

Volume 11, No. 3 2021

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

Том 11, № 3 2021

Журнал индексируется в российских и международных реферативных и индексных базах данных: Chemical Abstracts (CAS), Embase, 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 рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук

Пятилетний импакт-фактор РИНЦ – 0,394.

К публикации принимаются статьи, подготовленные в соответствии с правилами для авторов, размещенными на сайте журнала 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 ссылки на журнал 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 В. В. Косенко

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:

- Фармацевтическая химия, фармакогнозия, Технология получения лекарств;
- Фармакология, клиническая фармакология;
- Акушерство и гинекология, Эндокринология, Кардиология, Психиатрия, Инфекционные болезни, Нервные болезни, Онкология, Ревматология, Гастроэнтерология.

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

Косенко Валентина Владимировна, канд. фарм. наук, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

ОТВЕТСТВЕННЫЙ СЕКРЕТАРЬ

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

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Астапенко Елена Михайловна, канд. техн. наук, Минздрав России (Москва, Россия)

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

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

Гейн Владимир Леонидович, д-р хим. наук, проф., ПГФА (Пермь, Россия)

Глаголев Сергей Владимирович, Минздрав России (Москва, Россия)

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

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

Дмитриев Виктор Александрович, канд. мед. наук, Ассоциация российских фармацевтических производителей (Москва, Россия)

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

Егорова Светлана Николаевна, д-р фарм. наук, проф., Казанский ГМУ (Казань, Россия)

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

Кайтель Сюзан, Ph.D., EDQM (Страсбург, Франция)

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

Коваленко Сергей Николаевич, д-р хим. наук, проф., ХНУ им. В. Н. Каразина (Харьков, Украина)

Кузьмина Наталья Евгеньевна, д-р хим. 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)

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

Покровский Михаил Владимирович, д-р мед. наук, проф., БелГУ (Белгород, Россия)

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

Ремезова Ирина Петровна, д-р фарм. наук, проф., ПМФИ (Пятигорск, Россия)

Рождественский Дмитрий Анатольевич, канд. мед. наук, Департамент технического регулирования и аккредитации ЕЭК (Москва, Россия)

Самылина Ирина Александровна, член-корр. РАН, д-р фарм. наук, проф., Первый МГМУ им. И. М. Сеченова (Москва, Россия)

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

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

Тулегенова Ардак Уринбасаровна, д-р фарм. наук, проф., Фармакопейный комитет ЕАЭС (Москва, Россия)

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

РЕДАКЦИЯ

Федотова Ольга Федоровна, шеф-редактор, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

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)

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)

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 analytical test methods, approaches to medicines' quality evaluation, including approaches to assessment of interchangeability. The journal discusses new high-technology methods used in preclinical and clinical studies, current pharmacology and clinical medicine issues, rational use of drugs based on personalised medicine principles.

The journal publishes original research articles, reviews, brief communications, and methodological approaches pertaining to pharmaceutical and medical sciences and following specialist fields:

- pharmaceutical chemistry and pharmacognosy, formulation of medicines;
- pharmacology, clinical pharmacology;
- obstetrics and gynaecology, endocrinology, cardiology, psychiatry, infectious diseases, nervous diseases, oncology, rheumatology, gastroenterology.

EDITOR-IN-CHIEF

Valentina V. Kosenko, Cand. Sci. (Pharm.), Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

EXECUTIVE EDITOR

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

EDITORIAL BOARD

Elena M. Astapenko, Cand. Sci. (Tech.), Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow, Russia)

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

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

Vladimir L. Gein, Dr. Sci. (Chem.), Prof., Perm State Pharmaceutical Academy (Perm, Russia)

Sergey V. Glagolev, Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow, Russia)

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

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

Victor A. Dmitriev, Cand. Sci. (Med.), Association of the Russian Pharmaceutical Manufacturers (Moscow, Russia)

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

Svetlana N. Egorova, Dr. Sci. (Pharm.), Prof., Kazan State Medical University (Kazan, Russia)

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

Susanne Keitel, Ph.D., EDQM (Strasbourg, France)

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

Sergey N. Kovalenko, Dr. Sci. (Chem.), Prof., V. N. Karazin Kharkiv National University (Kharkiv, Ukraine)

Natalia E. Kuz'mina, Dr. Sci. (Chem.), Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Marina N. Makarova, Dr. Sci. (Med.), Scientific-Production Association 'HOME OF PHARMACY' (Leningrad Region, Russia)

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

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

Mikhail V. Pokrovsky, Dr. Sci. (Med.), Prof., Belgorod State University (Belgorod, Russia)

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

Irina P. Remezova, Dr. Sci. (Pharm.), Prof., Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute (Pyatigorsk, Russia)

Dmitry A. Rozhdestvensky, Cand. Sci. (Med.), Department of Technical Regulation and Accreditation of the Eurasian Economic Commission (Moscow, Russia)

Irina A. Samylina, Corr. Member of RAS, Dr. Sci. (Pharm.), Prof., Sechenov First Moscow State Medical University (Moscow, Russia)

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

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

Ardak U. Tulegenova, Dr. Sci. (Pharm.), Prof., Pharmacopoeial Committee of the Eurasian Economic Union

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

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

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

EDITORIAL STAFF

Olga F. Fedotova, Managing Editor, 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)

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

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

ВЕДОМОСТИ НАУЧНОГО ЦЕНТРА ЭКСПЕРТИЗЫ СРЕДСТВ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

СОДЕРЖАНИЕ

Том 11, № 3 2021

ОБЗОРЫ

Высокотехнологические лекарственные препараты на основе онколитических вирусов
(часть 1: разработка и регистрация в КНР) 148
Е. В. Мельникова, О. А. Рачинская, В. А. Меркулов

Экспериментальные модели клеточных линий для скрининга нефротоксичности 160
И. А. Мазеркина, В. А. Евтеев, А. Б. Прокофьев, О. В. Муслимова, Е. Ю. Демченкова

Выбор конечных точек для клинических исследований офтальмологических препаратов 167
М. О. Комарова

Анализ витамина А в поливитаминных препаратах 174
А. С. Алексеева, Т. Б. Шемерянкина, М. Н. Лякина, М. С. Смирнова,
Е. П. Федорова, С. Д. Кахраманова

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Анализ фолиевой кислоты в поливитаминных препаратах методом обращенно-фазовой ВЭЖХ. 185
А. С. Алексеева, М. В. Гаврилин, Т. Б. Шемерянкина, М. С. Смирнова, Е. П. Федорова,
Т. М. Каргина, О. О. Новиков, С. А. Ковалева, Н. Н. Бойко

Определение критических фаз экспериментальной части научно-исследовательской работы
с использованием лабораторных животных: анализ рисков 193
С. В. Ходько, М. Н. Макарова, В. Г. Макаров, С. С. Салынов, Н. В. Родионова

МЕТОДИЧЕСКИЕ МАТЕРИАЛЫ

Планирование программы клинических исследований препаратов
для лечения аксиального спондилоартрита 202
Д. В. Горячев

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 агентства «Урал-Пресс» — 57942.

Тираж 100 экз. Цена свободная.

Издатель ООО «НЭИКОН ИСП»: 115114, Москва, ул. Летниковская, д. 4, стр. 5

ООО «БЕАН»: 603003, Нижний Новгород, ул. Баррикад, д. 1, корп. 5

Подписано в печать: 29.09.2021 г.

<https://www.vedomostinccsmp.ru>, e-mail: vedomosti@expmed.ru

VEDOMOSTI NAUCHNOGO TSENTRA EKSPERTIZY SREDSTV MEDITSINSKOGO PRIMENENIYA

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

CONTENTS

Volume 11, No. 3 2021

REVIEWS

Advanced Therapy Medicines Based on Oncolytic Viruses (Part I: Development and Authorisation of Products in China) 148
E. V. Melnikova, O. A. Rachinskaya, V. A. Merkulov

Experimental Cell Line Models for Nephrotoxicity Screening 160
I. A. Mazerkina, V. A. Evteev, A. B. Prokofiev, O. V. Muslimova, E. Yu. Demchenkova

Selection of Endpoints for Clinical Studies of Ophthalmic Drugs 167
M. O. Komarova

Analysis of Vitamin A in Multivitamin Products 174
A. S. Alekseeva, T. B. Shemeryankina, M. N. Lyakina, M. S. Smirnova, E. P. Fedorova, S. D. Kakhramanova

ORIGINAL ARTICLES

Determination of Folic Acid in Multivitamin Preparations by Reversed Phase HPLC 185
A. S. Alekseeva, M. V. Gavrilin, T. B. Shemeryankina, M. S. Smirnova, E. P. Fedorova,
T. M. Kargina, O. O. Novikov, S. A. Kovaleva, N. N. Boyko

Determination of the Critical Phases of the Experimental Research Using Laboratory Animals: Risk Analysis 193
S. V. Khodko, M. N. Makarova, V. G. Makarov, S. S. Salynov, N. V. Rodionova

