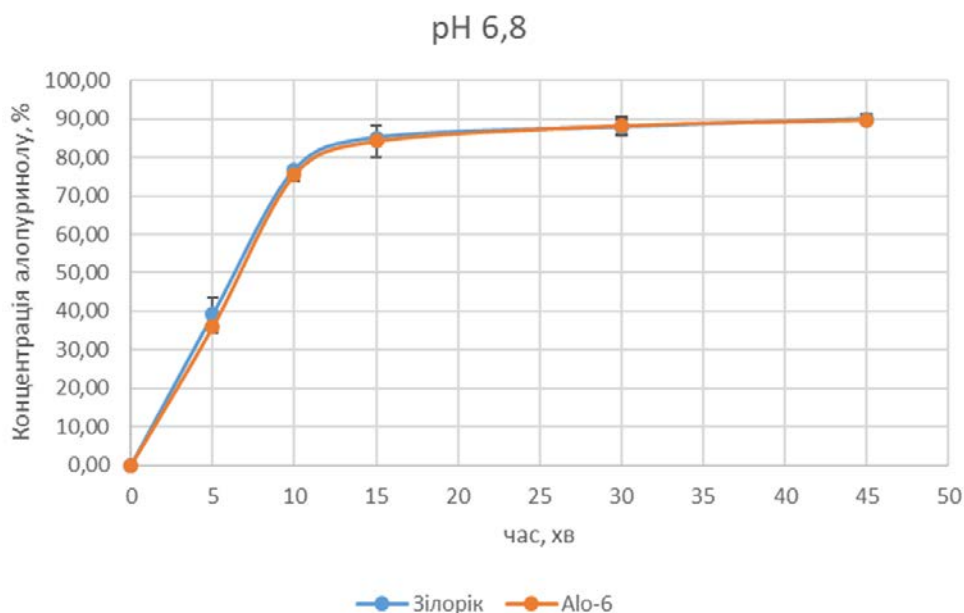


Рис. 6. Профілі розчинення досліджуваного препарату Алопуринол, таблетки по 100 мг і референтного препарату «Зілорик®», таблетки по 100 мг в середовищі фосфатного буферного розчину pH 6,8 (n = 12).

На підставі отриманих нами даних було встановлено, що для досліджуваних препаратів у всіх досліджуваних середовищах розчинення (pH 1,2, 4,5 і 6,8) спостерігається подібність профілів розчинення. В середовищі з хлористоводневою кислотою pH 1,2 і в середовищі з фосфатним буферним розчином pH 6,8 за перші 15 хв більше 85% діючої речовини переходить у розчин, отже, кінетичні криві розчинення (профілі розчинення) для даних препаратів в цих середовищах подібні, а препарати за визначенням є «дуже швидко розчинними» (рис. 4 та рис. 6).

Відповідно до критеріїв, що наведені у Настанові СТ-Н МОЗУ 42-7.4:2022 «Лікарські засоби. Дослідження біоеквівалентності» [6], вважається, що ЛЗ дуже швидко вивільняється якщо $\geq 85\%$ препарату розчиняється за ≤ 15 хвилин, що відповідає періоду напіввиведення з шлунка ($T_{50\%}$) у в умовах голодування і вважається швидким вивільненням якщо $\geq 85\%$ препарату розчиняється за 30 хвилин. Аналіз одержаних результатів показує, що при pH 1,2 вивільнення діючої речовини із зразку Alo-6 становило 94,37% за 15 хвилин, при pH 4,5 та 6,8 – відповідно 64,66% і 84,17%. Таким чином було підтверджено, що досліджуваний зразок відповідає встановленим критеріям щодо можливості застосування процедури біоетейвер для підтвердження еквівалентності.

