

**Volume 10, No. 2 2020**

**ISSN 1991-2919 (Print)**

**ISSN 2619-1172 (Online)**

# **ВЕДОМОСТИ**

## **НАУЧНОГО ЦЕНТРА ЭКСПЕРТИЗЫ СРЕДСТВ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ**

**THE BULLETIN OF THE SCIENTIFIC CENTRE  
FOR EXPERT EVALUATION OF MEDICINAL PRODUCTS**

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

**Том 10, №2 2020**

Журнал индексируется в российских и международных реферативных и индексных базах данных: Chemical Abstracts (CAS), Российский индекс научного цитирования (РИНЦ), его архив включен в базы крупнейших агрегаторов научных ресурсов и библиотек EBSCO, WorldCat, DOAJ, Российская государственная библиотека, Академия Google (Google Scholar), КиберЛенинка и др.

Журнал входит в перечень ведущих периодических изданий Высшей аттестационной комиссии при Министерстве образования и науки, рекомендуемых для опубликования основных научных результатов диссертации на соискание ученой степени кандидата и доктора наук.

Пятилетний импакт-фактор РИНЦ – 0,403.

К публикации принимаются статьи, подготовленные в соответствии с правилами для авторов, размещенными на сайте журнала [www.vedomostinicesmp.ru](http://www.vedomostinicesmp.ru).

Все статьи проходят рецензирование не менее чем двумя рецензентами. Используется модель двойного слепого рецензирования.

Плата за публикацию статьи и рецензирование рукописи не взимается. Ускоренная публикация не допускается.

Материалы заочных конференций не публикуются.

Воспроизведение или использование другим способом любой части издания без согласия редакции является незаконным и влечет за собой ответственность, установленную действующим законодательством Российской Федерации.

# ВЕДОМОСТИ

НАУЧНОГО ЦЕНТРА ЭКСПЕРТИЗЫ  
СРЕДСТВ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

**Рецензируемый научно-практический журнал**

Выходит четыре раза в год

Основан в **2005** году

Главный редактор доктор медицинских наук Ю. В. Олефир

Москва

«Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения» – рецензируемый научно-практический журнал ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России. Основан в 2005 г. В журнале освещаются передовые достижения по вопросам стандартизации и оценки качества лекарственных препаратов различных групп, разработки и совершенствования методик фармацевтического анализа, методологии экспертизы лекарственных средств, в том числе по установлению их взаимозаменяемости, обсуждаются новые высокотехнологичные методы доклинических и клинических исследований лекарственных средств, рассматриваются актуальные проблемы фармакологии, клинической медицины, вопросы рационального применения лекарственных препаратов на основе принципов персонализированной терапии.

К публикации в журнале принимаются обзорные и оригинальные статьи, краткие сообщения, методические материалы, тематика которых соответствует фармацевтическим и медицинским отраслям науки и следующим научным специальностям:

- 14.04.02 Фармацевтическая химия, фармакогнозия, 14.04.01 Технология получения лекарств;
- 14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология;
- 14.01.01 Акушерство и гинекология, 14.01.02 Эндокринология, 14.01.05 Кардиология, 14.01.06 Психиатрия, 14.01.09 Инфекционные болезни, 14.01.11 Нервные болезни, 14.01.12 Онкология, 14.01.22 Ревматология, 14.01.28 Гастроэнтерология.

#### РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Олефир Юрий Витальевич, главный редактор, д-р мед. наук, старший научный сотрудник, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Романов Борис Константинович, заместитель главного редактора, д-р мед. наук, доцент, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Корсун Лилия Владимировна, ответственный секретарь, канд. биол. наук, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Агатонович-Куштрин Снежана, д-р фарм. наук, проф., Университет Ла Троба (Бендиго, Австралия)

Аляутдин Ренат Николаевич, д-р мед. наук, проф., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Горячев Дмитрий Владимирович, д-р мед. наук, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Дурнев Андрей Дмитриевич, член-корр. РАН, д-р мед. наук, проф., НИИ фармакологии им. В. В. Закусова (Москва, Россия)

Иванов Максим Борисович, д-р мед. наук, Институт токсикологии (Санкт-Петербург, Россия)

Киселева Нина Михайловна, д-р биол. наук, проф., РНИМУ им. Н.И. Пирогова (Москва, Россия)

Ковалева Елена Леонардовна, д-р фарм. наук, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Алешкин Владимир Андрианович, д-р биол. наук, проф., МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского (Москва, Россия)

Бобизода Гуломқодир Мукамал, д-р биол. наук, д-р фарм. наук, проф., ТГПУ им. С. Айни (Душанбе, Республика Таджикистан)

Борисевич Игорь Владимирович, д-р мед. наук, проф., ФГБУ «ЦСП» Минздрава России (Москва, Россия)

Бунятян Наталья Дмитриевна, д-р фарм. наук, проф., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Звартау Эдвин Эдуардович, д-р мед. наук, проф., Первый СПбГМУ им. И. П. Павлова (Санкт-Петербург, Россия)

Калиничев Сергей Анатольевич, редактор, канд. фарм. наук, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Губарева Ольга Николаевна, редактор перевода, канд. филол. наук, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Макарова Марина Николаевна, д-р мед. наук, НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ» (Ленинградская область, Россия)

Ордабаева Сауле Кутымовна, д-р фарм. наук, проф., Южно-Казахстанская медицинская академия (Шымкент, Республика Казахстан)

Прокофьев Алексей Борисович, д-р мед. наук, проф., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Прокофьева Вера Ивановна, д-р фарм. наук, проф., Первый МГМУ им. И. М. Сеченова (Москва, Россия)

Пятигорская Наталья Валерьевна, д-р фарм. наук, проф., Первый МГМУ им. И. М. Сеченова (Москва, Россия)

Саканян Елена Ивановна, д-р фарм. наук, проф., АО НПО «Микроген» (Москва, Россия)

Сюбаев Рашид Даутович, д-р мед. наук, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Сычев Дмитрий Алексеевич, член-корр. РАН, д-р мед. наук, проф., РМАНПО (Москва, Россия)

Титова Анна Васильевна, д-р фарм. наук, ФГБУ «ИМЦЭУАОСМП» Росздравнадзора (Москва, Россия)

Ягудина Роза Исмаиловна, д-р фарм. наук, проф., Первый МГМУ им. И. М. Сеченова (Москва, Россия)

Якушева Елена Николаевна, д-р мед. наук, проф., РязГМУ (Рязань, Россия)

#### РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Меркулов Вадим Анатольевич, д-р мед. наук, проф., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Лепакхин Владимир Константинович, член-корр. РАН, д-р мед. наук, проф., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Петров Владимир Иванович, академик РАН, д-р мед. наук, проф., ВолгГМУ (Волгоград, Россия)

Хохлов Александр Леонидович, д-р мед. наук, проф., ЯГМУ (Ярославль, Россия)

Шимановский Николай Львович, член-корр. РАН, д-р мед. наук, проф., РНИМУ им. Н. И. Пирогова (Москва, Россия)

Яворский Александр Николаевич, д-р мед. наук, проф., ПушГЕНИ (Пушино, Россия)

#### РЕДАКЦИЯ

Молчан Нина Валерьевна, научный редактор, канд. фарм. наук, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Хрущева Мария Леонидовна, научный редактор, канд. хим. наук, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

“The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products” is a peer-reviewed journal covering topics related to applied sciences, which is published by the Federal State Budgetary Institution “Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products” of the Ministry of Health of the Russian Federation. The journal was founded in 2005. It covers the latest achievements in standardisation and quality control of various groups of medicines, development and improvement of pharmaceutical test methods, approaches to medicine quality evaluation, including approaches to establishment of medicine interchangeability. The journal discusses new high-tech methods used in pre-clinical and clinical studies, current pharmacological and clinical medicine issues, rational use of drugs based on personalised medicine principles.

The journal publishes original research articles, reviews, brief communications, and methodical approaches pertaining to one of the pharmaceutical and medical branches of science and following specialist fields:

- 14.04.02 Pharmaceutical chemistry, pharmacognosy, 14.04.01 Formulation of medicines;
- 14.03.06 Pharmacology, clinical pharmacology;
- 14.01.01 Obstetrics and gynaecology, 14.01.02 Endocrinology, 14.01.05 Cardiology, 14.01.06 Psychiatry, 14.01.09 Infectious diseases, 14.01.11 Nervous diseases, 14.01.12 Oncology, 14.01.22 Rheumatology, 14.01.28 Gastroenterology.

#### EDITORIAL BOARD

Yuri V. Olefir, Editor-in-chief, Dr. Sci. (Med.), Senior Research Associate, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Boris K. Romanov, Deputy Editor-in-chief, Dr. Sci. (Med.), Assoc. Prof., Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Lilia V. Korsun, Executive Editor, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Snezana Agatonovic-Kustrin, Dr. Sci. (Pharm.), Prof., La Trobe University (Bendigo, Australia)

Renad N. Alyautdin, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Dmitry V. Goryachev, Dr. Sci. (Med.), Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Andrey D. Durnev, Corr. Member of RAS, Dr. Sci. (Med.), Prof., Zakusov Institute of Pharmacology (Moscow, Russia)

Maxim B. Ivanov, Dr. Sci. (Med.), Institute of Toxicology (Saint Petersburg, Russia)

Nina M. Kiseleva, Dr. Sci. (Biol.), Prof., Pirogov Russian National Research Medical University (Moscow, Russia)

Elena L. Kovaleva, Dr. Sci. (Pharm.), Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Marina N. Makarova, Dr. Sci. (Med.), Scientific-Production Association «HOME OF PHARMACY» (Leningrad Oblast, Russia)

Saule K. Ordabaeva, Dr. Sci. (Pharm.), Prof., South Kazakhstan Medical Academy (Shymkent, Republic of Kazakhstan)

Alexey B. Prokofiev, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Vera I. Prokofieva, Dr. Sci. (Pharm.), Prof., Sechenov First Moscow State Medical University (Moscow, Russia)

Natalia V. Pyatigorskaya, Dr. Sci. (Pharm.), Prof., Sechenov First Moscow State Medical University (Moscow, Russia)

Elena I. Sakanyan, Dr. Sci. (Pharm.), Prof., Scientific and Production Association Microgen (Moscow, Russia)

Rashid D. Syubaev, Dr. Sci. (Med.), Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Dmitry A. Sychev, Corr. Member of RAS, Dr. Sci. (Med.), Prof., Russian Medical Academy of Postgraduate Education (Moscow, Russia)

Anna V. Titova, Dr. Sci. (Pharm.), Information and Methodological Center for Expertise, Accounting and Analysis of the Circulation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Roza I. Yagudina, Dr. Sci. (Pharm.), Prof., Sechenov First Moscow State Medical University, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Elena N. Yakusheva, Dr. Sci. (Med.), Prof., Ryazan State Medical University (Ryazan, Russia)

#### EDITORIAL COUNCIL

Vladimir A. Aleshkin, Dr. Sci. (Biol.), Prof., Gabrichevsky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology (Moscow, Russia)

Gulomkodir M. Bobizoda, Dr. Sci. (Biol.), Dr. Sci. (Pharm.), Prof., Ayni Tajik State Pedagogical University (Dushanbe, Republic of Tajikistan)

Igor V. Borisevich, Dr. Sci. (Med.), Prof., Centre for Strategic Planning (Moscow, Russia)

Natalia D. Bunyatyan, Dr. Sci. (Pharm.), Prof., Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Edwin E. Zvartau, Dr. Sci. (Med.), Prof., Pavlov First Saint Petersburg State Medical University (Saint Petersburg, Russia)

Vadim A. Merkulov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Vladimir K. Lepakhin, Corr. Member of RAS, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Vladimir I. Petrov, Academician of RAS, Dr. Sci. (Med.), Prof., Volgograd State Medical University (Volgograd, Russia)

Alexander L. Khokhlov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Yaroslavl State Medical University (Yaroslavl, Russia)

Nikolay L. Shimanovsky, Corr. Member of RAS, Dr. Sci. (Med.), Prof., Pirogov Russian National Research Medical University (Moscow, Russia)

Alexander N. Yavorsky, Dr. Sci. (Med.), Prof., Pushchino State Institute of Natural Sciences (Pushchino, Russia)

#### EDITORIAL OFFICE

Sergey A. Kalinichev, Editor, Cand. Sci. (Pharm.), Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Olga N. Gubareva, Translation Editor, Cand. Sci. (Philology), Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Nina V. Molchan, Science Editor, Cand. Sci. (Pharm.), Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Maria L. Khrushcheva, Science Editor, Cand. Sci. (Chem.), Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

# ВЕДОМОСТИ НАУЧНОГО ЦЕНТРА ЭКСПЕРТИЗЫ СРЕДСТВ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

## СОДЕРЖАНИЕ

Том 10, № 2 2020

### ОБЗОРЫ

Современные подходы к введению показателя «Аномальная токсичность»  
Н. П. Неугодова, Е. О. Степанюк, Г. А. Сапожникова, Е. И. Саканян, М. С. Рябцева . . . . . 82

Терапевтический лекарственный мониторинг, гено- и фенотипирование CYP2C9  
при применении препаратов глибенкламида у больных сахарным диабетом  
Г. И. Городецкая, В. В. Архипов, Е. С. Мельников, Т. А. Родина . . . . . 89

Противоопухолевые лекарственные препараты: планирование доклинических исследований  
по оценке эффективности и безопасности  
О. А. Безбородова, А. А. Панкратов, Е. Р. Немцова, Ю. Б. Венедиктова, М. С. Воронцова,  
Г. Н. Енгальчева, Р. Д. Сюраев . . . . . 96

Современные подходы к планированию и проведению клинических исследований  
лекарственных препаратов для лечения болезни Крона  
А. Н. Богданов, Е. В. Горбунова, Д. В. Горячев, Е. В. Петранева . . . . . 111

### ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Влияние условий пробоподготовки и режима хроматографирования  
на уровень фонового сигнала при ВЭЖХ-УФ-анализе плазмы крови  
В. М. Косман, М. В. Карлина, О. Н. Пожарицкая . . . . . 121

Применение метода Европейской фармакопеи для количественного определения  
антраценпроизводных в противогеморроидальном сборе Проктофитол®  
Н. П. Антонова, И. М. Моргунов, С. С. Прохвятилова, Е. П. Шефер, А. М. Калинин, Т. А. Голомазова . . . . 129

### МЕТОДИЧЕСКИЕ МАТЕРИАЛЫ

Методические подходы к определению депрессорных веществ в лекарственных средствах  
Т. А. Батушвили, Л. В. Симутенко, Н. П. Неугодова, П. В. Шадрин . . . . . 137

Журнал «Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения» зарегистрирован  
в Федеральной службе по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций.  
Свидетельство ПИ № ФС77-53169 от 14 марта 2013 г.

Учредитель: ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России

Адрес учредителя и редакции: 127051, Москва, Петровский б-р, д. 8, стр. 2

Подписной индекс в каталоге «Пресса России» — Т57942, в каталоге «Издания органов НТИ» агентства  
«Роспечать», агентства «Урал-Пресс» — 57942. Тираж 100 экз. Цена свободная.

Издатель ООО «НЭИКОН ИСП»: 115114, Москва, ул. Летниковская, д. 4, стр. 5  
Типография ООО «Буки Веди»: 115093, Москва, Партийный пер., д. 1, корп. 58, стр. 2.

Подписано в печать: 08.06.2020.

<https://www.vedomostincesmp.ru>, e-mail: [vedomosti@expmed.ru](mailto:vedomosti@expmed.ru)

# VEDOMOSTI NAUCHNOGO TSENTRA EKSPERTIZY SREDSTV MEDITSINSKOGO PRIMENENIYA

[The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products]

## CONTENTS

Volume 10, No. 2 2020

### REVIEWS

#### Current Approaches to the Abnormal Toxicity Test

N. P. Neugodova, E. O. Stepanyuk, G. A. Sapozhnikova, E. I. Sakanyan, M. S. Ryabtseva . . . . . 82

#### Therapeutic Drug Monitoring, CYP2C9 Genotyping and Phenotyping in the Treatment of Diabetes with Glibenclamide Products

G. I. Gorodetskaya, V. V. Arkhipov, E. S. Melnikov, T. A. Rodina . . . . . 89

#### Anti-Tumour Drugs: Planning Preclinical Efficacy and Safety Studies

O. A. Bezborodova, A. A. Pankratov, E. R. Nemtsova, Yu. B. Venediktova, M. S. Vorontsova, G. N. Engalycheva, R. D. Syubaev . . . . . 96

#### Current Approaches to Planning and Conducting Clinical Trials of Medicinal Products for the Treatment of Crohn's Disease

A. N. Bogdanov, E. V. Gorbunova, D. V. Goryachev, E. V. Petraneva . . . . . 111

### ORIGINAL ARTICLES

#### Effect of Sample Preparation and Chromatographic Conditions on Background Signal Level in HPLC-UV Analysis of Blood Plasma

V. M. Kosman, M. V. Karlina, O. N. Pozharitskaya . . . . . 121

#### Determination of Anthracene Derivatives in the Antihaemorrhoidal Medicinal Herb Mixture Proctophytol® Using the European Pharmacopoeia Method

N. P. Antonova, I. M. Morgunov, S. S. Prokhvatilova, E. P. Shefer, A. M. Kalinin, T. A. Golomazova . . . . . 129

### METHODICAL APPROACHES

#### Methodological Approaches to Determination of Depressor Substances in Medicinal Products

T. A. Batuashvili, L. V. Simutenko, N. P. Neugodova, P. V. Shadrin . . . . . 137

Journal "Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products" is registered in the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technologies and Mass Communications. Certificate PI No. FS77-53169 dated March 14, 2013

Founder: Federal State Budgetary Institution "Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products" of the Ministry of Health of the Russian Federation

Postal address of the founder and editorial office: 8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051

Subscription indices are provided in the catalogue "Pressa Rossii"—T57942, in the Rospechat agency' catalogue "Izdaniya organov NTI"—57942. Print run: 100 copies. Free price

Publisher "NEICON ISP" LLC: 4/5 Letnikovskaya St., Moscow 115114  
Printing office "Buki Vedi" LLC: 1/58 Partiyny lane, Moscow 115093

Passed for printing: June 8, 2020

<https://www.vedomostincesmp.ru>, e-mail: [vedomosti@expmed.ru](mailto:vedomosti@expmed.ru)

## Современные подходы к введению показателя «Аномальная токсичность»

Н. П. Неугодова<sup>1</sup>, Е. О. Степанюк<sup>1,\*</sup>, Г. А. Сапожникова<sup>1</sup>, Е. И. Саканян<sup>2</sup>, М. С. Рябцева<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации,  
Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

<sup>2</sup> Акционерное общество «Научно-производственное объединение  
по медицинским иммунобиологическим препаратам «Микроген»,  
1-я Дубровская ул., д. 15, стр. 2, Москва, 115088, Российская Федерация

**Резюме.** В течение более 60 лет тест на аномальную токсичность используется как один из важных показателей при контроле качества безопасности парентеральных медицинских и ветеринарных препаратов, получаемых из субстанций биологического происхождения. В 2017 г. на заседании Фармакопейного комитета Евразийского экономического союза (ЕАЭС) было предложено не включать тест на аномальную токсичность в проект Фармакопеи ЕАЭС, основанием для данной дискуссии послужил отказ Европейской фармакопеи от данного испытания. Однако на территории нашей страны в настоящее время подобный шаг не может быть реализован, так как не все производственные площадки для производства медицинских и ветеринарных препаратов полностью отвечают международным требованиям GMP. Основной целью проведения теста на аномальную токсичность является выявление токсичности препарата, превышающей установленный ранее допустимый уровень, контролируемый по повышению летальности или по неожиданным (нерегламентированным) явлениям интоксикации животных. Данное испытание позволяет определить аномальную (повышенную) токсичность лекарственного препарата, которая может возникнуть за счет появления продуктов разложения или нежелательных примесей при изменении процесса производства, не предусмотренных регламентом производства, транспортирования или хранения. Так, в течение 2016–2017 гг. количество выявленных несоответствий ветеринарных препаратов, в том числе вакцин и сывороток, составило 12 серий, а Росздравнадзором за период 2016–2019 гг. забраковано 16 серий лекарственных препаратов. Цель работы — анализ современных подходов к тесту «Аномальная токсичность» в отечественной и зарубежных фармакопеях, разработка программы поэтапного сокращения применения теста в зависимости от природы и фармакологических свойств лекарственных средств. В результате сравнительного анализа монографий ведущих фармакопей мира установлено, что действующие требования Государственной фармакопеи Российской Федерации характеризуются наиболее строгими условиями проведения теста. В качестве альтернативы отказу от испытания на аномальную токсичность авторами предложен поэтапный подход, позволяющий сократить использование теста. Определены группы препаратов, фармакологические свойства которых позволяют исключить показатель. Предложенный поэтапный подход к сокращению использования показателя «Аномальная токсичность» позволит сделать тест более рациональным и сократить количество испытаний, но по-прежнему будет способствовать обеспечению безопасности применения лекарственных препаратов. Исключение испытания на аномальную токсичность не может быть реализовано без всесторонней детальной проработки специалистами в области контроля качества и дальнейшего обсуждения этого вопроса всеми заинтересованными сторонами.

**Ключевые слова:** аномальная токсичность; гармонизация требований; Европейский союз; Евразийский экономический союз; испытания на животных; GMP; проект фармакопеи ЕАЭС

**Для цитирования:** Неугодова Н.П., Степанюк Е.О., Сапожникова Г.А., Саканян Е.И., Рябцева М.С. Современные подходы к введению показателя «Аномальная токсичность». *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2020;10(2):82–88. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2020-10-2-82-88>

\***Контактное лицо:** Степанюк Екатерина Олеговна; [stepanuk@expmed.ru](mailto:stepanuk@expmed.ru)

## Current Approaches to the Abnormal Toxicity Test

N. P. Neugodova<sup>1</sup>, E. O. Stepanyuk<sup>1,\*</sup>, G. A. Sapozhnikova<sup>1</sup>, E. I. Sakanyan<sup>2</sup>, M. S. Ryabtseva<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,  
8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

<sup>2</sup> Scientific and Production Association for Immunological Preparations “Microgen”,  
15/2 1st Dubrovskaya St., Moscow 115088, Russian Federation

**Abstract.** For over 60 years, the Abnormal Toxicity Test (ATT) has been used as an important tool in safety control of some parenteral and veterinary products made from biological materials. In 2017, some of the members of the Pharmacopoeial Committee of the Eurasian Economic Union (EAEU) proposed not to include the ATT in the draft monographs of the EAEU Pharmacopoeia based on the decision of the European Pharmacopoeia Commission to suppress the test. However, this may not be achieved in Russia at this point, because some production sites that manufacture medicinal products for human and veterinary use have not fully implemented GMP principles yet. The main aim of the ATT is to detect any toxicity above the pre-determined acceptable level. The unacceptable toxicity levels can manifest themselves in higher mortality rates or unexpected intoxication effects in laboratory animals. This test makes it possible to detect abnormal (high) toxicity of a medicinal product which may be associated with

degradation products or undesirable impurities resulting from changes of the production technology, which are not mentioned in specification documents related to production, transportation, and storage. In 2016–2017 12 batches of veterinary products, including vaccines and sera, were found to be noncompliant, and the Federal Service for Surveillance in Healthcare rejected 16 batches of medicinal products in 2016–2019. The aim of the study was to analyse current approaches to the ATT in the Russian and foreign pharmacopoeias, and to develop a programme for phasing out the ATT use depending on the nature and pharmacological properties of medicinal products. Comparative analysis of the monographs of the world leading pharmacopoeias showed that the State Pharmacopoeia of the Russian Federation has the most stringent test conditions. As an alternative to suppressing the ATT the authors suggest a phased approach to reduce the use of this test. They determined groups of medicinal products whose pharmacological properties allow for the suppression of the test. The proposed approach to phasing out the use of ATT will make it possible to use the test effectively and reduce the number of performed tests, but will still ensure drug safety. The suppression of the ATT can not be achieved without a comprehensive detailed research by quality control specialists and further discussion by all interested parties.

**Key words:** abnormal toxicity; harmonisation of requirements; European Union; Eurasian Economic Union; animal tests; GMP; draft texts of the EAEU Pharmacopoeia

**For citation:** Neugodova NP, Stepanyuk EO, Sapozhnikova GA, Sakanyan EI, Ryabtseva MS. Current approaches to the abnormal toxicity test. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2020;10(2):82–88. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2020-10-2-82-88>

\*Corresponding author: Ekaterina O. Stepanyuk; [stepanuk@expmed.ru](mailto:stepanuk@expmed.ru)

Определение аномальной токсичности является важным методом контроля безопасности лекарственных препаратов. Его основная цель — выявление неожиданных (нерегламентированных) примесей, вызывающих токсичность препарата, превышающую установленный ранее допустимый уровень, контролируемый по повышению летальности или по явлениям интоксикации животных<sup>1</sup> [1].

Стремительное развитие фармацевтической индустрии, внедрение принципов надлежащей производственной, лабораторной и клинической практики (GMP, GLP и GPC), переход на высокотехнологичный уровень аналитических методов и разработка новых классов лекарственных средств (ЛС) требуют пересмотра существующих подходов к стандартизации, контролю качества ЛС и современной методологии этих процессов. Применение надлежащей производственной практики и использование адекватных физико-химических методов контроля качества с жестким нормированием посторонних примесей, в том числе остаточных органических растворителей, привели к снижению значимости теста на аномальную токсичность. Одним из важнейших оснований для практически полного отказа от испытания «Аномальная токсичность» в странах Европейского союза послужили требования соблюдения гуманного отношения к экспериментальным животным<sup>2</sup> [2].

Цель работы — анализ современных подходов к тесту «Аномальная токсичность» в отечественной и зарубежных фармакопеях; разработка алгоритма поэтапного сокращения применения теста для лекарственных средств в зависимости от их природы и фармакологических свойств.

## ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ ПОКАЗАТЕЛЯ

Впервые тест «Аномальная токсичность» был введен в Государственную фармакопею СССР IX издания в 1961 г. в раздел «Испытание антибиотиков на токсичность» и использовался для испытаний антибиотиков природного происхождения. Методика создавалась с учетом требований ведущих фармакопей того времени, Международной фармакопеи и Фармакопеи США. Европейская фармакопея была опубликована позднее, в 1964 г., и также включала тест «Аномальная токсичность».

Вопрос об исключении испытания на аномальную токсичность впервые был поднят Европейской комиссией по фармакопее в 1997 г. В 1998 г. Европейская фармакопея отказалась от рутинных испытаний, затем было решено реализовать полное исключение теста из монографий на вакцины, иммуносыворотки, биотерапевтические средства, аллергены, антибиотики, противогрибковые средства и пластиковые контейнеры. Полное исключение из Европейской фармакопеи испытания на аномальную токсичность с 1 января 2019 г. было одобрено в ходе проведения 159 пленарной сессии Европейской комиссии по фармакопее, проходившей в Страсбурге 21–22 ноября 2017 г., и закреплено в Приложении 9.6 Европейской фармакопеи (Ph. Eur. Suppl. 9.6). В рамках этого решения были пересмотрены 49 монографий, в том числе 36 монографий, касающихся вакцин<sup>3</sup>.

Принятию такого решения способствовал многолетний опыт работы предприятий-производителей лекарственных средств в соответствии с правилами надлежащих практик. По мнению европейских специалистов в области фармакоконтроля,

<sup>1</sup> ОФС.1.2.4.0004.15. Аномальная токсичность. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 1. М.; 2015.

<sup>2</sup> Position paper. Rationale for removing abnormal toxicity testing. EFPIA. 2015. <https://www.efpia.eu/media/25713/position-paper-on-rationale-for-removing-abnormal-toxicity-testing-1.pdf>

<sup>3</sup> Suppression of the test for abnormal toxicity from the European Pharmacopoeia. 8 December 2017, EDQM. Strasbourg, France. [https://www.edqm.eu/sites/default/files/pr\\_pheur159sess\\_abnormal\\_toxicity\\_2017.pdf](https://www.edqm.eu/sites/default/files/pr_pheur159sess_abnormal_toxicity_2017.pdf)

именно внедрение принципов GMP является основной гарантией качества и безопасности ЛС. В результате в Европе выполнение теста на аномальную токсичность трансформировалось из основного испытания в неспецифичное испытание ЛС на безопасность [3].

Вместе с тем исключение любого показателя контроля качества должно быть обосновано, с одной стороны, отсутствием информации о браке ЛС по этому показателю, а с другой стороны — наличием в фармакопейной статье или спецификации нормативной документации иных показателей и методов их оценки, контроль по которым гарантирует подтверждение надлежащей чистоты ЛС [3].

### ПРИНЦИПЫ БИОЭТИКИ В АСПЕКТЕ ПРИМЕНЕНИЯ ИСПЫТАНИЯ НА АНОМАЛЬНУЮ ТОКСИЧНОСТЬ

Весомой причиной пересмотра методов контроля качества лекарственных средств является гуманное отношение к экспериментальным животным (принципы 3R)<sup>4</sup> [2]. Впервые принципы биоэтики были сформулированы в 1959 г. У. Расселом и Р. Берчем, этими же авторами была обоснована концепция гуманного использования животных в экспериментах, получившая название «Биоэтическая концепция трех R (Refinement (усовершенствование), Reduction (сокращение), Replacement (замена))» [4].

В марте 2019 г. в Риме прошел симпозиум по Всемирной гармонизации требований к испытанию вакцин, организованный Международным обществом гуманного обращения с животными (Humane Society International, HSI). Мероприятие собралось на своей площадке экспертов со всего мира (Аргентина, Бразилия, Китай, страны Европы, Индия, Россия, ЮАР и США). *Основной темой обсуждения было исключение испытаний на аномальную токсичность и безопасность вакцин для медицинского применения на целевых видах животных. В отношении ветеринарных вакцин рассматривалась возможность исключения испытания на безопасность на лабораторных животных.*<sup>#</sup>

Участники форума пришли к выводу о необходимости разработки научно обоснованного и подтвержденного производственной практикой плана действий в отношении теста «Аномальная

токсичность», а также распространения этого плана во всем мире. HSI выразило готовность оказать активную поддержку этой инициативы и предложило сотрудничество с каждым участником для определения дальнейших действий, что может повысить вероятность принятия конкретных решений по данному вопросу. Следует отметить, что некоторые страны, например Индия, Аргентина и др., занимают неоднозначную позицию в отношении испытаний на аномальную токсичность [2]. Так, в фармакопее Аргентины испытание на аномальную токсичность осталось только в одной частной монографии, и в ближайшем будущем планируется исключить и ее. В Индии воспользоваться правом отказа от теста могут лишь в том случае, если препарат в течение нескольких серий прошел успешно все испытания на безопасность, а на производстве используются надлежащие практики.

В настоящий момент в Ph. Eur. 9.0 включены только три монографии, содержащие методы оценки качества лекарственных средств с использованием лабораторных животных: «Пирогенность», «Гистамин» и «Депрессорные вещества»<sup>5</sup>. В фармакопее стран ЕАЭС (Республики Беларусь и Республики Казахстан) также присутствуют монографии, регламентирующие испытание на аномальную токсичность<sup>6</sup>. В Государственную фармакопею республики Казахстан включена монография «Испытания на биологическую реактивность *in vivo*»<sup>7</sup>, аналогичная статья в Фармакопее США 42 изд. (USP 42)<sup>8</sup>. Монография USP 42 о биологических испытаниях *in vivo* включает раздел биологических тестов на безопасность, где указано: «Испытание на безопасность, изложенное здесь, предназначено для обнаружения в препарате любой неожиданной, неприемлемой биологической реакции. Этот тест *in vivo* предназначен для оценки безопасности продуктов биотехнологического происхождения». Таким же принципом руководствуется и Государственная фармакопея Российской Федерации XIV изд. (ГФ РФ XIV)<sup>9</sup>. В USP 42 биологических испытаний намного больше, чем в Европейской фармакопее, в том числе представлена монография 121 «Испытания инсулинов», подобная монография ранее была исключена из Европейской фармакопеи.

<sup>4</sup> Rationale for removing abnormal toxicity testing (22 June 2015). Position paper. EFPIA. <https://www.efpia.eu/media/25713/position-paper-on-rationale-for-removing-abnormal-toxicity-testing-1.pdf>

<sup>5</sup> Monograph 2.6.8. Pyrogens; 2.6.10. Histamine; 2.6.11. Depressor substances. European Pharmacopoeia. 9th ed. Strasbourg: European Department for the Quality of Medicines and HealthCare; 2016.

<sup>6</sup> 2.6.9. Аномальная токсичность. Государственная фармакопея Республики Казахстан. Т. 1. Алматы: Жибек жолы; 2008.

2.6.9. Аномальная токсичность. Государственная фармакопея Республики Беларусь. Т. 1. Молодечно: Победа; 2012.

<sup>7</sup> Испытания на биологическую реактивность *in vivo*. Государственная фармакопея Республики Казахстан. Т. 3. Алматы: Жибек жолы; 2014.

<sup>8</sup> Monograph (88). Biological reactivity tests, *in vivo*. United States Pharmacopoeia. 42th ed.

<sup>9</sup> ОФС.1.4.1.0007.15. Лекарственные формы для парентерального применения. ОФС.1.1.0006.15. Фармацевтические субстанции. ОФС.1.7.1.0007.15. Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантной ДНК. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

<sup>#</sup> Выделенный фрагмент следует читать: «Основной темой обсуждения было исключение испытаний на аномальную токсичность вакцин для медицинского применения. В отношении ветеринарных вакцин рассматривалась возможность исключения испытания на безопасность на лабораторных животных и безопасность вакцин на целевых видах животных». См. Исправление к статье Н.П. Неугодовой и др., «Современные подходы к введению показателя «Аномальная токсичность» *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2020;10(3):212. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2020-10-3-212-212>

## АНАЛИЗ УСЛОВИЙ ПРОВЕДЕНИЯ ТЕСТА «АНОМАЛЬНАЯ ТОКСИЧНОСТЬ»

В отличие от высокоспецифичных физико-химических методов испытание на аномальную (повышенную) токсичность ЛС с использованием животных в качестве тест-объекта позволяет выявить любые, даже неожиданные примеси вне зависимости от их природы, тем самым повышая безопасность ЛС. В качестве контрпримера приведем метод широко используемой ВЭЖХ, с помощью которого можно обнаружить лишь строго определенные примеси с использованием конкретной методики определения [5].

Необходимые условия корректного выполнения теста на аномальную токсичность — это проведение исследований с использованием животных, обладающих определенными и стабильными характеристиками (масса тела, возраст, виды и линии), соблюдение конкретных условий содержания и утвержденного рациона питания животных. Для получения достоверных ответов должны быть выбраны максимально жесткие и унифицированные условия испытания. Отечественная фармакопея руководствуется именно этими принципами. Все параметры испытания должны быть постоянными, строго соответствовать методике проведения теста, животные — стандартизованы и подобраны с минимальным разбросом возраста и массы. Следует отметить, что именно незначительные различия массы участвующих в тесте животных ( $20,0 \pm 1,0$  г) являются одним из критериев точности результата в испытаниях по показателю «Аномальная токсичность». Основным критичным параметром выполнения теста является скорость введения препарата —  $0,1$  мл/с, что соответствует времени введения всей дозы  $5$  с. Быстрое внутривенное введение испытуемого препарата позволяет уловить проявления реакции интоксикации. Другим необходимым условием эксперимента является соблюдение определенного срока наблюдения за животными ( $48$  ч), что позволяет учесть не только острую токсическую реакцию, но и отсроченную гибель животных<sup>10</sup>. Однако в силу особых фармакологических особенностей некоторых ЛС для данного критерия оценки безопасности существуют исключения. Это может касаться, например, проведения испытаний препаратов, которые относятся к группе противоопухолевых, а также средств, содержащих моноклональные антитела. Для таких препаратов характерна отсроченная гибель животных, поэтому время наблюдения увеличено до  $7-14$  суток.

Требования Европейской фармакопеи гораздо мягче — допускается разброс массы животных

до  $7,0$  г, что составляет практически  $1/3$  от общей массы (средняя масса мышей  $20,5$  г). Время введения испытуемой пробы объемом  $0,5$  мл варьируется в пределах  $15-30$  с<sup>11</sup>. Подобные условия испытаний не позволяют получать однозначные результаты, что приводит к вариабельности ответов и делает тест практически бесполезным. Условия испытаний, приведенные в ОФС.1.2.4.0004.15 «Аномальная токсичность» ГФ РФ XIV, оптимальны и соответствуют условиям выполнения данного теста, указанным в Международной фармакопее<sup>12</sup>.

Требования ГФ РФ XIV и USP 42 идентичны по основному критичному параметру испытаний — скорости введения. Положительным отличием статьи «Аномальная токсичность» ГФ РФ XIV от монографии USP 42 является более узкий допустимый диапазон массы испытуемых мышей, что позволяет получить более надежные результаты.

При сравнении требований ведущих фармакопей мира к тесту «Аномальная токсичность» (табл. 1) отмечено, что наиболее жесткие условия испытания, позволяющие объективно оценивать результаты теста, были заложены в ГФ IX СССР, а затем сохранены в дальнейших редакциях фармакопей Российской Федерации, вплоть до действующей ГФ РФ XIV.

Задачей государств, работающих в формате единого пространства на основе общих правил надлежащих практик (Армения, Беларусь Казахстан, Кыргызстан, Россия), является унификация требований фармакопейных испытаний, гарантирующая достижение адекватных результатов контроля качества лекарственных средств.

В декабре 2017 г. на заседании Фармакопейного комитета ЕАЭС при рассмотрении ОФС «Аномальная токсичность» возникло предложение об исключении данного показателя из проекта Фармакопей ЕАЭС по аналогии с Европейской фармакопеей, однако по итогам обсуждений было принято решение о включении ОФС «Аномальная токсичность» в фармакопею. Были рассмотрены предложения о смягчении требований к проведению данного теста с целью приведения методики испытаний в соответствие с другими действующими фармакопеями мира. Однако сравнительный анализ фармакопей (табл. 1) показал, что условия испытания, описанные в ГФ РФ XIV и проекте Фармакопей ЕАЭС, обеспечивают наиболее достоверные результаты теста по показателю «Аномальная токсичность». Испытание в подобных условиях вполне оправдывает свое назначение и позволяет выявлять некачественные ЛС.

Тем не менее, ориентируясь на общемировую тенденцию по сокращению исследований

<sup>10</sup>ОФС.1.2.4.0004.15. Аномальная токсичность. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

<sup>11</sup> Monograph 2.6.9. Abnormal toxicity. European Pharmacopoeia. 9th ed. Strasbourg: European Department for the Quality of Medicines and HealthCare; 2016.

<sup>12</sup> Monograph 3.7. Undue toxicity. International Pharmacopoeia. 9th ed. 2019.