METHODICAL APPROACHES

Planning a Clinical Trial Programme for Medicinal Products for the Treatment of Axial Spondyloarthritis 202
D. V. Goryachev

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 codes are provided in the catalogues of Pressa Rossii—T57942 and Ural-Press agency—57942.
Print run: 100 copies. Free price

Publisher NEICON ISP LLC: 4/5 Letnikovskaya St., Moscow 115114
Printing office BEAN: 1/5 Barricad St., Nizhny Novgorod 603003

Passed for printing: 29 September 2021

<https://www.vedomostincesmp.ru>, e-mail: vedomosti@expmed.ru

Высокотехнологические лекарственные препараты на основе онколитических вирусов (часть 1: разработка и регистрация в КНР)

Е. В. Мельникова*, О. А. Рачинская, В. А. Меркулов

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. Одним из перспективных направлений при поиске инновационных препаратов для лечения онкологических заболеваний является применение онколитических (природных или генетически модифицированных) вирусов (ОЛВ) для избирательного действия на опухолевые клетки и их уничтожения, особенно в составе комбинированной терапии. В настоящее время официально разрешены к медицинскому применению три препарата на основе ОЛВ: два в Китайской Народной Республике (КНР) и один в США и Европейском союзе. Цель работы — анализ материалов, касающихся особенностей разработки препаратов на основе онколитических вирусов, проведения доклинических и клинических исследований, а также их регистрации в КНР. Был проведен анализ данных, представленных в свободном доступе на сайтах производителей препаратов, в публичных докладах и нормативной документации регуляторных органов КНР, в международных реестрах клинических исследований и научных публикациях. Препараты Gendicine® (SiBiono GeneTech Co., LTD) и Oncorine® (Shanghai Sunway Biotech Co., LTD) разрабатывались и были разрешены в КНР для использования в клинической практике в составе комбинированной терапии. Отмечена значительная продолжительность разработки препаратов (до момента начала регистрационных процедур препарат Gendicine® изучался в течение 14 лет), сложность дизайна доклинических исследований и возможность применения препаратов для нескольких нозологий с различной локализацией опухолей. Выявленные особенности разработки и регистрации в КНР препаратов на основе онколитических вирусов могут быть использованы в регуляторной практике Российской Федерации.

Ключевые слова: терапия онкологических заболеваний; онколитические вирусы; генетические модификации; доклинические исследования; клинические исследования; регистрация препаратов

Для цитирования: Мельникова ЕВ, Рачинская ОА, Меркулов ВА. Высокотехнологические лекарственные препараты на основе онколитических вирусов (часть 1: разработка и регистрация в КНР). *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2021;11(3):148–159. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2021-11-148-159>

* **Контактное лицо:** Мельникова Екатерина Валерьевна; MelnikovaEV@expmed.ru

Advanced Therapy Medicines Based on Oncolytic Viruses (Part I: Development and Authorisation of Products in China)

E. V. Melnikova*, O. A. Rachinskaya, V. A. Merkulov

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

Abstract. One of the promising areas in the development of innovative products for the treatment of cancer is the use of oncolytic (native or genetically modified) viruses (OLVs) for selective targeting of tumour cells and their destruction, especially as part of combination therapy. At present, there are three OLV-based products approved for medical use (two in China and one in the USA and EU). The aim of the study was to analyse data on specific aspects of OLV-based products' development, preclinical and clinical research, and authorisation process in China. The authors analysed data freely available on the manufacturers' websites, in public reports and documents of the Chinese regulatory authorities, in international clinical trial registries, and scientific publications. The products Gendicine® (SiBiono GeneTech Co., Ltd.) and Oncorine® (Shanghai Sunway Biotech Co., Ltd.) were originally developed and approved in China for clinical use as part of combination therapy. The analysis demonstrated long product development periods (Gendicine had been studied for 14 years before the start of the authorisation procedures), complex preclinical trial designs, and potential use of the products for several medical conditions with different tumour localisation. The identified specific aspects of OVL-based products' development and authorisation in China could be taken into account in the regulatory practice of the Russian Federation.

Key words: cancer therapy; oncolytic viruses; genetic modifications; preclinical trials; clinical trials; marketing authorisation

For citation: Melnikova EV, Rachinskaya OA, Merkulov VA. Advanced therapy medicines based on oncolytic viruses (part I: development and authorisation of products in China). *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya* = *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2021;11(3):148–159. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2021-11-148-159>

* **Corresponding author:** Ekaterina V. Melnikova; MelnikovaEV@expmed.ru

Онкологические заболевания являются одной из основных причин высокой смертности населения в мире, которая в 2020 г. по данным Всемирной организации здравоохранения составила почти 10 млн человек, общее количество диагностированных в мире новых случаев — почти 20 млн, из них 3% (543 045 случаев) выявлены в России. В мире самые высокие показатели заболеваемости характерны для рака молочной железы, легких, а также толстой и прямой кишки, а наибольшие показатели смертности (более 80% от выявленных случаев) — для рака поджелудочной железы, печени, пищевода, легких и мозга¹.

Постоянный поиск новых подходов и методов для создания эффективных противоопухолевых препаратов связан с наличием различных механизмов адаптации опухолевых клеток (например, появление резистентности к химиотерапевтическим лекарственным препаратам и «ускользание» от иммунного ответа, в том числе вследствие появления новых опухолевых клонов, синтеза опухолью иммуносупрессивных и блокирующих факторов). В свою очередь, внедрение таких инновационных препаратов в практическое здравоохранение требует осуществления индивидуального подхода при экспертной оценке результатов их разработки, доклинических и клинических исследований (ДКИ и КИ соответственно) в ходе государственной регистрации.

Изучение применения онколитических вирусов (ОЛВ) в терапии онкологических заболеваний является одним из передовых направлений в онкологии, получившим распространение в последние 20 лет. В настоящее время препараты на основе ОЛВ различных семейств, обладающие способностью избирательно инфицировать и уничтожать опухолевые клетки, изменять иммуносупрессивное микроокружение опухоли и стимулировать системный противоопухолевый ответ, находятся на стадии ДКИ и КИ в ряде стран [1–8]. Терапия ОЛВ имеет ряд преимуществ перед современными противоопухолевыми методами лечения:

- ОЛВ могут избирательно реплицироваться в опухолевых клетках, не затрагивая здоровые клетки, и/или нести чужеродные гены (терапевтические и иммуностимулирующие гены) для специфической экспрессии в опухолевых клетках [9–10];
- некоторые ОЛВ могут преодолевать гематоэнцефалический барьер для уничтожения опухолевых клеток в мозге, например реовирус [7] и парвовирус Н-1 (Н-1РV) [11, 12];
- ОЛВ могут повысить чувствительность устойчивых к другим видам иммунотерапии опухолевых клеток [13].

С целью улучшения основных характеристик препаратов на основе ОЛВ — селективности, эффективности и безопасности онколитические вирусы подвергают генетической модификации [8, 14–23] (рис. 1).

В соответствии с нормативной документацией зарубежных регуляторных органов, касающейся разработки препаратов на основе ОЛВ, несущих чужеродные гены, противоопухолевое действие которых опосредуется путем их транскрипции/трансляции в организме хозяина, генетически модифицированные ОЛВ могут быть классифицированы как продукты генной терапии и должны соответствовать требованиям руководств Управления по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных средств (Food and Drug Administration, FDA) и рекомендаций Европейского агентства по лекарственным средствам (European Medicines Agency, EMA) для генной терапии².

Особенностями исследований при разработке препаратов на основе ОЛВ являются: определение селективности ОЛВ, идентификация возможных молекулярных вариантов вируса и демонстрация генетической стабильности. Для проведения ДКИ могут быть использованы иммунодефицитные, сингенные, гуманизированные животные, а также животные с ксенотрансплантированными опухолями. Основные требования к моделям животных для проведения ДКИ препаратов на основе ОЛВ включают:

- вид животного должен быть восприимчив к вирусной инфекции и репликации ОЛВ;
- используемые модели должны позволять выявить все аспекты иммунного ответа на введение ОЛВ, максимально моделируя иммунный ответ на ОЛВ у человека;
- в случае генетической модификации ОЛВ модель животного должна быть чувствительна к экспрессируемому трансгену.

При невозможности создания одной модели, учитывающей все требования, целесообразно проведение ДКИ на двух или нескольких моделях животных (в том числе разных видов).

Дизайн ДКИ препаратов на основе ОЛВ должен включать следующие исследования: фармакологические (биологическая активность, потенциальный механизм действия, определение диапазона доз, путей и графика введения препарата для начала КИ), биораспределение, исследования по выделению вируса в окружающую среду с биологическим материалом, токсикологические исследования (острая, хроническая токсичность, обратимость токсических

¹ Global Cancer Observatory: Cancer Today. International Agency for Research on Cancer. <https://gco.iarc.fr/today/home>

² Guidance for industry. Design and analysis of shedding studies for virus or bacteria-based gene therapy and oncolytic products. FDA; 2015. ICH Considerations. Oncolytic viruses. EMEA/CHMP/ICH/607698/2008.