Подібність профілів розчинення референтного зразку з профілем розчинення референтного препарату «Зілорик®», таблетки по 100 мг, оцінювали за значенням фактору подібності (f_2), який розраховували за формулою:

$$f_2 = 50 \times \log \left[\frac{100}{\sqrt{1 + \frac{\sum_{t=1}^{t=n} [R(t) - T(t)]^2}{n}}} \right], \quad (1)$$

де f_2 – фактор подібності;

n – кількість точок контролю;

R (t) – середнє значення кількісного вмісту алопуринолу, яке перейшло в розчин в кожній вказаній точці відбору, при дослідженні референтного препарату (у %);

$T(t)$ – середнє значення кількісного вмісту алопуринолу, яке перейшло у розчин в кожній вказаній точці відбору, при дослідженні випробовуваного зразку генеричного ЛЗ (у %).

Профілі розчинення можна вважати подібними у випадку, якщо значення фактору подібності знаходиться в межах $50 \leq f_2 \leq 100$.

За результатами проведених розрахунків було встановлено, що фактори подібності профілів розчинення (f_2) становили для досліджуваних препаратів при рН 1,2 $f_2 = 61,12$; при рН 4,5 $f_2 = 58,25$; при рН 6,8 $f_2 = 91,07$. Як видно з одержаних результатів, всі досліджувані зразки мали значення фактору подібності вище 50, що дозволяє підтвердити подібність профілів розчинення до референтного препарату.

Суттєвий вплив на вивільнення алопуринолу з досліджуваного препарату мають якісний і кількісний склад та характеристики допоміжних речовин, а також параметри проведення технологічного процесу одержання таблеток. Можна припустити, що застосування в якості дезінтегранта та розпушувача у складі досліджуваного препарату кросповідону призвело до покращення показників вивільнення алопуринолу при рН 1,2 та рН 4,5 при порівнянні з референтним препаратом. Введення до складу твердих лікарських форм кросповідону призводить до поліпшення та збільшення швидкості розчинення за рахунок адсорбції діючих речовин на частках кросповідону.

Висновки. В результаті проведених досліджень встановлено, що результати вивчення кінетики розчинення в трьох середовищах при рН 1,2; рН 4,5 та рН 6,8 дозволяють підтвердити еквівалентність профілів розчинення *in vitro* за процедурою біоєквівалентності досліджуваного препарату Алопуринол, таблетки по 100 мг, і референтного препарату «Зілорик®», таблетки по 100 мг, фірми «Aspen Pharma GmbH», Німеччина.

References

1. Helmy, S. A., El-Bedaiwy, H. M. (2014). Pharmacokinetics and Comparative Bioavailability of Allopurinol Formulations in Healthy Subjects. *Clinical Pharmacology in Drug Development*, 3(5), 353–357. <https://doi.org/10.1002/cpdd.95>.
2. ICH: M9 Biopharmaceutics Classification System-Based Biowaivers Guidance for Industry. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, May 2021. URL: <https://www.fda.gov/media/148472/download#:~:text=The%20BCS%2Dbased%20biowaiver%20is,based%20biowaiver%20in%20this%20guidance>.
3. Therapeutic System Research Laboratories. Biopharmaceutics Classification System (BCS) Results. URL: <http://166.78.14.201/tsrlinc.com/services/bcs/results.cfm>.
4. Holovenko, M. Ya., Baula, O. P., Borysyuk, I. Yu. (2010). Biofarmatsevychna klasyfikatsiyna systema [Biopharmaceutical classification system]. Kyiv: Avitsena. 2010. 299 p. [in Ukrainian].
5. State enterprise "Ukrainian Scientific Pharmacopoeia Center for the Quality of Medicinal Products" (2015). Derzhavna Farmakopeya Ukrainy: v 3 t. [State Pharmacopoeia of Ukraine: in 3 vols]. 2nd ed. Kharkiv: Derzhavne pidpryyemstvo "Ukrayinskyy naukovyy