**Таблица 1.** Сравнительный анализ условий проведения испытаний и требований по показателю «Аномальная токсичность», приведенных в ведущих фармакопеях**Table 1.** Comparative analysis of the abnormal toxicity test conditions and requirements as described in leading pharmacopoeias

Условия и требования Conditions and requirements	Фармакопеи Pharmacopoeias				
	USP 42		Ph. Eur. 9.0	ГФ РФ XIV Ph. Rus. XIV	Проект фармакопеи ЕАЭС Draft texts of the EAEU Pharmacopoeia
	Safety test	Acute toxicity	Abnormal toxicity (исключен/ suppressed)	Аномальная Токсичность Abnormal toxicity	
Вид животных Animal species	Мышь / Mouse				
Количество животных (1-я постановка) Number of animals (1st injection)	5				
Масса (г) Weight (g)	17–23	Частные статьи Individual monographs	17–22	18–21	19–21
Путь введения Route of administration	Внутривенно / Intravenously				
Вводимый объем (мл) Administered volume (mL)	0,5	Частные статьи Individual monographs	0,5	0,5	0,5
Скорость введения Rate of administration	100 мкл/с 100 µL/s	100 мкл/с 100 µL/s	0,1 мл / 15–30 с 0,1 mL / 15–30 s	0,1 мл/с 0,1 mL/s	0,1 мл/с 0,1 mL/s
Срок наблюдения (ч) Observation period (h)	48	48	24	48	48
Брак (гибель) Rejection (death)	2 мыши / 2 mice				
Количество животных (мышей) при повторном испытании The number of animals (mice) for a retest	10	Частные статьи Individual monographs	5	5	5

*Примечание.* USP 42 — Фармакопея США 42 изд., Ph. Eur. 9.0 — Европейская фармакопея 9 изд., ГФ XIV — Государственная фармакопея Российской Федерации XIV изд.

*Note.* USP 42—United States Pharmacopoeia 42nd ed., Ph. Eur. 9—European Pharmacopoeia 9th ed., Ph. Rus. XIV—Russian State Pharmacopoeia 14th ed.

с использованием лабораторных животных, а также в связи с необходимостью гармонизации требований по контролю качества ЛС, было предложено рассмотреть возможность разработки поэтапной программы исключения показателя «Аномальная токсичность» или замены испытаний на лабораторных животных альтернативными методами с учетом концепции 3R. Разработка такой программы должна быть научно обоснована и выполнена на основании современных подходов к контролю качества фармацевтической продукции. Создание программы невозможно без детального ее обсуждения с ведущими мировыми производителями, а также международным научным сообществом.

Следует отметить, что оценка необходимости включения показателя «Аномальная токсичность» в перечень показателей контроля качества лекарственных средств должна рассматриваться для каж-

дого ЛС конкретно. Для ряда препаратов тестирование на аномальную токсичность нецелесообразно. Например, синтетические антибиотики ряда фторхинолонов не нуждаются в контроле по показателю «Аномальная токсичность» за исключением препаратов для парентерального введения, упакованных в пластик<sup>13</sup>.

Для некоторых готовых лекарственных форм, применяемых парентерально и упакованных в полимерную тару, сложно установить токсическую и безопасную дозы, поэтому введение показателя «Аномальная токсичность» является нерациональным. Однако исключение показателя возможно только после детального анализа фармакологических свойств испытуемого образца и получения экспериментальных данных, подтверждающих невозможность получения надежных результатов.

<sup>13</sup>Monograph 3.7. Undue toxicity. International Pharmacopoeia. 9th ed. 2019.

Так, например, препараты местных анестетиков для парентерального применения имеют слишком узкий терапевтический диапазон, и для них достаточно сложно установить токсическую и безопасную дозы. Фармакологическое действие большинства анестетиков, учитывая узкий коридор безопасности, может маскировать токсическое действие неожиданных примесей. Степень проявления системной токсичности напрямую зависит от концентрации анестетика в плазме крови. Быстрое внутрисосудистое поступление препарата в кровь приводит к выраженным токсическим эффектам, что связано с высокой кардиотоксичностью действующих веществ [6]. Доклинические исследования предоставляют обширную информацию по общей токсичности на крысах и собаках при подкожном введении. При внутривенном введении животному достаточно сложно установить токсичную и безопасную дозы, так как разница между ними слишком мала, поэтому низка вероятность, что установленная переносимая доза сможет продемонстрировать наличие токсических примесей. Таким образом, испытание по показателю «Аномальная токсичность» для лекарственных препаратов местных анестетиков для парентерального введения представляется нецелесообразным.

Допускается исключение показателя «Аномальная токсичность» из документации готовых лекарственных форм, если данный тест включен в нормативный документ на субстанцию, а лекарственная форма производится путем расфасовки без добавления вспомогательных веществ. В таких случаях нерационально проводить испытания лекарственного препарата.

#### **ПОЭТАПНЫЙ ПОДХОД К ОПТИМИЗАЦИИ ТРЕБОВАНИЙ К ПРОВЕДЕНИЮ ТЕСТА «АНОМАЛЬНАЯ ТОКСИЧНОСТЬ»**

Для гармонизации требований Фармакопеи ЕАЭС и ГФ РФ с ведущими мировыми фармакопеями по отношению к показателю «Аномальная токсичность» необходимо создание программы поэтапного сокращения использования этого теста.

Первый этап: фармакопейную статью «Аномальная токсичность» дополнить примечанием «Данное испытание является обязательным на территории Российской Федерации или Евразийского экономического союза». Данное примечание сначала должно быть введено в ГФ РФ XV, а затем при пересмотре и в Фармакопею ЕАЭС.

Второй этап: определить классы ЛС, для которых возможно исключение данного показателя:

1. ОФС.1.4.1.0007.15 «Лекарственные формы для парентерального применения» дополнить примечаниями «Данное испытание не является обязательным для:

- орфанных препаратов (можно не вводить показатель «Аномальная токсичность», так как препа-

раты выпускаются малыми партиями и применяются у ограниченного контингента пациентов);

- препаратов инсулина и его аналогов (можно не вводить показатель «Аномальная токсичность», так как токсическое действие данных препаратов определяется их биологической активностью и может быть замаскировано различными физиологическими факторами (сытость/голод животных, введение глюкозы и т.п.);

- инъекционных анестетиков в полимерных упаковках, местного действия с низкой системной абсорбцией.

2. ОФС.1.7.1.0007.15 «Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК», раздел «Испытания лекарственного препарата» дополнить примечанием «Испытание по показателю «Аномальная токсичность» выполняется на территории Российской Федерации».

Третий этап: исключение показателя «Аномальная токсичность» в случае замены альтернативным показателем.

Предложенный алгоритм перехода к отказу от показателя «Аномальная токсичность» должен быть всесторонне рассмотрен всеми заинтересованными сторонами.

#### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Решение вопроса об отказе от испытаний по показателю «Аномальная токсичность» нуждается во взвешенном подходе. Позиция Фармакопейного комитета Министерства здравоохранения Российской Федерации заключается в необходимости наличия теста в отечественной фармакопее на настоящем этапе. Однако это не исключает возможности сокращения использования теста, но нуждается в строгом научном обосновании такого подхода. В мировой практике существуют различные взгляды на данную проблему: от полного отрицания теста странами Европейского союза до его обязательного присутствия в фармакопеях Китая и Российской Федерации. Наличие надлежащей производственной практики, внедрение более строгих мер контроля качества, обеспечиваемых современными аналитическими методами, тщательный контроль исходных материалов и улучшение фармаконадзора позволяют гарантировать качество продукции. Однако для препаратов биологической природы и, в первую очередь, антибиотиков отсутствует надежное подтверждение возможности испытаний без использования животных, позволяющих установить некачественную или контрафактную продукцию. Для отказа от показателя «Аномальная токсичность» требуется дальнейшее подтверждение пригодности дополнительных физико-химических методов или альтернативных подходов для контроля качества лекарственных препаратов. Также необходимо проводить углубленный

анализ острой токсичности лекарственных средств для решения вопроса о соответствии установленной тест-дозы максимально переносимой дозе (МПД). Отказ от теста актуален в случаях, если выбранная доза намного ниже МПД и увеличить ее невозможно в силу объективных причин (например, низкая концентрация действующего вещества в готовой лекарственной форме), а увеличение дозы одновременно приводит к превышению допустимого физиологического объема, вводимого животным. Также рассматривается возможность исключения показателя в случаях, когда невозможно подобрать МПД. Предложенный поэтапный подход к сокращению использования показателя «Аномальная токсичность» позволит сделать тест более рациональным и сократить количество испытаний, но по-прежнему будет способствовать обеспечению безопасности применения лекарственных препаратов.

**Вклад авторов.** Н. П. Неугодова — сбор данных литературы; анализ и систематизация данных; редактирование рукописи; Е. О. Степанюк — сбор; анализ и обобщение данных литературы, оформление рукописи и переработка рукописи; Г. А. Сапожникова — анализ международных требований к тесту на «Аномальную токсичность»; Е. И. Саканян — основная идея публикации, анализ международных требований к тесту на «Аномальную токсичность»; М. С. Рябцева —

участие в разработке поэтапной оптимизации требований к показателю «Аномальная токсичность».

**Authors' contributions.** Natalia P. Neugodova—collection of literature data; analysis and summarising of data; editing the text; Ekaterina O. Stepanyuk—collection, analysis and summarising of literature data, formatting and revising the text; Galina A. Sapozhnikova—analysis of international requirements to the abnormal toxicity test; Elena I. Sakanyan—elaboration of the concept of the study, analysis of international requirements to the abnormal toxicity test; Maria S. Ryabtseva—participation in the development of a phased approach to optimisation of requirements for the abnormal toxicity test.

**Благодарности.** Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00003-20-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР АААА-А18-118021590049-0).

**Acknowledgements.** The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00003-20-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. АААА-А18-118021590049-0).

**Конфликт интересов.** Е. И. Саканян является членом редколлегии журнала «Вестник НЦЭСМП», остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

**Conflict of interest.** E. I. Sakanyan is a member of the Editorial Board of "The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products", the other authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Васильев АН. Качественные доклинические исследования — необходимый этап разработки и внедрения в клиническую практику новых лекарственных препаратов. *Антибиотики и химиотерапия*. 2012;57(1–2):41–9. [Vasilyev AN. Good preclinical study, as an obligatory stage in design and clinical use of new medicinal preparations. *Antibiotiki i khimioterapiya = Antibiotics and Chemotherapy*. 2012;57(1–2):41–9 (In Russ.)]
2. Viviani L, Halder M, Gruber M, Bruckner L, Cussler K, Sanyal G, et al. Global harmonization of vaccine testing requirements: Making elimination of the ATT and TABST a concrete global achievement. *Biologicals*. 2020;63:101–5. <https://doi.org/10.1016/j.biologics.2019.10.007>
3. Garbe JHO, Ausborn S, Beggs C, Bopst M, Joos A, Kitashova AA, et al. Historical data analyses and scientific knowledge suggest complete removal of the abnormal toxicity test as a quality control test. *J Pharm Sci*. 2014;103(11):3349–55. <https://doi.org/10.1002/jps.24125>
4. Чадаев ВЕ. Этические принципы при работе с лабораторными животными. *Вестник проблем биологии и медицины*. 2012;1(2):113–5. [Chadayev VE. Ethical principles when working with laboratory animals. *Vestnik problem biologii i meditsiny = Bulletin of Problems in Biology and Medicine*. 2012;1(2):113–5 (In Russ.)]
5. Рябцева МС, Филимонова ИН, Осипова ИГ, Неугодова НП, Ковалева ЕЛ, Шаройкина МВ. Показатель качества «аномальная токсичность» — одна из основных составляющих безопасности биологических лекарственных средств. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2016;(9–2):232–7. [Ryabtseva MS, Filimonova IN, Osipova IG, Neugodova NP, Kovaleva EL, Sharoykina MV. Quality indicator "abnormal toxicity"—one of the main components of safety of biological drugs. *Mezhdunarodny zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy = International Journal of Applied and Fundamental Research*. 2016;(9–2):232–7 (In Russ.)]
6. Корячкин ВА, Гераськов ЕВ, Казарин ВС, Лисыков МА, Моханна М, Мальце МП и др. Системная токсичность местных анестетиков при регионарной анестезии. *Регионарная анестезия и лечение острой боли*. 2015;9(3):45–50. [Koryachkin VA, Geras'kov EV, Kazarin VS, Lis'kov MA, Mokhanna M, Mal'tse MP, et al. Systemic toxicity of local anesthetics in regional anesthesia. *Regionalnaya anesteziya i lechenie ostroy boli = Regional Anesthesia and Acute Pain Management*. 2015;9(3):45–50 (In Russ.)]

## ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

**Неугодова Наталия Петровна**, канд. биол. наук. Natalia P. Neugodova, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-8615-952X>

**Степанюк Екатерина Олеговна**. Ekaterina O. Stepanyuk. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-6728-594X>

**Сапожникова Галина Алексеевна**. Galina A. Sapozhnikova. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-0379-5980>

**Саканян Елена Ивановна**, д-р фарм. наук, проф. Elena I. Sakanyan, Dr. Sci. (Pharm.), Professor. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-8536-4804>

**Рябцева Мария Сергеевна**, канд. биол. наук. Maria S. Ryabtseva, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-9130-3987>

Статья поступила 27.01.2020

После доработки 29.04.2020

Принята к печати 28.05.2020

Article was received 27 January 2020

Revised 29 April 2020

Accepted for publication 28 May 2020

## Терапевтический лекарственный мониторинг, гено- и фенотипирование CYP2C9 при применении препаратов глибенкламида у больных сахарным диабетом

Г. И. Городецкая\*, В. В. Архипов, Е. С. Мельников, Т. А. Родина

Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации,  
Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

**Резюме.** Вопросы рационального применения препаратов глибенкламида при лечении больных сахарным диабетом 2 типа продолжают оставаться актуальными. В статье представлена обобщенная характеристика основных групп препаратов глибенкламида, рассмотрены особенности его фармакогенетики. Глибенкламид метаболизируется ферментом цитохрома P450 2C9 (CYP2C9), лица с генетически обусловленной низкой активностью CYP2C9 подвержены повышенному риску гипогликемии. Носители аллелей *CYP2C9\*3* и *CYP2C9\*2* склонны к более высокой концентрации глибенкламида в крови и повышенной секреции инсулина. Для снижения риска гипогликемии при терапии глибенкламидом могут быть использованы фармакогенетическое тестирование и мониторинг концентрации лекарственных препаратов у пациентов с помощью ВЭЖХ-МС. На основании анализа данных литературы выбрана методика, которая отличается простотой пробоподготовки, коротким временем анализа и широким аналитическим диапазоном для определяемых веществ. Данная методика может быть полезной как для изучения биоэквивалентности, так и для оценки взаимозаменяемости препаратов глибенкламида. Фармакокинетика глибенкламида характеризуется высокой межиндивидуальной вариабельностью. Это является фактором как повышенного риска гипогликемии, так и неэффективности препарата, поэтому при назначении глибенкламида врач должен внимательно следить за эффективностью и безопасностью терапии.

**Ключевые слова:** глибенкламид; сахарный диабет; генотипирование; фенотипирование; CYP2C9; ВЭЖХ-МС; терапевтический лекарственный мониторинг

**Для цитирования:** Городецкая ГИ, Архипов ВВ, Мельников ЕС, Родина ТА. Терапевтический лекарственный мониторинг, гено- и фенотипирование CYP2C9 при применении препаратов глибенкламида у больных сахарным диабетом. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2020;10(2):89–95. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2020-10-2-89-95>

\***Контактное лицо:** Городецкая Галина Ивановна; [gorodetskaya@expmed.ru](mailto:gorodetskaya@expmed.ru)

## Therapeutic Drug Monitoring, CYP2C9 Genotyping and Phenotyping in the Treatment of Diabetes with Glibenclamide Products

G. I. Gorodetskaya\*, V. V. Arkhipov, E. S. Melnikov, T. A. Rodina

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,  
8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

**Abstract.** Rational use of glibenclamide products in the treatment of patients with type 2 diabetes remains a high-priority task. The paper offers a summary of the main groups of glibenclamide drugs and describes pharmacogenetics of glibenclamide. Glibenclamide is metabolized by the enzyme cytochrome P450 2C9 (CYP2C9). Individuals with genetically determined low CYP2C9 activity are at an increased risk of hypoglycaemia. Carriers of *CYP2C9\*3* and *CYP2C9\*2* alleles tend to have higher concentrations of glibenclamide in blood and increased insulin secretion. Pharmacogenetic testing of patients and drug concentration monitoring using HPLC-MS can help reduce the risk of hypoglycemia during glibenclamide treatment. Based on literature review the authors selected the method characterised by a simple sample preparation procedure, short analysis time, and a wide analytical range for the substances being determined. This method can be useful both for bioequivalence studies and evaluation of glibenclamide products interchangeability. Glibenclamide pharmacokinetics is characterised by high interindividual variability. This may lead to both an increased risk of hypoglycemia and drug inefficacy, therefore, when prescribing glibenclamide, a physician should carefully control the efficacy and safety of drug therapy.

**Key words:** glibenclamide; diabetes mellitus; genotyping; phenotyping; CYP2C9; HPLC-MS; therapeutic drug monitoring

**For citation:** Gorodetskaya GI, Arkhipov VV, Melnikov ES, Rodina TA. Therapeutic drug monitoring, CYP2C9 genotyping and phenotyping in the treatment of diabetes with glibenclamide products. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2020;10(2):89–95. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2020-10-2-89-95>

\***Corresponding author:** Galina I. Gorodetskaya; [gorodetskaya@expmed.ru](mailto:gorodetskaya@expmed.ru)

В Российской Федерации на конец 2018 г. на диспансерном учете состояло 4 584 575 пациентов с сахарным диабетом (СД) (3,1% населения), из них: 92% (4 238 503 пациентов) — с СД 2 типа [1].

Глибенкламид (ГЛБ), стимулятор секреции инсулина, используется в клинической практике уже более 50 лет, и за это время достаточно хорошо изучены многие аспекты эффективности и безопасности его применения. Тем не менее вопросы рациональной фармакотерапии СД в целом и применения ГЛБ в частности остаются актуальными. Более того, объем накопленной информации так велик и полученные данные столь разнообразны, что могут ввести в замешательство даже опытного специалиста.

Основная проблема применения ГЛБ — высокий риск развития гипогликемии, вплоть до летального исхода [2]. Возможна и обратная ситуация, при которой не наблюдается ожидаемого терапевтического эффекта от приема ГЛБ. При рассмотрении данных осложнений следует принимать во внимание прежде всего фармакокинетические факторы.

На протяжении 40 лет известно о высокой межиндивидуальной вариабельности фармакокинетики ГЛБ [3]. Наблюдаемые различия не могут быть объяснены только тем, что пациенты принимают препарат в разных дозах или имеют разную массу тела. В качестве причин вариабельности отмечают низкую приверженность больных к лечению, различия в активности изофермента *CYP2C9*, метаболизирующего глибенкламид [4, 5], и влияние скорости клубочковой фильтрации [6] на клиренс ГЛБ. Помимо этого, хорошо изучена роль фармацевтических факторов в высвобождении ГЛБ из лекарственной формы (ЛФ): состав вспомогательных веществ в ЛФ, микронизация ГЛБ, что особо остро ставит вопрос о взаимозаменяемости препаратов ГЛБ [7, 8].

Клинически имеют значение доза, время приема ГЛБ, контроль уровня глюкозы. Результаты действия ГЛБ зависят от количества в порции еды углеводов, избыток которых приводит к гипергликемии, недостаток — к гипогликемии. Принципиальным является прием ГЛБ до еды, известно, что 2,5 мг немикронизированного препарата, принятые за 30 минут до еды, оказывают такое же действие, как 7,5 мг препарата, принятые во время еды<sup>1</sup>. Медицинский персонал должен доступно донести до пациента информацию о необходимости соблюдения правил приема ГЛБ.

При социально значимых и широко распространенных заболеваниях, к которым относится СД, во всем мире чаще применяют воспроизведенные препараты [9]. Количество производителей ГЛБ составляет десятки, причем выпускаются как монопрепараты в различных дозировках, так и комбинированные лекарственные формы. Только в России

на начало 2020 года зарегистрировано 20 препаратов ГЛБ. При этом технология производства, используемая субстанция и вспомогательные вещества значительно отличаются у разных производителей. В результате на практике после подтвержденной в ходе регистрации биоэквивалентности препарата проявляется его терапевтическая неэквивалентность. Как показано в работах [7, 8], это стало общемировой проблемой, решением которой может быть более тщательная экспертиза препаратов ГЛБ при регистрации или проведение постмаркетинговых исследований, как это делается в США. Препараты ГЛБ включены Управлением по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств (Food and Drug Administration, FDA) в «Оранжевую книгу»<sup>2</sup> и разделены на подгруппы, внутри которых взаимозаменяемость пересматривается ежегодно. В настоящее время в нашей стране зарегистрированы препараты ГЛБ, фармакокинетика которых принципиально различается, и ее особенности влияют на риск развития нежелательных реакций (НР). Для немикронизированной формы референтным препаратом в нашей стране является Манинил® 5,0 мг производства «Берлин-Хеми АГ/Менарини-Фон Хейден ГмбХ» (Германия). Микронизированная форма Манинил® 1,75 и 3,5 мг и воспроизведенные препараты этой формы представлены в других дозировках, нежели в США, где референтным является GLYNASE® PRESTAB® производства Pfizer Inc. 1,5 и 3,0 мг. В России представлены комбинация в одной таблетке немикронизированного ГЛБ 2,5 мг и метформина 400 мг (референтный Глибомет® Лаборатория Гуидотти С.п.А.) и микронизированный ГЛБ 2,5 или 5 мг в комбинации с метформином 500 мг (референтный Глюкованс® Мерк Сантэ С.а.С.).

Цель работы — изучение и сравнение методов контроля эффективности и безопасности терапии СД 2 типа ГЛБ, таких как гено-, фенотипирование *CYP2C9*, а также обоснование выбора методики определения концентрации ГЛБ для проведения терапевтического лекарственного мониторинга (ТЛМ).

#### ФАРМАКОГЕНЕТИКА ГЛИБЕНКЛАМИДА

Основной вклад в биотрансформацию ГЛБ вносит изофермент *CYP2C9*. ГЛБ почти полностью метаболизируется в печени этим изоферментом (роль *CYP3A4* стенки кишки вторична) с образованием двух активных метаболитов — 4-транс-гидрокси-глибенкламида (М1) и 3-цис-гидрокси-глибенкламида (М2), которые экскретируются почками и печенью примерно поровну [10]. Активность цитохрома P-450 2C9 зависит от генетических особенностей пациента. Снижение активности данного фермента часто обусловлено аллелями *CYP2C9\*2*

<sup>1</sup> Кукес ВГ, Сычев ДА, ред. Клиническая фармакология. 5-е изд. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2017.

<sup>2</sup> [https://www.accessdata.fda.gov/scripts/Cder/ob/search\\_product.cfm](https://www.accessdata.fda.gov/scripts/Cder/ob/search_product.cfm)

и CYP2C9\*3. У носителей данных вариантов наблюдается низкая активность цитохрома CYP2C9, что ассоциировано с низкой скоростью биотрансформации ГЛБ и его повышенной концентрацией в плазме крови. К «медленным метаболитам» относятся носители генотипов CYP2C9\*2/\*2, CYP2C9\*3/\*3 и CYP2C9\*2/\*3, тогда как пациенты с одним «нормальным» аллелем (CYP2C9\*1/\*2 и CYP2C9\*1/\*3) являются «промежуточными метаболитами» [4, 5]. В связи с этим коррекция терапии, основанная на результатах генотипирования пациентов, может снизить риск развития тяжелых НР при терапии ГЛБ.

### ФЕНОТИПИРОВАНИЕ CYP2C9

Фенотипирование CYP2C9 является способом оценки риска развития НР при применении препаратов ГЛБ. Данный подход можно реализовать путем сравнения концентраций веществ, метаболизируемых изоферментом CYP2C9, в группах пациентов с полиморфизмом и без полиморфизма соответствующего гена. Например, S. Gravel с соавт. [11] было показано, что у больных СД наблюдается незначительное повышение активности этого изофермента. Авторы данного исследования сделали вывод, что более глубокое понимание метаболических процессов позволит увеличить эффективность и безопасность фармакотерапии. В качестве маркера для определения активности CYP2C9 ими был использован толбутамид. На наш взгляд, его применение в роли маркерного субстрата у больных СД нежелательно, так как толбутамид является препаратом из той же фармакологической группы, что и ГЛБ, поэтому их совместный прием может привести к серьезной гипогликемии.

Как альтернатива толбутамиду маркерным субстратом при определении активности CYP2C9 может быть лозартан. В работах Ü. Yasar с соавт., P. Dorado с соавт. и S. Tanaka с соавт. [12–14] продемонстрирована взаимосвязь наличия у пациентов вариантов генов, кодирующих CYP2C9, со скоростью трансформации лозартана до его основного метаболита E-3174. Причем определение концентрации лозартана и его основного метаболита при проведении фенотипирования с одинаковой достоверностью можно проводить как в плазме крови, так и в моче пациента. Данный факт является несомненным преимуществом описанного подхода, так как сбор мочи более прост для пациента и не требует необходимости в инвазивной процедуре забора крови отсутствует.

Кроме работ по поиску маркерных субстратов для оценки активности CYP2C9 большое число публикуемых исследований посвящено разработке и применению методик непосредственного определения концентрации ГЛБ в плазме/сыворотке крови человека [15–23].

### ОБОСНОВАНИЕ ПРОВЕДЕНИЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО МОНИТОРИНГА ГЛИБЕНКЛАМИДА

Ввиду сложностей в оценке терапевтической эквивалентности препаратов ГЛБ, ТЛМ может оказаться наиболее полезным методом контроля, так как гено- и фенотипирование CYP2C9 позволяют прогнозировать только скорость биотрансформации ГЛБ, в то время как при прямом определении концентрации в ходе ТЛМ результаты зависят от скорости всасывания препарата в желудочно-кишечном тракте. ГЛБ плохо растворим в воде, параметры растворения зависят от pH среды и размера частиц. Абсорбция немикронизированной формы (референтный препарат Манинил® 5,0 мг) влияет на время приема лекарственного препарата по отношению ко времени приема пищи и является причиной сложности подтверждения его биоэквивалентности. Абсолютная биодоступность этой формы может находиться в диапазоне 24–69%, что приводит к низкой эффективности и НР. Микронизированный глибенкламид (референтный Манинил® 1,75 и 3,5 мг) быстро всасывается за счет малого размера частиц ГЛБ. Комбинация в одной таблетке немикронизированного ГЛБ 2,5 мг и метформина 400 мг (референтный Глибомет®) более эффективна, чем равная доза глибенкламида немикронизированного, так как метформин ускоряет всасывание ГЛБ. Микронизированный ГЛБ 2,5 или 5 мг применяют с метформином 500 мг (референтный Глюкованс®)<sup>3</sup>. Комбинация метформина с микронизированным ГЛБ оказывает наиболее выраженный гипогликемический эффект среди препаратов данной группы, так как пик концентрации активных компонентов в плазме крови наступает еще раньше, чем при использовании метформина с немикронизированным ГЛБ.

Определяющими клинико-фармакологическими параметрами ГЛБ являются абсорбция и  $T_{max}$  (табл. 1). Биоэквивалентность препаратов ГЛБ создает условия для их терапевтической эквивалентности и взаимозаменяемости. ГЛБ рекомендован пациентам с СД 2 типа до 60 лет, без ожирения, со скоростью клубочковой фильтрации выше 60 мл/мин/1,73 м<sup>2</sup>, при снижении остаточной секреции инсулина без кетоацидоза и сердечно-сосудистой патологии в составе комбинированной терапии [1]. Достижение целевых значений гликированного гемоглобина (HbA1) от 6,5 до 7,5% сопровождается риском развития гипогликемических состояний, именно поэтому вопрос взаимозаменяемости препаратов очень актуален. Терапевтическая неэквивалентность при подтвержденной биоэквивалентности препаратов может быть связана с нарушением правил приема препарата, особенностями течения СД у пациента (склонность к гипогликемиям) и в связи с возможным взаимодействием ГЛБ с другими препаратами.

<sup>3</sup> Государственный реестр лекарственных средств. <https://grls.rosminzdrav.ru>

Таблица 1. Основные фармакокинетические показатели глибенкламида (по В. Г. Кукес с соавт.<sup>4</sup>, с изменениями)Table 1. The main pharmacokinetic parameters of glibenclamide (adapted from V. G. Kukes et al.<sup>5</sup>)

Препарат (МНН, форма субстанции, доза) Drug (INN, active substance form, dosage)		$T_{max}^*$ , ч $T_{max}^*$ , h	Биодоступность, % Bioavailability, %	$V_d$ , л $V_d$ , L	Связь с белком, % Protein binding, %	Метаболиты Metabolites	Элиминация, % Elimination, %	$T_{1/2}$ , ч $T_{1/2}$ , h	Длительность действия, ч Duration of action, h
Глибенкламид Glibenclamide	немикронизированная форма 2,5 мг; 5 мг nonmicronized, 2.5 mg; 5 mg	от 1–2 до 4–6 from 1–2 to 4–6	до 70 up to 70		95–99	неактивные и два активных с клинически незначимой степенью активности inactive metabolites, and two active metabolites with a clinically insignificant degree of activity	метаболиты: 50 – с мочой; 50 – через ЖКТ metabolites: 50—urinary elimination; 50—GI elimination	от 6–10 до 16 from 6–10 to 16	до 24 up to 24
	микронизированная форма 1,75 мг; 3,5 мг micronized, 1.75 mg; 3.5 mg	от <1 до 1,5 from <1 to 1.5	почти 100 almost 100					>3	24
Глибенкламид + метформин Glibenclamide + metformin	немикронизированная форма 2,5 /400 мг; 5,0/400 мг nonmicronized, 2.5/400 mg; 5.0/400 mg	7–8	84	9–10	97–99		метаболиты: 40 – с мочой; 60 – через ЖКТ metabolites: 40—urinary elimination; 60—GI elimination	5–10	24
	микронизированная форма 2,5/500 мг; 5,0/500 мг micronized, 2.5/500 mg; 5.0/500 mg	4	95					4–11	>24

Примечание. МНН — международное непатентованное наименование;  $T_{max}$  — время достижения максимальной концентрации препарата в крови;  $V_d$  — объем распределения;  $T_{1/2}$  — период полувыведения; ЖКТ — желудочно-кишечный тракт.

Note. INN—International Nonproprietary Name;  $T_{max}$ —time to maximum blood concentration;  $V_d$ —volume of distribution;  $T_{1/2}$ —elimination half life; GI—gastrointestinal tract.

Таким образом, ТЛМ может помочь пациентам с СД 2 типа с величиной HbA1c от 7,6 до 9%, получающим ГЛБ в составе комбинированной терапии, снизить риск гипогликемии при достижении целевого значения HbA1c.

#### ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ГЛИБЕНКЛАМИДА МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМОГРАФИИ

Анализ публикаций, появившихся в последние 20 лет, позволяет проследить не только накопление знаний о фармакокинетике ГЛБ, но и прогресс методов проведения биоаналитических исследований. Большинство исследователей используют метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), что можно назвать общей тенденцией проведения биоаналитических исследований для лекарственных средств (ЛС) в виде относительно простых по структуре молекул. Отдельного внимания заслуживает сравнительная оценка применяемых способов пробоподготовки биообразцов и методов детектирования аналита после хроматографического разделения.

Все рассматриваемые далее методики прошли стандартную процедуру валидации. Из всего

многообразия валидационных характеристик нас интересовал прежде всего аналитический диапазон каждой конкретной методики, так как именно этот параметр позволяет оценить ее применимость для решения задач ТЛМ.

Наиболее ранняя публикация в настоящем обзоре F. Susanto с соавт. [15] посвящена сравнению применения ВЭЖХ с флуориметрическим детектированием (ФЛД) и ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием (МС) при определении ГЛБ в сыворотке крови человека. Методика ВЭЖХ-ФЛД требует трудоемкой пробоподготовки, включающей жидкость-жидкостную экстракцию (ЖЖЭ) с последующей дериватизацией, хроматографическое разделение проводили в нормально-фазовом режиме, который на сегодняшний день исключительно редко используют в рутинных биоаналитических исследованиях ввиду особенностей работы с малополярными гидрофобными элюентами. Данная методика позволяет определить ГЛБ в диапазоне 50–1500 нг/мл, однако методика ВЭЖХ-МС, описанная в этой же работе, позволяет достичь такого же аналитического диапазона при упрощенной пробоподготовке (без дериватизации) и с использованием

<sup>4</sup> Кукес ВГ, Сычев ДА, ред. Клиническая фармакология. 5-е изд. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2017.

<sup>5</sup> Kukes VG, Sychev DA, eds. Clinical pharmacology. 5th ed. Moscow: GEOTAR-Media; 2017.

обращенно-фазового режима хроматографического разделения, который облегчает применение методики в рутинном анализе. Авторы отмечали лучшие валидационные характеристики методики ВЭЖХ-МС по сравнению с ВЭЖХ-ФЛД.

I. Niopas с соавт. [16] проводили анализ методом ВЭЖХ в обращенно-фазовом режиме со спектрофотометрическим детектированием в ультрафиолетовой области спектра (УФ). При данном способе детектирования ввиду его меньшей чувствительности по сравнению с методами ФЛД и МС предусмотрены сложная процедура пробоподготовки с двухстадийной ЖЖЭ, упариванием, перерастворением экстрактов и большой объем вводимого образца. Аналитический диапазон методики составил 10–400 нг/мл и позволил авторам проводить фармакокинетические исследования ГЛБ в течение суток после приема препарата.

В работе S. AbuRuz с соавт. [17] использовали обращенно-фазовую ВЭЖХ-УФ, пробоподготовку проводили методом твердофазной экстракции (ТФЭ), что увеличивает стоимость анализа и не всегда пригодно для рутинных исследований. Хроматографическое разделение выполняли с добавлением в подвижную фазу ион-парного реагента, что ограничивает возможности для использования этой же хроматографической колонки для других целей, когда не требуется ион-парный реагент. Аналитический диапазон методики составил 50–2000 нг/мл. Методика была использована при изучении фармакокинетики ГЛБ у 100 человек.

Работа P. Venkatesh с соавт. посвящена совместному определению в плазме крови шести ЛС, используемых в лечении СД, методом ВЭЖХ-УФ [18]. Пробоподготовку осуществляли методом осаждения белков плазмы ацетонитрилом, что позволило получить нижний предел количественного определения 300 нг/мл. Эта величина ограничивает использование данной методики в фармакокинетических исследованиях и объясняет отсутствие описания какого-либо внедрения разработанного подхода.

Для целей ТЛМ были разработаны еще две методики с использованием ВЭЖХ-УФ и ВЭЖХ-МС, причем обе методики оказались сопоставимы по своим валидационным характеристикам [19]. Аналитический диапазон (20–400 нг/мл) действительно приемлем для проведения ТЛМ, однако ЖЖЭ как способ пробоподготовки усложняет анализ большого объема образцов.

Представленная в работе С. Ness с соавт. [20] методика совместного определения 11 антидиабетических ЛС с помощью ВЭЖХ-МС/МС, несмотря на трудоемкую процедуру пробоподготовки (двукратная ЖЖЭ с упариванием и перерастворением), имеет в качестве преимуществ возможность одновременного анализа ряда ЛС и высокую чувствительность (аналитический диапазон 1–200 нг/мл).

Тем не менее для полноценного внедрения в повседневную практику такая методика должна быть доработана в сторону упрощения.

Еще одним примером использования метода ВЭЖХ-УФ является исследование, проведенное K. S. Lakshmi с соавт. [21], в котором авторам не удалось достичь высокой чувствительности анализа (50–2000 нг/мл), несмотря на применение при пробоподготовке метода ТФЭ. При этом общее время анализа составило 30 минут, что сделало описанный подход неприемлемым для ежедневного исследования большого количества образцов.

Новый этап развития аналитического оборудования и методов анализа нашел отражение в работе T. M. Binz с соавт. [22]. Авторы предложили методику определения 5 антидиабетических ЛС в сыворотке крови и волосах человека. При проведении пробоподготовки применяли простой и быстрый способ осаждения белков ацетонитрилом. Методика достаточно чувствительная (аналитический диапазон от 5 до 100 нг/мл) и могла бы быть оптимизирована для целей ТЛМ. В более ранних исследованиях подобная чувствительность достигалась благодаря сложной и многостадийной пробоподготовке. В данной работе оптимальные условия определения ЛС были получены благодаря расширению возможностей хроматомасс-спектрометрического оборудования, что позволило создать короткую по времени (градиентное элюирование, время анализа 6 мин), пригодную для потокового анализа методику. X. Zhang с соавт. [23] для определения ГЛБ в плазме крови и моче применили метод ВЭЖХ-МС/МС. Предложенные этими авторами условия анализа, сочетание простой и удобной пробоподготовки (осаждение белков плазмы ацетонитрилом, подкисленным 0,1% муравьиной кислотой), широкий аналитический диапазон (1–400 нг/мл) могут быть рассмотрены для возможного использования именно этой методики при проведении ТЛМ.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании анализа опубликованных данных установлено, что фармакогенетическое исследование у пациентов с СД 2 типа, получающих ГЛБ, позволяет выделить группу риска развития гипогликемий. Определение полиморфизма CYP2C9 можно дополнять фенотипированием (лозартановый тест), что дает представление о роли активности фермента CYP2C9 в структуре причин гипогликемий у конкретного пациента. Методику определения лозартана, его активного метаболита E-3174 и глибенкламида в сыворотке крови и моче методом ВЭЖХ-МС/МС можно использовать для проведения ТЛМ, устанавливающего связь гипогликемии с концентрацией ГЛБ. В России технологии персонализации терапии ГЛБ в настоящее время не внедрены в практическое здравоохранение. С момента

внедрения ГЛБ в лечебную практику предложено большое количество методик определения его концентрации в сыворотке крови, которые используются в исследованиях биоэквивалентности препаратов, содержащих ГЛБ, и могут найти применение при установлении взаимозаменяемости этих препаратов. Имеющиеся в литературе данные позволяют сделать вывод, что современные возможности лабораторного анализа могут использоваться для снижения риска НР и повышения эффективности лечения ГЛБ.

**Вклад авторов.** *Г. И. Городецкая* — концепция и дизайн работы, сбор, анализ, интерпретация и критический пересмотр содержания результатов работы, ответственность за все аспекты работы; *В. В. Архипов* — критический пересмотр содержания, утверждение окончательного варианта статьи для публикации, надлежащее изучение и решение вопросов, связанных с целостностью всех частей статьи; *Е. С. Мельников* — сбор, анализ, интерпретация, надлежащее изучение и решение вопросов, связанных с достоверностью данных; *Т. А. Родина* — сбор, анализ и написание текста раздела «Определение концентрации глибенкламида методом высокоэффективной жидкостной хроматографии».

**Authors' contributions.** *Galina I. Gorodetskaya*—elaboration of the idea and design of the study, collection, analysis, interpretation and review of the study results, overall responsibility for all aspects of the study; *Vladimir V. Arkhipov*—review of the paper contents, approval of the final version for publication, review of all issues related to the integrity of individual parts of the paper; *Evgeny S. Melnikov*—collection, analysis, interpretation of data, review of all aspects related to reliability of the data; *Tatiana A. Rodina*—collection and analysis of data, writing of the part entitled *Determination of glibenclamide concentration by high performance liquid chromatography*.