ICH Considerations. General principles to address virus and vector shedding. EMEA/CHMP/ICH/449035/2009.

ICH Considerations. General principles to address the risk of inadvertent germline integration of gene therapy vectors. CHMP/ICH/469991/2006.

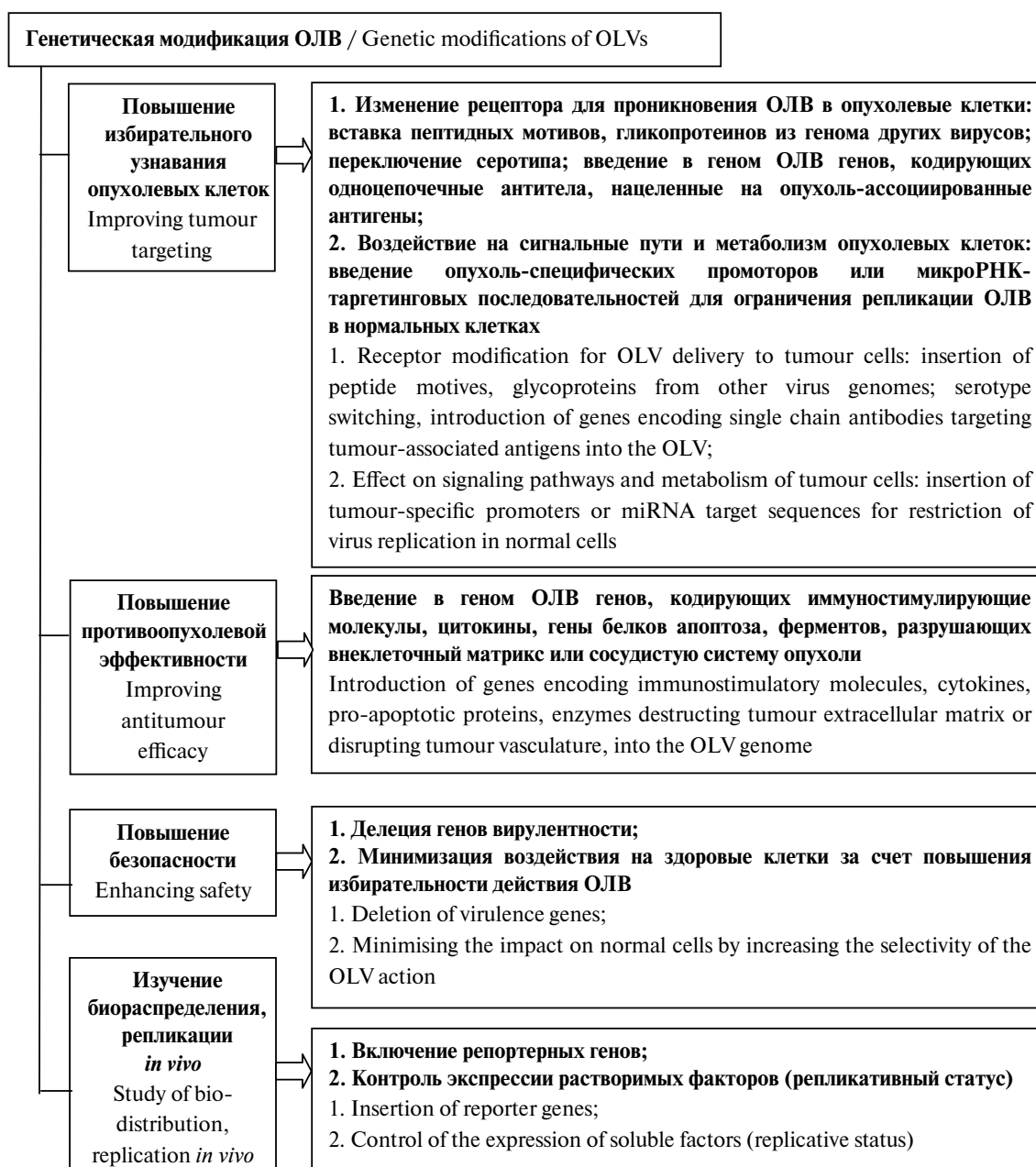


Рис. 1. Цели генетической модификации онколитических вирусов (ОЛВ) для иммунотерапии онкологических заболеваний
Fig. 1. Aims of genetic modification of oncolytic viruses (OLVs) for immunotherapy of oncological diseases

реакций, инсерционный мутагенез, зависимость токсических реакций от дозы)³.

В пилотных КИ препаратов на основе ОЛВ часто для определения подходящего пути введения используется стратегия поэтапного подхода, начиная с внутриопухолевого введения, переходя к местному и затем к системному введению. Учитывая возможность репликации ОЛВ в нецелых клетках, необходимо предусмотреть возможность противовирусной терапии для контроля

репликации ОЛВ. Наряду с традиционными фармакокинетическими и фармакодинамическими исследованиями и исследованиями биологической активности необходимо контролировать иммунные реакции организма пациентов, направленные как против самого ОЛВ, так и против трансгена в случае генетической модификации вируса. Особое внимание необходимо уделить исследованиям биобезопасности в плане выделения вируса в окружающую среду и возможности его передачи

³ Guidance for industry. Design and analysis of shedding studies for virus or bacteria-based gene therapy and oncolytic products. FDA; 2015. ICH Considerations. Oncolytic viruses. EMEA/CHMP/ICH/607698/2008.

другим людям (медицинскому персоналу, родственникам и т. д.)⁴.

Цель работы — анализ материалов, касающихся особенностей разработки препаратов на основе онколитических вирусов, проведения доклинических и клинических исследований, а также их регистрации в КНР.

Был проведен анализ данных, представленных в свободном доступе на сайтах производителей препаратов, в публичных докладах и нормативной документации регуляторных органов КНР, в международных реестрах клинических исследований и научных публикациях.

В настоящее время официально разрешены к медицинскому применению три препарата на основе ОЛВ: Gendicine® (SiBiono GeneTech Co., LTD) и Oncorine® (Shanghai Sunway Biotech Co., LTD) в КНР и IMLYGIC® (BioVex Inc. — Amgen, Inc.) в США и Европейском союзе. Еще один препарат для лечения меланомы RIGVIR® (LLC «Latima») на основе энтеровируса с 2004 до весны 2019 г. был разрешен к применению в Латвии, Армении и Грузии [24]. Однако в мае 2019 г. Государственное агентство по лекарственным средствам Латвии приостановило действие регистрационного удостоверения в связи с выявленным несоответствием качества препарата, а также отсутствием продления государственной регистрации со стороны компании-разработчика⁵.

Одним из первых коммерческих продуктов генной терапии на основе онколитического вируса для применения в онкологии в мире стал Gendicine®, разработанный SiBiono GeneTech Co., LTD и одобренный регуляторными органами КНР в 2003 г. для лечения злокачественных новообразований головы и шеи с мутациями гена *p53* в сочетании с химиотерапией или лучевой терапией.

Препарат Gendicine® представляет собой репликационно-дефектный аденовирус 5-го серотипа, который содержит последовательность гена белка *p53* человека, являющегося одним из основных онкосупрессоров в нормальных клетках. Разработка и исследования препарата велись с 1989 г.⁶ [25]. Для производства препарата были получены клетки-продуценты линии SBN-cel, произошедшие из HEK 293 (human embryonic kidney 293, клетки почки эмбриона человека), обладающие хорошей адгезивной способностью, однородностью морфологии клеток, высокой скоростью роста (время удвоения культуры примерно на 18 ч меньше, чем у исходной линии HEK 293), а также высоким выходом вирусных частиц [25].

В соответствии с порядком разработки препаратов и регистрационной процедуры КНР препарат

в течение 7 лет (с 1998 до конца 2004 г.) прошел следующие этапы: проведение КИ начальной фазы, КИ II—III фаз, рассмотрение заявки на применение нового препарата и затем лицензирование производства и контроль качества образцов трех серий, сертификация производства по правилам надлежащей производственной практики (GMP). В КНР существуют два этапа сертификации производства на соответствие условиям GMP: на первом этапе сертификат выдается со сроком действия 1 год, после которого подается новая заявка и оформляется сертификат на 5 лет. Производство Gendicine® регламентируется 1100 стандартными операционными процедурами [25, 26].

Материал, представленный в заявке на проведение КИ I фазы, включал более 17 томов объемом около 1000 страниц (более 1200 страниц при переводе на английский язык) и рассматривался комиссией экспертов, состоящей из 39 экспертов (10 из которых были членами Китайской академии наук).