Література

1. Helmy S. A., El-Bedaiwy H. M. Pharmacokinetics and Comparative Bioavailability of Allopurinol Formulations in Healthy Subjects. *Clinical Pharmacology in Drug Development*. 2014. No. 3(5). P. 353–357. <https://doi.org/10.1002/cpdd.95>.
2. ICH: M9 Biopharmaceutics Classification System-Based Biowaivers Guidance for Industry. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, May 2021. URL: <https://www.fda.gov/media/148472/download#:~:text=The%20BCS%2Dbased%20biowaiver%20is,based%20biowaiver%20in%20this%20guidance>.
3. Therapeutic System Research Laboratories. Biopharmaceutics Classification System (BCS) Results. URL: <http://166.78.14.201/tsrlinc.com/services/bcs/results.cfm>.
4. Головенко М. Я., Баула О. П., Борисюк І. Ю. Біофармацевтична класифікаційна система. К.: Авіцена. 2010. 299 с.
5. Державна Фармакопея України: в 3 т. 2-е вид. Харків: Державне підприємство "Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів", 2015. Т. 1. 1128 с.

farmakopeyny tsestr yakosti likarskykh zasobiv". Vol. 1. 1128 p. [in Ukrainian].

6. Sivacharan, K., Rajkumar, B., Tausif, A., Siddharth, C. (2022). Simplified Model-Dependent and Model-Independent Approaches for Dissolution Profile Comparison for Oral Products: Regulatory Perspective for Generic Product Development. *AAPS PharmSciTech*, 23, Article number: 53. URL: <https://link.springer.com/article/10.1208/s12249-021-02203-7>.

7. СТ-Н МОЗУ 42-7.4:2022 Лікарські засоби. Дослідження біоеквівалентності [СТ-Н МОЗУ 42-7.4:2022 Medicinal products. Bioequivalence studies]. Kyiv: Ministry of Health of Ukraine, 2022. 87 p. URL: <https://www.dec.gov.ua/wp-content/uploads/2022/12/nastanova-z-bioekvivalentnosti-st-n-mozu-42-7.42022.pdf> [in Ukrainian].

8. Who Expert Committee On Specifications For Pharmaceutical Preparations, Who Technical Report Series 937, Fortieth Report, Geneva. URL: http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_937_eng.pdf.

6. Sivacharan K., Rajkumar B., Tausif A., Siddharth C. Simplified Model-Dependent and Model-Independent Approaches for Dissolution Profile Comparison for Oral Products: Regulatory Perspective for Generic Product Development. *AAPS PharmSciTech*. 2022. 23. Article number: 53. URL: <https://link.springer.com/article/10.1208/s12249-021-02203-7>.

7. СТ-Н МОЗУ 42-7.4:2022 Лікарські засоби. Дослідження біоеквівалентності. Київ: Міністерство охорони здоров'я України, 2022. 87 с. URL: <https://www.dec.gov.ua/wp-content/uploads/2022/12/nastanova-z-bioekvivalentnosti-st-n-mozu-42-7.42022.pdf>.

8. Who Expert Committee On Specifications For Pharmaceutical Preparations, Who Technical Report Series 937, Fortieth Report, Geneva. URL: http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_937_eng.pdf.

TARASENKO HANNA

Candidate of Technical Science, Associate Professor,
Department of Industrial Pharmacy,
Kyiv National University of Technologies
and Design, Ukraine
<https://orcid.org/0000-0002-0995-7322>
Scopus Author ID: 58032095000
ResearcherID: JHT-0528-2023
E-mail: tarasenko.gv@knuutd.com.ua

BAULA OLGA

Candidate of Chemical Science, Professor,
International Agency of Professional
Qualifications, Ukraine
<https://orcid.org/0000-0003-4305-6517>
Scopus Author ID: 57193357927
E-mail: baulapharma@gmail.com

HURKOVSKA OLENA

Master's student,
Department of Industrial Pharmacy,
Kyiv National University of Technologies
and Design, Ukraine
E-mail: 13lena14@ukr.net

SALIY OLENA

Candidate of Pharmacy, Associate Professor,
Department of Industrial Pharmacy,
Kyiv National University of Technologies
and Design, Ukraine
<https://orcid.org/0000-0001-7103-2083>
Scopus Author ID: 57219560195
ResearchGateID: AAC-5721-2019
E-mail: saliy.oo@knuutd.edu.ua

¹TARASENKO H. V., ¹HURKOVSKA O. V., ²BAULA O. P., ¹SALIY O. O.