**Благодарности.** Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00003-20-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР АААА-А18-118021590049-0).

**Acknowledgements.** The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00003-20-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. АААА-А18-118021590049-0).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.  
**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Дедов ИИ, Шестакова МВ, Майоров АЮ, ред. Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом. Вып. 9. М.; 2019. [Dedov II, Shestakova MV, Mayorov AYU, eds. Standards of specialized diabetes care. 9th ed. Moscow; 2019 (In Russ.)] <https://doi.org/10.14341/DM221S1>
2. Zoppi M, Braunschweig S, Kuenzi UP, Maibach R, Hoigne R. Incidence of lethal adverse drug reactions in the comprehensive hospital drug monitoring, a 20-year survey, 1974–1993, based on the data of Berne/St. Gallen. *Eur J Clin Pharmacol*. 2000;56(5):427–30. <https://doi.org/10.1007/s00228000158>
3. Sartor G, Melander A, Schersten B, Wählin-Boll E. Serum glibenclamide in diabetic patients, and influence of food on the kinetics and effects of glibenclamide. *Diabetologia*. 1980;18(1):17–22. <https://doi.org/10.1007/bf01228296>
4. Kirchheiner J, Brockmöller J, Meineke I, Bauer S, Rohde W, Meisel C, et al. Impact of CYP2C9 amino acid polymorphisms on glyburide kinetics and on the insulin and glucose response in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther*. 2002;71(4):286–96. <https://doi.org/10.1067/mcp.2002.122476>
5. Surendiran A, Pradhan SC, Agrawal A, Subrahmanyam DK, Rajan S, Anichavezhi D, et al. Influence of CYP2C9 gene polymorphisms on response to glibenclamide in type 2 diabetes mellitus patients. *Eur J Clin Pharmacol*. 2011;67(8):797–801. <https://doi.org/10.1007/s00228-011-1013-8>
6. Hartmann B, Czock D, Keller F. Drug therapy in patients with chronic renal failure. *Dtsch Arztebl Int*. 2010;107(37):647–55. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2010.0647>
7. Sánchez-Nava LA, Bautista-Sánchez U, Robles-Piedras AL. Pharmaceutical equivalence and similarity studies of glibenclamide tablets. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*. 2019;07(01):096–101. <https://doi.org/10.30574/gscbps.2019.7.1.0053>
8. Шохин ИЕ, Раменская ГВ, Василенко ГФ, Малашенко ЕА. Биофармацевтические свойства и сравнительная кинетика растворов генерических лекарственных средств глибенкламида. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2009;(6):36–8. [Shokhin IE, Ramenskaya GV, Vasilenko GF, Malashenko EA. Biopharmaceutical properties and comparative dissolution kinetics of glibenclamide generics. *Voprosy biologicheskoy, meditsinskoy i farmatsevticheskoy khimii = Problems of Biological, Medical and Pharmaceutical Chemistry*. 2009;(6):36–8 (In Russ.)]
9. Рейхарт ДВ. Исследование биоэквивалентности лекарственных препаратов в России. *Фармация*. 2010;(3):5–8. [Reikhart DV. Investigation of the bioequivalence of drugs in Russia. *Farmatsiya = Pharmacy*. 2010;(3):5–8 (In Russ.)]
10. Rydberg T, Jönsson A, Melander A. Comparison of the kinetics of glyburide and its active metabolites in humans. *J Clin Pharm Ther*. 1995;20(5):283–95. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2710.1995.tb00664.x>
11. Gravel S, Chiasson JL, Turgeon J, Grangeon A, Michaud V. Modulation of CYP450 activities in patients with type 2 diabetes. *Clin Pharmacol Ther*. 2019;106(6):1280–9. <https://doi.org/10.1002/cpt.1496>
12. Yasar U, Forslund-Bergengren C, Tybring G, Dorado P, Llerena A, Sjöqvist F, et al. Pharmacokinetics of losartan and its metabolite E-3174 in relation to the CYP2C9 genotype. *Clin Pharmacol Ther*. 2002;71(1):89–98. <https://doi.org/10.1067/mcp.2002.121216>
13. Dorado P, Machín E, de Andrés F, Naranjo ME, Peñas-Lledó EM, Llerena A. Development of a HPLC method for the determination of losartan urinary metabolic ratio to be used for the determination of CYP2C9 hydroxylation phenotypes. *Drug Metabol Drug Interact*. 2012;27(4):217–33. <https://doi.org/10.1515/dmdi-2012-0018>
14. Tanaka S, Uchida S, Inui N, Takeuchi K, Watanabe H, Namiki N. Simultaneous LC-MS/MS analysis of the plasma concentrations of a cocktail of 5 cytochrome P450 substrate drugs and their metabolites. *Biol Pharm Bull*. 2014;37(1):18–25. <https://doi.org/10.1248/bpb.b13-00401>
15. Susanto F, Reinauer H. Glibenclamide in serum: comparison of high-performance liquid chromatography using fluorescence detector and liquid chromatography/mass spectrometry with atmospheric-pressure chemical-ionization (APCI LC/MS). *Anal Bioanal Chem*. 1996;356(5):352–7. <https://doi.org/10.1007/s0021663560352>
16. Niopas I, Daftsios AC. A validated high-performance liquid chromatographic method for the determination of glibenclamide in human plasma and its application to pharmacokinetic studies. *J Pharm Biomed Anal*. 2002;28(3–4):653–7. [https://doi.org/10.1016/s0731-7085\(02\)00013-4](https://doi.org/10.1016/s0731-7085(02)00013-4)
17. AbuRuz S, Millership J, McElnay J. The development and validation of liquid chromatography method for the simultaneous determination of metformin and glipizide, glimepiride, glibenclamide or glimepiride in plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2005;817(2):277–86. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.12.018>
18. Venkatesh P, Harisudhan T, Choudhury H, Mullangi R, Srinivas NR. Simultaneous estimation of six anti-diabetic drugs — glibenclamide, glimepiride, glipizide, pioglitazone, repaglinide and rosiglitazone: development of a novel HPLC method for use in the analysis of pharmaceutical formulations and its application to human plasma assay. *Biomed Chromatogr*. 2006;20(10):1043–8. <https://doi.org/10.1002/bmc.635>

19. Gedeon C, Kapur B, Aleksa K, Koren G. A simple and rapid HPLC method for the detection of glyburide in plasma original research communication (analytical). *Clin Biochem.* 2008;41(3):167–73. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2007.07.025>
20. Hess C, Musshoff F, Madea B. Simultaneous identification and validated quantification of 11 oral hypoglycaemic drugs in plasma by electrospray ionisation liquid chromatography–mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2011;400(1):33–41. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-4698-8>
21. Lakshmi KS, Rajesh T. Separation and quantification of eight anti-diabetic drugs on a high-performance liquid chromatography: its application to human plasma assay. *ISRN Pharm.* 2011;2011:521353. <https://dx.doi.org/10.5402%2F2011%2F521353>
22. Binz TM, Villani N, Neels H, Schneider S. Rapid extraction, identification and quantification of oral hypoglycaemic drugs in serum and hair using LC–MS/MS. *Forensic Sci Int.* 2012;223(1–3):119–24. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2012.08.014>
23. Zhang X, Wang X, Vernikovskaya DI, Fokina VM, Nanovskaya TN, Hankins GD, et al. Quantitative determination of metformin, glyburide and its metabolites in plasma and urine of pregnant patients by LC–MS/MS. *Biomed Chromatogr.* 2015;29(4):560–9. <https://doi.org/10.1002/bmc.3314>

#### ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

**Городецкая Галина Ивановна.** *Galina I. Gorodetskaya.* ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7322-3323>

**Архипов Владимир Владимирович,** д-р мед. наук, профессор. *Vladimir V. Arkhipov,* Dr. Sci. (Med.), Professor. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1441-3418>

**Мельников Евгений Сергеевич,** канд. фарм. наук. *Evgeny S. Melnikov,* Cand. Sci. (Pharm.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8993-4808>

**Родина Татьяна Александровна,** канд. хим. наук. *Tatiana A. Rodina,* Cand. Sci. (Chem.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0528-3068>

Статья поступила 31.07.2019

После доработки 19.02.2020

Принята к печати 28.05.2020

Article was received 31 July 2019

Revised 19 February 2020

Accepted for publication 28 May 2020

## Противоопухолевые лекарственные препараты: планирование доклинических исследований по оценке эффективности и безопасности

О. А. Безбородова<sup>1,\*</sup>, А. А. Панкратов<sup>1</sup>, Е. Р. Немцова<sup>1</sup>, Ю. Б. Венедиктова<sup>1</sup>,  
М. С. Воронцова<sup>1</sup>, Г. Н. Енгальчева<sup>2</sup>, Р. Д. Сюбаев<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П. А. Герцена — филиал Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 2-й Боткинский проезд, д. 3, Москва, 125284, Российская Федерация

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

**Резюме.** Расшифровка структуры ДНК и разработка новых молекулярных методов ее анализа, идентификация специфических геномных изменений, ответственных за неопластическую трансформацию, стали поворотными моментами в разработке инновационных лекарственных средств — таргетных противоопухолевых агентов, направленных на молекулярные и генетические мишени опухолевого роста. Переход от эмпирического скрининга агентов, механизм действия которых основан на ингибировании пролиферации опухолевых клеток, к молекулярно-нацеленным методам анализа привел к возникновению ряда важных методологических вопросов, связанных с доклинической разработкой инновационных лекарственных средств. Цель работы — анализ общих принципов и особенностей доклинических исследований эффективности и безопасности современных противоопухолевых препаратов различных классов для усовершенствования существующих национальных методических рекомендаций. В работе рассмотрены вопросы доклинических исследований различных классов противоопухолевых лекарственных средств (синтетических химиотерапевтических препаратов, гормонов и антагонистов гормонов, препаратов алкилирующего действия, антиметаболитов, препаратов микробного и растительного происхождения, а также моноклональных антител). Приведены общие принципы изучения их фармакологической активности в системах *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo*, определения фармакокинетических параметров, описаны используемые методы и модели исследований. Указаны особенности определения генотоксичности, канцерогенности, репродуктивной токсичности, мутагенности, острой и хронической токсичности препаратов разных групп, перечислены критерии выбора доз для токсикокинетических исследований. Необходимость гармонизации национальных требований к проведению доклинических исследований с европейскими нормами влечет за собой унификацию терминологии и дальнейшую разработку общих алгоритмов выбора доз и определения необходимых объемов исследования. Использование биомаркеров в доклинических исследованиях позволит исключить дальнейшие исследования неэффективных соединений.

**Ключевые слова:** противоопухолевые лекарственные препараты; цитотоксические препараты; таргетные препараты; доклинические исследования; эффективность и безопасность

**Для цитирования:** Безбородова ОА, Панкратов АА, Немцова ЕР, Венедиктова ЮБ, Воронцова МС, Енгальчева ГН, Сюбаев РД. Противоопухолевые лекарственные препараты: планирование доклинических исследований по оценке эффективности и безопасности. *Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2020;10(2):96–110. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2020-10-2-96-110>

\***Контактное лицо:** Безбородова Ольга Алексеевна; [olgabezborodova@yandex.ru](mailto:olgabezborodova@yandex.ru)

## Anti-Tumour Drugs: Planning Preclinical Efficacy and Safety Studies

О. А. Bezborodova<sup>1,\*</sup>, А. А. Pankratov<sup>1</sup>, Е. Р. Nemtsova<sup>1</sup>, Yu. B. Venediktova<sup>1</sup>,  
M. S. Vorontsova<sup>1</sup>, G. N. Engalycheva<sup>2</sup>, R. D. Syubaev<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Р.А. Hertsen Moscow Oncology Research Centre, Branch of the National Medical Radiology Research Centre, 3 2nd Botkinsky Drive, Moscow 125284, Russian Federation

<sup>2</sup>Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, 8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

**Abstract.** The decoding of the DNA structure and development of new molecular methods of its analysis, as well as identification of specific genomic changes responsible for malignant transformation, have become the turning points in elaboration of novel anti-tumour drugs directed against molecular and genetic targets of tumor growth. Transition from empirical screening of agents inhibiting tumour cell proliferation to molecule-targeted analytical methods has raised a number of serious methodological issues regarding preclinical evaluation of novel medicines. The objective of this paper was to analyse general principles and features of preclinical efficacy and safety studies of different classes of modern anti-tumour drugs with a view to improve existing national

guidelines. The paper reviews various aspects of preclinical studies of different classes of anti-tumour drugs (small molecule chemotherapy drugs, hormones and hormone antagonists, alkylating agents and antimetabolites, microbial and herbal medicines, as well as monoclonal antibodies). The article explores general principles of studying the drugs' pharmacological activity *in vitro*, *ex vivo*, and *in vivo*, and evaluating their pharmacokinetic parameters. It describes various methods and models of research, summarises specific aspects of determination of genotoxicity, carcinogenicity, reproductive toxicity, mutagenicity, acute and chronic toxicity of various groups of medicines. It also lists criteria for selecting drug doses for toxicokinetic studies. The need for harmonisation of national requirements for conducting preclinical studies with the European standards entails alignment of terminology and further development of general algorithms for selecting doses and determining the necessary scope of research. The use of biomarkers in preclinical studies will make it possible to exclude inefficient compounds from further research.

**Key words:** anti-tumour drugs; cytostatics; targeted drugs; preclinical studies; efficacy and safety

**For citation:** Bezborodova OA, Pankratov AA, Nemtsova ER, Venediktova YuB, Vorontsova MS, Engalycheva GN, Syubaev RD. Anti-tumour drugs: planning preclinical efficacy and safety studies. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2020;10(2):96–110. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2020-10-2-96-110>

\*Corresponding author: Olga A. Bezborodova; [olgabezborodova@yandex.ru](mailto:olgabezborodova@yandex.ru)

Лекарственная терапия является одним из основных методов лечения больных со злокачественными новообразованиями и нередко применяется в комплексе с облучением и хирургическим лечением. При гемобластозах и диссеминированных формах солидных опухолей лекарственное воздействие является основным методом лечения [1].

История развития лекарственной терапии опухолей началась в 40-е годы XX века, когда случайно было обнаружено первое ДНК-алкилирующее вещество — азотистый иприт, который использовали в военных целях. Позже ученые подтвердили фармакологическое действие этого соединения, были опубликованы первые результаты клинических исследований [2] официально признанных химиотерапевтических препаратов.

Эти достижения инициировали поиск других синтетических и природных веществ, обладающих противоопухолевым действием, а также инструментов для их тестирования. В начале 1960-х годов в США на базе Национального института рака были разработаны первые подходы к изучению противоопухолевых лекарственных средств. Позднее международная конференция по скринингу противоопухолевых препаратов (1974 г.) выработала методологию изучения новых фармакологических веществ, способных вызывать гибель клеток. Главным образом, это были агенты, механизм действия которых основан на ингибировании пролиферации опухолевых клеток путем нарушения целостности молекул ДНК или блокирования процессов транскрипции и митоза.

В середине 1980-х годов, благодаря новым открытиям в области клеточной и молекулярной биологии, позволяющим идентифицировать молекулярные мишени и механизмы злокачественного роста, которые возможно заблокировать специфическими агентами [3], произошла смена парадигмы разработки противоопухолевых препаратов. Расшифровка структуры ДНК и разработка новых мо-

лекулярных методов ее анализа, идентификация специфических геномных изменений, ответственных за неопластическую трансформацию клеток, стали поворотными моментами в разработке инновационных лекарственных средств — таргетных противоопухолевых препаратов, направленных на молекулярные и генетические мишени опухолевого роста (биомаркеры) [4]. Были разработаны новые иммунотерапевтические подходы к лечению больных злокачественными заболеваниями с использованием моноклональных антител [5, 6]. В 2010 г. произошли значимые изменения, связанные с введением в клиническую практику препаратов — ингибиторов контрольных точек иммунитета, которые показали высокую эффективность в отношении местнораспространенных и метастатических опухолей.

Внедрение таргетных препаратов в онкологическую практику привело к повышению эффективности лечения меланомы, немелкоклеточного рака легкого и ряда других злокачественных опухолей. Однако результаты большинства клинических исследований свидетельствуют либо об ограниченной эффективности лекарственных средств данной группы, либо о высокой отсроченной токсичности [6].

Причиной этого может быть не только отсутствие оптимального отбора больных с учетом молекулярных маркеров чувствительности и/или резистентности в результате мутаций или генетического полиморфизма опухоли, но и методологические недостатки в дизайне доклинических исследований еще на ранних этапах разработки препарата.

Проблемы в области доклинических исследований в Российской Федерации обусловлены тем, что существующие национальные Руководства по проведению доклинических исследований<sup>1</sup> не учитывают инновационный характер современных противоопухолевых препаратов и не отражают научно обоснованную методологию их изучения.

<sup>1</sup> Миронов АН, ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. М.: Гриф и К; 2012.

Хабриев РУ, ред. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: Медицина; 2005.

Таким образом, существует необходимость пересмотра подходов к планированию и проведению доклинических исследований лекарственных средств нового поколения с учетом принятых международных подходов, которые отражены в Руководствах Международного совета по гармонизации технических требований к лекарственным средствам для медицинского применения (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, ICH)<sup>2</sup>.

Цель работы — анализ общих принципов и особенностей доклинических исследований эффективности и безопасности современных противоопухолевых препаратов различных классов для усовершенствования существующих национальных методических рекомендаций.

### ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА, ПРИМЕНЯЕМЫЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ

Существующие в настоящее время классификации противоопухолевых лекарственных средств носят условный характер, поскольку многие препараты, объединяемые в одну группу, имеют свой уникальный механизм действия и эффективны в отношении совершенно разных нозологических форм злокачественных новообразований, тем не менее эти классификации представляют определенный практический интерес.

Спектр противоопухолевых препаратов широк [7] и включает препараты алкилирующего действия, аналоги антиметаболитов, препараты природного и растительного происхождения и их синтетические аналоги, гормоны и антагонисты гормонов, а также таргетные препараты.

**Препараты алкилирующего действия** [8] составляют наиболее обширную группу противоопухолевых препаратов на основе синтетических соединений, включая производные нитрозомочевины и комплексные соединения платины, механизм действия которых основан на ингибировании пролиферации опухолевых клеток путем нарушения целостности молекул ДНК или блокирования процессов транскрипции и митоза.

Противоопухолевая активность **антиметаболитов** (структурных аналогов фолиевой кислоты, пурина, пиримидина) основана на структурном или функциональном подобии (имитации) их метаболитам, участвующим в синтезе нуклеиновых кислот [9–12].

Среди противоопухолевых **препаратов природного происхождения** выделяют противоопухолевые антибиотики (продукты жизнедеятельности микроорганизмов, различных видов почвенных грибов или их синтетические производные) и вещества растительного происхождения.

Скрининг продуктов жизнедеятельности микроорганизмов привел к открытию целого ряда препаратов антрациклинового ряда, механизм действия которых основан на ингибировании синтеза нуклеиновых кислот путем интеркаляции между парами азотистых оснований, нарушении вторичной спирализации ДНК за счет взаимодействия с топоизомеразой II и связывании с липидами клеточных мембран [13].

Большой класс противоопухолевых препаратов составляют **вещества растительного происхождения**. По механизму действия их разделяют на препараты, которые воздействуют на микротрубочки митотического аппарата клетки (винкалкалоиды и таксаны), и на ингибиторы топоизомеразы I (камптотецины) и топоизомеразы II (подофиллотоксины) [14].

Особый класс препаратов, используемых в терапии гормонозависимых опухолей, — **противоопухолевые гормональные средства и антагонисты гормонов**, — включает ряд стероидных гормонов и их синтетических производных, нестероидных синтетических соединений со стероидным и стероид-антагонистическим действием, аналоги рилизинг-гормона лютеинизирующего гормона гипофиза, а также тиреоидные гормоны, аналоги соматостатина и другие.

Механизм действия препаратов этой группы связан как с их способностью изменять гормональные соотношения в организме, так и с возможностью непосредственно влиять на опухолевые клетки. Наличие специфических рецепторов гормонов в опухолевых клетках лежит в основе их чувствительности к препаратам этой группы. Действие антагонистов гормонов определяется их конкуренцией с соответствующими гормонами на уровне клеточных рецепторов.

Достижения в понимании ключевых клеточных сигнальных путей и генетических факторов, приводящих к возникновению злокачественных опухолей, обусловили исследования и разработку **таргетных препаратов**, способных блокировать рост и прогрессирование опухоли путем взаимодействия со специфичными молекулами, вовлеченными в процесс канцерогенеза (табл. 1 и 2, содержащие описание лекарственных средств, используемых в онкологической практике в мире<sup>3</sup>, опубликованы на сайте журнала<sup>4</sup>).

<sup>2</sup> ICH M3(R2). Nonclinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals.

ICH S6(R1). Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals.

ICH S9. Nonclinical evaluation for anticancer pharmaceuticals.

ICH S9 Q&A. Questions and answers: nonclinical evaluation for anticancer pharmaceuticals.

<sup>3</sup> <https://ema.europa.eu/ema>

<https://www.fda.gov/drugs/drug-approvals-and-databases/resources-information-approved-drugs>

<https://antibodysociety.org>

<sup>4</sup> <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2020-10-2-96-110-tab1>

<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2020-10-2-96-110-tab2>

Действие таргетного агента реализуется через его связь с определенной молекулярной мишенью (белком), который участвует в росте, инвазии и/или метастазировании опухоли. Механизм основан либо на ингибировании белка, который является ключевым для функционирования опухолевой клетки, либо на блокировании процесса связывания белка с рецептором для предотвращения его активации [6]. По этому принципу действия выделяют три группы таргетных препаратов, которые могут быть нацелены на функцию дефектной молекулы, на пути передачи сигнала в опухолевой клетке или на уникальный фенотип опухолевой клетки.

Таргетные лекарственные средства представлены селективными ингибиторами тирозинкиназ и цитоплазматическими ингибиторами серин/треонинкиназ [15]. Мишенями являются факторы роста, сигнальные молекулы, белки клеточного цикла, модуляторы апоптоза и сигнальные молекулы, активирующие ангиогенез.

По происхождению таргетные препараты могут являться продуктами биотехнологического синтеза (моноклональные антитела [16], фрагменты антител, слитые белки) или продуктами химического синтеза (малые синтетические молекулы).

Первым разрешенным для медицинского применения таргетным препаратом на основе **моноклональных антител** (МкАТ) является ритуксимаб — химерное МкАТ мышь/человек, которое связывается специфично с рецептором CD20 на поверхности пре-В-клеток и зрелых В-лимфоцитов, экспрессирующимся более чем в 95% В-клеточных неходжкинских лимфом [17, 18]. Тозитумомаб — мышшиное  $\lambda$ -МкАТ антитело IgG2a класса, направленное на рецептор CD-20, конъюгированное с йодом 131 (I131-тозитумомаб), применяется в терапии резистентных к ритуксимабу неходжкинских лимфом [19].

Трастузумаб — гуманизированное МкАТ, полученное с помощью генно-инженерных технологий, способно ингибировать активацию рецептора-2 к эпидермальному фактору роста человека (human epidermal growth factor *receptor* 2, HER2). Применение его является золотым стандартом в комплексном лечении больных ранним HER2-позитивным раком молочной железы и HER2-позитивным раком желудка [20].

Рецептор HER-2/neu является объектом для воздействия гуманизированного МкАТ — пертузумаба, который назначают в сочетании с трастузумабом и доцетакселом в адъювантном и неoadъювантном режимах [21].

Цетуксимаб — химерное МкАТ (мышшь/человек), направленное на рецептор эпидермального фактора роста (epidermal growth factor receptor, EGFR). Механизм действия основан на ингибировании сигнального пути EGFR, приводящего к блокиро-

ванию клеточного цикла, ингибированию ангиогенеза, инвазии и метастазирования [22].

Панитумумаб — человеческое МкАТ IgG2 класса, полученное путем рекомбинантной ДНК-технологии и направленное на EGFR [23].

Отдельная категория таргетных препаратов опосредованно воздействует на опухолевый рост, в частности, путем блокирования факторов, стимулирующих рост сосудов (бевацизумаб). В отличие от описанных выше МкАТ, этот препарат направлен не на внеклеточный рецептор, ответственный за активацию различных молекулярных путей, а на растворимый фактор роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor A, VEGF-A), то есть является антиангиогенным лекарственным средством [24].

Новый класс противоопухолевых лекарственных средств представляют собой препараты на основе конъюгатов антител с цитостатиками [25–28]. В этой комбинации МкАТ селективно доставляет лечебный агент к опухолевым клеткам, экспрессирующим антиген, а цитотоксическое соединение вызывает их избирательную гибель.

Таргетные препараты могут быть представлены **малыми синтетическими молекулами**, являющимися продуктами химического синтеза, которые проникают через клеточную мембрану и взаимодействуют с мишенями внутри клетки или влияют на ферментативную активность целевого белка.

Иматиниб является препаратом первого поколения ингибиторов BCR-ABL-тирозинкиназы — аномального фермента, ответственного за онкогенную трансформацию клеток и ассоциированного с хроническим миелолейкозом. В настоящее время разработаны ингибиторы BCR-ABL нового поколения (дазатиниб, нилотиниб, бозутиниб, понатиниб), предназначенные для лечения больных, резистентных к иматинибу. Эта резистентность, по мнению авторов, обусловлена большим мутагенным потенциалом BCR-ABL-киназы [29].

К малым молекулам относятся препараты гефитиниб и эрлотиниб — ингибиторы тирозинкиназы EGFR, которые способны ингибировать аномальную активацию реакций каскада митоген-активируемой протеинкиназы (mitogen-activated protein kinase, MAPK), сигнального пути фосфатидилинозитол-3-киназы и протеинкиназы В (phosphatidylinositol-3 kinase/protein kinase B, PI3K/AKT) [30].

Специфический ингибитор HER2 — лапатиниб способен взаимодействовать с АТФ-связывающим сайтом внутриклеточного домена рецептора HER2, что приводит к ингибированию роста опухолевых клеток [31].

Сорафениб и сунитиниб — представители класса таргетных малых молекул, способные подавлять как внутриклеточные киназы, так и расположенные на поверхности клеток рецепторные

тирозинкиназы, среди которых рецепторы фактора роста эндотелия сосудов VEGF-1,2,3, тромбоцитарного фактора роста (platelet-derived growth factor receptor, PDGFR), а также рецепторы фактора стволовых клеток KIT и Fms-подобной тирозинкиназы-3 (Fms-like tyrosine kinase-3, FLT3) [32].

Темсиролиму и эверолиму являются избирательными ингибиторами mTOR-киназы (mammalian target of rapamycin), относящейся к категории серин/треониновых протеинкиназ. Серин/треониновая киназа играет значимую роль в регуляции экспрессии генов, ответственных за синтез циклинов, которые участвуют в клеточном цикле от фазы G1 (пресинтетическая) до фазы S (синтез) клеточного цикла [33].

К ингибиторам митоген-активированной протеинкиназы относятся вемурафениб и дабрафениб — селективные ингибиторы BRAF, члена семейства RAF серин/треонинкиназы. Ген *BRAF* кодирует протоонкоген B-Raf, участвующий в функционировании высокоонкогенного MAPK-сигнального пути, мутации которого идентифицированы приблизительно в 7% всех злокачественных опухолей.

Траметиниб и кобиметиниб также относятся к ингибиторам митоген-активируемой MEK-киназы (MAPK-extracellular regulated kinase) [34, 35].

Среди таргетных препаратов выделяют группу лекарственных средств ингибиторов протеасом. Протеасомы — мультисубъединичные протеазы, осуществляющие деградацию около 80% клеточных белков, участвующих в самых разных процессах: пролиферации, апоптозе, дифференцировке, метаболических и сигнальных путях. Их активность повышена практически во всех злокачественных опухолях человека. Бортезомиб — препарат первого поколения, который обратимо ингибирует активность протеасомы 26S, карфилзомиб — ингибитор протеасомы 20S второго поколения, способный необратимо ингибировать химотрипсин-подобную активность протеасомы, и иксазомиб, который применяется с леналидомидом (ингибитором секреции провоспалительных цитокинов) и дексаметазоном у больных рецидивирующей и/или резистентной множественной миеломой [36].

Иммунотерапия — быстро развивающийся метод лечения больных со злокачественными новообразованиями, направленный на стимуляцию иммунных реакций организма для распознавания и уничтожения опухолевых клеток. Эффективный иммунный ответ осуществляется главным образом Т-лимфоцитами и основан на каскаде процессов — цикле противоопухолевого иммунного ответа [37]. Однако известно, что опухолевые клетки используют различные механизмы уклонения от иммунного ответа, и один из них — иммунные контрольные точки (ИКТ) — семейство ингибирующих и активирующих рецепторов и их лигандов, модуляция ко-

торых стала основой современной иммунотерапии опухолей. Наиболее изученными ИКТ являются рецептор запрограммированной клеточной смерти (programmed cell death 1, PD-1) и антиген, ассоциированный с цитотоксическими Т-лимфоцитами (cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4 immunoglobulin, CTLA4), которые экспрессируются преимущественно Т-лимфоцитами.

Внедрение в клиническую практику **таргетных иммунопрепаратов на основе МкАТ** с разными точками воздействия — PD-1/PD-L1 (рецептор PD-1/лиганд PD-L1) и CTLA4 — является значимым событием, которое привело к повышению эффективности и более благоприятному исходу в терапии злокачественных новообразований различного гистогенеза [38–40].

Фундаментальные исследования в области молекулярной генетики, современный уровень развития генной инженерии сделали возможным появление принципиально нового класса противоопухолевых лекарственных средств — **генных препаратов**, которые будут рассмотрены в последующих публикациях.

#### ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Изменение направления разработки противоопухолевых лекарственных средств в сторону селективных препаратов меняет классическую модель скрининга новых молекул на мишень-ориентированную модель с четким обоснованием механизма действия.

Сложность структур и разнообразие фармакологических свойств инновационных молекул-кандидатов в лекарственные средства диктует необходимость применения при их изучении релевантных тест-систем и предикторных моделей *in vitro* и *in vivo* для адекватной интерпретации результатов доклинических исследований и трансляции их в клиническую практику.

Эти обстоятельства являются причинами пересмотра методологии изучения и подходов к оценке эффективности ряда фармакологических веществ, среди которых могут быть не описанные ранее химические структуры — пептиды, полипептиды, белки с молекулярной направленностью.

Последовательность этапов разработки новых противоопухолевых лекарственных средств сохраняется такой же, как и при исследовании любого нового вещества, и включает этапы изучения фармакологической активности в системах *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo*, определения фармакокинетических параметров, а также оценку параметров безопасности.

Современные требования к тест-системам *in vitro* включают наличие охарактеризованных

по гистогенезу стандартизованных культур опухолевых клеток, представленных в Американской коллекции типовых культур клеток АТСС и Немецкой коллекции клеточных культур и микроорганизмов DSMZ<sup>5</sup>.

В настоящее время в экспериментальных исследованиях для выявления потенциальной противоопухолевой активности *in vitro* и быстрой идентификации агентов используют фенотипический скрининг на панелях клеточных линий различного гистогенеза [41]. Фенотипический скрининг направлен на оценку цитотоксического действия лекарственных средств в отношении опухолевых клеток и считается полуэмпирическим подходом, который не требует знания основного механизма действия вещества [42]. Этот подход является скрининговой системой первичного отбора соединений с потенциальной противоопухолевой активностью и основан на определении концентрации, подавляющей рост 50% клеток в культуре (inhibitory concentration, IC<sub>50</sub>), концентрации вещества, вызывающей гибель 50% клеток (lethal concentration, LC<sub>50</sub>), и концентрации вещества, вызывающей снижение функции у 50% клеток (effective concentration, EC<sub>50</sub>).

К настоящему моменту разработана технология культивирования опухолевых клеток в трехмерной системе (3D), которая позволяет формировать органоиды — самоорганизующиеся микроткани, встроенные в трехмерный внеклеточный матрикс, которые имеют несколько типов дифференцированных клеток, проявляют клеточную поляризацию и имеют архитектурные особенности, подобные моделям *in vivo*. В отличие от двумерных систем, которые не всегда обеспечивают достоверный прогноз действия исследуемого лекарственного средства, 3D-системы позволяют имитировать условия микроокружения опухоли, гетерогенность ее клеточного состава, патофизиологические, биохимические и молекулярные характеристики, условия развития опухоли в организме [43].

Для таргетных препаратов целесообразно использовать опухолевые клетки с наличием молекулярных мишеней (биомаркеров), которые идентифицируют с использованием геномного (ДНК), транскриптомного (экспрессия генов на уровне РНК), протеомного (экспрессия белка), метаболического (профилирование метаболитов) анализов.

В ряде случаев исследования в системе *in vitro* выполняют на культурах первичных клеток, обладающих определенными преимуществами по сравнению с иммортализованными культурами клеток. Первичные культуры опухолевых клеток соответствуют генотипу *in vivo* с наличием терапевтической мишени и поэтому могут быть использованы

для оценки направленного фармакологического действия на молекулярном уровне.

Также для скрининга молекул-кандидатов применяют опухолевые клетки, полученные генно-инженерным путем, с направленными изменениями в структуре генов или выключенной экспрессией определенного гена [44, 45].

Несмотря на имеющиеся преимущества отбора противоопухолевых препаратов в системе *in vitro*, до сих пор решающую роль в медико-биологических исследованиях играют исследования на животных. Для ряда препаратов культуры клеток вовсе не могут быть адекватным индикатором активности, поскольку для реализации ими противоопухолевого эффекта требуется их активация в условиях *in vivo*. Системы *in vitro* также неадекватны при изучении эффективности антиметастатических и антиангиогенных лекарственных средств.

Традиционным подходом в экспериментальной онкологии для разработки опухолевых моделей *in vivo* является трансплантация опухолевых клеток инбредным мышам или крысам (сингенные модели), а также ксенотрансплантация опухолевых клеток человека, культивируемых *in vitro*, бестимусным мышам с ослабленным иммунитетом или мышам с тяжелым иммунодефицитом [46]. Традиционно этот подход используют в доклинических фармакологических исследованиях по изучению неспецифических химиотерапевтических лекарственных средств.

Другой метод моделирования экспериментальных опухолей человека — это прямой перенос (ксенотрансплантация) опухолевого материала большого иммунодефицитным мышам с целью получения ксенографта опухоли человека (patient-derived xenografts, PDX) [47]. PDX-модели используют в фармакологических исследованиях для оценки терапевтической эффективности таргетных молекул, которые проявляют фармакологическую активность только для определенного типа опухоли со специфическими молекулярно-генетическими характеристиками. Для этого опухолевый материал от пациентов до переноски мышам подвергают тщательному анализу (морфологическому, иммунохимическому, молекулярно-генетическому) с целью получения информации о наличии/отсутствии биомаркера, который будет являться мишенью для воздействия тестируемого лекарственного средства. После успешной трансплантации опухоли человека мышам и полной ее биологической адаптации этот биоматериал становится объектом для коллекционирования в биобанке. Таким способом создают коллекции различных типов/подтипов опухолей с описанными морфологическими признаками и выявленными геномными, транскриптомными, эпигеномными

<sup>5</sup> <https://lgcstandards-atcc.org>  
<https://dsmz.de>

изменениями. В перспективе биологический материал может стать моделью опухоли человека, на которой будут проводить тестирование вновь созданной таргетной молекулы-кандидата в противоопухолевые лекарственные средства, предназначенного для группы больных злокачественными новообразованиями с определенным молекулярно-генетическим статусом.

Очевидным преимуществом ксенотрансплантации является возможность использования опухолей человека, однако отсутствие функционального иммунного фона и естественного для человека опухолевого микроокружения служит большим ограничением для изучения таргетных иммунных препаратов. Это вызвано тем, что тестирование препаратов, стимулирующих противоопухолевые иммунные реакции, возможно только в иммунокомпетентном организме на моделях сингенных опухолей (иммунокомпетентные модели).

Существует подход, предполагающий генетическое вмешательство в геном мыши с использованием различных технологий с целью получения генно-инженерных мышей (genetically engineered mice, GEM), у которых в условиях естественного иммунного микроокружения спонтанно развиваются опухоли, имитирующие гистопатологические и молекулярные особенности злокачественных новообразований, демонстрирующие генетическую гетерогенность и способность к метастазированию [48].

GEM-модели со спонтанными опухолями являются лучшими прогностическими моделями для оценки антиметастатического действия препаратов, а также являются ценными инструментами для оценки механизмов, лежащих в основе процессов резистентности к молекулярно-направленным препаратам. Ожидается, что исследования доклинической эффективности инновационных препаратов с использованием GEM-моделей обеспечат наибольшую предсказуемость их действия при клинических исследованиях.

Однако биопрепараты, как правило, обладают видоспецифической фармакологической активностью, и их испытание на животных приводит к развитию иммунного ответа на чужеродный белок (человека), выработке антител, которые его нейтрализуют, и, соответственно, к снижению фармакологической активности. В связи с этим изучение препаратов возможно только с использованием релевантной тест-системы, например гуманизированных животных, которые способны продуцировать иммунокомпетентные клетки человека, улучшая тем самым условия ксенотрансплантации опухолей человека [49].

Создание гуманизированной PDX-модели предполагает ксенотрансплантацию опухолевого

материала человека, охарактеризованного по генетическим и метаболическим параметрам, гуманизированным мышам [50] с отсутствием трансплантационного иммунитета. Эта модель почти полностью сохраняет гистогенез, фенотип, гетерогенность исходной опухоли, что позволяет получить прямую корреляцию между терапевтическими эффектами таргетных препаратов, направленных на стимуляцию противоопухолевых иммунных реакций, в эксперименте и клинике.

В случае отсутствия релевантных видов животных может быть использован альтернативный подход, такой как использование модельного препарата с гомологичной молекулой<sup>6</sup>. Гомологичный белок — белок животного происхождения, например мыши, который распознает антигены-мишени у соответствующего вида животных с той же эффективностью, с какой препарат, предназначенный для клинических исследований, распознает соответствующую мишень (мишени) у человека. Однако существует вероятность того, что фармакологические механизмы действия модельного препарата и препарата, предназначенного для клинического использования, могут различаться.

Основываясь на механизме действия, для молекулярно-направленных веществ целесообразно проводить оценку фармакологического действия на мишень-ориентированных PDX-моделях с использованием модифицированных критериев ответа при солидных опухолях (modified response evaluation criteria in solid tumors, mRECIST): полный ответ (CR), частичный ответ (PR), стабилизация заболевания (SD) и прогрессирование заболевания (PD) [51]. В расчетах критериев mRECIST применяют традиционные количественные параметры: уровень торможения роста опухоли, задержка роста опухоли и другие [52–54].

Установление фармакокинетических характеристик, таких как динамика концентрации исходного вещества, распределения, материальный баланс, механизмы и пути метаболизма и элиминации на релевантном виде животных, а в ряде случаев и на модели заболевания, является важным аспектом в выборе эффективной дозы и режима введения лекарственного средства.