Спецификация на конечный препарат содержит сведения о следующих показателях качества: описание (жидкость от светло-белого до прозрачного цвета), стерильность, бактериальные эндотоксины, микоплазма, чистота (родственная примесь — аденоассоциированный вирус; примеси, связанные с технологическим процессом — ДНК и белки клеток-продуцентов; бычий сывороточный альбумин), концентрация вирусных частиц в миллилитре (1×10^{12} ВЧ/мл), размер вирусных частиц (диаметр — 90 нм), способность к инфицированию (Plaque-Forming Unit, PFU), активность (уровень экспрессии гена *p53*), выявление векторов, способных к репликации [25, 27].

Опубликованные результаты ДКИ Gendicine® представлены в небольшом объеме и включают исследования, описанные в таблице 1. КИ препарата Gendicine®, на основании которых он был разрешен к медицинскому применению, включали исследования эффективности и безопасности терапии опухолей области головы и шеи при комбинированном применении препарата с традиционными подходами к терапии (хирургическое лечение, лучевая терапия и химиотерапия) [28–30]. По состоянию на 2018 г. в КИ приняли участие 2019 человек [27].

Результаты КИ представлены в таблице 2 и свидетельствуют о значительном вкладе Gendicine® в эффективность лечения онкологических заболеваний и пользе препарата в составе комбинированной терапии совместно с устоявшимися подходами к лечению.

⁴ Guidance for industry. Design and analysis of shedding studies for virus or bacteria-based gene therapy and oncolytic products. FDA; 2015.

ICH Considerations. Oncolytic viruses. EMEA/CHMP/ICH/607698/2008.

ICH Considerations. General principles to address virus and vector shedding. EMEA/CHMP/ICH/449035/2009.

ICH Considerations. General principles to address the risk of inadvertent germline integration of gene therapy vectors. CHMP/ICH/469991/2006.

⁵ State Agency of medicines Republic of Latvia. Rigvir marketing authorisation suspended; information for current patients. 2019. <https://www.zva.gov.lv/en/news-and-publications/news/rigvir-marketing-authorisation-suspended-information-current-patients>

⁶ Официальный сайт разработчика препарата Gendicine®. <http://www.sibiono.com/en/productinfo.aspx>

Таблица 1. Доклинические исследования препарата Gendicine® [25, 28]
Table 1. Preclinical studies of Gendicine® [25, 28]

Исследование Study	Дизайн Design	Результат Result
Генотоксичность Genotoxicity	- <i>In vitro</i>: выявление хромосомных aberrаций в клетках яичника китайского хомячка; - <i>In vivo</i>: микроядерный тест на клетках костного мозга мыши - <i>In vitro</i>: detection of chromosomal aberrations in Chinese hamster ovary cells; - <i>In vivo</i>: mouse bone marrow micronucleus test	- Gendicine® не способен встраиваться в геном инфицированной клетки; - Gendicine® не реплицируется в инфицированных клетках и не способен к заражению соседних клеток - Gendicine® is unable to integrate into the genome of an infected cell; - Gendicine® does not replicate in infected cells and is not capable of infecting neighbouring cells
Токсикологические исследования Toxicological studies	- Макаки-резусы: 12 особей были разделены на 2 группы, которые получили внутримышечные инъекции Gendicine® в течение 16 сут, превышающие в 7,5 раз и 75 раз рекомендованные для клинического применения дозы - Rhesus monkeys: 12 animals were divided into 2 groups, which received intramuscular injections of Gendicine® for 16 days at doses which were 7.5 times and 75 times higher than the dose recommended for clinical use	На 14 сут в сыворотке у всех обезьян обнаруживались нейтрализующие антитела к Gendicine®. Незначительные патологические изменения наблюдались в почках у 2 обезьян. С помощью ПЦР Gendicine® был обнаружен в тканях легких, печени и почек. Иммуногистохимический анализ выявлял экспрессированный белок p53 в тканях кишечника, легких, мочевом пузыре и почках (на 14 сут и через 3 недели после инъекций) After 14 days, neutralising antibodies to Gendicine® were detected in the serum of all the monkeys. Two monkeys had slight pathological changes in the kidneys. Gendicine® was detected by PCR in the lung, liver, and kidney tissue. The immunohistochemistry detected expressed p53 protein in the intestinal, lung, urinary bladder, and kidney tissues
Фармакокинетические исследования Pharmacokinetic studies	<i>In vivo</i>	Вирус проникал в опухолевые клетки в течение часа (при местном и системном введении). Экспрессия белка p53 начинала выявляться спустя 3 часа после инъекции, спустя 12 ч ее уровень возрастал до 47% от максимального значения, а 100% белка p53 определялось через 72 ч, после чего его количество снижалось и спустя 120 ч уже определялось только 30%. Однако белок p53 все еще обнаруживался через 14 сут после последней инъекции и полностью исчезал спустя 3 недели. При местном введении препарата наблюдалось преимущественно местное накопление в окружающих тканях с минимальным распространением в другие ткани и органы (The virus penetrated into the tumour cells within one hour (following local and systemic administration). The expression of the p53 protein was detectable 3 hours after the injection, amounted to 47% of the maximum level after 12 hours, and to 100% after 72 hours, after that it began to fall and reached 30% after 120 hours. However, the p53 protein was still detectable 14 days after the last injection and disappeared completely after 3 weeks. The local administration resulted in mainly local accumulation in the surrounding tissues with minimal spread to other tissues and organs)

Продолжение таблицы 1
Table 1 (continued)

Исследование Study	Дизайн Design	Результат Result
Активность Potency	<i>In vitro</i>: определение способности Gendicine® изменять ответ на гипертермию (в режимах нагревания до 42 °C/2 ч и 43 °C/0,5 ч) клеток двух опухолевых линий (BGC823-wtp53, содержащей белок p53 дикого типа, и BGC823-mutp53, содержащей мутантный белок p53) в ходе оценки термочувствительности клеток путем определения влияния Gendicine® на клеточный цикл; <i>In vivo</i>: мышам линии nude инокулировали клетки тех же двух линий подкожно в области бедра, после измерения их размер в группах, получавших Gendicine®, гипертермию отдельно, гипертермию совместно с Gendicine® и не получавшей ничего (контрольная группа). Рассчитывали коэффициент увеличения термочувствительности, равный отношению ответа опухоли на совместное применение Gendicine® и гипертермии к ответу опухоли на применение только гипертермии. Противоопухолевое действие — уменьшение размеров опухоли в экспериментальной группе <i>In vitro</i>: determination of Gendicine® ability to alter the response to hyperthermia (in heating modes up to 42 °C for 2 hours and up to 43 °C for 0.5 hours) of two human gastric cancer cell lines (BGC823-wtp53 containing wild-type p53 protein and BGC823-mutp53 containing mutant p53 protein) during assessment of thermal sensitivity of the cells by determining the effect of Gendicine® on the cell cycle; <i>In vivo</i>: cells of the above-mentioned cell lines were inoculated subcutaneously in the thigh of nude mice, after that the cell size was measured in the groups receiving Gendicine®, hyperthermia alone, hyperthermia in combination with Gendicine®, and no treatment (control group). The thermal sensitivity enhancement ratio was calculated as the ratio of the tumour response to the combination treatment with Gendicine® and hyperthermia to the tumour response to the hyperthermia alone. Antitumour effect—reduction of the tumour size in the experimental group	<i>In vitro</i>: Gendicine® увеличивал термочувствительность клеток обеих линий за счет останова клеточного цикла в G2-фазе и апоптоза, индуцированного нагреванием. <i>In vivo</i>: наблюдалась задержка роста опухолей при применении комбинированного подхода с использованием и Gendicine® и гипертермии по сравнению с применением каждого метода по отдельности. А коэффициенты увеличения термочувствительности составили 1,72 для опухолевых очагов, образовавшихся из клеток BGC823-wtp53, и 1,56 для опухолевых очагов, образовавшихся из клеток BGC823-mutp53. Таким образом, это исследование показало, что совместное применение Gendicine® и гипертермии является перспективным для применения его в клинических исследованиях и не зависит от наличия или отсутствия мутации белка p53 <i>In vitro</i>: Gendicine® increased the thermal sensitivity of both cell lines by arresting the cell cycle in the G2 phase, and heat-induced apoptosis. <i>In vivo</i>: delayed tumour growth in animals was observed with the combined approach using both Gendicine® and hyperthermia, compared with each method used alone. The thermal sensitivity enhancement ratio was 1.72 for tumours that developed from BGC823-wtp53 cells and 1.56 for tumours that developed from BGC823-mutp53 cells. Thus, this study demonstrated that the combination of Gendicine® and hyperthermia could be used in clinical trials, and that it did not depend on the presence of the p53 protein mutation

Примечание. ПЦР — полимеразная цепная реакция.
Note. PCR—polymerase chain reaction.

С момента регистрации и по настоящее время проводятся также и другие КИ по применению Gendicine® в комбинированном лечении других онкологических заболеваний: саркомы мягких тканей [33, 34], органов женской репродуктивной системы [35, 36], гепатоцеллюлярной карциномы печени [37–39], немелкоклеточного рака легкого [40].