¹Kyiv National University of Technologies and Design, Ukraine

²International Agency of Professional Qualifications, Ukraine

**ASSESSMENT OF IN VITRO EQUIVALENCE OF GENERIC DRUG BASED
ON ALLOPURINOL IN TABLET FORM**

Purpose. To study the dissolution kinetics of allopurinol-based solid dosage form and assess its equivalence under in vitro conditions compared to the generics medicinal product; to compare the similarity factor of dissolution profiles and evaluate the equivalence of the generic drug.

Methodology: The pharmaceutical equivalence of the generic brand Allopurinol, 100 mg tablets, and the reference product Zyloric®, 100 mg tablets, by "Aspen Pharma GmbH" in Germany, was investigated. Analytical studies were conducted using the adsorption spectrophotometry method on a UV-1700 spectrophotometer "SHIMADZU" (Japan) and VK 7000 dissolution apparatus with a VK750D heater Vankel (USA). Analytical balances VR 221S from "Sartorius" (Switzerland) were utilized, along with a pH meter ADWA AD8000 (Hungary). Dissolution kinetics studies were carried out in accordance with the requirements of the State Pharmacopoeia of Ukraine (SPhU) 2.9.3 "Dissolution Test for Solid Dosage Forms, Guidelines on Bioavailability and Bioequivalence Studies, and WHO Guidelines. The studies were conducted in three buffer solutions at pH values of 1.2 (hydrochloric acid solution), 4.5 (acetate buffer solution), and 6.8 (phosphate buffer solution). Buffer solutions were prepared according to SPhU (2.9.3). The dissolution kinetics were conducted under specific conditions using the Vankel VK 7000 apparatus with a paddle (rotation speed 50 rpm), the dissolution medium volume at 900 ml and the dissolution medium temperature at $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Samples was withdrawn manually using a 5 ml pipette from a zone midway between the surface of the dissolution medium and the rotating paddle 1 cm away from the vessel wall, at time intervals of 10, 15, 20, 30, and 45 minutes. Collected samples were subsequently filtered through an "Agilent" syringe filter ($0.45 \mu\text{m}$). After sample collection, the withdrawn volume was adjusted with the corresponding dissolution medium, and the pH of buffer solutions was monitored. Statistical analysis of the results was performed using Microsoft Office Excel with a confidence level of $P=95\%$. To ensure statistically reliable results, the determination was conducted on 12 samples for each of the investigated objects.

Findings. The equivalence assessment of the generic allopurinol-based drug in tablet form 100 mg was conducted by studying the dissolution kinetics through the "Biowaiver" procedure in accordance with the requirements of the ST-N MOZU 42-7.4:2022 "Medicinal Products. Bioequivalence Studies" and WHO recommendations. It was found that in a medium with pH 1.2 (hydrochloric acid), the release fraction of the active substance from the analyzed drug was 94.37% within a 15-minute timeframe. Additionally, in the medium with pH 4.5 (acetate buffer solution) and pH 6.8 (phosphate buffer solution), the release fraction of the active substance was 64.66% and 84.17%, respectively. Thus, the dissolution kinetic curves (dissolution profiles) of the generic and reference drugs in the investigated media were similar, and the medicinal products were considered "rapid". The similarity factors of dissolution profiles for the generic drug at pH 1.2, 4.5, and 6.8 were 61.12, 58.25, and 91.07, respectively, confirming the similarity of dissolution profiles to the reference drug since the similarity factor $f_2 > 50$.

Originality. The equivalence assessment of the generic allopurinol-based drug in tablet form was conducted in vitro for the first time, confirming the similarity of dissolution profiles through the "Biowaiver" procedure.

Practical value. Equivalence of the generic and reference allopurinol-based drugs has been confirmed through the study of the release kinetics of the active substance and the comparison of dissolution profiles in vitro. The obtained results allow to confirm the equivalence of the investigated drugs without the need for in vivo bioequivalence studies.

Keywords: allopurinol; biowaver; dissolution kinetics; in vitro; method of adsorption spectrophotometry; tablets.