В результате фармакодинамические показатели определяются как зависимость эффекта от дозы (концентрации), где концентрация — это фармакокинетический показатель (площадь под кривой зависимости «концентрация–время» или максимальная концентрация); эффект — это модуляция фармакодинамического биомаркера, или ингибирование/задержка роста опухоли, или величина mRECIST, а для ряда препаратов — мера безопасности, включающая широту терапевтического и токсического действия [55].

<sup>6</sup> K1CH S6(R1). Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals.

Такой мультипараметрический подход к оценке фармакологического действия исследуемого вещества позволяет:

1) выявить диапазон терапевтических доз, при которых наблюдается снижение скорости роста опухоли или стабилизация процесса, а возможно, и уровень доз, для которых характерна частичная (во времени) или полная регрессия;

2) оценить уровень изменения специфической опухолевой мишени (биомаркера) с целью корректировки доз, поскольку известно, что фармакодинамические биомаркеры (биомаркеры ответа на лечение) применяются не только для проверки концепции о том, что лекарство вызывает фармакологический ответ, но и ориентированы на исследования «доза–эффект»;

3) определить потенциальную группу пациентов с определенным типом опухоли.

Таким образом, является целесообразным включение разработки предикторной модели с мишенью/биомаркером в программу доклинических исследований по оценке терапевтического действия молекулярных или биофармацевтических агентов. Специфический биомаркер будет являться индикатором фармакологического эффекта, качественно или количественно измеряемым параметром активности в отношении молекулярной мишени или показателем степени модуляции сигнального пути. Использование биомаркеров приведет к выявлению потенциально эффективных лекарственных средств, ускорит их продвижение в клинику и позволит исключить дальнейшие исследования неэффективных соединений.

#### ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ ИЗУЧЕНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Дизайн и объем доклинических исследований по оценке безопасности различаются в зависимости от типа изучаемого противоопухолевого препарата — для низкомолекулярных лекарственных средств (продуктов химического синтеза) и биологических препаратов (продуктов биотехнологического синтеза).

Методология доклинического изучения безопасности противоопухолевых лекарственных средств представлена как в национальном Руководстве по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ<sup>7</sup>, так и в международных Руководствах ИСН<sup>8</sup>.

Программа доклинической оценки безопасности **цитостатических противоопухолевых лекар-**

**ственных средств** включает исследования острой токсичности и хронической токсичности на двух видах животных и иммунотоксичности. Путь и режим введения препаратов животным должны соответствовать предлагаемому пути и режиму введения препарата человеку.

Для препаратов, рекомендованных для внутривенного применения, целесообразно проводить исследования по оценке совместимости препарата с кровью.

Исследование генотоксичности, канцерогенности и репродуктивной токсичности цитостатических препаратов нецелесообразно ввиду того, что противоопухолевые препараты *a priori* являются мутагенами и канцерогенами, так как механизм цитостатического действия реализуется либо путем прямого взаимодействия с ДНК, либо через ферменты, ответственные за синтез и функции ДНК. Однако подобный механизм не обеспечивает истинную избирательность противоопухолевого действия, поскольку уязвимыми для поражения цитостатиками являются не только злокачественные, но и активно пролиферирующие клетки нормальных тканей.

При исследовании общетоксических свойств (острая и хроническая токсичности) целесообразно использовать не только грызунов, но и крупных животных — плотоядных животных, собак. Использование различных видов животных позволит более достоверно оценить токсический потенциал исследуемого лекарственного средства, определить коэффициент видовой чувствительности и более точно прогнозировать вероятность развития токсических и побочных эффектов препарата у человека при его клиническом изучении.

При оценке острой токсичности лекарственного средства на грызунах, на наш взгляд, недостаточным является определение только максимальной переносимой дозы и/или летальной дозы LD<sub>50</sub>, целесообразно также определять и другие количественные критерии, характеризующие острую токсичность лекарственного средства: LD<sub>10</sub>, LD<sub>16</sub> и LD<sub>84</sub>, которые в дальнейшем используются для оценки степени опасности лекарственного средства при его однократном применении. При изучении субхронической/хронической токсичности желательнее определить три уровня доз: высокую токсическую дозу, низкую токсическую дозу и высокую нетоксическую дозу<sup>9</sup>.

Ввиду отсутствия у цитостатических лекарственных средств избирательности токсического действия, важной является оценка степени опасности

<sup>7</sup> Миронов АН, ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. М.: Гриф и К; 2012.

Хабриев РУ, ред. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: Медицина; 2005.

<sup>8</sup> ИСН S9. Nonclinical evaluation for anticancer pharmaceuticals.

ИСН S9. Questions and answers: nonclinical evaluation for anticancer pharmaceuticals.

<sup>9</sup> Хабриев РУ, ред. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: Медицина; 2005.

токсического действия при их однократном и многократном применении.

Для оценки степени опасности данного класса препаратов целесообразно анализировать количественные критерии токсичности: широту терапевтического действия, широту токсического действия, широту смертельного действия, коэффициент видовой чувствительности, наличие кумулятивных свойств у исследуемого препарата (индекс кумуляции, коэффициент кумуляции)<sup>10</sup>. Для характеристики противоопухолевых препаратов по степени опасности целесообразно использовать классификации, предложенные авторитетными токсикологами [56, 57].

Принимая во внимание, что для цитотоксических лекарственных средств характерны отсутствие избирательной токсичности и отсроченная токсичность, которая проявляется скрытым (латентным) периодом до клинической манифестации, при планировании доклинических исследований срок наблюдения за животными в экспериментах по изучению острой токсичности должен быть не менее 30 суток, а в экспериментах по изучению хронической токсичности — от 30 до 90 суток после последнего введения лекарственного средства в зависимости от механизма действия, фармакокинетических параметров и образности проявлений токсичности.

Программа доклинического изучения лекарственных средств, которые предполагают назначать больному для лечения в течение длительного времени (химиопрепараты для адъювантной терапии, гормональные препараты), более обширна и включает этапы исследований, рекомендованные для препаратов неонкологического профиля<sup>11</sup>.

**Гормональные препараты** обычно не являются прямыми цитотоксическими лекарственными средствами и действуют как антиэстрогены, (анти)прогестины, (анти)андрогены, ингибиторы ароматазы, агонисты гонадотропин-рилизинг-гормона. Поэтому оценка безопасности должна быть сосредоточена на результатах их долгосрочного воздействия на все системы организма, особенно на функциональную активность репродуктивной системы, фертильность, на беременность, внутриутробное и постнатальное развитие потомства, а также на потенциальную индукцию злокачественных новообразований. Минимальная продолжительность лечения у животных должна быть не менее 6 месяцев у грызунов и не менее 12 месяцев у негрызунов. Несмотря на то что эти препараты разрабатываются для применения с учетом полового признака, доклинические испытания целесообразно проводить на животных обоего пола, что позволит идентифицировать токсичность, не связанную с первичным

действием гормонального препарата, которое может быть скрыто у животных того же пола, что и предполагаемая группа пациентов [58]. Также является целесообразным проведение генотоксических исследований, изучение канцерогенности, репродуктивной токсичности и фертильности у крыс и токсичности у крыс и кроликов [59].

Мишени терапевтического действия **таргетных противоопухолевых препаратов** могут находиться не только в опухолевых, но и в нормальных клетках и тканях организма, поэтому токсический профиль таргетной терапии определяется механизмом действия, биораспределением препарата в организме, дозой и длительностью его применения, а также временем полувыведения [60]. При проведении таргетной противоопухолевой терапии у человека токсические реакции наблюдаются со стороны сердечно-сосудистой системы (изменение артериального давления, коагулопатии, аритмии, мио- или перикардиты, инфаркт миокарда, кардиомиопатия, сердечная недостаточность), дыхательной системы (инфильтраты в легких, интерстициальный пневмонит, облитерирующий бронхиолит), мочевыделительной системы (протеинурия, микроангиопатия, нефротический синдром, почечная недостаточность), желудочно-кишечного тракта (диарея, мукозиты, перфорации, фистулы), центральной нервной системы (синдром задней обратимой лейкоэнцефалопатии), а также со стороны эндокринных желез (гипопаратиреоидизм), костного мозга, кожи (ладонно-подошвенный синдром, сыпь). Как правило, они обратимы, но в ряде случаев могут быть жизнеугрожающими и даже заканчиваться летальным исходом [61].

Программа доклинического изучения **таргетных низкомолекулярных лекарственных средств** включает исследования острой токсичности, хронической токсичности и репродуктивной токсичности на двух видах животных, а также иммунотоксических свойств. Однако при подтверждении эмбриофетальной онтогенетической токсичности на одном виде животных исследование на втором виде не требуется<sup>12</sup>. Генотоксические свойства достаточно изучить в тесте Эймса. Для таргетных низкомолекулярных препаратов проведение исследований канцерогенности является нецелесообразным.

Доклиническое изучение безопасности **биотехнологических препаратов** также направлено на выявление потенциальной токсичности и соответствующих параметров ее мониторинга при клинических испытаниях.

Токсикологические исследования следует проводить на фармакологически релевантных (чувствительных) видах животных, у которых

<sup>10</sup>Там же.

<sup>11</sup>ICH M3(R2) Nonclinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals.

<sup>12</sup>ICH S9. Nonclinical evaluation for anticancer pharmaceuticals.

исследуемый препарат является фармакологически активным. Для МкАТ, фрагментов антител и слитных белков исследования проводят с использованием нечеловекообразных приматов, поскольку известно, что большинство этих препаратов не проявляет биологическую активность при использовании стандартных тест-систем (мыши, крысы и собаки). В случае отсутствия релевантных тест-систем возможен подбор модельного препарата животного происхождения с гомологичной молекулой.

Однако следует учитывать, что качественные и количественные изменения в организме животных могут отличаться от реакций на препарат у человека. В процессе интерпретации результатов исследования необходимо обратить внимание на различия в аффинности препарата к молекулярным мишеням, тканевом распределении молекулярной мишени, клеточных последствиях связывания мишеней, клеточных регуляторных механизмах и метаболизме препарата.

В связи с вышесказанным для биотехнологических препаратов подход к изучению безопасности имеет существенные отличия по сравнению с дизайном доклинических исследований низкомолекулярных лекарственных средств<sup>13</sup>. В частности, изучение острой токсичности, как правило, не требуется. Однако, на наш взгляд, целесообразным является введение ограниченной группе животных дозы исследуемого препарата, превышающей максимальную терапевтическую дозу в 50–100 раз, для определения его безопасности по критерию «широта терапевтического действия». Эти данные могут быть использованы для выбора доз при исследовании хронической токсичности.

При планировании исследований по изучению хронической токсичности биотехнологических препаратов необходимо учитывать предполагаемую длительность клинического применения, и для оценки потенциальной отсроченной токсичности в дизайне исследований должны быть использованы доза, при которой наблюдается максимальный фармакологический эффект, и доза, превышающая таковую в 10 раз.

Для биотехнологических лекарственных средств не рекомендуется использовать рутинные подходы многоуровневых иммунотоксических исследований, а только скрининговые тесты с учетом механизма действия препарата, так как эти лекарственные средства могут стимулировать или подавлять иммунную систему, оказывая влияние на гуморальный и клеточный иммунитет. Однако одним из важнейших аспектов изучения иммунотоксичности

для данного класса препаратов является оценка их иммуногенности, которую целесообразно, на наш взгляд, изучать в рамках исследований хронической токсичности.

Оценку репротоксичности таких препаратов проводят на одном релевантном виде животных. Если единственным релевантным видом животных являются нечеловекообразные приматы или имеются сведения литературы о репродуктивных токсических эффектах известных препаратов, которые подобны исследуемым биотехнологическим, то целесообразно представить научное обоснование потенциально возможного влияния препарата на фертильность, эмбриональное, фетальное и препостнатальное развитие плода. В качестве альтернативы можно использовать результаты токсикологических исследований, например по оценке влияния препарата на репродуктивные органы.

Особое внимание необходимо уделить исследованиям фармакологической безопасности, которая является неотъемлемой частью доклинической оценки безопасности новых лекарственных препаратов<sup>14</sup>, включая все классы противоопухолевых лекарственных средств. Необходимо проводить исследования, отражающие влияние препарата на жизненно важные системы организма: сердечно-сосудистую<sup>15</sup>, дыхательную и центральную нервную [62]. Также для проведения исследований, на наш взгляд, целесообразно использовать рекомендованный для клинического применения путь введения и два уровня доз (терапевтическую и максимально переносимую дозы).

Токсикокинетические исследования в настоящее время являются рутинным компонентом комплексных токсикологических экспериментов при доклиническом изучении безопасности лекарственных средств<sup>16</sup>. Для оценки корреляции системной экспозиции с токсическими эффектами используются основные фармакокинетические параметры: значение максимальной концентрации ( $C_{max}$ ), время достижения максимальной концентрации ( $T_{max}$ ) и интегральная площадь под фармакокинетической кривой «концентрация–время» (area under curve,  $AUC$ ).

Включение токсикокинетических исследований в программу доклинического токсикологического изучения имеет принципиальное значение для экстраполяции экспериментальных данных и прогноза безопасности применения лекарственных средств у человека, так как эти данные отражают биодоступность исследуемого вещества с наблюдаемыми токсическими эффектами и концентрацией исследуемого соединения в биоматериале [63].

<sup>13</sup>ICH S6(R1). Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals.

<sup>14</sup>ICH S7A. Safety pharmacology studies for human pharmaceuticals.

<sup>15</sup>Там же.

ICH S7B. Non-clinical evaluation of the potential for delayed ventricular repolarisation (QT interval prolongation) by human pharmaceuticals.

<sup>16</sup>ICH S3A. Toxicokinetics: a guidance for assessing systemic exposure in toxicology studies.

На сегодняшний день вопрос оценки алергизирующих свойств в рамках доклинических исследований носит дискуссионный характер. В работе ряда авторов [64–66] представлены результаты исследований алергизирующих свойств препаратов с разной молекулярной массой действующего вещества в стандартных тестах на морских свинках. Эти исследования подтверждают отсутствие корреляции между экспериментальными и клиническими данными, что свидетельствует о невозможности сделать корректный прогноз развития алергических реакций у человека.

Таким образом, весь спектр токсикологических исследований позволяет установить уровень токсических доз и дозу, не оказывающую нежелательного действия (no-observed adverse effect level, NOAEL), которая используется для выбора стартовой дозы в клинических исследованиях, впервые проводимых у человека<sup>17</sup>.

Выбор стартовой дозы для препаратов для адъювантной терапии, гормональных препаратов проводят по Рекомендациям Управления по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств (FDA)<sup>18</sup> для препаратов неонкологического профиля на основании установленной NOAEL. Стартовая безопасная доза препарата может быть определена как 1/10 (фактор безопасности 10) от дозы NOAEL и выражается в мг/м<sup>2</sup>. Пересчет доз с животного на человека осуществляется с использованием межвидовых коэффициентов переноса доз с учетом площади поверхности тела [67, 68]. Дополнительные факторы безопасности могут учитываться при наличии крутой кривой «доза–токсический эффект», тяжелых токсических явлений с длительной обратимостью, таких как гематотоксичность, нефротоксичность, гепатотоксичность, кардиотоксичность и нарушения центральной нервной системы.

Начальная доза для низкомолекулярных таргетных противоопухолевых препаратов выбирается как 1/10 (фактор безопасности 10) от дозы, которая вызывает гибель или необратимую тяжелую токсичность у 10% грызунов (severely toxic dose, STD<sub>10</sub>) и не вызывает серьезную необратимую токсичность у наиболее чувствительных видов животных — у негрызунов. Если предполагаемая начальная доза, рассчитанная по данным у грызунов, вызывает необратимую токсичность у негрызунов или известно, что этот вид животных является наиболее чувствительным или подходящим для моделирования заболевания, тогда начальная доза выбирает-

ся как 1/6 (коэффициент безопасности 6) от дозы, которая не вызывает гибели и серьезной необратимой токсичности у негрызунов (highest non-severely toxic dose, HNSTD). Тяжелые токсические эффекты включают: гибель животных, энцефалопатию, судороги, паралич, необратимую атаксию, кардиотоксичность и др. Для малых молекул STD<sub>10</sub> и HNSTD рассчитывают на единицу площади поверхности тела (мг/м<sup>2</sup>)<sup>19</sup>.

Для лекарственных средств, как правило, релевантными видами животных являются приматы. Токсические реакции, связанные с биотехнологическими препаратами, являются эффектом чрезмерной фармакологии, опосредованной мишенью. Поскольку многие препараты этого класса имеют высокую молекулярную массу (>100кДа) и вводятся внутривенно, то дозы для человека рассчитывают на единицу массы (мг/кг), а не площади поверхности тела [69]. Для выбора стартовой дозы используется расчет NOAEL для наиболее чувствительных к воздействию препарата видов животных. Начальная доза биопрепаратов (рекомбинантные белки, цитокины, факторы роста) выбирается как 1/10 (фактор безопасности 10) от дозы, не вызывающей побочного действия на релевантном виде животных, с учетом корректировки по аффинности мишени у человека и обезьяны (релевантного вида), длительного периода полувыведения, потенциальной иммуногенности и других факторов.

При отсутствии релевантных видов животных для биофармацевтических препаратов вместо расчета NOAEL определяют минимальную дозу, которая вызывает фармакологический ответ, полученный с использованием данных фармакодинамики *in vitro* и *in vivo* и фармакокинетики (minimum anticipated biological effect level, MABEL)<sup>20</sup>.

Для МКАТ является целесообразным с целью выбора стартовой дозы в клинических исследованиях, впервые проводимых у человека, основываться на определении MABEL даже в том случае, если доклинические исследования проводились на релевантных тест-системах [70, 71].

Таким образом, для противоопухолевых препаратов нового поколения следует разрабатывать индивидуальный дизайн исследования с включением основных приемов и методов доклинического изучения, направленного на выявление потенциальной способности вызывать непредвиденные и нежелательные реакции у человека.

Особенности токсического действия противоопухолевых препаратов различных классов, их

<sup>17</sup>European Medicines Agency. Guideline on strategies to identify and mitigate risks for first-in-human and early clinical trials with investigational medicinal products (EMA/CHMP/SWP/28367/07 Rev. 1). 2017.

<sup>18</sup>Preclinical Development of Oncology Drugs. A comprehensive guide to toxicology in nonclinical drug development. 2017.

<sup>19</sup>Food and Drug Administration Guidance for Industry. Estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics for adult healthy volunteers. 2005.

<sup>20</sup>European Medicines Agency. Guideline on strategies to identify and mitigate risks for first-in-human and early clinical trials with investigational medicinal products (EMA/CHMP/SWP/28367/07 Rev. 1). 2017.

вариабельность и сложность выявления требуют специфических и неординарных подходов к доклиническому изучению их токсических свойств. При этом, согласно международным требованиям, только доклинические исследования безопасности, но не фармакологической эффективности и фармакокинетики, проводят в соответствии с принципами надлежащей лабораторной практики (GLP)<sup>21</sup>.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время развитие фундаментальных представлений о разнообразии молекулярных механизмов опухолевой прогрессии идет практически вровень с последними достижениями молекулярно-генетических технологий. Это создает предпосылки для выявления новых драйверных мишеней и для создания препаратов, направленных против них. Успешное внедрение в клиническую практику инновационных препаратов во многом зависит от степени доказанности их безопасности и фармакологической активности на этапе доклинического исследования, дизайн которого имеет ряд особенностей, связанных со структурой основного действующего вещества и многообразием его фармакологического действия.

Проблемы в области доклинических исследований в Российской Федерации обусловлены именно тем, что рост научных исследований в последние десятилетия обуславливает значительные изменения в методических подходах к изучению фармакологических свойств инновационных препаратов. Однако этот прогресс в методологии и методах становится основой национальных руководств лишь спустя годы после их разработки. Поэтому с точки зрения современных достижений фармакологии, предлагаемые в национальных Руководствах по доклиническому изучению лекарственных средств<sup>22</sup> тест-системы *in vitro*, модели опухолей *in vivo* в большинстве своем не являются релевантными и не позволяют оценить потенциальный механизм действия и фармакологические эффекты лекарственных средств.

На сегодняшний день существует необходимость в гармонизации методических подходов национальных и международных Руководств к доклинической оценке безопасности противоопухолевых лекарственных средств, в рамках которой необходимо разработать программу доклинического изучения общетоксических свойств и других видов токсичности для каждого класса противоопухолевых лекарственных средств, которой можно придать форму конкретных протоколов; определить оптимальный объем этих исследований, необходимый для достоверной оценки токсических свойств

противоопухолевых лекарственных средств; унифицировать терминологию и суть количественных критериев, которые характеризуют токсический потенциал лекарственного средства; разработать четкий алгоритм выбора стартовой безопасной дозы препарата для человека на I фазу клинического исследования с учетом токсического потенциала исследуемого лекарственного средства для каждого класса противоопухолевых препаратов.

**Вклад авторов.** *О. А. Безбородова* — сбор и анализ материала по характеристике противоопухолевых препаратов различных классов и изучению их фармакологической активности, ответственность за все аспекты работы и целостность всех частей статьи; *А. А. Панкратов* — сбор и анализ материала по изучению безопасности противоопухолевых препаратов, написание раздела по безопасности; *Е. Р. Немцова* — анализ материала по изучению фармакологической активности противоопухолевых препаратов, редактирование текста; *Ю. Б. Венедиктова* — получение экспериментальных результатов по изучению фармакологических свойств противоопухолевых препаратов; *М. С. Воронцова* — получение экспериментальных результатов по изучению безопасности противоопухолевых препаратов; *Г. Н. Енгальчева* — анализ международных и национальных руководств по доклиническим исследованиям лекарственных средств, консультации по вопросам изучения фармакологической безопасности препаратов; *Р. Д. Сябаев* — предложение идеи и составление плана обзора, анализ международных и национальных руководств по доклиническим исследованиям лекарственных средств, интерпретация результатов работы, утверждение окончательного варианта статьи для публикации.

**Author's contributions.** *Olga A. Bezborodova*—collection and analysis of data on characterisation of various classes of anti-tumour drugs and on evaluation of their pharmacological activity; control of all aspects of the study and integrity of all parts of the paper; *Andrey A. Pankratov*—collection and analysis of data on safety of anti-tumour drugs, writing the part of the review devoted to safety; *Elena R. Nemtsova*—analysis of data on various aspects of studying pharmacological activity of anti-tumour drugs, editing of the paper; *Yulia B. Venediktova*—experimental study of anti-tumour drugs' pharmacological properties; *Maria S. Vorontsova*—experimental study of anti-tumour drugs' safety; *Galina N. Engalycheva*—analysis of international and national guidelines on preclinical studies of medicines, providing advice on safety pharmacology studies; *Rashid D. Syubaev*—elaboration of the idea and plan of the review, analysis of international and national guidelines on preclinical studies of medicines, interpretation of the results of the study, approval of the final version of the paper for publication.

**Благодарности.** Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России на проведение прикладных научных исследований по теме «Создание методических рекомендаций к разработке релевантных опухолевых моделей у животных для экспериментального изучения различных видов противоопухолевой радиационной терапии».

**Acknowledgements.** The study reported in this publication was carried out as a part of the publicly funded research project "Elaboration of Guidelines for the Development of Relevant Tumour Models in Animals for Experimental Study of Various

<sup>21</sup>ГОСТ 33044-2014. Принципы надлежащей лабораторной практики. М.: Стандартинформ; 2019.

<sup>22</sup>Миронов АН, ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. М.: Гриф и К; 2012.

Хабриев РУ, ред. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: Медицина; 2005.

Types of Anti-Tumour Radiation Therapy” and was supported by the National Medical Radiology Research Centre.

**Конфликт интересов.** Р. Д. Сюбаев является членом редакционной коллегии журнала «Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения», остальные

авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

**Conflict of interest.** R. D. Syubaev is a member of the Editorial Board of the “The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products”. The other authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Mokhtari RB, Homayouni TS, Baluch N, Morgatskaya E, Kumar S, Das B, et al. Combination therapy in combating cancer. *Oncotarget*. 2017;8(23):38022–43. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16723>
- Goodman LS, Wintrobe MM, Dameshek W, Goodman MJ, Gilman A, McLennan MT. Nitrogen mustard therapy. Use of methyl-bis(beta-chloroethyl)amine hydrochloride and tris(beta-chloroethyl)amine hydrochloride for Hodgkin's disease, lymphosarcoma, leukemia and certain allied and miscellaneous disorders. *J Am Med Assoc*. 1984;251(17):2255–61. <https://doi.org/10.1001/jama.1984.03340410063036>
- Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975;256(5517):495–7. <https://doi.org/10.1038/256495a0>
- Krause DS, Van Etten RA. Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *N Engl J Med*. 2005;353:172–87. <https://doi.org/10.1056/NEJMr044389>
- Scott AM, Allison JP, Wolchok JD. Monoclonal antibodies in cancer therapy. *Cancer Immun*. 2012;12:14. PMID:22896759
- Tsimberidou AM. Targeted therapy in cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2015;76(6):1113–32. <https://doi.org/10.1007/s00280-015-2861-1>
- DeVita Jr VT, Chu E. A history of cancer chemotherapy. *Cancer Res*. 2008;68(21):8643–53. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6611>
- Puyo S, Montaudon D, Pourquie P. From old alkylating agents to new minor groove binders. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2014;89(1):43–61. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2013.07.006>
- Tiwari M. Antimetabolites: established cancer therapy. *J Cancer Res Ther*. 2012;8(4):510–9. <https://doi.org/10.4103/0973-1482.106526>
- De Abreu RA, Lambooy LH, Ahment K, Brouwer C, Keizer-Garritsen JJ, Bokkerink JP, et al. 6-mercaptopurine: efficacy and bone marrow toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Adv Exp Med Biol*. 2000;486:271–5. [https://doi.org/10.1007/0-306-46843-3\\_53](https://doi.org/10.1007/0-306-46843-3_53)
- Wei Y, Yang P, Cao S, Zhao L. The combination of curcumin and 5-fluorouracil in cancer therapy. *Arch Pharm Res*. 2018;41(1):1–13. <https://doi.org/10.1007/s12272-017-0979-x>
- Carrillo E, Navarro SA, Ramírez A, García MÁ, Griñán-Lisón C, Perán M, et al. 5-Fluorouracil derivatives: a patent review (2012–2014). *Expert Opin Ther Pat*. 2015;25(10):1131–44. <https://doi.org/10.1517/13543776.2015.1056736>
- Hortobágyi GN. Anthracyclines in the treatment of cancer. An overview. *Drugs*. 1997;54(Suppl. 4):1–7. <https://doi.org/10.2165/00003495-199700544-00003>
- Arruebo M, Vilaboa N, Sáez-Gutierrez B, Lambea J, Tres A, Valladares M, et al. Assessment of the evolution of cancer treatment therapies. *Cancers (Basel)*. 2011;3(3):3279–330. <https://doi.org/10.3390/cancers3033279>
- Wu P, Clausen MH, Nielsen TE. Allosteric small-molecule kinase inhibitors. *Pharmacol Ther*. 2015;156:59–68. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2015.10.002>
- Pento JT. Monoclonal antibodies for the treatment of cancer. *Anticancer Res*. 2017;37(11):5935–9. <https://doi.org/10.21873/anticancer.12040>
- Coiffier B, Lepage E, Briere J, Herbrecht R, Tilly H, Bouabdallah R, et al. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2002;346(4):235–42. <https://doi.org/10.1056/nejmoa011795>
- Mounier N, Briere J, Gisselbrecht C, Emile JF, Lederlin P, Sebban C, et al. Rituximab plus CHOP (R-CHOP) overcomes bcl-2-associated resistance to chemotherapy in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). *Blood*. 2003;101(11):4279–84. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-11-3442>
- Quackenbush RC, Horner TJ, Williams VC, Giampietro P, Lin TS. Patients with relapsed follicular lymphoma treated with rituximab versus tositumomab and iodine I-131 tositumomab. *Leuk Lymphoma*. 2015;56(3):779–81. <https://doi.org/10.3109/10428194.2014.927461>
- Müller V, Clemens M, Jassem J, Al-Sakaff N, Auclair P, Nüesch E, et al. Long-term trastuzumab (Herceptin™) treatment in a continuation study of patients with HER2-positive breast cancer or HER2-positive gastric cancer. *BMC Cancer*. 2018;18(1):295. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4183-2>
- Schneeweiss A, Chia S, Hickish T, Harvey V, Eniu A, Hegg R, et al. Pertuzumab plus trastuzumab in combination with standard neoadjuvant anthracycline-containing and anthracycline-free chemotherapy regimens in patients with HER2-positive early breast cancer: a randomized phase II cardiac safety study (TRYPHAENA). *Ann Oncol*. 2013;24(9):2278–84. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdt182>
- Vincenzi B, Zoccoli A, Pantano F, Venditti O, Galluzzo S. Cetuximab: from bench to bedside. *Curr Cancer Drug Targets*. 2010;10(1):80–95. <https://doi.org/10.2174/156800910790980241>
- Poulin-Costello M, Azoulay L, Van Cutsem E, Peeters M, Siena S, Wolf M. An analysis of the treatment effect of panitumumab on overall survival from a phase 3, randomized, controlled, multicenter trial (20020408) in patients with chemotherapy refractory metastatic colorectal cancer. *Target Oncol*. 2013;8(2):127–36. <https://doi.org/10.1007/s11523-013-0271-z>
- Keating GM. Bevacizumab: a review of its use in advanced cancer. *Drugs*. 2014;74(16):1891–925. <https://doi.org/10.1007/s40265-014-0302-9>
- Bouchard H, Viskov C, Garcia-Echeverria C. Antibody-drug conjugates—a new wave of cancer drugs. *Bioorg Med Chem Lett*. 2014;24(23):5357–63. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.10.021>
- Barok M, Joensuu H, Isola J. Trastuzumab emtansine: mechanisms of action and drug resistance. *Breast Cancer Res*. 2014;16(2):209. <https://doi.org/10.1186/bcr3621>
- Herrera A, Moskowitz A, Bartlett N, Vose J, Ramchandren R, Feldman TA, et al. Interim results of brentuximab vedotin in combination with nivolumab in patients with relapsed or refractory Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2018;131(11):11183–94. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-10-811224>
- Beck A, Goetsch L, Dumontet C, Corvaia N. Strategies and challenges for the next generation of antibody-drug conjugates. *Nat Rev Drug Discov*. 2017;16(5):315–37. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.268>
- Rossari F, Minutolo F, Orciuolo E. Past, present, and future of Bcr-Abl inhibitors: from chemical development to clinical efficacy. *J Hematol Oncol*. 2018;11(1):84. <https://doi.org/10.1186/s13045-018-0624-2>
- Steins M, Thomas M, Geißler M. Erlotinib. *Recent Results Cancer Res*. 2018;211:1–17. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-91442-8\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-91442-8_1)
- Voigtlaender M, Schneider-Merck T, Trepel M. Lapatinib. *Recent Results Cancer Res*. 2018;211:19–44. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-91442-8\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-91442-8_2)
- Imbulgoda A, Heng DY, Kollmannsberger C. Sunitinib in the treatment of advanced solid tumors. *Recent Results Cancer Res*. 2014;201:165–84. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-54490-3\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-642-54490-3_9)
- Fasolo A, Sessa C. Targeting mTOR pathways in human malignancies. *Curr Pharm Des*. 2012;18(19):2766–77. <https://doi.org/10.2174/138161212800626210>
- Leonardi GC, Falzone L, Salemi R, Zanghi A, Spandidos DA, McCubrey JA, et al. Cutaneous melanoma: from pathogenesis to therapy (review). *Int J Oncol*. 2018;52(4):1071–80. <https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4287>

35. Salemi R, Falzone L, Madonna G, Polesel J, Cinà D, Mallardo D, et al. MMP-9 as a candidate marker of response to BRAF inhibitors in melanoma patients with BRAF<sup>V600E</sup> mutation detected in circulating-free DNA. *Front Pharmacol*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00856>
36. Goldschmidt H, Moreau P, Ludwig H, Niesvizky R, Chng WJ, Joshua D, et al. Carfilzomib-dexamethasone versus subcutaneous or intravenous bortezomib in relapsed or refractory multiple myeloma: secondary analysis of the phase 3 ENDEAVOR study. *Leuk Lymphoma*. 2018;59(6):1364–74. <https://doi.org/10.1080/10428194.2017.1376743>
37. Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: The cancer-immunity cycle. *Immunity*. 2013;39(1):1–10. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.07.012>
38. Amdahl J, Chen L, Delea TE. Network meta-analysis of progression-free survival and overall survival in first-line treatment of BRAF mutation-positive metastatic melanoma. *Oncol Ther*. 2016;4(2):239–56. <https://doi.org/10.1007/s40487-016-0030-2>
39. Sakamuri D, Glitza IC, Betancourt Cuellar SL, Subbiah V, Fu S, Tsimberidou AM, et al. Phase I dose-escalation study of anti-CTLA-4 antibody ipilimumab and lenalidomide in patients with advanced cancers. *Mol Cancer Ther*. 2018;17(3):671–6. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.mct-17-0673>
40. Powles T, O'Donnell P, Massard C, Arkenau HT, Friedlander TW, Hoimes TJ, et al. Efficacy and safety of durvalumab in locally advanced or metastatic urothelial carcinoma. Updated results from a phase 1/2 open-label study. *JAMA Oncol*. 2017;3(9):e172411. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2017.2411>
41. Shoemaker RH. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(10):813–23. <https://doi.org/10.1038/nrc1951>
42. Moffat JG, Rudolph J, Bailey D. Phenotypic screening in cancer drug discovery—past, present and future. *Nat Rev Drug Discov*. 2014;13(8):588–602. <https://doi.org/10.1038/nrd4366>
43. Duval K, Grover H, Han LH, Mou Y, Pegoraro AF, Fredberg J, et al. Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture. *Physiology (Bethesda)*. 2017;32(4):266–77. <https://doi.org/10.1152/physiol.00036.2016>
44. Yu C, Mannan AM, Yvone GM, Ross KN, Zhang YL, Marton MA, et al. High-throughput identification of genotype-specific cancer vulnerabilities in mixtures of barcoded tumor cell lines. *Nat Biotechnol*. 2016;34(4):419–23. <https://doi.org/10.1038/nbt.3460>
45. Barretina J, Caponigro G, Stransky N, Venkatesan K, Margoilin AA, Kim S, et al. The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature*. 2012;483(7391):603–7. <https://doi.org/10.1038/nature11003>
46. Morton CL, Houghton PJ. Establishment of human tumor xenografts in immunodeficient mice. *Nat Protoc*. 2007;2(2):247–50. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.25>
47. Annibaldi D, Leucci E, Hermans E, Amant F. Development of patient-derived tumor xenograft models. *Methods Mol Biol*. 2019;1862:217–25. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8769-6\\_15](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8769-6_15)
48. Kersten K, de Visser KE, van Miltenburg MH, Jonkers Jos. Genetically engineered mouse models in oncology research and cancer medicine. *EMBO Mol Med*. 2017;9(2):137–53. <https://doi.org/10.15252/emmm.201606857>
49. Zhou Q, Facciponte J, Jin M, Shen Q, Lin Q. Humanized NOD-SCID IL2rg<sup>-/-</sup> mice as a preclinical model for cancer research and its potential use for individualized cancer therapies. *Cancer Lett*. 2014;344(1):13–9. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.10.015>
50. Wege AK, Schmidt M, Ueberham E, Ponnath M, Ortmann O, Brockhoff G, et al. Co-transplantation of human hematopoietic stem cells and human breast cancer cells in NSG mice: a novel approach to generate tumor cell specific human antibodies. *MAbs*. 2014;6(4):968–77. <https://doi.org/10.4161/mabs.29111>
51. Gao H, Korn JM, Ferretti S, Monahan JE, Wang Y, Sing M, et al. High-throughput screening using patient-derived tumor xenografts to predict clinical trial drug response. *Nat Med*. 2015;21(11):1318–25. <https://doi.org/10.1038/nm.3954>
52. Hothorn LA. Statistical analysis of in vivo anticancer experiments: Tumor growth inhibition. *Drug Inform J*. 2006;40:229–38. <https://doi.org/10.1177/02F009286150604000212>
53. Wu J. Statistical inference for tumor growth inhibition T/C ratio. *J Biopharm Stat*. 2010;20(5):954–64. <https://doi.org/10.1080%2F10543401003618983>
54. Wu J, Houghton PJ. Interval approach to assessing antitumor activity for tumor xenograft studies. *Pharm Stat*. 2010;9(1):46–54. <https://doi.org/10.1002/pst.369>
55. Garraalda E, Dienstmann R, Tabernero J. Pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling for drug development in oncology. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2017;37:210–15. [https://doi.org/10.1200/edbk\\_180460](https://doi.org/10.1200/edbk_180460)
56. Березовская ИВ. Классификация химических веществ по параметрам острой токсичности при парентеральных способах введения. *Химио-фармацевтический журнал*. 2003;37(3):32–4. [Berezovskaya IV. Classification of substances with respect to acute toxicity for parenteral administration. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2003;37(3):139–41 (In Russ.)] <https://doi.org/10.1023/A:1024586630954>
57. Гуськова ТА. *Токсикология лекарственных средств*. М.: МДВ; 2008. [Gus'kova TA. *Toxicology of drugs*. Moscow: MDV; 2008 (In Russ.)]
58. Choudary J, Contrera JF, DeFelice A, DeGeorge JJ, Farrelly JG, Fitzgerald G, et al. Response to Monro and Mehta proposal for use of single-dose toxicology studies to support single-dose studies of new drugs in humans. *Clin Pharmacol Ther*. 1996;59(3):265–7. [https://doi.org/10.1016/s0009-9236\(96\)80003-8](https://doi.org/10.1016/s0009-9236(96)80003-8)
59. Faqi AS, ed. *A comprehensive guide to toxicology in nonclinical drug development*. 2nd ed. New York; Elsevier: 2016.
60. Chen HX, Cleck JN. Adverse effects of anticancer agents that target the VEGF pathway. *Nat Rev Clin Oncol*. 2009;6(8):465–77. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2009.94>
61. Чубенко ВА. Осложнения таргетной терапии. *Практическая онкология*. 2010;11(3):192–202. [Chubenko VA. Complications of targeted therapy. *Prakticheskaya onkologiya = Practical Oncology*. 2010;11(3):192–202 (In Russ.)]
62. Енгальчева ГН, Сюбаев РД, Горячев ДВ. Стандарты качества доклинических фармакологических исследований. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2019;9(4):248–55. [Engalycheva GN, Syubaev RD, Goryachev DV. Quality standards of preclinical pharmacological studies. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2019;9(4):248–55 (In Russ.)] <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2019-9-4-248-255>
63. Сюбаев РД, Енгальчева ГН, Горячев ДВ, Соколов АВ, Чистяков ВВ, Степанова ЕС. Экспертная оценка доклинических исследований токсикокинетики лекарственных средств (обзор). *Химио-фармацевтический журнал*. 2018;52(9):3–7. [Syubaev RD, Engalycheva GN, Goryachev DV, Sokolov AV, Chistyakov VV, Stepanova ES. Expert evaluation of preclinical toxicokinetic studies of pharmaceuticals (review). *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2018;52(9):753–7 (In Russ.)] <https://doi.org/10.1007/s11094-018-1894-2>
64. Крышень КЛ, Кательникова АЕ, Мужикян АА, Макарова МН, Макаров ВГ. Регуляторные и методические аспекты изучения алергизирующих свойств новых лекарственных средств на этапе доклинических исследований. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2018;8(1):44–55. [Kryshen KL, Katelnikova AE, Muzhikyan AA, Makarova MN, Makarov VG. Regulatory and methodological aspects of studying allergenic properties of new medicines at the preclinical stage. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2018;8(1):44–55 (In Russ.)] <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2018-8-1-44-55>
65. Choquet Kastylevsky G, Descotes J. Value of animal models for predicting hypersensitivity reactions to medicinal products. *Toxicology*. 1998;129(1):27–35. [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(98\)00060-2](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(98)00060-2)
66. Weaver JL, Staten D, Swann J, Armstrong G, Bates M, Hastings KL. Detection of systemic hypersensitivity to drugs using standard guinea pig assays. *Toxicology*. 2003;193(3):203–17. [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(03\)00267-1](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(03)00267-1)

67. Freireich EJ, Gehan EA, Rall DP, Schmidt LH, Skipper HE. Quantitative comparison of toxicity of anticancer agents in mouse, rat, hamster, dog, monkey, and man. *Cancer Chemother Rep*. 1966;50(4):219–44. PMID: 4957125
68. Уланова ИП, Сидоров КК, Халепо АИ. К вопросу об учете поверхности тела экспериментальных животных при токсикологическом исследовании. В кн.: Летавет АА, Саночский ИВ, ред. *Токсикология новых промышленных химических веществ*. Л.: Медицина; 1968. [Ulanova IP, Sidorov KK, Khalepo AN. On consideration of the body surface of experimental animals during toxicological studies. In: Letavet AA, Sanotsky IV. *Toxicology of new industrial chemicals*. Leningrad: Meditsina; 1968 (In Russ.)]
69. Tam K. Estimating the “First in human” dose—a revisit with particular emphasis on oncology drugs. *ADMET & DMPK*. 2013;1(4):63–75. <https://doi.org/10.5599/admet.1.4.10>
70. Johnson DE. Biotherapeutics: Challenges and opportunities for predictive toxicology of monoclonal antibodies. *Int J Mol Sci*. 2018;19(11):3685. <https://doi.org/10.3390/ijms19113685>
71. Brennan F, Kiessling A. In vitro assays supporting the safety of immunomodulatory antibodies. *Toxicol In Vitro*. 2017;45(Pt. 3):296–308. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.02.025>

#### ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

- Безбородова Ольга Алексеевна**, д-р биол. наук. *Olga A. Bezborodova*, Dr. Sci. (Biol.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-5009-1508>
- Панкратов Андрей Александрович**, канд. биол. наук. *Andrey A. Pankratov*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-7291-9743>
- Немцова Елена Романовна**, д-р биол. наук. *Elena R. Nemtsova*, Dr. Sci. (Biol.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-3579-1733>
- Венедиктова Юлия Борисовна**. *Yulia B. Venediktova*. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-0909-4202>
- Воронцова Мария Сергеевна**. *Maria S. Vorontsova*. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-9320-1746>
- Енгальчева Галина Нинелевна**, канд. биол. наук. *Galina N. Engalycheva*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-5121-0858>
- Сюбаев Рашид Даутович**, д-р мед. наук. *Rashid D. Syubaev*, Dr. Sci. (Med.). **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-6729-2349>

Статья поступила 25.11.2019  
После доработки 12.05.2020  
Принята к печати 28.05.2020

Article was received 25 November 2019  
Revised 12 May 2020  
Accepted for publication 28 May 2020

## Современные подходы к планированию и проведению клинических исследований лекарственных препаратов для лечения болезни Крона

А. Н. Богданов, Е. В. Горбунова, Д. В. Горячев, Е. В. Петранева\*

Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации,  
Петровский бульвар, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

**Резюме.** Развитие знаний о заболевании, появление биологических препаратов, предназначенных для патогенетического лечения болезни Крона, послужили основанием для разработки объективных методов оценки активности патологического процесса, что, в свою очередь, повлияло на изменение научных подходов к планированию клинических исследований в этой области. На сегодняшний день обновлены многие международные рекомендации, относящиеся к планированию, проведению и анализу результатов клинических исследований, накоплен значительный опыт клинических исследований лекарственных препаратов, предназначенных для лечения болезни Крона. Это диктует необходимость пересмотра методологического подхода к планированию программы клинических исследований. Цель работы — разработка требований к планированию и экспертной оценке клинических исследований, проводимых с целью регистрации лекарственных препаратов для лечения болезни Крона. В работе проведен анализ нормативных документов и рекомендаций, данных научной литературы по лечению болезни Крона и описана методология планирования клинических исследований. Описана эволюция подходов к планированию клинических исследований с момента появления биологических лекарственных препаратов. Обоснована необходимость единства концепции клинического исследования, включающей цели, оцениваемый терапевтический эффект, дизайн и выбор метода статистического анализа. Представлено научное обоснование необходимости применения комбинированной первичной конечной точки, включающей эндоскопическую ремиссию и результаты лечения, оцениваемые самим пациентом. Приведены критерии включения пациентов в клинические исследования лекарственных препаратов по показаниям «достижение и/или поддержание ремиссии заболевания». Рассмотрены основные интеркуррентные события, их влияние на терапевтический эффект, предложены подходы к планированию конечных точек, включающие оценку интеркуррентных событий. В работе подчеркивается необходимость соответствия принципов планирования и проведения клинических исследований III фазы научно обоснованным стратегиям снижения риска некорректной оценки эффективности и безопасности новых лекарственных препаратов для лечения болезни Крона и соответствия полученных результатов требованиям регуляторных органов на этапе регистрации препарата.