Таким образом, среди особенностей разработки препарата Gendicine® необходимо отметить значительную ее продолжительность (до момента начала регистрационных процедур препарат изучался в течение 14 лет), а также применение препарата в составе комплексной терапии (химиотерапии или лучевой терапии).

В ноябре 2005 г. регуляторный орган КНР одобрил для коммерческого использования другой препарат на основе онколитического аденовируса — Oncorine® (также известный как H101) производства компании Shanghai Sunway Biotech Co., LTD. На фармацевтический рынок КНР Oncorine® вышел в 2006 г. Продукт был одобрен для совместного применения с химиотерапевтическими препаратами (цисплатином и 5-фторурацилом) для лечения тяжелых форм назофарингеальной карциномы.

Oncorine® — это препарат на основе аденовируса 5-го серотипа с deletированными E1 и E3 участками генома⁷ [41]. Механизм избирательного действия препарата обусловлен модификацией аденовируса (делециями E1 и E3) и основан на разрушении клеток опухоли, дефектных по гену p53. При попадании аденовируса в нормальные клетки с функционирующим геном p53 его размножение будет предотвращено действием фактора транскрипции p53 [42, 43].

Данные о ранней разработке, производстве, контроле качества препарата Oncorine® практически полностью отсутствуют в открытых источниках информации. Известно лишь, что производство Oncorine® соответствует стандартам GMP, о чем свидетельствует сертификат производства по GMP, полученный в 2014 г. (первая сертификация была проведена в 2006 г.).

Фармакодинамика и фармакокинетика (в том числе определение эффективной дозы) препарата изучались в ДКИ *in vivo* на мышах с ксенотрансплантированными опухолевыми клетками линий C33 A (клетки HPV-негативной карциномы шейки матки человека) и HT-29 (клетки аденокарциномы толстой кишки человека). Токсикологические исследования препарата Oncorine® проводились на морских свинках и мышах, которые подкожно получали препарат в дозах 5×10^{10} , 1×10^{11} и 2×10^{11} ВЧ/кг. Токсических проявлений со стороны сердечно-сосудистой, дыхательной и нервной систем выявлено не было. В исследованиях острой токсичности

на мышах LD₅₀ превышала 5×10^{12} ВЧ/кг. В токсикологических исследованиях на морских свинках при гистологическом исследовании были выявлены небольшие повреждения ультраструктур печени и легких при введении Oncorine® подкожно в дозах, превышающих 1×10^{11} ВЧ/кг [43].

В таблице 3 представлены результаты КИ препарата Oncorine®, проведенных в целях его регистрации.

В настоящее время в официальном реестре КИ Китая доступна информация о 9 зарегистрированных КИ препарата Oncorine® (H101), шесть из которых находятся на стадии набора пациентов, для трех — набора пока нет⁸. Целью трех из этих КИ (ChiCTR2000033959, ChiCTR1900025377, ChiCTR1800017971) является изучение эффективности совместного применения Oncorine® с иммунотерапией (в том числе с ингибиторами контрольных точек), целью КИ NCT03790059, NCT03780049, ChiCTR1900025112, ChiCTR-OPC-15006142, ChiCTR-OPN-15006746 — изучение совместного применения с химиотерапией и/или облучением.

Также имеются сообщения о применении в онкологической практике препарата Oncorine® (H101) в комбинации с трансартериальной хемоземболизацией (Transarterial Chemoembolization, TACE) для лечения гепатоцеллюлярной карциномы разной степени тяжести [47, 48], а также для лечения неоперабельной аденокарциномы поджелудочной железы в комбинации с гемцитабином [49].

Таким образом, особенностью клинической разработки препарата Oncorine® (КИ I, II фаз) является его исследование не только для пациентов с карциномой носоглотки (показание, для которого препарат разрешен к медицинскому применению), но и для лечения злокачественных новообразований различных локализаций (рак молочной железы, легкого, пищевода, желудка, колоректальный рак, меланома и другие). Необходимо отметить и тот факт, что разработка препарата Oncorine®, как и препарата Gendicine®, с самого начала проводилась только в составе комплексной терапии (химиотерапия и лучевая терапия).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ограниченная эффективность и безопасность противоопухолевых препаратов, резистентность к проводимому лечению диктуют необходимость поиска новых лекарственных препаратов, одним из направлений которого является использование способности избирательного инфицирования и уничтожения опухолевых клеток онколитическими вирусами. Большая часть проводимых в настоящее время КИ и основной опыт регистрации препаратов данной группы принадлежит КНР. Среди особенностей разработки препаратов на основе ОЛВ в Китае, проведения

⁷ Официальный сайт производителя Oncorine®. <http://www.sunwaybio.com.cn/en/product.html>

⁸ Chinese clinical trial registry. <https://www.chictr.org.cn/searchprojen.aspx>

Таблица 2. Клинические исследования Gendicine® в целях регистрации
Table 2. Clinical trials of Gendicine® supporting the marketing authorisation application

Тип КИ CT type	Описание Description	Результат Result	Источник Reference
КИ I фазы CT phase I	Оценивались эффективность и безопасность препарата у 12 пациентов с опухолью гортани (3 группы по 4 человека с дозами введения: 1×10^{10}, 1×10^{11} и 1×10^{12} ВЧ на инъекцию). Осу- ществлялось 2 курса внутриопухолевых инъекций: первый курс включал 5 инъекций через день, через 48 ч оперативное вмешательство, а далее второй курс по той же схеме The efficacy and safety of the product were evaluated in 12 patients with laryngeal cancer (3 groups of 4 patients each, received doses of: 1×10^{10}, 1×10^{11}, and 1×10^{12} VPs per injection). Two courses of intratumoural injections were carried out according to the following scheme: the first course included 5 injections on alternate days, and a surgical intervention 48 hours after the course, followed by a second course including the same number of injections and regime of administration	Иммуногистохимические исследования опухолей по- казали повышение экспрессии белка p53 в опухолевых клетках. Специфические антитела к аденовирусу опре- делялись на вторую или третью неделю после первой инъекции. У одного пациента было зафиксировано по- вышение температуры. В ходе трехлетнего наблюдения ни один пациент не заболел раком повторно, трехлетняя выживаемость составила 92% The immunohistochemical analysis of the tumours dem- onstrated an increase in the p53 protein expression in the tumour cells. Specific antibodies to the adenovirus were determined two or three weeks after the first injection. One patient had moderate fever. During the three-year follow- up period, none of the patients had recurrent cancer, the three-year survival rate was 92%	[30]
КИ II фазы, ран- домированное контролируемое CT phase II, randomised con- trolled	Оценивались эффективность совместного применения лучевой терапии с Gendicine® в срав- нении с эффективностью лучевой монотерапии для лечения плоскоклеточного рака области головы и шеи. 42 участника КИ были разделены на 2 группы: группа 1 (20 человек) полу- чали внутриопухолевые инъекции Gendicine® (в дозе 1×10^{12} ВЧ на инъекцию) раз в неделю в течение 8 недель, спустя 3 дня после инъекции пациенты получали лучевую терапию со- следующим режимом дозирования: 5 раз в неделю по 2 Гр до достижения суммарной дозы 70 Гр; группа 2 (22 человека), у которых проводили курс лучевой терапии без Gendicine®. Оценивали эффективность на 5 (точка 1) и 8 (точка 2) неделях, а также спустя 2 месяца по- сле окончания лечения (валидационная точка) с использованием методов КТ. Контрольные точки — суммарная доза облучения составляла 40 Гр (точка 1) и 70 Гр (точка 2) The efficacy of radiation therapy in combination with Gendicine® was evaluated in comparison with the efficacy of radiation monotherapy for the treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck. 42 subjects were divided into 2 groups: group 1 (20 patients) received intratu- moural injections of Gendicine® (at a dose of 1×10^{12} VPs per injection) once a week for 8 weeks, 3 days after each injection the patients received radiation therapy according to the following regimen: 2 Gy 5 times a week until the total dose of 70 Gy; group 2 (22 patients) did not receive Gendicine®. CT imaging was performed to assess efficacy at weeks 5 (point 1) and 8 (point 2), as well as 2 months after the end of the treatment (validation point). Control points: total radiation doses were 40 Gy (point 1) and 70 Gy (point 2)	Средние показатели уменьшения объема опухоли соста- вили 63 ± 17, 82 ± 18 и $90 \pm 16\%$ в моменты времени точки 1, точки 2 и валидационной точки соответственно ($p < 0,05$). Уровень полного ответа в группе 1 был в 1,68 раза выше, чем в группе 2 The average tumour volume reduction rates were $63 \pm 17\%$, $82 \pm 18\%$, and $90 \pm 16\%$ at time points 1, 2, and validation point, respectively ($p < 0.05$). The complete response level in group 1 was 1.68 times higher than in group 2	[28]

Продолжение таблицы 2
Table 2 (continued)

Тип КИ CT type	Описание Description	Результат Result	Источник Reference
КИ II фазы CT phase II	Сравнивалась эффективность применения лучевой терапии совместно с Gendicine® с эффективностью применения только лучевой терапии для лечения назофарингеальной карциномы. Пациенты (29 человек) были разделены на 2 группы: группа 1 (16 человек) получали внутритропхотелевые инъекции Gendicine® 1 раз в неделю в течение 8 недель, а на третий день после первой инъекции начинали лучевую терапию в суммарной дозе 60–70 Гр; группа 2 (13 человек) получали только лучевую терапию с таким же режимом. Для оценки изменения размера опухоли проводились КТ и МРТ исследования на 4, 8 и 12 неделях после терапии The efficacy of radiation therapy in combination with Gendicine® was compared with the efficacy of radiation monotherapy for the treatment of nasopharyngeal carcinoma. The subjects (29 patients) were divided into 2 groups: group 1 (16 patients) received intratumoural injections of Gendicine® once a week for 8 weeks, and on the third day after the first injection began receiving radiation therapy at a total dose of 60–70 Gy; group 2 (13 patients) received only radiation therapy according to the same regimen. To assess the change in the size of the tumour, CT and MRI studies were performed at weeks 4, 8, and 12 after the treatment	На 8 неделе уменьшение размеров опухолей на 94,9±10,2 % в группе 1, а в группе 2 — на 80,4±17,0 % ($p < 0,001$). К 12 неделе полный ответ составил 75 % в группе 1 и 15 % в группе 2 ($p < 0,001$). В трех случаях отмечен эпизод лихорадки. Других побочных эффектов отмечено не было At week 8 a decrease in the size of tumours by 94.9±10.2 % was observed in group 1, and by 80.4±17.0 % ($p < 0.001$) in group 2. By week 12, the complete response was 75 % in group 1 and 15% in group 2 ($p < 0.001$). Moderate fever was observed in three cases. No other adverse events were observed	[29]
Пострегистрационное КИ (ретроспективное) Postauthorisation CT (retrospective)	102 пациента с плоскоклеточным раком гипотарингеальной зоны были разделены на три группы: группа 1 (16 человек) получали только хирургическое лечение, группа 2 (44 человека) — хирургическое лечение, химиотерапию и лучевую терапию, группа 3 (42 человека) — хирургическое лечение, химиотерапию, лучевую терапию и курс Gendicine® 102 patients with hypopharyngeal squamous cell carcinoma were divided into three groups: group 1 (16 patients) received only surgical treatment, group 2 (44 patients) received surgical treatment, chemotherapy, and radiation therapy, group 3 (42 patients) received surgical treatment, chemotherapy, radiation therapy, and Gendicine®	Общая выживаемость по трем группам составила 43,8, 54,5 и 78,6% соответственно The overall survival rates for the three groups were 43.8%, 54.5%, and 78.6%, respectively	[31]
Пострегистрационное КИ Postauthorisation CT	Изучение эффективности использования Gendicine® вместе с химиотерапией для лечения рака полости рта Study of the efficacy of chemotherapy in combination with Gendicine® for the treatment of oral cancer	Эффективность для группы пациентов, получавших Gendicine® с химиотерапией, составила 82% The efficacy for the group of patients treated with Gendicine® in combination with chemotherapy was 82%	[32]

Примечание. КИ — клинические исследования; ВЧ — вирусные частицы; КТ — компьютерная томография; МРТ — магнитно-резонансная томография.
Note. CT—clinical trials; VPs—viral particles; CT—computed tomography; MRI—magnetic resonance imaging.

Таблица 3. Клинические исследования препарата Oncorine® в целях регистрации
Table 3. Clinical trials of Oncorine® supporting the marketing authorisation application

Тип КИ CT type	Описание Description	Результат Result	Источник Reference
КИ I фаза, не-мультитентруемое CT phase I, non-controlled	15 участников (5 пациентов с плоскоклеточным раком головы и шеи SCCN, остальные — с опухолями различной локализации), внутрипухлевые инъекции, эскалация дозы — с 5×10^7 до $1,5 \times 10^{12}$ ВЧ/сут в течение 5 сут 15 participants (5 patients had squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCN), the others had tumours in different sites), intratumoural injections, dose escalation from 5×10^7 to $1,5 \times 10^{12}$ VPs/day for 5 days	- Уменьшение размеров опухолей у 3 из 15 пациентов; - серьезных побочных эффектов не выявлено: наблюдались только лихорадка, гриппоподобный синдром и боль в области введения; - определена оптимальная доза для использования во II фазе КИ — 5×10^{11} ВЧ/сут в течение пяти дней - Reduction of tumour size in 3 out of 15 patients; - no serious side effects were observed: the only side effects were fever, flu-like syndrome, and pain at the injection site; - the optimal dose for CT phase II: 5×10^{11} VPs/day for five days	[44]
КИ II фаза, мультитентруемое, контролируемое CT phase II, multicentre, controlled	50 участников (15 пациентов с плоскоклеточным раком головы и шеи SCCN, остальные — с опухолями различной локализации), один цикл терапии состоял из двух серий внутрипухлевых инъекций препарата в дозе 5×10^{11} ВЧ/сут в течение пяти дней с интервалами 16 и 21 сут. Пациенты получали минимум 2 цикла терапии. Введение препарата осуществлялось на фоне химиотерапии 50 participants (15 patients had SCCN, the others had tumours in different sites), one treatment cycle consisted of two courses of intratumoural injections of the product at a dose of 5×10^{11} VPs/day for five days at intervals of 16 and 21 days. The patients received at least 2 treatment cycles. The product was administered parallel to chemotherapy	- Общий ответ составил 28,0% (14 пациентов из 50, 4 пациента выбыло в ходе исследования); - общий ответ для пациентов с SCCN составил 26,7% (4 пациента из 15) против 12% (6 пациентов из 50) в контрольной группе; - серьезных побочных эффектов не выявлено. Наиболее часто наблюдались лихорадка, гриппоподобный синдром и боль в области введения препарата - The overall response was 28.0% (14 patients out of 50, 4 patients dropped out during the study); - the overall response for the patients with SCCN was 26.7% (4 patients out of 15) as compared to 12% (6 patients out of 50) in the control group; - no serious side effects were detected. Fever, flu-like syndrome, and pain at the injection site were the most often observed side effects	[45]
КИ III фаза, мультитентруемое, контролируемое CT phase III, multicentre, controlled	170 участников (все пациенты с плоскоклеточным раком головы и шеи SCCN, в том числе назофарингеальной карциномой), 160 человек из 170 получили 2 цикла терапии (но не более пяти), 37 человек были исключены из КИ по разным причинам. В конечном итоге оценивались данные по 123 пациентам, которые были разделены на 2 группы: группа 1 получала Oncorine® совместно с химиотерапией, группа 2 — только химиотерапию. Один цикл терапии включал внутривенные инъекции в дозе 5×10^{11} ВЧ/сут в течение 21 сут с интервалами между циклами 5 сут 170 participants (all patients with SCCN, including nasopharyngeal carcinoma), 160 participants out of 170 received at least 2 treatment cycles (but not more than five), 37 participants were excluded from the CT for various reasons. In the end, data were evaluated on 123 patients from 2 groups: group 1 received Oncorine® together with chemotherapy, group 2 received chemotherapy alone. One treatment cycle included intratumoural injections at a dose of 5×10^{11} VPs/day for 21 days with intervals of 5 days between the cycles	- Общий ответ в группе 1, определенный для 105 пациентов, дошедших до конца КИ, составил 78,8% против 39,6% в группе 2; - для назофарингеальной карциномы комбинированная терапия оказалась эффективнее, чем применение только химиотерапии: величина полного ответа пациентов составила 75,6 и 57,1% соответственно; - наиболее часто отмечались лихорадка (45,7%), боль в месте введения препарата (28,3%), гриппоподобный синдром (9,8%), лейкопения, тромбоцитопения, нарушение показателей функциональной активности печени, алопеция и тошнота - The overall response determined for 105 patients who stayed till the end of the CT, was 78.8% compared to 39.6% in group 2; - the combination therapy was more efficacious for nasopharyngeal carcinoma than chemotherapy used alone: the complete response was 75.6% and 57.1%, respectively; - the most common side effects were: fever (45.7%), pain at the injection site (28.3%), flu-like syndrome (9.8%), leukopenia, thrombocytopenia, decreased liver function, alopecia, and nausea	[46]

Примечание. КИ — клинические исследования; ВЧ — вирусные частицы; SCCN — Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck (плоскоклеточный рак головы и шеи).
Note. CT—clinical trials; VPs—viral particles; SCCN—squamous cell carcinoma of the head and neck.