**Ключевые слова:** клиническое исследование; регистрация; болезнь Крона; дизайн клинических исследований; конечные точки; популяция; ремиссия; интеркуррентные события

**Для цитирования:** Богданов АН, Горбунова ЕВ, Горячев ДВ, Петранева ЕВ. Современные подходы к планированию и проведению клинических исследований лекарственных препаратов для лечения болезни Крона. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2020;10(2):111–120. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2020-10-2-111-120>

\***Контактное лицо:** Петранева Елена Вилорьевна; [petranevaev@expmed.ru](mailto:petranevaev@expmed.ru)

## Current Approaches to Planning and Conducting Clinical Trials of Medicinal Products for the Treatment of Crohn's Disease

A. N. Bogdanov, E. V. Gorbunova, D. V. Goryachev, E. V. Petraneva\*

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,  
8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

**Abstract.** Accumulation of knowledge on Crohn's disease, and development of biological products intended for the treatment of its underlying cause formed the basis for the development of objective methods for assessing the intensity of the pathological process, which in turn affected scientific approaches to the planning of clinical trials in this field. To date, many international recommendations related to planning, conduct of clinical trials, and analysis of their results, have been updated. Considerable experience has been gained with clinical trials of medicines intended for the treatment of Crohn's disease. Therefore, the methodological approach to the planning of pivotal clinical studies needs to be reviewed. The aim of the study was to develop requirements for planning and expert evaluation of clinical trials conducted with the aim of obtaining marketing authorisation for medicinal products for the treatment of Crohn's disease. The paper analyses regulations, recommendations, and scientific literature on the treatment of Crohn's disease and describes the methodology for planning clinical trials. It describes the evolution of approaches to clinical research planning since biological medicines appeared. The authors substantiate the need for an integrated concept of clinical research, which covers goals, estimated therapeutic effect, design, and choice of the statistical analysis method. They also provide scientific arguments in favour of a combined primary endpoint including endoscopic remission and the assessment of treatment results by the patient. The paper lists patient eligibility criteria in terms of "inducing and/or maintaining remission of the disease". The authors analyse the main intercurrent events, their influence on the therapeutic effect, and propose approaches to the planning of endpoints, including assessment of intercurrent events. The paper highlights the fact that the principles of planning

and conducting Phase III clinical trials need to be consistent with the evidence-based strategies of reducing the risk of incorrect assessment of efficacy and safety of new medicines, and that the obtained results have to meet the requirements of the regulatory authorities at the stage of marketing authorisation.

**Key words:** clinical study; marketing authorisation; Crohn's disease; clinical trial design; endpoints; population; remission; intercurrent events

**For citation:** Bogdanov AN, Gorbunova EV, Goryachev DV, Petraneva EV. Current approaches to planning and conducting clinical trials of medicinal products for the treatment of Crohn's disease. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2020;10(2):111–120. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2020-10-2-111-120>

\*Corresponding author: Elena V. Petraneva; petranevaev@expmed.ru

Болезнь Крона (БК) — хроническое рецидивирующее заболевание желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) неясной этиологии, характеризующееся трансмуральным, сегментарным, гранулематозным воспалением слизистой оболочки ЖКТ с развитием местных и системных осложнений<sup>1</sup>. В последние годы возможности терапии этого заболевания значительно расширились. В первую очередь это произошло благодаря появлению биологических препаратов, предназначенных для патогенетического лечения БК [1].

Первое клиническое исследование (КИ) биологического препарата, ингибитора фактора некроза опухоли при люминальной (воспалительной) форме БК, было проведено в 1997 г. [2]. В 2001 г. Европейское медицинское агентство по лекарственным средствам (European Medicines Agency, EMA) опубликовало руководство, где впервые были представлены критерии определения активности воспалительного процесса, ответа на лечение и ремиссии, а также рекомендован предпочтительный дизайн КИ с целью индукции и/или поддержания ремиссии БК<sup>2</sup>. Однако эти рекомендации основывались на ограниченном опыте клинических исследований биологических лекарственных препаратов.

Развитие специфических методов оценки активности заболевания, углубление знаний о течении заболевания, накопленный опыт КИ, а также появление новых требований со стороны регуляторных органов привели к необходимости пересмотра методологического подхода к планированию клинических исследований лекарственных препаратов (ЛП), применяемых для лечения БК [3]. Непосредственное влияние на определение потенциальных показаний к применению ЛП оказало формирование согласованных критериев оценки ответа на терапию. Вопросы оценки терапевтического эффекта при разработке ЛП продолжают находиться в фокусе внимания разработчиков, регуляторных и экспертных организаций разных уровней.

Комплексный индекс активности болезни Крона (ИАБК) (Crohn's Disease Activity Index, CDAI), который в течение длительного времени применялся в клинической практике и продолжает быть наиболее частым критерием оценки конечных точек в традиционных КИ, утратил свою объективность, поскольку не отражает восприятие заболевания и процесса лечения самим пациентом. ИАБК определяется по сумме баллов нескольких параметров и отражает только клинические (но не эндоскопические) критерии активности БК [4]. ИАБК сложно применять в повседневной клинической практике, в связи с чем затрудняется интерпретация и воспроизводимость результатов КИ. В настоящий момент EMA и американское Управление по контролю качества продуктов питания и лекарственных средств (Food and Drug Administration, FDA) пересматривают рекомендации по использованию комплексных индексов в КИ и в процессе разработки ЛП. Конечная цель рекомендаций заключается в поддержке заявляемых производителем показаний для применения ЛП, которые должны быть дополнены измерениями PRO (Patient Reported Outcomes / Результаты, сообщаемые пациентом)<sup>3</sup>, в сочетании с объективной оценкой степени воспаления [5]. Это, в свою очередь, оказывает влияние на дизайн и результаты КИ.

Количество исследований с оценкой PRO растет. Так, 21% регистрационных досье ЛП, одобренных FDA в 2006–2010 гг., содержали результаты оценки эффективности препаратов, полученные с применением PRO [6]. Результаты метаанализа 116 плацебо-контролируемых КИ демонстрируют тенденцию к увеличению доли КИ, в которых эффективность оценивалась с помощью PRO и эндоскопического исследования (рис. 1).

Поскольку разработка новых ЛП, особенно биологических, крайне длительна и высокочатратна, то планирование КИ, касающихся эффективности и безопасности применения препарата, должно быть научно обосновано и соответствовать требованиям регуляторных органов. Цель работы — разработка

<sup>1</sup> Клинические рекомендации по диагностике и лечению взрослых пациентов с болезнью Крона. Разработаны экспертной комиссией ООО «Российская гастроэнтерологическая ассоциация», ООО «Ассоциация колопроктологов России» и Общества по изучению воспалительных заболеваний кишечника при Ассоциации колопроктологов России. 2013 г. [https://www.gnck.ru/rec/recommendation\\_bk\\_v16.pdf](https://www.gnck.ru/rec/recommendation_bk_v16.pdf)

<sup>2</sup> Points to consider on clinical investigation of medicinal products for the management of Crohn's disease. CPMP/EWP/2284/99.

<sup>3</sup> Patient-focused drug development: collecting comprehensive and representative input. Guidance for industry, food and drug administration staff and other stakeholders. FDA-2018-D-1893. FDA, 2018.

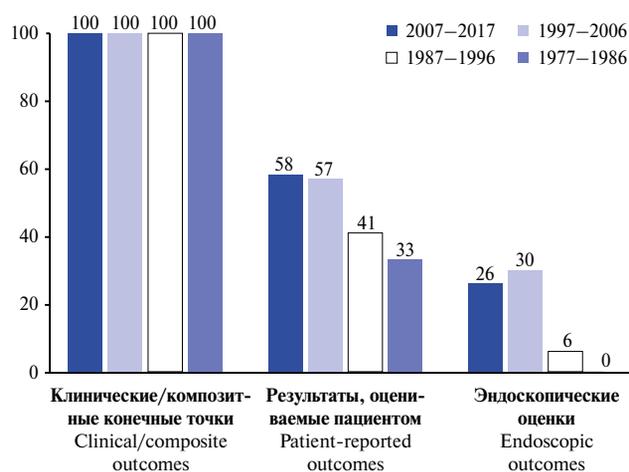
и обоснование требований к планированию и экспертной оценке протоколов клинических исследований, проводимых с целью регистрации лекарственных препаратов для лечения болезни Крона.

### ЦЕЛИ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЕЗНИ КРОНА

Целями лечения БК являются достижение и поддержание симптоматической и эндоскопической ремиссии [8]. Ранее лечение БК было направлено исключительно на контроль симптомов заболевания. В настоящее время накоплены данные о том, что у многих пациентов с БК продолжается активный процесс воспаления слизистой оболочки даже при отсутствии клинических проявлений и симптоматики [9]. Напротив, разработка схем лечения, направленных на заживление слизистых оболочек ЖКТ, и развитие методов эндоскопической визуализации позволили доказать взаимосвязь заживления слизистых и улучшения долгосрочного прогноза заболевания [10, 11].

Исторически варианты лечения БК были ограничены и в основном представляли собой схемы, основанные на применении глюкокортикостероидов (ГКС) и традиционных (небиологических) иммунодепрессантов. Фазы лечения были разделены на индукцию и поддержание ремиссии. Такое деление было обусловлено активным применением быстродействующих ГКС и имеющимся представлением об их эффективности в достижении ремиссии. Однако накопленные на сегодняшний день научные данные не подтверждают возможности достижения ремиссии с помощью ГКС, так как свидетельствуют о том, что эти препараты неэффективны для применения в целях заживления слизистой оболочки ЖКТ [12, 13]. Применение ГКС на стадии ремиссии также является необоснованным, к тому же длительное лечение ГКС сопровождается побочными эффектами. Традиционные иммунодепрессанты, которые также применяются в терапии БК, как правило, не подходят для индукции быстрого ответа на терапию, но способствуют поддержанию ремиссии, достигнутой с помощью других лекарственных препаратов.

Появление биологических препаратов (ингибиторы фактора некроза опухоли, антагонисты рецепторов интегрин и др.), предназначенных для непрерывного длительного лечения заболевания, и в том числе для индукции ремиссии, изменило традиционные подходы к лечению БК. В результате различия между схемами терапии, направленными на индукцию ремиссии и поддержание ремиссии, стали менее существенными. Тем не менее разделение на фазы лечения не потеряло свою актуальность и немаловажно, в частности, для разработки новых лекарственных средств, имеющих отложенное начало действия либо вызывающих нежелательные реакции при длительном применении. Такие ЛП могут иметь показания к применению на одной из фаз лечения БК.



**Рис. 1.** Доля (%) клинических исследований лекарственных препаратов лечения болезни Крона, в которых применялись оценки, по различным типам конечных точек. Адаптировано из [7]

**Fig. 1.** Proportion (%) of clinical trials of medicinal products for the treatment of Crohn's disease in which different types of endpoints were assessed. Adapted from [7]

### ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ

Цель исследования и, как следствие, изучаемый терапевтический эффект необходимо формулировать как можно более конкретно. Дизайн исследования, статистический анализ, интерпретация терапевтического эффекта должны соответствовать цели КИ и быть направлены на уменьшение рисков неправильной оценки терапевтического эффекта (рис. 2).

Оценка терапевтического эффекта в КИ при БК должна включать эффективность ЛП в достижении/индукции (краткосрочный эффект) и/или поддержании симптоматической и эндоскопической ремиссии (долгосрочный эффект).

При оценке терапевтического эффекта должны быть отражены события, которые могут произойти после начала лечения (интеркуррентные события) и которые могут повлиять на интерпретацию интересующей переменной [14].

Таковыми событиями могут быть:

- прекращение лечения из-за недостаточной переносимости, недостаточной эффективности препарата или прогрессирования заболевания и другие терминальные события (в том числе летальные);
- изменения в применении других ЛП, в том числе «препаратов спасения» и препаратов фоновой терапии;
- применение запрещенных протоколом ЛП;
- отказ от снижения дозы ГКС в соответствии со схемой протокола.

Поскольку не всякое отклонение от графика снижения дозы ГКС является интеркуррентным событием, в протоколе необходимо указать, какие отклонения от схемы применения ГКС считаются незначительными и приемлемыми. В протоколе



Рис. 2. Алгоритм планирования клинического исследования, рекомендованный ICH E9 (R1) Addendum on estimands and sensitivity analyses in clinical trials to the guideline on statistical principles for clinical trials. EMA/CHMP/ICH/436221/2017

Fig. 2. Algorithm of planning a clinical study presented in ICH E9 (R1) Addendum on estimands and sensitivity analyses in clinical trials to the guideline on statistical principles for clinical trials. EMA/CHMP/ICH/436221/2017

исследования обязательно указывают причину отказа от снижения дозы. Формулировка причины изменения схемы снижения дозы как «решение исследователя» является недопустимой.

Если в исследовании не учитывается возникновение или воздействие интеркуррентных событий, происходящих в клинической практике, например прекращение лечения и прием других препаратов, то его репрезентативность является сомнительной. Таким образом, при оценке терапевтического эффекта препарата необходимо учитывать результаты всех пациентов, не только оставшихся на лечении, но и прекративших его.

Для того чтобы повысить воспроизводимость результатов КИ, следует применять композитную стратегию, для которой интеркуррентное событие является частью определения конечной точки. Примером композитной стратегии в КИ по показанию «индукция ремиссии» является оценка терапевтического эффекта по доле пациентов, достигших ремиссии в течение 6–12 недель. Пациенты, которые прекратили лечение по причине неэффективности рандомизированного лечения, классифицируются как не достигшие конечной точки [15].

Для вторичных точек в тех случаях, когда эффект лечения измеряется как успех или неудача, применяются аналогичные подходы.

Поскольку стратегия лечения, включающая длительное применение ГКС, нежелательна, то и оценка терапевтического эффекта, не учитывающая применение ГКС (или отказ от снижения дозы), не представляет собой научного интереса и может вызвать вопросы регуляторных органов и экспертных организаций.

## КОНЕЧНЫЕ ТОЧКИ

### Первичные конечные точки

Первичной конечной точкой в КИ III фазы при воспалительной (люминальной) форме БК должна быть комбинированная оценка симптоматической и эндоскопической ремиссии, то есть одновременно оцениваются доля пациентов с симптоматической и доля пациентов с эндоскопической ремиссиями.

На данный момент валидированный PRO для БК отсутствует, поэтому в рекомендациях ЕМА<sup>4</sup> для оценки двух или трех симптомов заболевания предлагается использовать PRO2 или PRO3, которые базируются на симптоматической части ИАБК [16].

Степень воспаления слизистой оболочки ЖКТ рекомендуется оценивать эндоскопическими методами с использованием валидированной шкалы, например эндоскопического индекса тяжести БК (Crohn's Disease Endoscopic Index of Severity, CDEIS)<sup>5</sup> (ремиссия фиксируется при оценке  $\leq 3$  баллов) или простого эндоскопического индекса активности БК (Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease, SES-CD) (ремиссия фиксируется при оценке 0–2 балла) [17]. Рекомендуется проводить централизованную оценку эндоскопической картины с целью получения стандартизованного описания и минимизации субъективного фактора трактовки данных. Содержание суррогатных маркеров воспаления (С-реактивный белок и фекальный кальпротектин) считаются дополнительными показателями и не могут заменить прямую оценку воспаления.

Время оценки первичных точек зависит от цели лечения, а также от фармакодинамических свойств исследуемого препарата. Для большинства ЛП существует определенная отсрочка во времени между симптоматической и эндоскопической ремиссиями, затрудняющая одновременную оценку первичных точек. Оценка заживления слизистой оболочки ЖКТ и оценка наступления симптоматической ремиссии могут быть запланированы и выполнены в разные промежутки времени от начала лечения. Стандартный момент времени оценки эндоскопической ремиссии до сих пор не установлен. В КИ по показанию «индукция ремиссии»

<sup>4</sup> Guideline on the development of new medicinal products for the treatment of Crohn's Disease. CPMP/EWP/2284/99 Rev. 2. EMA. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). 2018.

<sup>5</sup> <https://www.igibdscores.it/en/info-cdeis.html>

рекомендовано проводить оценку первичной точки не позднее 12–16 недель с момента начала лечения, так как по этическим соображениям длительность приема плацебо в контрольной группе следует максимально ограничить [8].

Улучшение внешнего вида слизистой оболочки (ответ на лечение) может быть включено в первичную оценку эффективности в исследовании индукции ремиссии в дизайне «выбывание из группы лечения при рандомизации» (“randomized withdrawal”) или после инициального периода, в котором все пациенты получают исследуемый препарат. В случае отсутствия ответа на лечение происходит выбывание пациентов из исследования. Ответивших на лечение пациентов путем рандомизации распределяют в группы исследуемого препарата и плацебо. Этот дизайн позволяет произвольно устанавливать время для первичной оценки эффективности на отрезке времени до проведения рандомизации, когда все пациенты получают исследуемый препарат. Если полная эндоскопическая ремиссия (заживление слизистой) не может быть достигнута до проведения рандомизации, но есть вероятность улучшения эндоскопической картины, то улучшение внешнего вида слизистой может быть выбрано как часть первичной оценки при условии обоснования клинической значимости такого параметра. Крайне важно включить оценку эндоскопической ремиссии (заживление слизистых)<sup>6</sup> после завершения рандомизированной фазы исследования. Описанный дизайн позволяет сократить длительность применения плацебо и может быть выполнен в разных вариантах.

### **Вторичные конечные точки**

В протоколе рекомендуется использовать следующие вторичные конечные точки:

- количество пациентов, достигших как симптоматической, так и эндоскопической ремиссии;
- количество пациентов, ответивших на терапию;
- количество пациентов, достигших ремиссии, определяемой с применением более строгой оценки (если первичная точка оценивается менее требовательно, и наоборот);
- в краткосрочных КИ по показанию «индукция ремиссии», в которых не происходит снижение дозы ГКС к моменту оценки первичной конечной точки, могут определяться:

- доля пациентов, у которых симптоматическая и/или эндоскопическая ремиссия достигается без ГКС [18];

- доля пациентов, достигших симптоматической и/или эндоскопической ремиссии при сопутствующей терапии определенными дозами ГКС (например, 5, 10 или 20 мг преднизолона или его эквивалента) [19]<sup>7</sup>;

- количественные, отдельные оценки индивидуальных показателей по шкале оценки симптомов (например, «боль в животе» — по ИАБК 0–3 балла, PRO2 ≤1 балла) и шкале оценки состояния слизистой (например, SES-CD 1–2 балла), выраженные как доля пациентов, достигших указанных показателей;
- гистологическая оценка воспаления слизистой оболочки, в том числе количество пациентов с полной нормализацией гистологической картины;
- количество пациентов с зафиксированным заживлением слизистых оболочек, что подтверждено как эндоскопически, так и затуханием клинической симптоматики, нормализацией уровня биомаркеров и гистологической картины;
- изменение частоты стула;
- оценка биомаркеров воспаления (например, уровень фекального кальпротектина);
- время наступления ремиссии (только по оценке симптомов и биомаркерам);
- время достижения ответа на лечение (только по оценке симптомов и биомаркерам).

Дополнительно могут использоваться и другие вторичные конечные точки:

- валидированная оценка качества жизни, относящегося к здоровью (Health Related Quality of Life, HRQoL) с использованием опросника по воспалительным заболеваниям кишечника (Inflammatory Bowel Disease Questionnaire, IBDQ);
- сокращение числа хирургических процедур;
- количество баллов по шкале ИАБК.

### **ДИЗАЙН КЛИНИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ**

Разработка дизайна КИ при воспалительной форме БК является сложной задачей, поскольку заболевание охватывает неоднородную популяцию пациентов с различными фенотипическими проявлениями заболевания и непохожим развитием процесса. Кроме того, клинические симптомы БК (например боль в животе, частота стула) не очень специфичны и, следовательно, не всегда соотносятся с объективными признаками патологического процесса.

Стандартом дизайна КИ является рандомизированное двойное слепое исследование, которое должно проводиться в параллельных группах с активным препаратом сравнения и/или плацебо.

<sup>6</sup> ICH Topic E 10 Choice of Control Group in Clinical Trials. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-e-10-choice-control-group-clinical-trials-step-5\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-e-10-choice-control-group-clinical-trials-step-5_en.pdf)

<sup>7</sup> В качестве примера можно привести исследование CARMEN CD 307 по поддержанию ремиссии у пациентов с умеренной и тяжелой стадией болезни Крона, в котором вторичная конечная точка была определена как количество пациентов, достигших «чистой ремиссии» без применения ГКС на протяжении минимум 12 недель перед завершением исследования, общей продолжительностью лечения 52 недели. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03627091?cond=Crohn%27s+Disease&draw=1&rank=1>



Рис. 3. Типы дизайна клинических исследований III фазы  
Fig. 3. Types of confirmatory study designs (Phase III)

Дизайн определяется в зависимости от поставленной цели исследования (рис. 3).

**Клинические исследования «общего характера»: исследование по показанию «лечение болезни Крона»**

Для оценки влияния терапии на течение и исход заболевания необходимо провести по меньшей мере два исследования с включением пациентов, находящихся на разных стадиях заболевания, например в популяции пациентов, находящихся на ранних стадиях заболевания и не ответивших на стандартное лечение без применения биологических ЛП, и в популяции пациентов, находящихся на более поздних стадиях заболевания, у которых отсутствует ответ на различные варианты лечения, в том числе с применением биологических ЛП.

Исследуемое показание к применению ЛП определяет критерии включения пациентов в КИ (популяцию пациентов). Для всех КИ следует заранее определить критерии применения неотложной терапии («препаратов спасения»)⁸. С целью оценки применения «препаратов спасения» может быть запланировано проведение проспективного субпопуляционного или субгруппового анализа⁹. Оценка эффективности и безопасности, как правило, проводится в условиях применения исследуемого препарата в дополнение к фоновой терапии, поэтому желательно провести стратификацию пациентов в соответствии с предшествующим и/или фоновым лечением.

В КИ изучается как краткосрочная, так и долгосрочная эффективность ЛП, поэтому частью первичной конечной точки должны стать две временные точки. В зависимости от дизайна исследования статистически значимые эффекты следует фикси-

ровать как для ранних (6–12 недель), так и для поздних временных точек (6–12 месяцев).

При определении эффективности краткосрочной терапии («индукция ремиссии») продолжительность исследования обычно составляет от 6 до 12 недель. Изменение продолжительности исследования возможно только в случае надлежащего обоснования. Дизайн исследования при любой продолжительности должен давать возможность оценить время от начала до максимального эффекта ЛП для оценки по первичной точке.

Долгосрочная эффективность препарата изучается в долгосрочных исследованиях либо при продолжении ранее проведенного краткосрочного исследования при дальнейшем сохранении ослепления и рандомизации или с рандомизацией в группу плацебо или исследуемого препарата пациентов, ответивших на лечение (дизайн “randomized withdrawal”) [20, 21]. Такой подход требует привлечения большего числа пациентов, поскольку исследование должно иметь достаточную статистическую мощность для финальной 52-недельной оценки с учетом того, что не ответившие на лечение пациенты исключаются из рандомизации¹⁰. Общая продолжительность исследования «общего характера» составляет не менее 12 месяцев.

**Клинические исследования по показаниям «индукция ремиссии» либо «поддержание ремиссии»**

Пациенты, включенные в КИ «индукция ремиссии», должны иметь выраженную симптоматику БК. В критериях включения указываются минимальная выраженность симптомов, сопутствующие осложнения, степень воспаления слизистой оболочки и локализация процесса. Степень воспаления и протяженность пораженного участка ЖКТ должна быть подтверждена результатами эндоскопических и гистологических исследований, проведенными не ранее чем за три месяца до включения пациента в исследование. Для подтверждения может использоваться рентгенологическая визуализация (в том числе магнитно-резонансная томография). Критерием включения в исследование должно быть наличие симптомов заболевания не менее чем за три месяца до включения, чтобы избежать включения в исследование пациентов с инфекционной, желчно-солевой диареей, а также с синдромом раздраженного кишечника. Необходимо учитывать наличие показаний для применения исследуемого препарата.

В качестве критериев включения возможно использование индекса ИАБК на базе клинической картины и симптомов заболевания или PRO,

⁸ Руководство по подготовке досье неисследуемых лекарственных препаратов для получения разрешения на проведение клинических исследований. Проект. Евразийский экономический союз. [https://docs.eaeunion.org/pd/ru-ru/0122625/pd\\_19022018\\_att.pdf](https://docs.eaeunion.org/pd/ru-ru/0122625/pd_19022018_att.pdf)

⁹ Guideline on the investigation of subgroups in confirmatory clinical trials. 2019. EMA/CHMP/539146/2013. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP).

¹⁰ Adaptive designs for clinical trials of drugs and biologics. FDA-2018-D-3124.

разработанного из ИАБК (PRO2 (не менее 14 баллов) или PRO3 (не менее 22 баллов)); определенный уровень воспаления слизистой оболочки, подтвержденный при помощи индекса CDEIS или SES-CD [22]. Для каждого пациента следует указывать фенотипическую форму заболевания, продолжительность, степень активности, наличие осложнений, локализацию процесса, предварительное лечение и статус курения.

Целью КИ по показанию «поддержание ремиссии» является подтверждение того, что полная ремиссия у пациентов, зафиксированная в начале исследования, сохраняется в течение всего 52-недельного периода наблюдения.

### ВЫБОР ПРЕПАРАТА СРАВНЕНИЯ

Выбор препарата сравнения зависит от целей применения исследуемого препарата. При планировании применения ЛП в первой линии терапии БК необходимо обеспечить прямое сравнение с актуальным общепринятым стандартом терапии первой линии или с результатами, полученными в группе плацебо-контроля (если это этически оправдано<sup>11</sup>).

При предполагаемом применении препарата в качестве терапии второй линии (в случае неэффективности или непереносимости препаратов первой линии) как в монотерапии, так и в добавлении к стандартной (фоновой) терапии в качестве препарата сравнения может быть использовано плацебо. При введении исследуемого препарата в схему лечения в дополнение к стандартной терапии последняя продолжается при отсутствии непереносимости и наличии возможных дополнительных преимуществ в обеих группах рандомизированного лечения. В протоколе КИ при этом указываются критерии неэффективности препаратов первой линии. В некоторых целевых популяциях пациентов может потребоваться применение препарата сравнения.

### ПРЕДШЕСТВУЮЩАЯ И ФОНОВАЯ ТЕРАПИЯ

Пациенты с БК обычно получают стандартное лечение, которое может быть продолжено и во время исследования (фоновая терапия). Продолжительность и дозы применяемых препаратов фоновой терапии должны быть определены до включения в исследование. Например, при лечении азатиоприном/меркаптопурином необходимо соблюдение приема этих препаратов в постоянной дозе, по крайней мере, в течение трех месяцев. Следует отметить, что изменения в фоновой терапии могут быть расценены как интеркуррентное событие, что может усложнить оценку терапевтического эффекта. В случае отмены предшествующей включению в исследование терапии уста-

навливается необходимый по продолжительности отмывочный период.

Следует определить минимальную продолжительность приема и дозу препаратов, которые пациент принимал до начала исследования. В КИ второй линии терапии у пациентов со средней и тяжелой степенью заболевания такими предшествующими препаратами могут быть ГКС. История предшествующего применения ГКС или иммунодепрессантов не имеет большого значения, так как большинство пациентов с диагнозом БК, как правило, применяли эти препараты в течение своего заболевания. Предшествующее применение препаратов следует отличать от зависимости или рефрактерности к предшествующему лечению [23]. Предшествующая терапия антибиотиками обычно отменяется.

Пациенты, включенные в КИ ранних стадий лечения и получающие ГКС, должны либо получать ГКС в течение всего исследования в постоянной дозе (при условии, что это не представляет риска для пациента), либо уменьшать дозу ГКС согласно схеме, определенной протоколом. Пациенты, которым не проводилось снижение дозы ГКС до или в течение лечения, должны начать сокращение дозы ГКС в течение 12 недель после включения в фазу поддерживающей терапии.

### ОСНОВНЫЕ СТАТИСТИЧЕСКИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Выбор метода статистического анализа, включая обработку недостающих данных, должен исходить из цели исследования [24].

Если интеркуррентное событие считается «неудачей лечения» (компаративная стратегия), данные, полученные после наступления такого события, не требуются для оценки клинического исхода. Однако такие данные могут быть необходимы для оценки иных параметров, отражающих другие вопросы исследования, представляющие научный интерес, например влияние лечения на симптоматику заболевания.

Важно различать интеркуррентные события и недостающие данные. Так, например, отказ пациента от повторной эндоскопии может сыграть определенную роль в интерпретации данных, особенно для исследований, где требуется частая эндоскопическая диагностика. Однако в этом случае отсутствие результатов эндоскопического исследования не является критерием наступления интеркуррентного события, а расценивается как недостающие данные, которые должны учитываться при общем анализе результатов исследования. Недостающие данные могут быть восстановлены с помощью метода множественной импутации, основанного на вероятности ремиссии у пациентов, находящихся

<sup>11</sup> ICH Topic E 10. Choice of Control Group in Clinical Trials. EMA CPMP/ICH/364/96. 2001. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-e-10-choice-control-group-clinical-trials-step-5\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-e-10-choice-control-group-clinical-trials-step-5_en.pdf)

на лечении. Во внимание также могут быть приняты дополнительные данные.

### ОЦЕНКА БЕЗОПАСНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА

Выявленные в КИ нежелательные реакции, связанные с применением исследуемых лекарственных препаратов, следует описывать с указанием и учетом продолжительности лечения, дозы, времени разрешения нежелательных явлений, возраста пациентов и других факторов (например, фоновой терапии). Поскольку основной группой препаратов, применяемых при лечении болезни Крона, являются иммунодепрессанты, особое внимание следует уделять возможности возникновения инфекционных, аутоиммунных заболеваний и проонкогенному действию этих препаратов. Так как БК часто встречается у женщин с детородным потенциалом, этой популяции пациентов должно уделяться особое внимание.

При оценке безопасности лекарственного препарата необходимо охарактеризовать и количественно описать профиль безопасности лекарственного препарата за промежуток времени, соответствующий предполагаемой продолжительности его применения. Таким образом, длительность экспозиции лекарственного препарата и ее взаимосвязь как со сроком возникновения нежелательных явлений, так и с их выраженностью являются важными факторами установления объема базы данных, требуемых для оценки безопасности. Применение лекарственной терапии при болезни Крона, как правило, длительное, поэтому необходимо проведение исследований у достаточной по репрезентативности группе пациентов в течение продолжительного времени.

Длительное применение биологических препаратов может приводить к образованию антител, поэтому должно быть изучено образование связующих и/или нейтрализующих антител к исследуемому ЛП и влияние этих антител на долгосрочную эффективность и безопасность исследуемого препарата. Применение иммунодепрессантов в качестве сопутствующей терапии может увеличить риск возникновения серьезных нежелательных реакций, в том числе возникновения оппортунистических инфекций и злокачественных новообразований, и дополнительно снизить возможность определения иммуногенности исследуемого препарата. В этом случае внимание должно быть уделено сбору данных по безопасности при применении ЛП в пострегистрационном периоде.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Клинические исследования лекарственных препаратов для лечения БК необходимо планировать на основании (или с учетом) современных знаний о стратегии лечения заболевания, которая

в первую очередь определяется задачами достижения ремиссии у каждого конкретного пациента и поддержанием ремиссии после окончания индукционной терапии. В работе представлен четкий алгоритм планирования клинических исследований III фазы. Определены основные характеристики исследования, включающие цель исследования, оцениваемый терапевтический эффект, дизайн исследования и анализ результатов. Приведены согласованные подходы между оцениваемым терапевтическим эффектом, выбором конечных точек, популяцией исследования (критериями включения), интеркуррентными событиями и суммарной оценкой. Дизайн исследования должен отвечать общепринятым концепциям доказательной медицины и представлять собой рандомизированное двойное слепое контролируемое клиническое исследование. При этом длительность исследования зависит от поставленной цели и может составлять от 6 недель («индукция ремиссии») до года с целью оценки достигнутой ремиссии.

В исследованиях с целью достижения ремиссии наиболее значимыми являются критерии ремиссии, отражающие интегральный показатель клинической эффективности, который учитывает как объективную оценку эндоскопической картины, так и оценку эффективности лечения самим пациентом.

Особенность оценки безопасности биологических лекарственных препаратов связана с длительностью проводимой терапии, механизмом действия препарата и поэтому не может быть ограничена сроками достижения первичных конечных точек. Оценка безопасности должна быть продолжена в пострегистрационном периоде.

При выборе терапии сравнения значение приобретает позиционирование очередности применения препарата — выбор его применения в качестве препарата первой или второй линии терапии. В первом случае приоритетным является выбор стандартной терапии, во втором случае возможно использование плацебо в качестве единственной альтернативы. Современные подходы к оценке терапевтического эффекта требуют снижения дозы ГКС в соответствии с алгоритмом, описанным в протоколе клинического исследования.

Представленные в работе подходы отражают общие принципы планирования и проведения клинических исследований, обозначенные в международных руководствах. Разработка специальных рекомендаций продиктована возрастанием роли биологических лекарственных препаратов и непрекращающимся поиском терапевтических альтернатив для лечения болезни Крона. В случае дальнейшего расширения знаний о патогенезе заболевания и появления препаратов с новыми механизмами действия, вероятно, могут потребоваться

уточнения, касающиеся этапа клинической разработки. Представленные к настоящему моменту рекомендации, очевидно, будут необходимы как для экспертов, оценивающих результаты реализации программ клинических исследований, так и для разработчиков ЛП.