ДКИ и КИ, а также рассмотрения их регуляторными органами КНР с целью регистрации следует отметить:

- процесс разработки препаратов на основе ОЛВ в КНР достаточно продолжителен: до момента начала регистрационных процедур может пройти более десятка лет;
- производство препаратов на основе ОЛВ осуществляется строго в соответствии со стандартами ГМР на лицензированных производственных площадках;
- применение препаратов на основе ОЛВ возможно, прежде всего, в составе комплексной терапии (химиотерапии или лучевой терапии);
- при проведении ДКИ вследствие ограниченных возможностей моделей животных (различия в иммунном ответе, недостаточная продолжительность жизни для моделей с ксенотрансплантированными опухолями) существуют трудности в подборе оптимальной дозы, пути, графика введения препарата, а окончательно эффективность и безопасность препаратов могут быть подтверждены только в ходе ранних фаз КИ;
- наряду с токсикологическими, фармакокинетическими исследованиями и изучением активности препаратов в ДКИ обязательно проведение генотоксических исследований с доказательством неспособности препаратов встраиваться и реплицироваться в геноме инфицированных клеток (если применимо);
- КИ на ранних фазах проводятся по нескольким показаниям к применению (опухоли различной этиологии).

Вклад авторов. *Е. В. Мельникова* — идея, концепция и дизайн исследования, анализ данных, изложенных в нормативных документах; *О. А. Рачинская* — сбор, систематизация и обобщение данных, изложенных в нормативных документах, написание текста; *В. А. Меркулов* — окончательное утверждение версии рукописи для публикации.

Authors' contributions. *Ekaterina V. Melnikova*—elaboration of the idea, concept, and design of the study, analysis of data from regulatory documents; *Olga A. Rachinskaya*—collection, systematisation, consolidation of data from regulatory documents, writing of the text; *Vadim A. Merkulov*—final approval of the paper for publication.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00005-21-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121021800098-4).

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00005-21-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121021800098-4).

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. Arab A, Behravan N, Razazan A, Barati N, Mosaffa F, Nicastro J, et al. The viral approach to breast cancer immunotherapy. *J Cell Physiol.* 2019;234(2):1257–67. <https://doi.org/10.1002/jcp.27150>
2. Packiriswamy N, Upreti D, Zhou Y, Khan R, Miller A, Diaz RM, et al. Oncolytic measles virus therapy enhances tumor antigen-specific T-cell responses in patients with multiple myeloma. *Leukemia.* 2020;34(12):3310–22. <https://doi.org/10.1038/s41375-020-0828-7>
3. Yang X, Huang B, Deng L, Hu Z. Progress in gene therapy using oncolytic vaccinia virus as vectors. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2018;144(12):2433–40. <https://doi.org/10.1007/s00432-018-2762-x>
4. Wei D, Xu J, Liu X-Y, Chen Z-N, Bian H. Fighting cancer with viruses: oncolytic virus therapy in China. *Hum Gene Ther.* 2018;29(2):151–9. <https://doi.org/10.1089/hum.2017.212>
5. Taguchi S, Fukuhara H, Todo T. Oncolytic virus therapy in Japan: progress in clinical trials and future perspectives. *Jpn J Clin Oncol.* 2019;49(3):201–9. <https://doi.org/10.1093/jjco/hyy170>
6. Fu L-Q, Wang S-B, Cai M-H, Wang X-J, Chen J-Y, Tong X-M, et al. Recent advances in oncolytic virus-based cancer therapy. *Virus Res.* 2019;270:197675. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.197675>
7. Haines BB, Denslow A, Grzesik P, Lee JS, Farkaly T, Hewett J, et al. ONCR-177, an oncolytic HSV-1 designed to potentially activate systemic antitumor immunity. *Cancer Immunol Res.* 2021;9(3):291–308. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.cir-20-0609>
8. Lan Q, Xia S, Wang Q, Xu W, Huang H, Jiang S, Lu L. Development of oncolytic virotherapy: from genetic modification to combination therapy. *Front Med.* 2020;14(2):160–84. <https://doi.org/10.1007/s11684-020-0750-4>
9. Chiocca EA, Rabkin SD. Oncolytic viruses and their application to cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Res.* 2014;2(4):295–300. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.cir-14-0015>
10. Wang P, Li X, Wang J, Gao D, Li Y, Li H, et al. Re-designing Interleukin-12 to enhance its safety and potential as an anti-tumor immunotherapeutic agent. *Nat Commun.* 2017;8(1):1395. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01385-8>
11. Samson A, Scott KJ, Taggart D, West EJ, Wilson E, Nuovo GJ, et al. Intravenous delivery of oncolytic reovirus to brain tumor patients immunologically primes for subsequent checkpoint blockade. *Sci Transl Med.* 2018;10(422):eaam7577. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aam7577>
12. Geletneký K, Hajda J, Angelova AL, Leuchs B, Capper D, Bartsch AJ, et al. Oncolytic H-1 parvovirus shows safety and signs of immunogenic activity in a first phase I/IIa glioblastoma trial. *Mol Ther.* 2017;25(12):2620–34. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.08.016>
13. Bourgeois-Daigneault MC, Roy DG, Aitken AS, El Sayes N, Martin NT, Varette O, et al. Neoadjuvant oncolytic virotherapy before surgery sensitizes triple-negative breast cancer to immune checkpoint therapy. *Sci Transl Med.* 2018;10(422):eaao1641. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aao1641>
14. Bommarreddy PK, Shettigar M, Kaufman HL. Integrating oncolytic viruses in combination cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* 2018;18(8):498–513. <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0014-6>
15. Foreman PM, Friedman GK, Cassady KA, Markert JM. Oncolytic virotherapy for the treatment of malignant glioma. *Neurotherapeutics.* 2017;14(2):333–44. <https://doi.org/10.1007/s13311-017-0516-0>
16. Alessandrini F, Menotti L, Avitabile E, Appolloni I, Ceresa D, Marubbi D, et al. Eradication of glioblastoma by immuno-virotherapy with a retargeted oncolytic HSV in a preclinical model. *Oncogene.* 2019;38(23):4467–79. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-0737-2>
17. Li JM, Kao KC, Li LF, Yang TM, Wu CP, Horng YM, et al. MicroRNA-145 regulates oncolytic herpes simplex virus-1 for selective killing of human non-small cell lung cancer cells. *Virol J.* 2013;10(1):241. <https://doi.org/10.1186/1743-422x-10-241>
18. Eriksson E, Milenova I, Wenthe J, Stahle M, Leja-Jarblad J, Ullenhag G, et al. Shaping the tumor stroma and sparking immune activation by CD40 and 4-1BB signaling induced by an armed oncolytic virus. *Clin Cancer Res.* 2017;23(19):5846–57. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-17-0285>
19. Pearl TM, Markert JM, Cassady KA, Ghonime MG. Oncolytic virus-based cytokine expression to improve immune activity in brain and solid tumors. *Mol Ther Oncolytics.* 2019;13:14–21. <https://doi.org/10.1016/j.omto.2019.03.001>
20. Foloppe J, Kempf J, Futin N, Kintz J, Cordier P, Pichon C, et al. The enhanced tumor specificity of TG6002, an armed oncolytic vaccinia virus deleted in two genes involved in nucleotide metabolism. *Mol Ther Oncolytics.* 2019;14:1–14. <https://doi.org/10.1016/j.omto.2019.03.005>