**Вклад авторов.** *А. Н. Богданов* — сбор, анализ и обобщение данных, редактирование; *Е. В. Горбунова* — вклад в концепцию и план работы, интерпретация результатов; *Д. В. Горячев* — разработка концепции, критический пересмотр текста, утверждение варианта для публикации; *Е. В. Петранева* — написание текста, работа с графическим материалом, редактирование, утверждение окончательного варианта статьи для публикации.

**Authors' contributions.** *Aleksandr N. Bogdanov*—collection, analysis, and systematisation of data; editing of the text; *Ekaterina V. Gorbunova*—assistance in elaboration of the concept and design of the study, interpretation of the obtained results; *Dmitry V. Goryachev*—elaboration of the study concept, revision of the text, approval of the final version of the paper

for publication; *Elena V. Petraneva*—writing of the text, preparation of illustrations, editing of the text, approval of the final version of the paper for publication.

**Благодарности.** Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00003-20-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР АААА-А18-118021590049-0).

**Acknowledgements.** The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00003-20-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. АААА-А18-118021590049-0).

**Конфликт интересов.** Д. В. Горячев является членом редколлегии журнала «Вестник НЦЭСМП», остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

**Conflict of interest.** D. V. Goryachev is a member of the Editorial Board of the “The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products”, the other authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Маев ИВ, Андреев ДН. Новые подходы к диагностике и лечению болезни Крона. *Терапевтический архив*. 2014;86(8):4–12. [Maev IV, Andreev DN. New approaches to the diagnosis and treatment of Crohn's disease. *Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic Archive*. 2014;86(8):4–12 (In Russ.)]
2. Targan SR, Hanauer SB, van Deventer SJ, Mayer L, Present DH, Braakman T, et al. A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. *N Engl J Med*. 1997;337(15):1029–36. <https://doi.org/10.1056/NEJM199710093371502>
3. Gomollón F, Dignass A, Annesse V, Tilg H, Van Assche G, Lindsay JO, et al. 3rd European evidence-based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease 2016: Part 1: Diagnosis and medical management. *J Crohns Colitis*. 2017;11(1):3–25. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjw168>
4. Hindryckx P, Baert F, Hart A, Armuzzi A, Panès J, Peyrin-Biroulet L. Clinical trials in luminal Crohn's disease: A historical perspective. *J Crohns Colitis*. 2014;8(11):1339–50. <https://doi.org/10.1016/j.crohns.2014.04.007>
5. Bojic D, Bodger K, Travis S. Patient reported outcome measures (PROMs) in inflammatory bowel disease: New data. *J Crohns Colitis*. 2017;11(suppl\_2):S576–85. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjw187>
6. Marquis P, Caron M, Emery MP, Scott JA, Arnould B, Acquadro C. The role of health-related quality of life data in the drug approval processes in the US and Europe. *Pharm Med*. 2011;25:147–60. <https://doi.org/10.1007/BF03256856>
7. Ma C, Hussein IM, Al-Abbar YJ, Panaccione R, Fedorak RN, Parker CE, et al. Heterogeneity in definitions of efficacy and safety endpoints for clinical trials of Crohn's disease: A systematic review. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2018;16(9):1407–19. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2018.02.051>
8. Sandborn WJ, Hanauer S, Van Assche G, Panès J, Wilson S, Petersen J, et al. Treating beyond symptoms with a view to improving patient outcomes in inflammatory bowel diseases. *J Crohns Colitis*. 2014;8(9):927–35. <https://doi.org/10.1016/j.crohns.2014.02.021>
9. Peyrin-Biroulet L, Sandborn W, Sands BE, Reinisch W, Bemelman W, Bryant RV, et al. Selecting therapeutic targets in inflammatory bowel disease (STRIDE): Determining therapeutic goals for treat-to-target. *Am J Gastroenterol*. 2015;110(9):1324–38. <https://doi.org/10.1038/ajg.2015.233>
10. Klenske E, Bojarski C, Waldner M, Rath T, Neurath MF, Atreya R. Targeting mucosal healing in Crohn's disease: what the clinician needs to know. *Therap Adv Gastroenterol*. 2019;12:1–11. <https://doi.org/10.1177/1756284819856865>
11. Baert F, Moortgat L, Van Assche G, Caenepeel P, Vergauwe P, De Vos M, et al. Mucosal healing predicts sustained clinical remission in patients with early-stage Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2010;138(2):463–8. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.09.056>
12. Faubion WA, Loftus EV, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Sandborn WJ. The natural history of corticosteroid therapy for inflammatory bowel disease: a population-based study. *Gastroenterology*. 2001;121(2):255–60. <https://doi.org/10.1053/gast.2001.26279>
13. Steinhart AH, Ewe K, Griffiths AM, Modigliani R, Thomsen OO. Corticosteroids for maintenance remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2003(4):CD000301. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD000301>
14. D'Haens G. Standardisation of study protocols—pros and cons. *J Crohns Colitis*. 2016;10(suppl\_2):S553–9. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjw001>
15. Colombel JF, Rutgeerts PJ, Sandborn WJ, Yang M, Camez A, Pollack PF, et al. Adalimumab induces deep remission in patients with Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2014;12(3):414–22.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2013.06.019>
16. Khanna R, Zou G, D'Haens G, Feagan BG, Sandborn WJ, Vandervoort MK. A retrospective analysis: the development of patient reported outcome measures for the assessment of Crohn's disease activity. *Aliment Pharm Ther*. 2014;41(1):77–86. <https://doi.org/10.1111/apt.13001>
17. Koutroumpakis E, Katsanos KH. Implementation of the simple endoscopic activity score in Crohn's disease. *Saudi J Gastroenterol*. 2016;22(3):183–91. <https://doi.org/10.4103/1319-3767.182455>
18. Levesque BG, Sandborn WJ, Ruel J, Feagan BG, Sands BE, Colombel JF. Converging goals of treatment of inflammatory bowel disease from clinical trials and practice. *Gastroenterology*. 2015;148(1):37–51. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.08.003>
19. Colombel JF, Sandborn WJ, Reinisch W, Mantzaris GJ, Kornbluth A, Rachmilewitz D, et al. Infliximab, azathioprine, or combination therapy for Crohn's disease. *N Engl J Med*. 2010;362(15):1383–95. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0904492>
20. Pallmann P, Bedding AW, Choodari-Oskoei B, Dimairo M, Flight L, Hampson LV, et al. Adaptive designs in clinical trials: why use them, and how to run and report them. *BMC Med*. 2018;16(1):29. <https://doi.org/10.1186/s12916-018-1017-7>
21. Hindryckx P, Baert F, Hart A, Armuzzi A, Panès J, Peyrin-Biroulet L. Clinical trials in luminal Crohn's disease: A historical perspective. *J Crohns Colitis*. 2014;8(11):1339–50. <https://doi.org/10.1016/j.crohns.2014.04.007>
22. de Jong MJ, Huibregtse R, Masclee AAM, Jonkers DMAE, Pierik MJ. Patient-reported outcome measures for use in clinical trials and clinical practice in inflammatory bowel diseases: A systematic review. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2018;16(5):648–63. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2017.10.019>

23. Харитонов АГ, Щукина ОБ, Кондрашина ЭА. Гормональная резистентность при воспалительных заболеваниях кишечника. *Альманах клинической медицины*. 2016;44(6):734–43. [Khari-  
tonov AG, Shchukina OB, Kondrashina EA. Steroid resistance in  
inflammatory bowel disease. *Al'manakh klinicheskoy meditsiny* =  
*Almanac of Clinical Medicine*. 2016;44(6):734–43 (In Russ.)]  
<https://doi.org/10.18786/2072-0505-2016-44-6-734-743>
24. Ruberg SJ, Akacha M. Considerations for evaluating treatment effects from randomized clinical trials. *Clin Pharmacol Ther.* 2017;102(6):917–23. <https://doi.org/10.1002/cpt.869>

#### ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

**Богданов Александр Николаевич**, д-р мед. наук. *Aleksandr N. Bogdanov*, Dr. Sci. (Med.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-8930-4689>

**Горбунова Екатерина Владимировна**. *Ekaterina V. Gorbunova*. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-6433-9781>

**Горячев Дмитрий Владимирович**, д-р мед. наук. *Dmitry V. Goryachev*, Dr. Sci. (Med.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-8583-2372>

**Петранева Елена Вилорьевна**, канд. мед. наук. *Elena V. Petraneva*, Cand. Sci. (Med.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-7400-8289>

*Статья поступила 21.10.2019*

*После доработки 25.05.2020*

*Принята к печати 28.05.2020*

*Article was received 21 October 2019*

*Revised 25 May 2020*

*Accepted for publication 28 May 2020*

## Влияние условий пробоподготовки и режима хроматографирования на уровень фонового сигнала при ВЭЖХ-УФ-анализе плазмы крови

В. М. Косман\*, М. В. Карлина, О. Н. Пожарицкая

Закрытое акционерное общество «Санкт-Петербургский институт фармации»,  
Заводская ул., 3, к. 245, г.п. Кузьмолловский, Всеволожский р-н,  
Ленинградская обл., 188663, Российская Федерация

**Резюме.** Метод ВЭЖХ с УФ-детектированием широко используют для количественного анализа лекарственных веществ в биообразцах, полученных при изучении фармакокинетики, биоэквивалентности или лекарственного мониторинга. Основное ограничение связано со значимым фоновым влиянием матриц биообразцов, ограничивающим чувствительность ВЭЖХ-УФ-методик. **Цель работы:** оценка влияния условий пробоподготовки и режима хроматографирования на уровень фонового сигнала при ВЭЖХ-УФ-анализе плазмы крови человека и лабораторных животных. **Материалы и методы:** на примере трех типов плазмы крови (крысы, кролика и человека) рассмотрено влияние осадителя, режима центрифугирования, включения стадии твердофазной экстракции (ТФЭ) в процедуру подготовки проб на уровень фонового сигнала при анализе методом ВЭЖХ-УФ в трех хроматографических режимах при трех длинах волн. **Результаты:** установлено, что уровень фонового сигнала практически не зависит от хроматографического режима, интенсивности центрифугирования и введения стадии ТФЭ; для плазмы крови человека и кролика уровень фонового сигнала имеет тенденцию к снижению по сравнению с сигналом плазмы крови крыс. Наибольшее значение на уровень фонового сигнала оказывает выбор осадителя при пробоподготовке и длина волны детектирования. Показано, что ацетонитрил предпочтительнее, чем метанол, а при выборе длины волны следует по возможности избегать ближневолновой области. **Выводы:** выявленные особенности ключевых моментов процедуры подготовки проб и выбора условий хроматографического анализа могут быть использованы при разработке и валидации биоаналитических методик, применяемых в доклинических и клинических исследованиях.

**Ключевые слова:** ВЭЖХ-УФ; плазма крови; пробоподготовка; осадитель; хроматографический режим; биоаналитические исследования

**Для цитирования:** Косман ВМ, Карлина МВ, Пожарицкая ОН. Влияние условий пробоподготовки и режима хроматографирования на уровень фонового сигнала при ВЭЖХ-УФ-анализе плазмы крови. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2020;10(2):121–128. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2020-10-2-121-128>

\***Контактное лицо:** Косман Вера Михайловна; kosman.vm@doclinika.ru

## Effect of Sample Preparation and Chromatographic Conditions on Background Signal Level in HPLC-UV Analysis of Blood Plasma

V. M. Kosman\*, M. V. Karlina, O. N. Pozharitskaya

St. Petersburg Institute of Pharmacy,  
3/245 Zavodskaya St., Kuzmolovsky settlement, Vsevolozhsky district,  
Leningrad region 188663, Russian Federation

**Abstract.** The HPLC-UV method is widely used for quantitative analysis of drug substances found in biological samples obtained in pharmacokinetics studies, bioequivalence studies, or during therapeutic drug monitoring. The main limitation is associated with a significant background effect of biological matrixes, limiting the sensitivity of HPLC-UV methods. **The aim** of the study was to evaluate sample preparation and chromatographic conditions in terms of background signal level during HPLC-UV analysis of human and laboratory animal blood plasma. **Material and methods:** three types of blood plasma (rat, rabbit and human), three chromatographic modes, and three detection wavelengths were used to assess the effect of the precipitation agent, centrifuge conditions, and the inclusion of the solid-phase extraction (SPE) step into the sample preparation procedure on the background signal level during HPLC-UV analysis. **Results:** it was established that the background signal was practically unaffected by the chromatographic mode, centrifugation intensity, or introduction of the SPE step. The background signal levels for human and rabbit blood plasma tended to be lower than that for rat blood plasma. The factors that had the greatest effect on the background signal level were the choice of the precipitation agent during sample preparation, and the detection wavelength. It was shown that acetonitrile is preferable to methanol, and that the near UV region should be avoided. **Conclusions:** the identified key aspects of sample preparation procedures and chromatographic conditions can be used in the development and validation of bioanalytical methods for preclinical and clinical studies.

**Key words:** HPLC-UV; blood plasma; sample preparation; precipitation agent; chromatographic mode; bioanalytical methods

**For citation:** Kosman VM, Karlina MV, Pozharitskaya ON. Effect of sample preparation and chromatographic conditions on background signal level in HPLC-UV analysis of blood plasma. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2020;10(2):121–128. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2020-10-2-121-128>

\***Corresponding author:** Vera M. Kosman; kosman.vm@doclinika.ru

Биообразцы (плазма крови, органы и ткани) — довольно частый объект биоаналитических исследований с применением метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [1]. Наиболее распространенной является задача количественного определения различных лекарственных веществ в биообразцах, полученных при изучении фармакокинетики, биоэквивалентности или лекарственного мониторинга. Для биообразцов перед введением в ВЭЖХ-системы требуется специальная пробоподготовка, как для сложных комплексных матриц [2–4]. Ключевым этапом при разработке методики анализа является выбор оптимальной процедуры обработки проб, позволяющей максимально удалить компоненты, мешающие определению, и выделить целевой аналит. Подготовка биообразцов для ВЭЖХ-анализа различных лекарственных препаратов направлена прежде всего на разрушение клеточных структур и дальнейшее удаление белковых и липидных компонентов.

Выделяют три основных способа подготовки биообразцов: жидкость-жидкостная экстракция (ЖЖЭ), твердофазная экстракция (ТФЭ) и осаждение белков [2–5].

ЖЖЭ предполагает либо экстракцию аналита в слой органического растворителя (этилацетата, диэтилового эфира, хлороформа и др.), не смешивающегося с гидрофильной средой пробы (плазмы крови, гомогената тканей или органов), либо иной комплекс манипуляций, связанный с распределением анализируемого соединения между двумя несмешивающимися жидкостями. Для улучшения экстракции в зависимости от свойств аналита может быть рациональным создание определенного рН гидрофильной среды. Метод ЖЖЭ является достаточно специфичным (не универсальным) способом, поскольку для каждого аналита необходимо подобрать оптимальные условия — экстрагент, рН среды, соотношение двух фаз, время обработки и т.п. При применении данного метода обычно удается получить достаточно чистые пробы, минимизировать влияние нативных компонентов биопроб, однако метод длителен, требует значительного расхода токсичных органических растворителей и имеет ограниченное применение (не для всех аналитов можно подобрать подходящий экстрагент и условия экстракции).

Метод ТФЭ предполагает нанесение проб на картридж с сорбентом и последовательное пропускание через него различных растворителей, элюирующих отдельно примеси и целевой аналит. Некоторые разновидности метода можно считать вариантом ЖЖЭ, однако более экономичным с точки зрения расхода растворителей и временных затрат. К числу преимуществ относят также возможность автоматизации

пробоподготовки как в офлайн, так и в онлайн (встроенном в ВЭЖХ-систему) режимах. Считают, что ТФЭ позволяет получать более очищенные пробы по сравнению с другими методами, поэтому она получила в настоящее время достаточно широкое распространение в практике хроматографического анализа [2, 3]. Основным недостатком является высокая стоимость картриджей, а также их неуниверсальность. Коммерчески доступно большое количество различных типов картриджей, отличающихся сорбентами и, соответственно, механизмами взаимодействия с примесями и целевым компонентом, предусматривающими различные протоколы работы с ними. С одной стороны, это положительный факт — можно подобрать оптимальный картридж/режим в зависимости от свойств аналита и матрицы. С другой стороны, с учетом относительно высокой стоимости данного типа расходных материалов при отсутствии утвержденных процедур для конкретного соединения разработка методики пробоподготовки на основании данных литературы и рекомендаций производителя картриджей становится достаточно ресурсоемкой и затруднительной. Один из возможных путей решения — использование универсальных картриджей, предлагаемых производителями<sup>1</sup>.

Осаждение белков является наиболее простым, универсальным и достаточно эффективным способом подготовки биообразцов к ВЭЖХ-анализу как по мнению авторов [6], так и согласно рекомендациям производителей хроматографического оборудования и расходных материалов<sup>2</sup>. В качестве осадителей обычно используют кислые растворы (трихлоруксусная, трифторуксусная кислоты), метанол, ацетонитрил, реже соли и другие реагенты. Метанол и ацетонитрил используют наиболее часто, поскольку эти растворители хорошо смешиваются с гидрофильной средой биопроб (плазмы крови), легко удаляются (процедура пробоподготовки часто предусматривает замену растворителя, необходимую для компенсации разбавления пробы осадителем), оптимальны для последующего повторного растворения проб и совместимы с элюентами, используемыми в ВЭЖХ.

Метод ВЭЖХ с ультрафиолетовым (УФ) детектированием является удобным, эффективным и достаточно экспрессным методом для анализа лекарственных веществ в биопробах [1, 5, 7]. Основное ограничение связано со значимым фоновым влиянием матриц биопроб, ограничивающим чувствительность ВЭЖХ-УФ-методик для большинства аналитов<sup>3</sup> на уровне концентраций порядка 50–100 нг/мл [5, 7]. Вариант ВЭЖХ с масс-спектрометрическим (МС) детектированием является более чувствитель-

<sup>1</sup> Improve your LC/MC analysis with Phree phospholipid removal solutions. Phenomenex, USA; 2014.

Phree™ phospholipid removal solutions. General Protocol. Phenomenex, USA; 2013.

<sup>2</sup> Majors RE. Sample preparation fundamentals for chromatography. Wilmington: Agilent Technologies; 2014.

<sup>3</sup> Комаров ТН. Изучение фармакокинетики противоопухолевых препаратов с помощью методов ВЭЖХ-МС и ГХ-МС: дис. ... канд. фарм. наук. М.; 2015.

**Таблица 1.** Условия подготовки проб плазмы крови

**Table 1.** Conditions for the preparation of blood plasma samples

№ пробы Sample No.	Осадитель (соотношение плазма:осадитель, по объему) Precipitation agent (plasma:precipitation agent, v/v)	Центрифугирование Centrifugation		Использование твердофазной экстракции SPE
		Скорость (об/мин) Speed (rpm)	Время (мин) Time (min)	
1	Ацетонитрил (1:3) Acetonitrile (1:3)	3000	15	Нет/No
2				Да/Yes
3		10 000	15	Нет/No
4				Да/Yes
5	Метанол (1:4) Methanol (1:4)	3000	15	Нет/No
6				Да/Yes
7		10 000	15	Нет/No
8				Да/Yes

ным и селективным, чем ВЭЖХ-УФ, но и существенно более дорогим методом. Снижение фонового сигнала за счет различных способов подготовки проб позволило бы повысить чувствительность ВЭЖХ-УФ метода, являющегося значительно более доступным, чем вариант ВЭЖХ-МС.

Цель работы — оценка влияния условий пробоподготовки и режима хроматографирования на уровень фонового сигнала при ВЭЖХ-УФ-анализе плазмы крови человека и лабораторных животных (на примере крыс и кроликов).

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использована гепаринизированная плазма крови интактных животных (половозрелых самцов крыс и кроликов), хранившаяся в замороженном виде при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Образцы были получены в рамках экспериментальных исследований, проводимых в ЗАО «Санкт-Петербургский институт фармации» и одобренных на заседаниях биоэтической комиссии, согласно нормативным документам, регулирующим проведение доклинических исследований с использованием лабораторных животных (ГОСТ 33044-2014; Директива 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза от 22.09.2010 и др.). В качестве плазмы крови человека использована референтная нормальная пулированная плазма (ООО «Технология стандарт», Россия).

Для каждого типа плазмы было подготовлено по 8 проб, не менее чем в двукратной повторности каждая. Особенности пробоподготовки представлены в таблице 1, общая схема была следующей: в пластиковую центрифужную пробирку вместимостью 2 мл (типа «Эппендорф») помещали 0,2 мл плазмы крови, прибавляли осадитель (0,6 мл ацетонитрила или 0,8 мл метанола), встряхивали в течение 30 с на шейкере Vortex-2 (ИКА, Германия). Затем пробы центрифугировали 15 мин при 3000 об/мин (центрифуга лабораторная медицинская LMC-3000, ООО «BioSan»,

Латвия) или при 10 000 об/мин (микроцентрифуга Z 216 V-2, Hermle Labortechnik GmbH, Германия). Надосадочную жидкость отделяли, для проб 2, 4, 6 и 8 пропускали через картридж Phree Phospholipid Removal вместимостью 1 мл (кат. № 8B-S133-TAK, серия S417-0036, Phenomenex, США) с помощью 12-позиционной установки для ТФЭ (Phenomenex, США). Далее для всех проб растворитель удаляли, к сухому остатку прибавляли 0,2 мл метанола, встряхивали на шейкере Vortex-2 (ИКА, Германия) в течение 30 с, пробу переносили в виалу для автосамплера и дозировали в ВЭЖХ-систему.

Анализ выполнен на жидкостном хроматографе высокого давления LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония) с диодно-матричным детектором и колонкой Luna<sup>®</sup> C18(2) 150×4,6 мм (размер частиц сорбента 5 мкм) и предколонкой (3 мм), заполненной тем же сорбентом (Phenomenex, США), элюирование проводили смесью 0,03% раствора трифторуксусной кислоты (ТФУ) (фаза А) и ацетонитрила (фаза Б) в трех хроматографических режимах:

- режим 1 — градиентный (табл. 2);
- режим 2 — изократический, соотношение фаз А:Б 75:25 (для гидрофильных аналитов);
- режим 3 — изократический, соотношение фаз А:Б 35:65 (для гидрофобных аналитов).

Скорость подачи элюента 1 мл/мин, дозируемый объем пробы 20 мкл, детектирование — диодно-матричное сканирование в диапазоне длин волн 220–340 нм, обработка хроматограмм выполнена при длинах волн 220, 254 и 295 нм.

Регистрация и обработка хроматограмм выполнена с помощью программного обеспечения LabSolution (Shimadzu, Япония). В качестве критерия количественной оценки фонового сигнала выбрана суммарная площадь всех пиков, зарегистрированных на хроматограмме. Для статистической обработки данных использовали программное обеспечение Microsoft Office Excel 2007.

**Таблица 2.** Градиентный режим элюирования**Table 2.** Gradient elution mode

Время, мин Time, min	Фаза А Phase A	Фаза Б Phase B
0	80	20
10	35	65

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Основные элементы аналитической процедуры выбраны нами на основании ретроспективного анализа и систематизации собственного экспериментального опыта по разработке и валидации биоаналитических методик для нескольких десятков различных фармацевтических субстанций синтетического происхождения (более 50 веществ). Базовые варианты пробоподготовки (осаждение ацетонитрилом или метанолом) с последующей заменой растворителя оказались эффективны примерно в 64% случаев; смеси 0,03% раствора ТФУ и ацетонитрила использованы в качестве элюента примерно в 47% случаев; изократические режимы удалось подобрать для 68% объектов. На основании накопленной информации был выбран один усредненный градиентный режим (режим 1, табл. 2) и два изократических режима с меньшим и большим содержанием органического компонента (ацетонитрила) в составе элюента, условно ориентированные на анализ более гидрофильных (режим 2) и более гидрофобных (режим 3) целевых аналитов. Также были выбраны три волны детектирования (220, 254 и 295 нм), относящиеся к трем наиболее часто используемым областям УФ-спектров (205–220, 220–254 и 270–295 нм). Соотношения плазма:осадитель 1:3 для ацетонитрила и 1:4 для метанола выбраны в связи с тем, что в ходе предварительных исследований для этих вариантов установлена наиболее полная очистка от белка, а также они рекомендованы в инструкции по использованию картриджей для ТФЭ<sup>4</sup>.

Для всех видов плазмы и для всех режимов элюирования наблюдали схожую хроматографическую картину: в начальной области (первые 3 мин анализа) регистрировали группу достаточно интенсивных, плохо разделенных пиков наиболее гидрофильных и наименее удерживаемых компонентов, далее по всей хроматограмме регистрировали значительное количество минорных пиков и колебаний базовой линии, сумму площадей которых (в условных единицах интегратора, усл. ед.) считали суммарным фоновым сигналом (рис. 1).

В таблице 3 представлены полученные результаты оценки уровня фонового сигнала при ВЭЖХ-УФ-анализе в трех хроматографических режимах при трех длинах волн проб трех типов плазмы крови

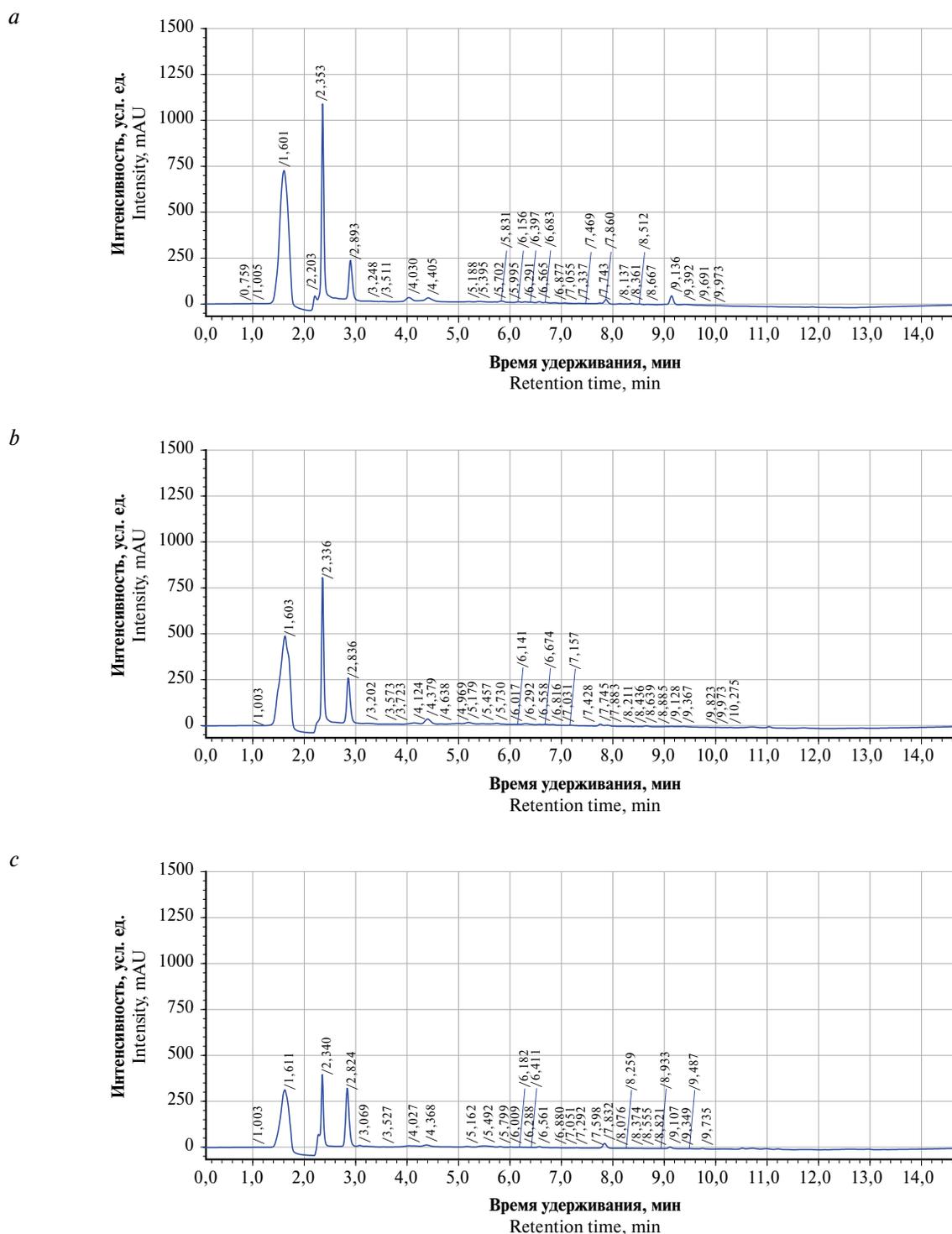
(крысы, кролика и человека) с использованием различных условий пробоподготовки.

Сопоставление данных, представленных в таблице 3, позволяет сделать ряд следующих заключений. Суммарное значение фонового сигнала зависит от природы биообразцов, по крайней мере, для трех исследованных видов плазмы крови. Например, для градиентного режима (режим 1) при длине волны детектирования 220 нм получены значения около  $(17-40) \times 10^6$  усл. ед. для плазмы крови крысы, около  $(22-36) \times 10^6$  усл. ед. для плазмы крови кролика и около  $(20-25) \times 10^6$  усл. ед. для плазмы крови человека. На рисунке 2 представлена диаграмма, иллюстрирующая средние значения фонового сигнала для различных видов плазмы крови при трех длинах волн детектирования по результатам анализа в режиме 1. Схожие изменения наблюдали в других режимах хроматографирования и для других длин волн детектирования.

Полученные данные в целом свидетельствуют о том, что уровень фонового сигнала плазмы крови кролика имеет тенденцию к снижению по сравнению с аналогичным параметром плазмы крови крысы (на 10–53%). То есть использование кроликов в качестве тест-системы для фармакокинетических исследований при возможности выбора биологической модели предпочтительнее с точки зрения дальнейшего анализа биообразцов. Отметим, что для плазмы крови человека были получены наиболее низкие значения фонового сигнала (на 30–70% ниже, чем для плазмы крови крысы). Кроме того, для плазмы крови человека во всех случаях наблюдали более узкий диапазон значений, а для проб плазмы крови крысы — наиболее широкий. Таким образом, суммарный фоновый сигнал плазмы крови кролика ближе по значениям к аналогичному параметру плазмы крови человека по сравнению с плазмой крови крысы. Это подтверждает преимущества использования данного вида лабораторных животных в доклинических исследованиях, предполагающих анализ содержания лекарственного вещества в образцах плазмы крови. Наиболее часто эту задачу ставят в экспериментах по изучению фармакокинетики и токсикокинетики лекарственных препаратов, для которых основными биологическими тест-системами являются крысы и кролики.

Увеличение длины волны позволяет снизить уровень фонового сигнала для всех видов плазмы крови во всех использованных режимах. Так, например, для проб плазмы крови крысы в градиентном режиме (режим 1) уровень фонового сигнала составил около  $(17-40) \times 10^6$  усл. ед. с детектированием при 220 нм, около  $(0,8-13) \times 10^6$  усл. ед. с детектированием при 254 нм и около  $(0,9-13) \times 10^6$  усл. ед. с детектированием при 295 нм (рис. 2). Аналогичные

<sup>4</sup> Improve your LC/MC analysis with Phree phospholipid removal solutions. Phenomenex, USA; 2014.  
Phree™ phospholipid removal solutions. General Protocol. Phenomenex, USA; 2013.



**Рис. 1.** Типичные хроматограммы образцов плазмы крови после обработки ацетонитрилом, без твердофазного экстрагирования, с центрифугированием при 3000 об/мин, условия анализа: колонка Luna® C18(2) 150×4,6 мм (5 мкм), элюирование смесью 0,03% трифторуксусная кислота — ацетонитрил в градиентном режиме от 20 до 65% ацетонитрила за 10 мин, скорость потока 1 мл/мин, детектирование при 220 нм: (а) плазма крови крысы; (б) плазма крови кролика; (с) плазма крови человека

**Fig. 1.** Typical chromatograms of blood plasma samples after treatment with acetonitrile, without solid phase extraction, centrifuged at 3000 rpm; chromatographic conditions: Luna® C18(2) column 150×4.6 mm (5 μm), elution with 0.03% trifluoroacetic acid—acetonitrile in a gradient elution mode from 20 to 65% acetonitrile in 10 minutes, flow rate of 1 mL/min, detection at 220 nm: (a) rat plasma; (b) rabbit plasma; (c) human plasma

**Таблица 3.** Значения суммарного фонового сигнала при ВЭЖХ-УФ-анализе проб плазмы крови ( $\times 10^6$  усл. ед.,  $\bar{X} \pm SD$ ,  $n = 2$ )**Table 3.** Total background signal in HPLC-UV analysis of blood plasma samples ( $\times 10^6$  mAU $\times$ c,  $\bar{X} \pm SD$ ,  $n = 2$ )

Проба Sample	Режим 1 / Mode 1			Режим 2 / Mode 2			Режим 3 / Mode 3		
	220 нм / nm	254 нм / nm	295 нм / nm	220 нм / nm	254 нм / nm	295 нм / nm	220 нм / nm	254 нм / nm	295 нм / nm
<b>Плазма крови крысы / Rat blood plasma</b>									
1	30,0 $\pm$ 1,0	6,52 $\pm$ 0,02	7,01 $\pm$ 0,06	26,2 $\pm$ 0,6	6,44 $\pm$ 0,14	6,68 $\pm$ 0,08	23,2 $\pm$ 1,2	7,96 $\pm$ 0,10	7,77 $\pm$ 0,07
2	27,2 $\pm$ 0,1	5,08 $\pm$ 0,02	5,54 $\pm$ 0,01	23,8 $\pm$ 0,1	5,12 $\pm$ 0,03	5,31 $\pm$ 0,02	17,5 $\pm$ 0,2	5,90 $\pm$ 0,11	5,86 $\pm$ 0,10
3	27,2 $\pm$ 0,1	5,23 $\pm$ 0,09	5,67 $\pm$ 0,07	22,6 $\pm$ 1,9	5,24 $\pm$ 0,02	5,44 $\pm$ 0,03	18,1 $\pm$ 0,1	6,20 $\pm$ 0,04	6,02 $\pm$ 0,04
4	17,2 $\pm$ 0,7	0,75 $\pm$ 0,01	0,88 $\pm$ 0,01	10,2 $\pm$ 1,0	0,99 $\pm$ 0,07	1,00 $\pm$ 0,03	5,42 $\pm$ 0,04	1,09 $\pm$ 0,01	1,03 $\pm$ 0,02
5	31,4 $\pm$ 1,2	7,82 $\pm$ 0,03	7,89 $\pm$ 0,01	28,3 $\pm$ 1,1	7,93 $\pm$ 0,25	7,88 $\pm$ 0,04	23,6 $\pm$ 0,1	9,32 $\pm$ 0,15	9,02 $\pm$ 0,01
6	40,0 $\pm$ 0,1	12,9 $\pm$ 0,1	12,6 $\pm$ 0,1	35,3 $\pm$ 0,9	12,2 $\pm$ 0,5	11,7 $\pm$ 0,3	30,6 $\pm$ 0,1	14,7 $\pm$ 0,1	13,6 $\pm$ 0,1
7	40,4 $\pm$ 0,5	13,2 $\pm$ 0,1	13,3 $\pm$ 0,1	36,8 $\pm$ 1,4	13,6 $\pm$ 0,1	13,3 $\pm$ 0,2	34,6 $\pm$ 0,5	15,1 $\pm$ 0,2	14,5 $\pm$ 0,2
8	25,4 $\pm$ 0,3	3,92 $\pm$ 0,01	4,09 $\pm$ 0,09	19,4 $\pm$ 0,4	4,16 $\pm$ 0,10	4,24 $\pm$ 0,06	15,2 $\pm$ 0,1	4,57 $\pm$ 0,05	4,53 $\pm$ 0,04
<b>Плазма крови кролика / Rabbit blood plasma</b>									
1	26,2 $\pm$ 0,2	3,96 $\pm$ 0,01	3,01 $\pm$ 0,04	21,8 $\pm$ 0,2	4,11 $\pm$ 0,01	2,97 $\pm$ 0,01	13,7 $\pm$ 2,3	4,09 $\pm$ 0,89	2,93 $\pm$ 0,65
2	25,3 $\pm$ 0,3	3,52 $\pm$ 0,01	2,78 $\pm$ 0,01	20,8 $\pm$ 1,3	3,78 $\pm$ 0,03	2,87 $\pm$ 0,01	15,8 $\pm$ 0,1	4,62 $\pm$ 0,04	3,44 $\pm$ 0,04
3	22,3 $\pm$ 0,1	1,75 $\pm$ 0,09	0,82 $\pm$ 0,01	18,8 $\pm$ 0,1	2,02 $\pm$ 0,02	1,02 $\pm$ 0,03	12,7 $\pm$ 0,1	2,30 $\pm$ 0,02	1,17 $\pm$ 0,09
4	26,5 $\pm$ 0,1	4,77 $\pm$ 0,02	4,46 $\pm$ 0,01	22,6 $\pm$ 0,2	4,78 $\pm$ 0,08	4,26 $\pm$ 0,07	16,0 $\pm$ 0,1	5,56 $\pm$ 0,10	4,87 $\pm$ 0,01
5	28,8 $\pm$ 0,1	5,88 $\pm$ 0,02	4,74 $\pm$ 0,02	25,3 $\pm$ 0,3	6,03 $\pm$ 0,08	4,67 $\pm$ 0,07	19,6 $\pm$ 0,3	7,10 $\pm$ 0,06	5,49 $\pm$ 0,05
6	23,9 $\pm$ 0,1	2,70 $\pm$ 0,02	1,89 $\pm$ 0,15	18,4 $\pm$ 0,1	2,90 $\pm$ 0,06	2,09 $\pm$ 0,14	13,8 $\pm$ 0,1	3,32 $\pm$ 0,01	2,38 $\pm$ 0,02
7	28,3 $\pm$ 0,1	5,24 $\pm$ 0,08	4,08 $\pm$ 0,02	24,3 $\pm$ 0,2	5,40 $\pm$ 0,01	4,06 $\pm$ 0,05	18,7 $\pm$ 0,3	6,30 $\pm$ 0,11	4,73 $\pm$ 0,06
8	35,8 $\pm$ 0,1	10,35 $\pm$ 0,03	9,39 $\pm$ 0,06	19,4 $\pm$ 0,4	4,16 $\pm$ 0,10	4,24 $\pm$ 0,06	27,2 $\pm$ 0,4	12,2 $\pm$ 0,2	10,4 $\pm$ 0,1
<b>Плазма крови человека / Human blood plasma</b>									
1	20,9 $\pm$ 0,1	1,60 $\pm$ 0,01	1,90 $\pm$ 0,01	14,2 $\pm$ 1,9	2,11 $\pm$ 0,31	2,25 $\pm$ 0,03	10,8 $\pm$ 0,2	3,10 $\pm$ 0,01	2,66 $\pm$ 0,02
2	20,6 $\pm$ 0,1	1,49 $\pm$ 0,01	1,91 $\pm$ 0,01	13,0 $\pm$ 1,1	1,69 $\pm$ 0,01	2,01 $\pm$ 0,01	11,6 $\pm$ 0,1	3,02 $\pm$ 0,01	2,57 $\pm$ 0,03
3	22,1 $\pm$ 0,1	2,06 $\pm$ 0,09	2,18 $\pm$ 0,01	16,1 $\pm$ 0,6	2,42 $\pm$ 0,01	2,31 $\pm$ 0,01	13,1 $\pm$ 0,2	3,50 $\pm$ 0,01	2,90 $\pm$ 0,01
4	21,3 $\pm$ 0,1	1,59 $\pm$ 0,01	1,63 $\pm$ 0,01	13,7 $\pm$ 0,6	1,85 $\pm$ 0,01	1,90 $\pm$ 0,01	10,6 $\pm$ 0,1	2,42 $\pm$ 0,03	2,18 $\pm$ 0,03
5	20,2 $\pm$ 0,1	1,55 $\pm$ 0,01	1,56 $\pm$ 0,01	14,8 $\pm$ 1,0	1,84 $\pm$ 0,03	1,86 $\pm$ 0,04	11,8 $\pm$ 0,2	3,40 $\pm$ 0,02	2,57 $\pm$ 0,03
6	21,4 $\pm$ 0,1	1,91 $\pm$ 0,10	1,84 $\pm$ 0,01	13,8 $\pm$ 0,1	2,32 $\pm$ 0,03	1,98 $\pm$ 0,01	12,7 $\pm$ 0,5	2,98 $\pm$ 0,03	2,44 $\pm$ 0,01
7	20,5 $\pm$ 0,3	2,12 $\pm$ 0,09	2,08 $\pm$ 0,01	16,2 $\pm$ 1,1	2,58 $\pm$ 0,01	2,37 $\pm$ 0,01	12,9 $\pm$ 0,1	4,22 $\pm$ 0,03	3,17 $\pm$ 0,05
8	24,7 $\pm$ 0,1	4,08 $\pm$ 0,26	4,26 $\pm$ 0,05	19,8 $\pm$ 0,1	4,55 $\pm$ 0,05	4,38 $\pm$ 0,03	15,0 $\pm$ 0,1	5,70 $\pm$ 0,10	5,03 $\pm$ 0,02

Примечание.  $\bar{X} \pm SD$  — среднее значение суммарного фонового сигнала и стандартное отклонение для числа испытаний  $n$ .  
Note.  $\bar{X} \pm SD$ —mean total background signal, and standard deviation for  $n$  tests.

изменения наблюдали в других режимах хроматографирования, а также для других типов плазмы крови. Снижение уровня сигнала при переходе от 220 к 254 или 295 нм достаточно существенное — для плазмы крови крысы в среднем в 3–4 раза, для плазмы крови кролика — в 5–6 раз и более, для плазмы крови человека — в 5–13 раз. В то же время уровень фонового сигнала при 254 и 295 нм примерно одинаков. То есть при выборе длины волны детектирования для минимизации фонового влияния матрицы важно сместиться из ближневолнового диапазона (205–220 нм) в более длинноволновую область. Дальнейший выбор конкретной длины волны в большей степени зависит от свойств целевого аналита (положение максимума в УФ-спектре), чем от фонового

влияния матрицы. Влияние выбора длины волны на величину фонового сигнала наиболее выражено для плазмы крови человека.

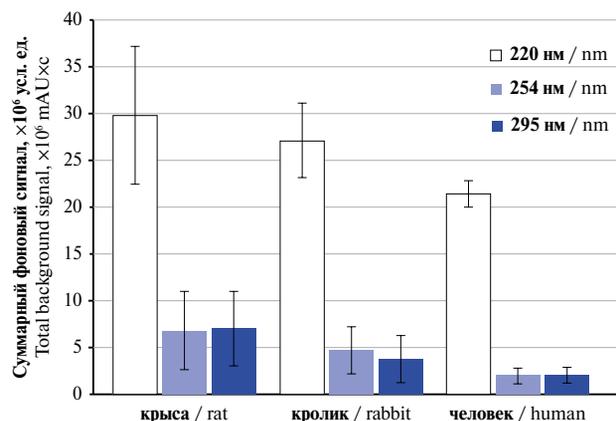
Уровень фонового сигнала в градиентном режиме хроматографирования образцов и в изократических режимах приблизительно одинаков. Так, на примере проб плазмы крови крыс уровень фонового сигнала с детектированием при 220 нм составил около  $(17–40) \times 10^6$  усл. ед. для режима 1, около  $(10–37) \times 10^6$  усл. ед. для режима 2 и около  $(5,5–35) \times 10^6$  усл. ед. для режима 3. Схожие уровни сигнала были получены и на других длинах волн для трех типов плазмы крови. Следовательно, выбор хроматографического режима для биоаналитических исследований определяется прежде всего свойствами

целевого аналита, и влияние условий элюирования на величину фонового сигнала матрицы незначительно.

Для проб после пробоподготовки с ацетонитрилом (пробы 1–4 для каждого из трех типов плазмы крови) уровень фонового сигнала несколько меньше, чем для проб после пробоподготовки с метанолом (пробы 5–8). Так, для проб плазмы крови крысы в градиентном режиме (режим 1) с детектированием при 220 нм уровень фонового сигнала составил  $(25,4 \pm 5,2) \times 10^6$  усл. ед. при обработке ацетонитрилом и  $(34,3 \pm 6,7) \times 10^6$  усл. ед. при обработке метанолом (различия статистически достоверны при уровне значимости  $p = 0,05$ ). Аналогичные изменения наблюдали независимо от режимов хроматографирования, типа плазмы крови и длин волн детектирования.

Изменение режима центрифугирования — 3000 об/мин (пробы 1, 2, 5, 6) или 10 000 об/мин (пробы 3, 4, 7, 8) — в целом не оказывает значимого влияния на уровень фонового сигнала. Только для проб плазмы крови крысы, обработанных ацетонитрилом, выявлено некоторое снижение уровня фонового сигнала при увеличении скорости центрифугирования —  $(27–30) \times 10^6$  усл. ед. для проб 1, 2 (3000 об/мин) и  $(17–27) \times 10^6$  усл. ед. для проб 3, 4 (10 000 об/мин, на примере режима 1 при длине волны детектирования 220 нм). Для проб, обработанных метанолом, а также для других типов плазмы крови снижения уровня фонового сигнала при более жестких условиях центрифугирования не выявлено. То есть применение более производительного оборудования для улучшения качества очистки биопроб для ВЭЖХ-УФ-анализа в общем случае нецелесообразно.

Введение в процедуру пробоподготовки стадии ТФЭ не оказало существенного влияния на уровень фонового сигнала. При сопоставлении данных, полученных без ТФЭ (пробы 1, 3, 5, 7) и с ТФЭ (пробы 2, 4, 6, 8), для трех типов плазмы с применением двух типов осадителей и двух режимов центрифугирования для некоторых пар проб отмечено снижение уровня фонового сигнала; для других получены схожие значения, а в ряде случаев выявлено повышение уровня фонового сигнала. По-видимому, выявленные отличия носили случайный характер, не позволили выявить строгих закономерностей, и следует заключить, что процедура ТФЭ не оказала существенного влияния на уровень фонового сигнала. Учитывая высокую стоимость картриджей, являющихся индивидуальным расходным материалом для каждой пробы (вопросы регенерации картриджей требуют отдельного обсуждения и экспериментального подтверждения), данный подход, по крайней мере, в рассмотренном сочетании (тип картриджа и тип детектирования) не является вариантом выбора. Более простые, традиционные



**Рис. 2.** Средние значения суммарного фонового сигнала для плазмы крови различных биологических видов при различных длинах волн детектирования на примере результатов анализа в градиентном режиме элюирования. Условия анализа те же, что указаны на рис. 1, вертикальными отрезками обозначены стандартные отклонения для числа испытаний  $n = 16$

**Fig. 2.** Mean total background signal for blood plasma of different biological species at various detection wavelengths in the gradient elution mode. The chromatographic conditions were the same as shown in Fig. 1, the vertical error bars represent the standard deviations of the tests ( $n = 16$ )

приемы осадительной подготовки проб позволяют достаточно полно очистить биообразцы от компонентов матрицы для последующего ВЭЖХ-анализа с УФ-детектированием.

Считают, что при подготовке биообразцов к дальнейшему ВЭЖХ-анализу необходимо очистить пробы от двух основных групп мешающих эндогенных компонентов — белков и липидных соединений, включающих моно-, ди-, триглицериды и фосфолипиды<sup>5</sup>. Основным и наиболее простым способом избавления от белков является их осаждение. Для очистки от фосфолипидов мы применяли картриджи для ТФЭ, специально предназначенные для этой процедуры. Оказалось, что в случае ВЭЖХ с УФ-детектированием дополнительная очистка от фосфолипидов не снижает уровень фонового сигнала. Именно фосфолипиды (а также соли органических и неорганических кислот) считают причиной так называемого «матричного эффекта», искажающего интенсивность сигнала целевого аналита при ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием [8]. По-видимому, именно для их устранения эффективны варианты пробоподготовки с ТФЭ, получившие широкое распространение в биоаналитических методиках с этим типом детектирования. Можно предположить, что в варианте УФ-детектирования фоновый сигнал обусловлен компонентами не белковой (их осадили) и не фосфолипидной (их удаление не дает положительного эффекта), а какой-то иной природы (ионы, витамины, короткие пептиды, нуклеиновые фрагменты и др.).

<sup>5</sup> Improve your LC/MC analysis with Pree phospholipid removal solutions. Phenomenex, USA. 2014. 6 p. Phree™. Phospholipid removal solutions. General Protocol. Phenomenex, USA. 2013. 12 p.

Рассмотренные факторы можно условно разделить на две группы: связанные с процедурой подготовки проб (осадитель, условия центрифугирования, включение стадии ТФЭ) и связанные с условиями хроматографического анализа (режим, длина волны детектирования). Среди первой группы факторов наибольшее значение для снижения фонового сигнала имеет выбор реагента для осаждения белков — предпочтительнее использовать ацетонитрил. Во второй группе факторов ключевое значение имеет выбор длины волны детектирования — необходимо стремиться выбирать длину волны в области специфического поглощения целевого аналита, что зависит от природы и свойств анализируемого соединения.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования рассмотрено влияние природы осадителя, режима центрифугирования, включения стадии твердофазной экстракции в процедуру подготовки проб трех типов плазмы крови (крысы, кролика, человека) на уровень фонового сигнала при анализе методом ВЭЖХ-УФ в трех хроматографических режимах при трех длинах волн. Установлено, что уровень фонового сигнала для плазмы крови человека и кролика имеет тенденцию к снижению по сравнению с плазмой крови крыс. Фоновый сигнал практически не зависит от хроматографического режима, интенсивности центрифугирования и введения стадии ТФЭ. Наибольшее влияние на уровень фонового

сигнала оказывают выбор осадителя при пробоподготовке (ацетонитрил предпочтительнее, чем метанол) и выбор длины волны детектирования (следует по возможности избегать ближневолновой области). Выявленные особенности процедуры подготовки проб и условий хроматографического анализа могут быть использованы при разработке и валидации биоаналитических методик, применяемых в доклинических и клинических исследованиях.

**Вклад авторов.** В. М. Косман — планирование исследования, сбор, обработка и систематизация экспериментальных данных, написание и доработка текста; М. В. Карлина — идея и дизайн исследования, консультации по проведению отдельных этапов экспериментальных работ, доработка текста; О. Н. Пожарицкая — концепция исследования, интерпретация результатов, критический пересмотр текста публикации.

**Authors' contributions.** Vera M. Kosman—planning of the study, collection, processing and systematisation of experimental data, writing and revision of the text; Marina V. Karlina—elaboration of the study idea and design, consultation on individual stages of experimental work, finalization of the text; Olga N. Pozharitskaya—elaboration of the study concept, interpretation of the results, revision of the text.

**Благодарности.** Работа выполнена в рамках инициативного исследования, без финансовой поддержки.

**Acknowledgements.** The article describes the results of an independent research project which was carried out without financial support.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.  
**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

### ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Wada M, Alkhalil SM, Nakashima K. Current HPLC methods for determination of medicaments in formulations and biological samples. *JJPS*. 2008;1(1):1–27.
2. Медведев ЮВ, Раменская ГВ, Шохин ИЕ, Ярушок ТА. ВЭЖХ и СВЭЖХ как методы для определения лекарственных веществ в крови (обзор). *Химико-фармацевтический журнал*. 2013;47(4):45–51. [Medvedev YuV, Ramenskaya GV, Shokhin IE, Yarushok TA. HPLC and UPLC for determining drugs in blood (a review). *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal = Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2013;47(4):45–51 (In Russ.)]
3. Blahova E, Brandsteterova E. Approaches in sample handling before HPLC analysis of complex matrices. *Chem Pap*. 2004;58(5):362–73.
4. Prabu SL, Suriyaprakash TNK. Extraction of drug from the biological matrix: a review. In: Naik GR, ed. *Applied biological engineering—principles and practice*. Rijeka: InTech; 2012. P. 479–506. <https://doi.org/10.5772/32455>
5. Рейхарт ДВ, Чистяков ВВ. Анализ лекарственных средств при фармакокинетических исследованиях. *Казанский медицинский журнал*. 2010;91(4):532–6. [Reikhart DV, Chistyakov VV. Analysis of drugs in pharmacokinetic studies. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal = Kazan Medical Journal*. 2010;91(4):532–6 (In Russ.)]
6. Alshammari TM, Al-Hassan AA, Hadda TB, Aljofan M. Comparison of different serum sample extraction methods and their suitability for mass spectrometry analysis. *Saudi Pharm J*. 2015;23(6):689–97. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2015.01.023>
7. Рейхарт ДВ, Чистяков ВВ. Высоочувствительные аналитические методы в оценке биоэквивалентности лекарственных препаратов (обзор). *Химико-фармацевтический журнал*. 2009;43(12):39–46. [Reikhart DV, Chistyakov VV. High-sensitivity analytical methods for estimating the bioequivalence of drugs. *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal = Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2009;43(12):39–46 (In Russ.)]
8. Ярошенко ДВ, Карцова ЛА. Матричный эффект и способы его устранения в биоаналитических методиках, использующих хромато-масс-спектрометрию. *Журнал аналитической химии*. 2014;69(4):351–8. [Yaroshenko DV, Kartsova LA. Matrix effect and methods for its elimination in bioanalytical methods using chromatography-mass spectrometry. *Zhurnal analiticheskoy khimii = Journal of Analytical Chemistry*. 2014;69(4):351–8 (In Russ.)] <https://doi.org/10.7868/s0044450214040136>

### ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

**Косман Вера Михайловна**, канд. фарм. наук. Vera M. Kosman, Cand. Sci. (Pharm.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-9690-1935>

**Карлина Марина Валерьевна**, канд. фарм. наук. Marina V. Karlina, Cand. Sci. (Pharm.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-6292-8934>

**Пожарицкая Ольга Николаевна**, канд. фарм. наук. Olga N. Pozharitskaya, Cand. Sci. (Pharm.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-1061-0665>

Статья поступила 18.10.2019

После доработки 14.11.2019

Принята к печати 28.05.2020

Article was received 18 October 2019

Revised 14 November 2019

Accepted for publication 28 May 2020

## Применение метода Европейской фармакопеи для количественного определения антраценпроизводных в противогеморроидальном сборе Проктофитол®

Н. П. Антонова, И. М. Моргунов\*, С. С. Прохвятилова, Е. П. Шефер,  
А. М. Калинин, Т. А. Голомазова

Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации,  
Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

**Резюме.** Совершенствование методик контроля качества многокомпонентных лекарственных растительных препаратов, позволяющих объективно оценивать содержание действующих веществ, определяющих фармакологическое действие препарата, является актуальной задачей специалистов в фармакогнозии. **Цель работы:** исследовать возможность применения метода Европейской фармакопеи для определения суммы антраценпроизводных в противогеморроидальном сборе Проктофитол®, предложить норму содержания суммы антраценпроизводных. **Материалы и методы:** в исследовании были использованы отдельные компоненты сбора, содержащие антраценпроизводные (сенны листья и крушины кора), а также модельные смеси сенны листья : крушины кора в соотношении 1:1 и модельная смесь сбора Проктофитол® с использованием тех же компонентов. Для количественного определения антраценпроизводных использовался метод спектрофотометрии. **Результаты:** установлено, что с помощью метода Европейской фармакопеи можно оценить качество сбора Проктофитол® по содержанию суммы антраценпроизводных. Показано, что спектрофотометрическая методика Европейской фармакопеи имеет преимущества по отношению к методикам, включенным в отечественные нормативные документы, так как позволяет проводить полное извлечение действующих веществ и является унифицированной для антраценпроизводных. **Выводы:** для определения антраценпроизводных в сборе Проктофитол® была адаптирована методика Европейской фармакопеи, в качестве экстрагента предложено использовать 70% этанол вместо 70% метанола. Подобраны оптимальная навеска и разведения испытуемого раствора. Рассчитана и экспериментально установлена предлагаемая норма содержания суммы антраценпроизводных — «не менее 1,9%». Предложенная методика может быть рекомендована для включения в Государственную фармакопею Российской Федерации на сборы, аналогичные по составу сбору Проктофитол®.

**Ключевые слова:** спектрофотометрия; антраценпроизводные; лекарственное растительное сырье; лекарственные растительные препараты; фармакопейные методы; сенны листья; крушины кора

**Для цитирования:** Антонова НП, Моргунов ИМ, Прохвятилова СС, Шефер ЕП, Калинин АМ, Голомазова ТА. Применение метода Европейской фармакопеи для количественного определения антраценпроизводных в противогеморроидальном сборе Проктофитол®. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения.* 2020;10(2):129–136. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2020-10-2-129-136>

\***Контактное лицо:** Моргунов Игорь Михайлович; [morgunov@expmed.ru](mailto:morgunov@expmed.ru)

## Determination of Anthracene Derivatives in the Antihaemorrhoidal Medicinal Herb Mixture Proctophytol® Using the European Pharmacopoeia Method

N. P. Antonova, I. M. Morgunov\*, S. S. Prokhvatilova, E. P. Shefer,  
A. M. Kalinin, T. A. Golomazova

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,  
8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

**Abstract.** Specialists in pharmacognosy are facing an important task of improving quality control methods for combination herbal medicinal products in order to enable reliable assessment of the content of active substances that are responsible for the drug's pharmacological effect. **The aim of the study** was to investigate the possibility of using the European Pharmacopoeia method to determine the total content of anthracene derivatives in the antihaemorrhoidal medicinal herb mixture Proctophytol® and to propose limit values for the total content of anthracene derivatives. **Materials and methods:** individual mixture components containing anthracene derivatives, such as senna leaves and frangula bark, as well as model mixtures containing these individual components in a 1:1 ratio, and a model mixture imitating Proctophytol® were used in the study. The determination of the anthracene derivatives content was carried out using spectrophotometry. **Results:** it was demonstrated that the European Pharmacopoeia method could be used to assess the quality of Proctophytol® in terms of anthracene derivatives total content. The spectrophotometric method described in the European Pharmacopoeia has advantages over the methods described in manufacturer specifications for Russian products, because it allows for thorough extraction of the active substances and is standardized for anthracene derivatives. **Conclusions:** the European Pharmacopoeia method was adjusted to determine anthracene derivatives in the medicinal herb mixture Proctophytol®. It was proposed to use 70% ethanol instead of 70% methanol as extraction solvent. The authors identified optimum sample weights and test solution dilutions, and calculated and verified the limit for anthracene derivatives content—“Not less than 1.9%”. The adjusted method can be recommended for inclusion in the monographs of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation for medicinal herb mixtures similar to Proctophytol®.

**Key words:** spectrophotometry; anthracene derivatives; herbal substances; herbal medicinal products; pharmacopoeial methods; senna leaves; frangula bark

**For citation:** Antonova NP, Morgunov IM, Prokhvatilova SS, Shefer EP, Kalinin AM, Golomazova TA. Determination of anthracene derivatives in the antihemorrhoidal medicinal herb mixture Proctophytol® using the European Pharmacopoeia method. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2020;10(2):129–136. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2020-10-2-129-136>

\*Corresponding author: Igor M. Morgunov; morgunov@expmed.ru

Совершенствование методик контроля качества многокомпонентных лекарственных растительных препаратов, позволяющих объективно оценивать содержание действующих веществ, определяющих фармакологическое действие препарата, является актуальной задачей фармакогностов.

Сбор Проктофитол® применяется в медицинской практике как противогеморроидальное средство растительного происхождения, оказывает слабительное, спазмолитическое, гемостатическое действие. В состав сбора входят сенны листья, крушины кора, тысячелистника трава, кориандра плоды, солодки корни в равных частях. Слабительное действие сбора обусловлено наличием производных антрацена, содержащихся в коре крушины и листьях сенны. Учитывая фармакологическое действие препарата, а также то, что 40% препарата составляет сырье, содержащее антраценпроизводные, целесообразно стандартизировать сбор по данной группе действующих веществ [1–3]. В отечественной практике для количественного определения антраценпроизводных в основном используется метод спектрофотометрии, общую схему пробоподготовки при этом можно представить как экстракция → гидролиз и окисление → переэкстракция с образованием окрашенных фенолятов. Для количественного определения суммы антраценпроизводных в сборе Проктофитол® используется модифицированный метод Аутерхоффа, основанный на гидролизе гликозидов лежачей уксусной кислотой и экстракции продуктов гидролиза диэтиловым эфиром [4].

Данный метод имеет ряд недостатков:

- получение заниженных результатов содержания антраценпроизводных;
- использование диэтилового эфира в качестве экстрагента, который не является оптимальным;
- метод небезопасный: предусмотрено нагревание смеси диэтилового эфира и лежачей уксусной кислоты;
- метод трудоемкий, так как для построения калибровочного графика выполняются измерения в 12 калибровочных растворах хлорида кобальта;
- использование неспецифичного стандарта — определение антраценпроизводных проводят по калибровочному графику, построенному с помощью хлорида кобальта;
- испытываемые растворы отдельных компонентов сбора имеют разные максимумы поглощения

в условиях методики: сенны листьев — 523 нм, крушины коры — 540 нм;

- установленная норма содержания суммы действующих веществ требует уточнения.

Таким образом, данный метод не является оптимальным, и для его усовершенствования целесообразно использовать зарубежный опыт, а также введенные в действие фармакопейные методики количественного определения антраценпроизводных в лекарственном растительном сырье. В ФС.2.5.0021.18 «Крушины ольховидной кора» Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV изд. включен метод определения суммы антраценпроизводных, гармонизированный с методом Европейской фармакопеи 9 изд.<sup>1</sup> с небольшими изменениями. В Европейской фармакопее методики определения содержания антраценпроизводных в различных видах лекарственного растительного сырья (ЛРС) унифицированы, различия лишь в используемом экстрагенте. Так, например, для сенны листьев и плодов, экстракта алоэ в качестве экстрагента используется вода, для крушины коры — 70% метанол. Максимумы поглощения испытуемых растворов, полученных из листьев сенны, и растворов, полученных из коры крушины, совпадают и находятся в области около 515 нм. Для расчета содержания суммы антраценпроизводных используется удельный показатель поглощения (для листьев сенны — 240, для коры крушины — 204). Теоретический расчет показал, что норма содержания суммы антраценпроизводных может составлять «не менее 1,9%» ( $7,0\% \times 0,2 + 2,5\% \times 0,2 = 1,9\%$ , где коэффициент 0,2 — доля компонента в сборе), так как содержание суммы антраценпроизводных по Европейской фармакопее в коре крушины — не менее 7,0%, в листьях сенны — не менее 2,5% [3].

Цель работы — исследование возможности количественного определения антраценпроизводных в сборе Проктофитол® с использованием метода Европейской фармакопеи и установление нормы их содержания в условиях предложенной методики определения.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы лекарственных растительных препаратов:

- «Крушины ольховидной кора»: ООО «Лек С+», с. 11017; ООО Фирма «Фито-Бот», с. 210417; ОАО «Красногорсклексредства», с. 20217;

<sup>1</sup> Monograph 0025. Frangula bark. European Pharmacopoeia. 9th ed. Strasbourg: EDQM; 2016.

- «Сенны листья»: ООО «Лек С+», с. 21117; ООО Фирма «Здоровье», с. 011017; АО «Красногорсклексредства», с. 30317;

- модельная смесь, состоящая из лекарственного растительного сырья, содержащего антраценпроизводные, — крушины кора : сенны листья (1:1), приготовленная из вышеуказанных компонентов, 3 серии;

- модельная смесь, соответствующая по составу сбору Проктофитол®, приготовленная из вышеуказанных компонентов, 3 серии.

В модельные смеси вошли разные серии препаратов крушины коры и сенны листьев с разным содержанием действующих веществ, что привело к разному содержанию в этих модельных смесях антраценпроизводных.

Другие компоненты сбора, не содержащие исследуемую группу веществ, используемые для приготовления сбора:

- «Тысячелистника трава», ООО Фирма «Фитобот», с. 160817;

- «Солодки корни», ООО Фирма «Здоровье», с. 010912РЕГ;

- «Кориандра плоды», Житница здоровья, с. 180119.

Стандартный образец сеннозида Б, Sigma-Aldrich, кат. номер 00530580.

Оборудование: спектрофотометр Cary 100 (Varian), сушильный шкаф Binder ED53, электронные весы Mettler Toledo XPE205DR, баня водяная Julabo TW-12, испаритель ротационный Rotavapor R-300, автоматизированная система нанесения проб CAMAG® Linomat 5, УФ-кабинет CAMAG® TLC Visualizer 2, мельница IKA MF 10 basic с ситом 0,5 мм.

Испытания проводились на 3 модельных смесях сбора в трех параллелях с расчетом относительного стандартного отклонения (*RSD*). Для приготовления каждой из модельных смесей сбора использовали отдельную серию перечисленных выше компонентов сбора.

Для определения содержания суммы антраценпроизводных в сенны листьях и крушины коре использовалась методика Европейской фармакопеи, в которой вместо 70% метанола использовали 70% этанол. Для определения содержания суммы антраценпроизводных в сборе Проктофитол® использовалась методика, основанная на методике Европейской фармакопеи<sup>2</sup>, с использованием в качестве экстрагента 70% этанола.

Для сравнительной оценки компонентного состава продуктов гидролиза в испытуемых растворах и растворе сеннозида Б использовали метод высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ).

**Методика количественного определения антраценпроизводных.** Аналитическую пробу сырья из-

мельчали до получения частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм. Около 0,5 г (точная навеска) сбора помещали в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляли 50,0 мл 70% этанола, взвешивали с погрешностью  $\pm 0,01$  г. Колбу присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на кипящей водяной бане в течение 15 мин. После охлаждения до комнатной температуры колбу вновь взвешивали и доводили до первоначальной массы 70% этанолом. Содержимое колбы фильтровали через бумажный складчатый фильтр.

20,0 мл фильтрата помещали в делительную воронку вместимостью 250 мл, прибавляли 30 мл воды и 0,1 мл хлористоводородной кислоты концентрированной, осторожно взбалтывали в течение 2–3 мин с 20 мл петролейного эфира (х.ч.) (далее — эфир). После полного расслоения фаз нижний водный слой переносили в стакан вместимостью 100 мл, верхний эфирный слой переносили в колбу вместимостью 250 мл. Водный слой из стакана переносили в ту же делительную воронку и аналогичным образом обрабатывали еще 4 раза эфиром (порциями по 20 мл). Водный слой переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл. Объединенные петролейные извлечения переносили обратно в делительную воронку и промывали водой 2 раза (порциями по 15 мл), водный слой помещали в ту же мерную колбу вместимостью 100 мл, оставляя темные хлопья в эфирном слое. В мерную колбу с объединенными водными извлечениями прибавляли 5 мл раствора 5% натрия карбоната и доводили объем раствора водой до метки (раствор А).

50,0 мл раствора А пипеткой переносили в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляли 20 мл железа(III) хлорида раствора (плотность 1,07–1,08 г/мл), колбу присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на кипящей водяной бане при периодическом перемешивании в течение 20 мин, погружая ее в воду бани выше уровня раствора в колбе. Затем в колбу добавляли 2 мл хлористоводородной кислоты концентрированной и, часто встряхивая, продолжали нагревание в течение 20 мин до растворения осадка.

Колбу охлаждали, содержимое колбы переносили в делительную воронку вместимостью 500 мл, колбу ополаскивали 30 мл эфира, присоединяли ополоски к основному раствору в делительной воронке и осторожно взбалтывали в течение 2–3 мин. После полного расслоения фаз нижний водный слой переносили в ту же колбу вместимостью 250 мл, эфирный слой собирали в колбу вместимостью 100 мл. Извлечение повторяли еще 2 раза аналогичным образом. Объединенные эфирные извлечения переносили обратно в делительную воронку и промывали 2 раза водой (по 15 мл), водный слой отбрасывали. Эфирные извлечения фильтровали через воронку с бумажным фильтром, содержащим

<sup>2</sup> Monograph 0025. Frangula bark. European Pharmacopoeia. 9th ed. Strasbourg: EDQM; 2016.

3 г натрия сульфата безводного, в мерную колбу вместимостью 100 мл. Воронку с натрия сульфатом безводным промывали эфиром, доводили объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивали (раствор Б).

20,0 мл раствора Б пипеткой переносили в бюкс вместимостью 100 мл и сушили досуха в вытяжном шкафу. Сухой остаток полностью растворяли в 10 мл магния ацетата спиртового раствора 0,5% (раствор В).

Оптическую плотность раствора В измеряли на спектрофотометре при длине волны 515 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве раствора сравнения спирт 96%.

Содержание суммы антрагликозидов в пересчете на глюкофрангулин А в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{A \times 50 \times 100 \times 10 \times 100 \times 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \times 20 \times 50 \times 20 \times a(100-w)} = \frac{A \times 122,55}{a(100-w)},$$

где A — оптическая плотность раствора В;  $A_{1\text{см}}^{1\%}$  — удельный показатель поглощения глюкофрангулина А при длине волны 515 нм, равный 204; a — навеска сырья, г; w — влажность сырья, %.

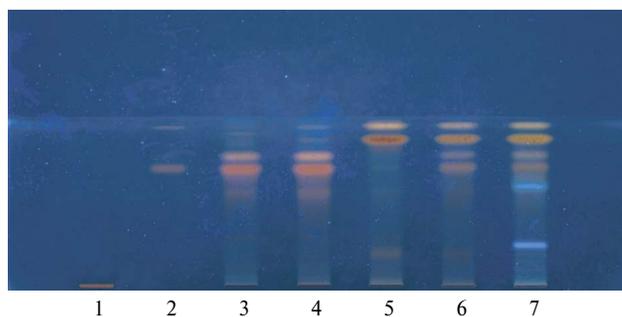
### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В работе оценивалась возможность количественного определения антраценпроизводных сены листьев и крушины коры в сборе Проктофитол® с использованием метода Европейской фармакопеи и установления нормы содержания антраценпроизводных в условиях предложенной методики.

Для решения поставленной задачи было проведено изучение спектров поглощения образцов крушины ольховидной коры, сены листьев и модельных смесей крушины и сены (1:1), модельных смесей сбора Проктофитол®, стандартного образца сеннозида Б. Спектры испытуемых растворов сены листьев, крушины коры, модельных смесей на их основе, а также продуктов гидролиза стандартного образца сеннозида Б практически идентичны и отличаются незначительным отклонением максимума поглощения (табл. 1, рис. 2, 3).

Использование в качестве экстрагента 70% этанола при определении суммы антраценпроизводных в пересчете на сеннозид Б в листьях сены дает сопоставимые результаты с методикой, в которой в качестве экстрагента используется вода очищенная (табл. 2). Методом ВЭТСХ была проведена оценка качественного состава испытуемых растворов. Хроматограммы растворов, содержащих экстракты сены листьев, полученные при экстракции водой и при экстракции этанолом 70%, идентичны по положению и цвету основных зон адсорбции (рис. 1).

Установлено, что при гидролизе и окислении сеннозида Б образуется одно основное вещество и одно дополнительное в незначительном количестве. При гидролизе и окислении в ходе количественного определения испытуемых растворов сены листьев и крушины коры образуются два основных соединения, зоны адсорбции которых



**Рис. 1.** Хроматограммы компонентов сбора и модельных смесей. 1 — сеннозид Б; 2 — продукты гидролиза сеннозида Б; 3 — испытуемый раствор сены (экстракция водой); 4 — испытуемый раствор сены (экстракция 70% этанолом); 5 — испытуемый раствор крушины коры; 6 — испытуемый раствор смеси сены и крушины; 7 — испытуемый раствор сбора Проктофитол®

**Fig. 1.** Chromatograms of the individual components and their mixtures. 1—sennoside B; 2—sennoside B hydrolysis products; 3—senna leaves test solution (water extraction); 4—senna leaves test solution (70% ethanol extraction); 5—frangula bark test solution; 6—senna leaves and frangula bark mixture test solution; 7—Proctophytol® test solution

**Таблица 1.** Максимумы поглощения образцов компонентов сбора и модельных смесей

**Table 1.** Maximum absorption wavelengths of individual components and their mixtures

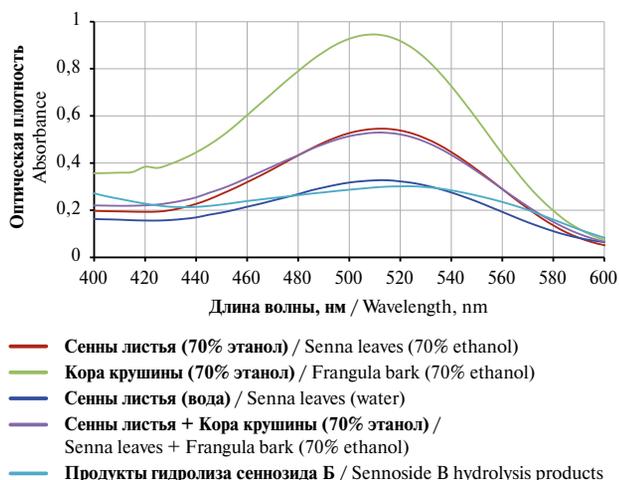
Наименование образца Sample	Максимум поглощения, серия 1, нм Maximum absorption wave- length of batch 1, nm	Максимум поглощения, серия 2, нм Maximum absorption wave- length of batch 2, nm	Максимум поглощения, серия 3, нм Maximum absorption wave- length of batch 3, nm
Сенны листья Senna leaves	514	514	513
Крушины кора Frangula bark	510	509	511
Смесь сены и крушины 1:1 Senna and frangula mixture 1:1	510	511	513
Сбор Проктофитол® Proctophytol®	512	513	512

**Таблица 2.** Количественное определение суммы антраценпроизводных

**Table 2.** Determination of the total content of anthracene derivatives

Образец Sample	Сумма антраценпроизводных в пересчете на: Total content of anthracene derivatives expressed as:	Результат, % Result, %		
		Серия 1 Batch 1	Серия 2 Batch 2	Серия 3 Batch 3
Сенны листья, экстракция водой Senna leaves, water extraction	Сеннозид Б Sennoside B	2,821 (RSD 2,59%)	2,167 (RSD 2,88%)	2,918 (RSD 1,91%)
Сенны листья, экстракция 70% этанолом Senna leaves, 70% ethanol extraction	Сеннозид Б Sennoside B	2,695 (RSD 2,95%)	2,044 (RSD 2,91%)	2,420 (RSD 1,12%)
Крушины кора, экстракция 70% этанолом Frangula bark, 70% ethanol extraction	Глюкофрангулин А Glucofrangulin A	6,042 (RSD 1,63%)	5,932 (RSD 0,83%)	7,736 (RSD 1,53%)
Смесь листьев сенны и коры крушины, экстракция 70% этанолом (теоретический расчет) Mixture of senna leaves and frangula bark, 70% ethanol extraction (theoretical value)	Глюкофрангулин А и сеннозид Б Glucofrangulin A and sennoside B	4,369	3,988	5,078
	Глюкофрангулин А Glucofrangulin A	4,606	4,168	5,292
Смесь листьев сенны и коры крушины, экстракция 70% этанолом Mixture of senna leaves and frangula bark, 70% ethanol extraction	Глюкофрангулин А и сеннозид Б Glucofrangulin A and sennoside B	5,091 (RSD 2,67%)	4,238 (RSD 2,81%)	5,276 (RSD 2,12%)
	Глюкофрангулин А Glucofrangulin A	5,421 (RSD 2,67%)	4,611 (RSD 2,81%)	5,742 (RSD 2,12%)
Модельная смесь Проктофитол® (теоретический расчет) Model mixture imitating Proctophytol® (theoretical value)	Глюкофрангулин А и сеннозид Б Glucofrangulin A and sennoside B	1,773	1,595	2,031
	Глюкофрангулин А Glucofrangulin A	1,872	1,667	2,116
Модельная смесь Проктофитол®, экстракция 70% этанолом Model mixture imitating Proctophytol®, 70% ethanol extraction	Глюкофрангулин А и сеннозид Б Glucofrangulin A and sennoside B	2,241 (RSD 2,08%)	1,800 (RSD 2,04%)	1,964 (RSD 1,42%)
	Глюкофрангулин А Glucofrangulin A	2,438 (RSD 2,08%)	1,904 (RSD 2,04%)	2,138 (RSD 1,42%)

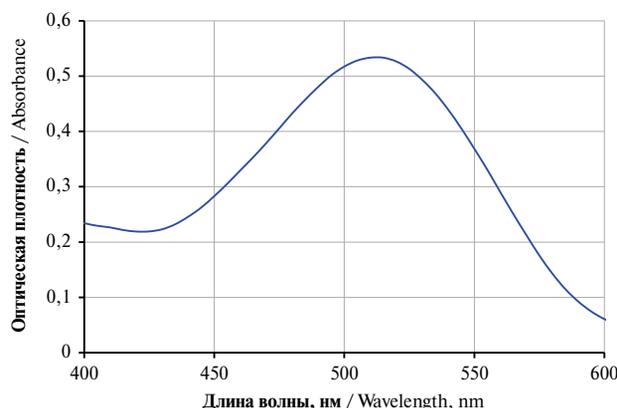
Примечание. RSD — относительное стандартное отклонение.  
 Note. RSD—relative standard deviation.



**Рис. 2.** Спектры поглощения испытуемых растворов  
**Fig. 2.** Absorption spectra of the test solutions

наблюдаются на хроматограмме смеси крушины и сенны и на хроматограмме сбора Проктофитол®. Все зоны адсорбции четко разделены.

Содержание суммы антраценпроизводных в пересчете на глюкофрангулин А для смеси крушины кора : сенны листья (1:1) и смеси, идентичной сбору



**Рис. 3.** Спектр поглощения испытуемого раствора, полученного из сбора Проктофитол® экстракцией 70% этанолом  
**Fig. 3.** Absorption spectrum of the Proctophytol® test solution (70% ethanol extraction)

Проктофитол®, изготовленных из тех же компонентов, незначительно выше в двух испытаниях, чем теоретически рассчитанное по результатам количественного определения суммы антраценпроизводных в коре крушины и листьях сенны, и незначительно ниже в одном испытании (табл. 2). Следует

отметить, что содержание суммы антраценпроизводных в смеси крушины кора : сенны листья (1:1) расходится с теоретическим значением больше, чем в смеси, идентичной сбору Проктофитол®.

Для определения содержания суммы антраценпроизводных в пересчете на глюкофрангулин А использовался удельный показатель поглощения, приведенный в методике Европейской фармакопеи<sup>3</sup>, равный 204. Так как сенны листья и крушины кора в сборе находятся в равных количествах (для сенны листьев удельный показатель поглощения равен 240, а для коры крушины — 204), можно было бы использовать усредненный удельный показатель

поглощения, равный 222, но для этого необходимо сопоставить результаты с экспериментальными данными при использовании стандартного раствора глюкофрангулин А : сеннозид Б (1:1). Нами были проведены теоретические расчеты на усредненный удельный коэффициент, равный 222, дающие пропорциональные результаты, но они пригодны лишь для ознакомления (табл. 2).

Была проведена валидация<sup>4</sup> использованной методики для подтверждения того, что она пригодна для количественного определения антраценпроизводных в сборе Проктофитол®. Результаты ревалидации представлены в таблице 3.

**Таблица 3.** Результаты ревалидации аналитической методики количественного определения антраценпроизводных в сборе Проктофитол®

**Table 3.** The results of revalidation of the assay used for determination of anthracene derivatives in the medicinal herb mixture Proctophytol®

Характеристика Parameter	Требования Requirements	Результат Result		
Специфичность Specificity	Присутствие сопутствующих компонентов не влияет непредусмотренным образом на результат анализа The presence of related compounds does not inadvertently affect the result of analysis	На УФ-спектре испытуемого раствора присутствует характерный максимум поглощения, совпадающий с максимумом поглощения УФ-спектра раствора глюкофрангулина А; на УФ-спектре раствора сравнения максимум поглощения отсутствует The UV spectrum of the test solution shows a characteristic absorption maximum which matches the absorption maximum in the UV spectrum of glucofranulin A standard solution; the UV spectrum of the reference solution does not have an absorption maximum		
Линейность Linearity	Данные экспериментальных измерений аналитических сигналов 5 проб с различным содержанием определяемых веществ обработаны методом наименьших квадратов с использованием линейной модели Experimental data obtained from measurements of analytical signals of 5 samples containing different amounts of the analytes were processed using the least squares method and the linear model: $y = bx + a$  Коэффициент корреляции Correlation coefficient: $r \geq 0,99$	Навеска сбора Sample weight		
		г (g)	%	
		0,40	80	Оптическая плотность Absorbance
		0,45	90	0,45612
		0,50	100	0,52533
		0,55	110	0,57749
		0,60	120	0,63343
		Уравнение прямой Line equation $y = 0,0060404x - 0,024748$ Коэффициент корреляции Correlation coefficient $r = 0,9985571$ $r > 0,99$		
Аналитическая область Range	Методика применима в интервале от 80 до 120% от минимального допустимого значения The method is applicable in the range from 80 to 120% of the minimum acceptable value	Соответствует на основании данных по изучению линейности The result is satisfactory based on linearity data		
Правильность Trueness	Свободный член уравнения меньше своего доверительного интервала The constant term of the line equation is less than its confidence interval $\Delta a = t(0,05, n - 2) \times s_a$ $a \leq \Delta a$	На основании данных по изучению линейности Based on linearity data $a = 0,0247393$ $s_a = 0,0189431$ $t(0,05, n - 2) = 3,182$ $\Delta a = 3,182 \times 0,0189431 = 0,0602769442$ $a < \Delta a$		

<sup>3</sup> Monograph 0025. Frangula bark. European Pharmacopoeia. 9th ed. 2016.

<sup>4</sup> ОФС.1.1.0012.15. Валидация аналитических методик; ОФС.1.1.0013.15. Статистическая обработка результатов химического эксперимента. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

Гармаш АВ, Сорокина НМ. Метрологические основы аналитической химии. М.: МГУ им. М.В. Ломоносова; 2012.

Характеристика Parameter	Требования Requirements	Результат Result		
Прецизионность Precision  Повторяемость Repeatability	<i>RSD</i> результатов 6 определений количественного содержания антраценпроизводных должно быть ≤ 3,0% <i>RSD</i> of 6 determinations of anthracene derivatives ≤ 3.0%	Результаты 6 определений количественного содержания антраценпроизводных The results of 6 determinations of anthracene derivatives		
		№ определения Determination	Значение Result	
		1	2,35402	
		2	2,49309	
		3	2,49297	
		4	2,39394	
		5	2,38380	
Межлабораторная прецизионность Intermediate precision	Полученное значение критерия Фишера, вычисленное по результатам проведения испытаний разными исполнителями на разном оборудовании, должно быть меньше табличного значения F-test value calculated from the results obtained by different operators with different equipment is less than the tabular value $F_{\text{pract.}} = s_1^2/s_2^2 \leq F_{\text{teor.}}$	Среднее значение / Mean = 2,42347 <i>RSD</i> = 2,40%		
		№ определе- ния Determina- tion	Исполнитель 1, Оборудование 1 Operator 1, Equipment 1	Исполнитель 2, Оборудование 2 Operator 2, Equipment 2
		1	2,46764%	2,40402%
		2	2,38684%	2,36211%
		3	2,38217%	2,48880%
		S	0,048	0,065
		S <sup>2</sup>	0,002304	0,004225
		$F_{\text{pract.}} = 0,004225/0,002304 = 1,83$ $F_{\text{teor.}}(0,05; 2; 2) = 19,00$ $F_{\text{pract.}} < F_{\text{teor.}}$		

Примечание.  $t(0,95; n-2)$  — коэффициент Стьюдента, где 0,95 — вероятность,  $n-2$  — число степеней свободы;  $F_{\text{pract.}}$ ,  $F_{\text{teor.}}(0,05; 2; 2)$  — полученный и табличный критерии Фишера соответственно, где 0,05 — уровень значимости, 2 и 2 — число степеней свободы;  $s$  — стандартное отклонение;  $s_1, s_2$  — большее и меньшее стандартные отклонения полученных результатов соответственно;  $s_a$  — стандартное отклонение свободного члена, *RSD* — относительное стандартное отклонение (%).

Note.  $t(0,95; n-2)$ —Student's *t*-test, where 0.95 is probability,  $n-2$ —the number of degrees of freedom;  $F_{\text{pract.}}$ ,  $F_{\text{teor.}}(0,05; 2; 2)$ —Fisher's test obtained values and table values, respectively, where 0.05 is the significance level, 2 and 2—the number of degrees of freedom;  $s$ —standard deviation;  $s_1, s_2$ —larger and smaller values of standard deviations, respectively;  $s_a$ —standard deviation of the constant term; *RSD*—relative standard deviation (%).

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведена оценка возможности определения суммы антраценпроизводных в сборе Проктофитол® с использованием метода Европейской фармакопеи. Установлено, что спектры поглощения испытуемых растворов сенны листьев и крушины коры, полученные в условиях предложенной методики, практически совпадают.

В результате проведенной работы для определения антраценпроизводных в сборе Проктофитол® была адаптирована методика Европейской фармакопеи. В качестве экстрагента предложено использовать 70% этанол вместо 70% метанола, предусмотренного методикой Европейской фармакопеи. Для расчетов предложено использовать удельный показатель поглощения глюкофрангулина А, равный 204, предусмотренный методикой Европейской фармакопеи. Предложено нормировать сумму

антраценпроизводных в пересчете на глюкофрангулин А «не менее 1,9%».

Была проведена валидация предложенной методики для подтверждения того, что она пригодна для количественного определения антраценпроизводных в сборе Проктофитол®. Предложенная методика может быть рекомендована для включения в фармакопейные статьи Государственной фармакопеи Российской Федерации на сборы, аналогичные по составу сбору Проктофитол®.

**Вклад авторов.** *Н. П. Антонова* — идея, планирование исследования, консультация по вопросам проведения отдельных этапов экспериментальных работ; *И. М. Моргунов* — выполнение экспериментальной части исследований по количественному определению антраценпроизводных, написание чернового варианта статьи; *С. С. Прохвятилова* — сбор, анализ и обобщение данных литературы; *Е. П. Шефер* — разработка дизайна валидационного исследования и обработка его результатов;

**А. М. Калинин** — подготовка иллюстраций, техническое оформление материала, редактирование текста; **Т. А. Голомазова** — проведение практических испытаний по валидации.

**Authors' contributions.** **Natalia P. Antonova**—study idea and planning, consultation on individual stages of the experimental work; **Igor M. Morgunov**—experimental part of the study, quantitative determination of anthracene derivatives, drafting the paper; **Svetlana S. Prokhvatilova**—collection, analysis and summarising of literature data; **Elena P. Shefer**—design of the validation study and analysis of its results; **Artem M. Kalinin**—preparing illustrations, formatting the paper, editing the text; **Tatiana A. Golomazova**—experimental validation work.

**Благодарности.** Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00003-20-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР АААА-А18-118021590049-0).

**Acknowledgements.** The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00003-20-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. АААА-А18-118021590049-0).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Куркин ВА, Шмыгарева АА, Саньков АН. Разработка новых подходов к стандартизации проктофитола. *Медицинский альманах*. 2014;(2):138–41. [Kurkin VA, Shmygareva AA, San'kov AN. The creation of new approaches to the standardization of Proktofitol. *Medit-sinskiy al'manakh = Medical almanac*. 2014;(2):138–41 (In Russ.)]
2. Куркин ВА, Шмыгарева АА, Саньков АН. Разработка новых подходов к стандартизации сбора «Для очищения организма». *Известия Оренбургского государственного аграрного университета*. 2015;(2):171–4. [Kurkin VA, Shmygareva AA, San'kov AN. Working out new approaches to standardization of the medicinal plants collection "For body cleansing". *Izvestiya Orenburgskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta = Izvestia of the Orenburg State Agrarian University*. 2015;(2):171–4 (In Russ.)]
3. Куркин ВА, Авдеева ЕВ, Петрухина ИК, Шмыгарева АА, Агапов АИ, Ежков ВН. Актуальные аспекты стандартизации лекарственного растительного сырья, содержащего антраценпроизводные, и слабительных препаратов на их основе. *Фундаментальные исследования*. 2015;(2):1424–31. [Kurkin VA, Avdeeva EV, Petrukhina IK, Shmygareva AA, Agapov AI, Ezhkov VN. The actual aspects of plant medicinal drugs, contained the anthracenderivatives, and laxative preparations on the basis of their. *Fundamentalnye issledovaniya = Fundamental Research*. 2015;(2):1424–31 (In Russ.)]
4. Марахова АИ, Аврач АС, Скалозубова ТА, Сорокина АА, Сергунова ЕВ, Федоровский НН. Спектрофотометрия в анализе сборов. *Медицина и образование в Сибири*. 2012;(2):79–89. [Marakhova AI, Avrach AS, Skalozubova TA, Sorokina AA, Sergunova EV, Fedorovsky NN. Spectrophotometry in analysis of preparations. *Meditsina i obrazovanie v Sibiri = Journal of Siberian Medical Sciences*. 2012;(2):79–89 (In Russ.)]

## ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

**Антонова Наталья Петровна**, канд. биол. наук. *Natalia P. Antonova*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-7818-5303>

**Моргунов Игорь Михайлович**. *Igor M. Morgunov*. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-3907-3456>

**Прохватилова Светлана Степановна**, канд. фарм. наук. *Svetlana S. Prokhvatilova*, Cand. Sci. (Pharm.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-3278-1994>

**Шефер Елена Павловна**, канд. фарм. наук. *Elena P. Shefer*, Cand. Sci. (Pharm.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-8389-4799>

**Калинин Артем Михайлович**. *Artem M. Kalinin*. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-4980-3248>

**Голомазова Татьяна Александровна**. *Tatiana A. Golomazova*. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-9917-9367>

Статья поступила 04.02.2020

После доработки 27.04.2020

Принята к печати 28.05.2020

Article was received 4 February 2020

Revised 27 April 2020

Accepted for publication 28 May 2020

## Методические подходы к определению депрессорных веществ в лекарственных средствах

Т. А. Батуашвили, Л. В. Симутенко, Н. П. Неугодова, П. В. Шадрин\*

Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации,  
Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

**Резюме.** Для гармонизации отечественных и зарубежных требований к оценке качества лекарственных средств в ОФС.1.2.4.0008.18 «Испытание на депрессорные вещества» включен второй вариант метода проведения испытания, который соответствует требованиям Европейской фармакопеи. Цель работы — сравнительный анализ двух вариантов метода определения депрессорных веществ в лекарственных средствах в условиях *in vivo* на кошках и подготовка рекомендаций по применению каждого из этих вариантов. В результате проведенного сравнительного анализа двух вариантов определения в лекарственных средствах примесей, снижающих артериальное давление, показаны различные подходы к проведению испытаний, проверке чувствительности животного к раствору сравнения (гистамина дигидрохлориду). Показано, что в соответствии с фармакопейными требованиями в вариантах 1 и 2 результаты оцениваются с использованием разных концентраций, а также объемов и доз лекарственных средств. На основании установленных различий методического подхода к определению депрессорных веществ в лекарственных средствах разработаны рекомендации для использования каждого из рассмотренных вариантов проведения испытания. Благодаря включению в общую фармакопейную статью двух вариантов метода появляется возможность оценивать качество лекарственных средств в более подходящих для каждого конкретного препарата условиях и тем самым повышать достоверность результатов.

**Ключевые слова:** лекарственные средства для инъекций; депрессорные вещества; артериальное давление; гистамин; брадикинин; фармакопейные методы; биологические методы испытаний

**Для цитирования:** Батуашвили ТА, Симутенко ЛВ, Неугодова НП, Шадрин ПВ. Методические подходы к определению депрессорных веществ в лекарственных средствах. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2020;10(2):137–141. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2020-10-2-137-141>

\***Контактное лицо:** Шадрин Павел Валерьевич; [shadrin@expmed.ru](mailto:shadrin@expmed.ru)

## Methodological Approaches to Determination of Depressor Substances in Medicinal Products

T. A. Batuashvili, L. V. Simutenko, N. P. Neugodova, P. V. Shadrin\*

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,  
8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

**Abstract.** In order to harmonise national and foreign requirements for quality control of medicinal products, a second variant of the test method, which complies with the requirements of the European Pharmacopoeia, was included into the general monograph OFS.1.2.4.0008.18 “Test for depressor substances”. The aim of the study was to compare the two variants of the *in vivo* test method that uses cats for determination of depressor substances in medicinal products and to develop recommendations for the use of these two variants of the test method. The comparative analysis of the two ways of determining impurities that lower blood pressure revealed different approaches to performing the test and to testing an animal’s sensitivity to the reference solution (histamine dihydrochloride). It was demonstrated that different concentrations, volumes, and doses of medicinal products are used to assess the results of testing performed by variants 1 and 2 of the test method according to the pharmacopoeial requirements. Based on the established differences in the methodological approach to determination of depressor substances in medicinal products, the authors developed recommendations for each of the test variants. The inclusion of two variants of the test method in the general monograph provides an opportunity to evaluate the quality of medicinal products under the most appropriate conditions and, consequently, to improve the validity of test results.

**Key words:** injectable medicinal products; depressor substances; blood pressure; histamine; bradykinin; pharmacopoeial methods; bioassays

**For citation:** Batuashvili TA, Simutenko LV, Neugodova NP, Shadrin PV. Methodological approaches to determination of depressor substances in medicinal products. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2020;10(2):137–141. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2020-10-2-137-141>

\***Corresponding author:** Pavel V. Shadrin; [shadrin@expmed.ru](mailto:shadrin@expmed.ru)

Биологические методы оценки качества лекарственных средств (ЛС) используются, как правило, для определения биологической активности или нежелательных примесей в субстанциях и инъекционных препаратах. В качестве тест-объектов могут быть использованы интактные животные, изолированные органы или микроорганизмы.

В соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV изд. (ГФ РФ XIV) наличие примесей в ЛС для инъекций и для внутривенных введений определяют методами, изложенными в общих фармакопейных статьях (ОФС) «Аномальная токсичность», «Пирогенность», «Испытание на гистамин» и «Испытание на депрессорные вещества»<sup>1</sup>.

Присутствие в ЛС примесей, снижающих артериальное давление (АД), может приводить к нежелательным побочным реакциям у пациентов. Тест для определения депрессорных веществ в ЛС впервые был введен в ведущие фармакопеи мира с началом производства антибиотиков. Тест-объектом в испытаниях являются кошки как наиболее чувствительные к гистамину и другим депрессорным веществам животные.

В 1961 году для оценки безопасности антибиотиков в Государственную фармакопею СССР IX изд. была включена общая статья «Испытание антибиотиков на содержание веществ гистаминоподобного действия»<sup>2</sup>. В 1963 году в частные статьи Британской фармакопеи<sup>3</sup> для окситетрациклина гидрохлорида, тетрациклина гидрохлорида, стрептомицина сульфата и гепарина натриевой соли введен показатель «Испытание на гистаминоподобные примеси». В 1971 году, согласно отраслевому стандарту ОСТ-42-1-71, этот показатель включен в разделы соответствующих фармакопейных статей на субстанции антибиотиков и препараты животного происхождения, а также на лекарственные формы для инъекций, произведенные из этих субстанций<sup>4</sup>.

В 1987 году во включенную в Государственную фармакопею СССР XI изд. ОФС «Испытание на содержание веществ гистаминоподобного действия»<sup>5</sup> было

внесено изменение, в соответствии с которым стали проводить подобные испытания не только для антибиотиков, но и для других «лекарственных средств, предназначенных для парентерального введения»<sup>6</sup>.

В 2009 году были изданы методические рекомендации по составлению нормативной документации на субстанции ЛС<sup>7</sup>, в соответствии с которыми показатель «Депрессорные вещества» следует включать в проект нормативной документации на субстанции животного и микробиологического происхождения, из которых производят препараты для внутрисосудистого введения.

В ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения» Государственной фармакопеи Российской Федерации XIII изд. окончательно сформулированы необходимые условия для включения теста на депрессорные вещества в частные фармакопейные статьи: «Испытанию на гистамин и депрессорные вещества подлежат субстанции, которые используются для приготовления лекарственных препаратов, предназначенных только для внутрисосудистого введения, и если в их составе могут быть изначально или приобретаются в процессе производства примеси, обладающие депрессорным действием (субстанции микробиологического или животного происхождения)»<sup>8</sup>.

При нарушении технологического процесса, в основном условий хранения или сроков обработки органов на начальных этапах получения сырья животного происхождения для производства ЛС, возможно загрязнение продукции вазоактивными веществами, например гистамином<sup>9</sup>.

В процессе производства ЛС путем микробиологического синтеза в питательную среду, богатую белками и пептидами, возможно попадание бактерий *Lactobacillus* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. и *Escherichia coli*, которые декарбоксилируют L-гистидин, превращая его в гистамин, являющийся нежелательной примесью<sup>10</sup>.

Гистамин как важнейший медиатор [1, 2] участвует в различных физиологических и патологических процессах организма<sup>11</sup>. Действие гистамина

<sup>1</sup> Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

<sup>2</sup> ОФС «Испытание антибиотиков на содержание веществ гистаминоподобного действия». Государственная фармакопея СССР IX изд. М.: Медгиз; 1961.

<sup>3</sup> British Pharmacopoeia. London: Pharmaceutical Press; 1963.

<sup>4</sup> ОСТ 42-1-71 «Порядок разработки, согласования и утверждения нормативно-технической документации на лекарственные средства и лекарственное сырье». М.; 1971.

<sup>5</sup> ОФС «Испытание на содержание веществ гистаминоподобного действия». Государственная фармакопея СССР. Вып. 1. XI изд., доп. М.: Медицина; 1987.

<sup>6</sup> ОФС «Инъекционные лекарственные формы». Государственная фармакопея СССР. Вып. 2. XI изд. М.: Медицина; 1988.

<sup>7</sup> Правила составления, изложения и оформления стандартов качества на фармацевтические субстанции. М.; ФГУ НЦЭСМП; 2009.

<sup>8</sup> ОФС.1.4.1.7 «Лекарственные формы для парентерального применения». Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Ч. 2. М.; 2007.

<sup>9</sup> Органолептические препараты. [https://big\\_medicine.academic.ru/6369/ОРГАНОПРЕПАРАТЫ](https://big_medicine.academic.ru/6369/ОРГАНОПРЕПАРАТЫ)

<sup>10</sup> [https://www.who.int/foodsafety/areas\\_work/chemical-risks/histamine/ru/;](https://www.who.int/foodsafety/areas_work/chemical-risks/histamine/ru/)

Яруллина ДР, Фахруллин РФ. Бактерии рода *Lactobacillus*: общая характеристика и методы работы с ними. Учебно-методическое пособие. Казань: Казанский университет; 2014. [https://kpfu.ru/portal/ias\\_utils.file\\_download?p\\_table\\_id=4&p\\_file=F1699665265/Metodichka\\_Yarullina.pdf](https://kpfu.ru/portal/ias_utils.file_download?p_table_id=4&p_file=F1699665265/Metodichka_Yarullina.pdf)

<sup>11</sup> Захарова НГ, Вершинина ВИ, Ильинская ОН. Краткий курс по микробиологии, вирусологии и иммунологии. Казань; 2015. [https://kpfu.ru/portal/docs/F1983116484/krat\\_kurs.compressed2.pdf](https://kpfu.ru/portal/docs/F1983116484/krat_kurs.compressed2.pdf)

в организме осуществляется через разные подтипы Н-рецепторов, различающихся по строению, локализации и физиологическим функциям<sup>12</sup>. Воздействуя на рецепторы H<sub>1</sub>, расположенные в гладкой мускулатуре артерий и вен, гистамин вызывает расширение сосудов и увеличение их проницаемости, что приводит к снижению АД и отеку<sup>13</sup>.

Другими возможными примесями, которые могут присутствовать в ЛС и способны вызывать депрессорные реакции, являются кинины, в частности брадикинин<sup>14</sup>. Он воздействует на кровеносные сосуды, высвобождая простаглицлин и оксид азота. Брадикинин является пептидом, состоящим из 9 аминокислот и образующимся из калликреиногена под действием калликреина плазмы при воспалении или повреждении тканей<sup>15</sup> [3]. Калликреиноген содержится в легких крупного рогатого скота, которые используют как сырье для получения органопрепаратов<sup>16</sup>.

Простаглицлины являются вазоактивными производными ненасыщенных жирных кислот, синтезируются во всех органах и тканях в ответ на различные воздействия окружающей среды и способны оказывать гипотензивное действие на организм. Основную роль в снижении АД выполняет простаглицлин, который синтезируется в эндотелии и гладкомышечных клетках кровеносных сосудов. Находясь в крови, он оказывает вазодилатирующий эффект<sup>17</sup>.

В последние годы развернулась дискуссия о целесообразности проведения испытаний на животных. Тем не менее тест, определяющий присутствие нежелательных депрессорных примесей в ЛС, по-прежнему остается востребованным [4]. В ряде стран постсоветского пространства он введен в национальные фармакопеи<sup>18</sup>, практически полностью повторяя методику Европейской фармакопеи<sup>19</sup>. Учитывая, что гармонизация отечественных и зарубежных требований к оценке качества ЛС будет способствовать их оптимизации, в ОФС.1.2.4.0008.18 «Испытание на депрессорные вещества» (ГФ РФ XIV) в качестве второго варианта добавлена методика, описанная в Европейской фармакопее. Кроме того, в связи с подготовкой аналогичного проекта монографии для фармакопеи Евразийского экономического союза целесообразно для теста «Испытание на депрессорные вещества» включить оба варианта метода. Вариант

1 был описан еще в предыдущем издании Государственной фармакопеи Российской Федерации (ОФС.1.2.4.0008.15). Вариант 2 представляет собой адаптированное изложение методики, приведенной в Европейской фармакопее.

Для правильного выбора варианта проведения испытания ЛС на наличие депрессорных веществ необходимо сравнение методических особенностей каждого из них.

Цель работы — сравнительный анализ двух вариантов метода определения депрессорных веществ в ЛС в условиях *in vivo* на кошках и подготовка рекомендаций по применению каждого из этих вариантов.

Оба варианта являются модификацией метода с полуколичественной оценкой, в основе которого лежит сравнение реакций сердечно-сосудистой системы (ССС) животного на введение испытуемого препарата и раствора сравнения.

Подготовка животных к проведению испытания, включая введение наркоза, препарирование сосудов, и регистрация АД в обоих вариантах метода проводятся одинаково. В качестве раствора сравнения используют раствор гистамина дигидрохлорида (ч. или ч.д.а.) в пересчете на гистамин-основание.

В то же время существенных различий значительно больше. Они заключаются в схеме проведения испытания, в подходе к проверке чувствительности животного к гистамину, во вводимых объемах и дозах гистамина, объемах испытуемого препарата и, соответственно, оценке полученных результатов.

Для определения чувствительности животного к гистамину в Варианте 1 используют две концентрации раствора гистамина: 0,5 и 1,0 мкг/мл в объеме 0,2 мл/кг, тогда как в Варианте 2 только одну концентрацию — 0,1 мкг/мл в объеме 1,0 и 1,5 мл/кг.

Основным критерием оценки чувствительности животных к гистамину по Варианту 1 является реакция ССС, сопровождающаяся снижением АД, на введение раствора гистамина с концентрацией 1,0 мкг/мл в объеме 0,2 мл/кг массы тела (тест-доза 0,2 мкг/0,2 мл/кг). В этой дозе минимальная величина снижения АД должна быть не менее 20 мм рт. ст. Существенным дополнением к оценке

<sup>12</sup> Шмагель КВ, Черешнев ВА. Гистамин и гистаминовые рецепторы. <https://newvrach.ru/gistamin-i-gistaminovye-receptory.html>

<sup>13</sup> Гормон гистамин. Гистамин — роль в организме, аллергия, наличие в продуктах. <https://bleat.ru/gormon-gistamin-gistamin-rol-v-organizme-allergiya-nalichie-v/>

<sup>14</sup> Депрессорные механизмы регуляции АД. <https://megalektsii.ru/s23043t11.html>

Жолондз МЯ. Новый взгляд на гипертонию: причины и лечение. СПб.; Питер: 2010.

<sup>15</sup> Кассиль ГН. Наука о боли. М.: Наука; 1975.

<sup>16</sup> Технология полимеров медико-биологического назначения. Полимеры природного происхождения. [https://ozlib.com/827373/himiya/podgotovka\\_sуга](https://ozlib.com/827373/himiya/podgotovka_sуга)

<sup>17</sup> Жолондз МЯ. Новый взгляд на гипертонию: причины и лечение СПб: Питер; 2010.

<sup>18</sup> Государственная фармакопея Республики Беларусь. Минск; 2007.

Государственная фармакопея Республики Казахстан. Алматы; 2008.

Государственная фармакопея Украины. Киев; 2004.

<sup>19</sup> Monograph 2.6.11. Depressor substances. European Pharmacopoeia, 9th ed. V. 1. Strasbourg: EDQM; 2016.

чувствительности и стабильности снижения АД на гистамин по Варианту 1 является введение в начале испытания два раза подряд через минуту в одном и том же объеме раствора гистамина в концентрации 0,5 мкг/мл (тест-доза 0,1 мкг/0,2 мл/кг).

Не менее важным подтверждением правильности выполнения испытания является наличие дозозависимости полученного снижения АД животного в ответ на введение растворов гистамина в концентрации 0,5 и 1,0 мкг/мл. Только при выполнении вышеперечисленных условий возможно дальнейшее проведение испытания по Варианту 1.

Для подтверждения чувствительности и стабильности реакции АД животного на гистамин при выполнении испытания по Варианту 2 необходимо выполнение следующих условий:

1) повторные введения (не менее двух раз) раствора гистамина в объеме 1 мл/кг должны сопровождаться близкими сопоставимыми снижениями АД, а при введении гистамина в объеме 1,5 мл/кг снижение АД должно быть более выражено (двухразовое введение гистамина в вышеуказанных дозах повторяют дважды, чередуя с повторным введением испытуемого препарата);

2) ни одна из испытуемых доз раствора гистамина, введенного в объеме 1 мл/кг, не должна вызывать более выраженную реакцию, чем при введении раствора в объеме 1,5 мл/кг. В противном случае животное исключают из опыта.

Число введений испытуемого ЛС и способ оценки результатов в схемах проведения испытаний по двум вариантам методики также различаются. По Варианту 1 препарат вводят однократно, а по Варианту 2 — дважды в каждом цикле.

По Варианту 2 оценку результата проводят при сопоставлении средних значений величин АД, полученных из всех введений испытуемого препарата и средних значений снижения АД на введение раствора гистамина в дозе 1 мл/кг. Средняя величина снижения АД на препарат не должна превышать среднее значение снижения АД на раствор гистамина.

В то же время при испытании ЛС по Варианту 1 для заключения о пригодности препарата достаточно одного условия: снижение АД животного в ответ на введение испытуемого препарата не должно быть больше, чем на введение раствора гистамина с концентрацией 0,5 мкг/мл.

Еще одним существенным отличием двух вариантов методики является скорость введения препарата и раствора сравнения. В Варианте 1 указана конкретная величина, равная 0,1 мл/с, в то время как в Варианте 2 скорость введения не регламентирована.

Следует также указать на большие различия в рекомендуемых объемах при испытании одной се-

рии ЛС двумя вариантами методики. Например, согласно Варианту 1 кошка массой 3 кг получит около 2,4 мл раствора сравнения, а по Варианту 2 то же животное получит примерно 30 мл того же раствора, что составляет около 14% от общего объема крови.

Объем вводимых растворов испытуемого препарата также будет значительно больше по схеме Варианта 2. Не исключено, что при испытании одного и того же препарата в разных условиях есть вероятность получить не совсем одинаковую реакцию ССС в результате гиповолемии. Следует подчеркнуть, что и в медицинской литературе гиповолемии уделяется большое внимание, в особенности последствиям избыточного введения инфузионных растворов и даже физиологического раствора во время операции [5, 6].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведено сравнение двух вариантов метода определения депрессорных веществ в ЛС, выполняемого на кошках. Рассмотрены разные подходы к оценке качества испытуемых ЛС по данному показателю. В каждом из вариантов метода выделены основные факторы, влияющие на качество проведения испытания и достоверность получаемых результатов. В Варианте 1 главными стабилизирующими факторами являются постоянная скорость введения растворов и воспроизводимая на протяжении эксперимента дозозависимая реакция животного на введение больших и малых доз раствора сравнения. В Варианте 2 основным фактором, позволяющим определять правильность проведения испытания, является циклическая схема введения испытуемого препарата и раствора сравнения. Схема введения испытуемого препарата, чередуемая многократным введением малых и больших доз раствора сравнения, позволяет определить, насколько адекватно реагирует животное на введенные растворы, и дать оценку качеству препарата. Несмотря на разные подходы к проведению испытаний, вышеперечисленные факторы дают возможность в каждом варианте получать результаты с высокой степенью достоверности. Включение Варианта 2 в ОФС.1.2.4.0008.18, а в дальнейшем включение аналогичной общей статьи в Фармакопею ЕАЭС и в Государственную фармакопею Российской Федерации XV изд. позволит подбирать наиболее подходящую методику для определения депрессорных примесей в испытуемом ЛС. Если, например, в нормативном документе на ЛС указано, что испытуемые растворы вводят животному в небольших объемах (в основном в пределах 0,2–0,5 мл/кг), то для тестирования ЛС наиболее подходящим будет Вариант 1, а для препаратов с указанными большими объемами введения — Вариант 2. Так, согласно требованиям нормативных документов

на высоко- и низкомолекулярные гепарины, их растворы вводят в объеме 1 мл/кг массы животного, следовательно, в данном случае более приемлемым будет Вариант 2. Кроме того, наличие в ОФС «Испытание на депрессорные вещества» двух методик даст возможность в случае необходимости проводить испытание с привлечением обоих вариантов, тем самым повышая уровень качества лекарственных средств.

**Вклад авторов.** *Т. А. Батуашвили* — сбор и анализ источников литературы по вопросам возможного появления нежелательных примесей, обладающих депрессорным действием, в лекарственных средствах природного происхождения, систематизация таких примесей по их природе, свойствам и строению; *Л. В. Симутенко* — сравнительный анализ двух вариантов метода определения депрессорных веществ в лекарственных средствах *in vivo* на кошках и разработка рекомендаций по применению данных вариантов метода; *Н. П. Неугодова* — идея, консультация, утверждение окончательного варианта статьи для публикации; *П. В. Шадрин* — участие в сборе и анализе данных, в написании, редактировании и оформлении текста.

**Authors' contributions.** *Tamara A. Batuashvili*—compilation and analysis of literature data on potential presence of undesi-

table depressor substances in medicinal products of natural origin, systematisation of these impurities by their nature, properties and structure; *Ludmila V. Simutenko*—comparative analysis of the two variants of the *in vivo* test method that uses cats for determination of depressor substances in medicinal products and development of recommendations for the use of these test variants; *Natalia P. Neugodova*—elaboration of the study idea, providing consultation to other authors, approval of the final version of the paper for publication; *Pavel V. Shadrin*—participation in the compilation and analysis of data, writing, editing and formatting the text.

**Благодарности.** Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00003-20-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР АААА-А18-118021590049-0).

**Acknowledgements.** The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00003-20-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. АААА-А18-118021590049-0).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

#### ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Тарасова ИВ. Медиаторы аллергических реакций. *Аллергология и иммунология в педиатрии*. 2010;(4):27–32. [Tarasova IV. Mediators of allergic reactions. *Allergologiya i immunologiya v pediatrii = Allergology and Immunology in Pediatrics*. 2010;(4):27–32 (In Russ.)]
2. Емельянов АВ. Клиническое применение H1-антигистаминных препаратов. *Медицинский совет*. 2016;(4):74–81. [Emelyanov AV. Clinical use of H1-antihistamines. *Meditinskiy sovet = Medical Council*. 2016;(4):74–81 (In Russ.)] <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2016-4-74-81>
3. Яровая ГА, Нешкова АЕ. Калликреин-кининовая система. Прошлое и настоящее. *Биоорганическая химия*. 2015;41(3):275–91. [Yarovaya GA, Neshkova EA. Kallikrein-Kinin System. Long history and present. *Bioorganicheskaya khimiya = Bioorganic Chemistry*. 2015;41(3):275–91 (In Russ.)] <https://doi.org/10.7868/S0132342315030112>
4. Меркулова ЮВ, Чайка ЛА, Белякова ЕС. Актуальность контроля качества лекарственных средств по показателю «Депрессорные вещества». Обобщающий анализ результатов испытания. *Фармаком*. 2016;(4):44–8. [Merkulova YuV, Chayka LA, Belyakova ES. Relevance of quality control of drugs in terms of "Depressor substances". Generalizing analysis of tests. *Farmakom = Farmacom*. 2016;(4):44–8 (In Russ.)]
5. Александрович ЮС, Воронцова НЮ, Гребенников ВА, Диордиев АВ, Жирнова ЮВ, Кочкин ВС и др. Рекомендации по проведению инфузионно-трансфузионной терапии у детей во время хирургических операций. *Вестник анестезиологии и реаниматологии*. 2018;15(2):68–84. [Aleksandrovich YuS, Vorontsova NYu, Grebennikov VA, Diordiev AV, Zhirkova YuV, Kochkin VS, et al. Recommendations on infusion-transfusion therapy in children undergoing surgery. *Vestnik anesteziologii i reanimatologii = Messenger of Anesthesiology and Resuscitation*. 2018;15(2):68–84 (In Russ.)] <https://doi.org/10.21292/2078-5658-2018-15-2-68-84>
6. Йовенко ИА, Царев АВ, Кузьмова ЕА, Мынка ВЮ, Селезнева УВ. Клиническая физиология и клиническая фармакология современной инфузионной терапии циркуляторного шока (обзор литературы). *Медицина неотложных состояний*. 2018;(5):52–65. [Yovenko IA, Tsarev AV, Kuz'mova EA, Mynka VYu, Selezneva UV. Clinical physiology and clinical pharmacology of modern fluid therapy of circulatory shock (literature review). *Meditina neotlozhnykh sostoyaniy = Emergency Medicine*. 2018;(5):52–65 (In Russ.)]

#### ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

**Батуашвили Тамара Ариеловна**, канд. биол. наук. *Tamara A. Batuashvili*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-2656-8131>  
**Симутенко Людмила Васильевна**, канд. биол. наук. *Ludmila V. Simutenko*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-2373-8756>  
**Неугодова Наталья Петровна**, канд. биол. наук. *Natalia P. Neugodova*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-8615-952X>  
**Шадрин Павел Валерьевич**. *Pavel V. Shadrin*. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-7143-8227>

Статья поступила 14.02.2020  
После доработки 19.05.2020  
Принята к печати 28.05.2020

Article was received 14 February 2020  
Revised 19 May 2020  
Accepted for publication 28 May 2020



РегЛек – ЕАЭС

6–14 июля 2020 г.

Онлайн-формат

Научно-практическая конференция  
**«ЭКСПЕРТИЗА И РЕГИСТРАЦИЯ  
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ  
В ЕВРАЗИЙСКОМ ЭКОНОМИЧЕСКОМ СОЮЗЕ»  
«РегЛек – ЕАЭС 2020»**

В конференции примут участие ведущие эксперты и представители регуляторных органов стран ЕАЭС (Российская Федерация, Республика Беларусь, Республика Казахстан и др.), сотрудники зарубежных и российских фармацевтических компаний производителей и поставщиков лекарственных средств.

**Основные темы конференции:**

- ✚ Особенности организации проведения регуляторных процедур по правилам ЕАЭС в странах союза. Организация информационного обмена;
- ✚ Очистка промышленных линий по производству ЛС и пределы воздействия на здоровье;
- ✚ Экспертиза материалов регистрационного досье в части оценки качества по процедурам ЕАЭС;
- ✚ Особая продукция – особая регистрация;
- ✚ Инспектирование в ЕАЭС: кого, когда, зачем и как;
- ✚ Место инновационных (гибридных) ЛП в системе регистрации ЕАЭС;
- ✚ Экспертные требования к оценке соотношения ожидаемой пользы к возможным рискам применения препаратов: критический взгляд на анализируемые досье;
- ✚ Надлежащая регуляторная практика ЕАЭС;
- ✚ Формирование и использование информации о лекарственных препаратах: что нужно знать фармпроизводителю;
- ✚ Актуальные вопросы экспертизы и регистрации лекарственных средств;
- ✚ Выпуск в гражданский оборот ЛП: система заработала, есть ли проблемы;
- ✚ Актуальное состояние применения правил и требований ЕАЭС при подаче электронного общего технического документа;
- ✚ Различные подходы к маркировке ЛП на этапе технологического процесса;
- ✚ Другие актуальные вопросы в сфере экспертизы лекарственных средств.

Программа конференции и заявка на участие на сайте [www.fru.ru](http://www.fru.ru)



**Подписку на журнал можно оформить  
в любом отделении «Почты России».**

Подписной индекс издания:  
в каталоге Агентства «Роспечать»

**«Издания органов научно-технической  
информации» — 57942**

С любого номера  
в региональных агентствах подписки:

**Урал-Пресс ([www.ural-press.ru](http://www.ural-press.ru)) — 57942**

По объединенному каталогу

**«Пресса России» ([www.pressa-rf.ru](http://www.pressa-rf.ru)) — T57942**