21. Grigg C, Blake Z, Gartrell R, Sacher A, Taback B, Saenger Y. Talimogene laherparepvec (T-Vec) for the treatment of melanoma and other cancers. *Semin Oncol.* 2016;43(6):638–46. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2016.10.005>
22. Hamid O, Hoffner B, Gasal E, Hong J, Carvajal RD. Oncolytic immunotherapy: unlocking the potential of viruses to help target cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2017;66(10):1249–64. <https://doi.org/10.1007/s00262-017-2025-8>
23. Robinson S, Galanis E. Potential and clinical translation of oncolytic measles viruses. *Expert Opin Biol Ther.* 2017;17(3):353–63. <https://doi.org/10.1080/14712598.2017.1288713>
24. Doniņa S, Strēle I, Proboka G, Auziņš J, Alberts P, Jonsson B, et al. Adapted ECHO-7 virus Rignvir immunotherapy (oncolytic virotherapy) prolongs survival in melanoma patients after surgical excision of the tumour in a retrospective study. *Melanoma Res.* 2015;25(5):421–26. <https://doi.org/10.1097/cmr.0000000000000180>
25. Peng Z. Current status of gendicine in China: recombinant human Ad-p53 agent for treatment of cancers. *Hum Gene Ther.* 2005;16(9):1016–27. <https://doi.org/10.1089/hum.2005.16.1016>
26. Husain SR, Han J, Au P, Shannon K, Puri RK. Gene therapy for cancer: regulatory considerations for approval. *Cancer Gene Ther.* 2015;22(12):554–63. <https://doi.org/10.1038/cgt.2015.58>
27. Zhang WW, Li L, Li D, Liu J, Li X, Li W, et al. The first approved gene therapy product for cancer Ad-p53 (gendicine): 12 years in the clinic. *Human Gene Ther.* 2018;29(2):160–79. <https://doi.org/10.1089/hum.2017.218>
28. Zhang SW, Xiao SW, Liu CQ, Sun Y, Su X, Li DM, et al. Treatment of head and neck squamous cell carcinoma by recombinant adenovirus-p53 combined with radiotherapy: a phase II clinical trial of 42 cases. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2003;83(23):2023–8. PMID: 14703408
29. Chen CB, Pan JJ, Xu LY. Recombinant adenovirus p53 agent injection combined with radiotherapy in treatment of nasopharyngeal carcinoma: a phase II clinical trial. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2003;83(23):2033–5. PMID: 14703410
30. Han DM, Huang ZG, Zhang W, Yu ZK, Wang Q, Ni X, et al. Effectiveness of recombinant adenovirus p53 injection on laryngeal cancer: phase I clinical trial and follow up. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2003;83(23):2029–32. PMID: 14703409
31. Liu J, Lv D, Wang H, Zou J, Chen F, Yang H. Recombinant adenovirus-p53 enhances the therapeutic effect of surgery and chemoradiotherapy combination in hypopharyngeal squamous cell carcinomas patients. *Medicine (Baltimore).* 2018;97(35):e12193. <https://doi.org/10.1097/md.00000000000012193>
32. Li Y, Li L-J, Wang L-J, Zhang Z, Gao N, Liang C-Y, et al. Selective intra-arterial infusion of rAd-p53 with chemotherapy for advanced oral cancer: a randomized clinical trial. *BMC Med.* 2014;12:16. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-12-16>
33. Geng J, Xiao S, Zhang S, Liu Ch, Li Y, Fang JJ, et al. Clinical effectiveness of recombinant adenovirus-p53 combined with radiotherapy in advanced soft tissue sarcoma: A report of 37 cases. *J Clin Oncol.* 2014;32(15):e21514. https://dx.doi.org/10.1200/jco.2014.32.15_suppl.e21514
34. Xiao SW, Xu Y-Z, Xiao B-F, Jiang J, Liu C-Q, Fang Z-W, et al. Recombinant adenovirus-p53 gene therapy for advanced unresectable soft-tissue sarcomas. *Hum Gene Ther.* 2018;29(6):699–707. <https://doi.org/10.1089/hum.2017.103>
35. Su X, Chen W-J, Xiao S-W, Li X-F, Xu G, Pan J-J, Zhang S-W. Effect and safety of recombinant adenovirus-p53 transfer combined with radiotherapy on long-term survival of locally advanced cervical cancer. *Hum Gene Ther.* 2016;27(12):1008–14. <https://doi.org/10.1089/hum.2016.043>
36. Qu H, Xia Y, Li X. Recombinant human p53 adenovirus injection (rAd-p53) combined with chemotherapy for 4 cases of high-grade serous ovarian cancer. *Curr Gene Ther.* 2020;20(4):313–20. <https://doi.org/10.2174/1566523220666200826100245>
37. Shen A, Liu S, Yu W, Deng H, Li Q. P53 gene therapy-based transarterial chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma: a prospective cohort study. *J Gastroenterol Hepatol.* 2015;30(11):1651–6. <https://doi.org/10.1111/jgh.13009>
38. Liu Y, Zhang Y, Bautista D, Tang S, Zhou J, Li C, Zhao G. Trans-arterial p53-gene-embolization with gelatin sponge microparticles for hepatocellular carcinoma with BCLC stage B: single-center experience. *Cell Biochem Biophys.* 2015;71(1):99–104. <https://doi.org/10.1007/s12013-014-0167-2>
39. Zhou J, Zhang Y, Zhao G, Liu Y, Li C, Tang S, et al. The preliminary study of recombinant adenovirus p53 combined with transarterial embolization with particles for advanced hepatocellular carcinoma. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2014;94(9):660–3. PMID: 24842203
40. Yang J, Wang X, Zheng G. A primary report of recombinant adenoviral human p53 gene (rad-p53) in combination with concurrent radio-chemotherapy in patients with t4n0-2m0 stage non-small cell lung cancer in elderly. *Chinese Journal of Coal Industry Medicine.* 2013;10(1):1586–9.
41. Garber K. China approves world's first oncolytic virus therapy for cancer treatment. *J Natl Cancer Inst.* 2006;98(5):298–300. <https://doi.org/10.1093/jnci/djj111>
42. Lichtenstein DL, Toth K, Doronin K, Tollefson AE, Wold WSM. Functions and mechanisms of action of the adenovirus E3 proteins. *Int Rev Immunol.* 2004;23(1–2):75–111. <https://doi.org/10.1080/08830180490265556>
43. Liang M. Oncorine, the world first oncolytic virus medicine and its update in China. *Curr Cancer Drug Targets.* 2018;18(2):171–6. <https://doi.org/10.2174/1568009618666171129221503>
44. Yuan Z-Y, Zhang L, Li S, Qian X-Z, Guan Z-Z. Safety of an E1B deleted adenovirus administered intratumorally to patients with cancer. *Ai Zheng.* 2003;22(3):310–3. PMID: 12654194
45. Lu W, Zheng S, Li X-F, Huang J-J, Zheng X, Li Z. Intra-tumor injection of H101, a recombinant adenovirus, in combination with chemotherapy in patients with advanced cancers: a pilot phase II clinical trial. *World J Gastroenterol.* 2004;10(20):3634–8. <https://doi.org/10.3748/wjg.v10.i24.3634>
46. Xia Z-J, Chang J-H, Zhang L, Jiang W-Q, Guan Z-Z, Liu J-W, et al. Phase III randomized clinical trial of intratumoral injection of E1B gene-deleted adenovirus (H101) combined with cisplatin-based chemotherapy in treating squamous cell cancer of head and neck or esophagus. *Ai Zheng.* 2004;23(12):1666–70. PMID: 15601557
47. He C, Zhang Y, Lin X. Increased overall survival and decreased cancer-specific mortality in patients with hepatocellular carcinoma treated by transarterial chemoembolization and human adenovirus type-5 combination therapy: a competing risk analysis. *J Gastrointest Surg.* 2018;22(6):989–97. <https://doi.org/10.1007/s11605-018-3703-3>
48. He C-B, Lao X-M, Lin X-J. Transarterial chemoembolization combined with recombinant human adenovirus type 5 H101 prolongs overall survival of patients with intermediate to advanced hepatocellular carcinoma: a prognostic nomogram study. *Chin J Cancer.* 2017;36(1):59. <https://doi.org/10.1186/s40880-017-0227-2>
49. Xiao B, Jin Z-D, Li Z-S, Du Y-Q, Wu R-P, Zhou J. Intra-tumoral injection of E1B gene-deleted adenovirus combined with gemcitabine for unresectable pancreatic carcinoma: 19 cases analysis. *Chinese Journal of Pancreatol.* 2011;11(3). <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.1674-1935.2011.03.004>

05 ABTOPAX / AUTHORS

Мельникова Екатерина Валерьевна, канд. биол. наук. *Ekaterina V. Melnikova*, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9585-3545>
Рачинская Ольга Анатольевна, канд. биол. наук. *Olga A. Rachinskaya*, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8377-9205>
Меркулов Вадим Анатольевич, д-р мед. наук, проф. *Vadim A. Merkulov*, Dr. Sci. (Med.), Professor. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4891-973X>

Статья поступила 15.07.2021
 После доработки 31.08.2021
 Принята к печати 20.09.2021

Article was received 15 July 2021
 Revised 31 August 2021
 Accepted for publication 20 September 2021

Экспериментальные модели клеточных линий для скрининга нефротоксичности

И. А. Мазеркина*, В. А. Евтеев, А. Б. Прокофьев, О. В. Муслимова, Е. Ю. Демченкова

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. Цель работы — обзор клеточных моделей для экспериментальной оценки нефротоксичности ЛС *in vitro* по данным литературных источников. Нефротоксичность является причиной отказа от дальнейшей разработки нового лекарственного средства в 2% случаев по результатам доклинических исследований *in vivo* на лабораторных животных и в 19% — после исследований III фазы. Прогнозирование токсичности на клеточных моделях позволит сэкономить средства при разработке лекарственного средства, а также сократить/избежать исследований на лабораторных животных. В настоящее время не существует официальных международных рекомендаций по исследованию нефротоксичности *in vitro*, тема находится в интенсивной разработке. Основной мишенью токсического поражения почек являются эпителиальные клетки проксимальных канальцев, поэтому основные исследования направлены на создание клеточных линий, характеризующихся стабильными функциональными качествами этих клеток. При моделировании нефротоксичности также важным является выбор релевантных методов и конечных точек тестов, которые могли бы учитывать возможные механизмы токсического действия. В обзоре рассматриваются существующие линии эпителиальных клеток проксимального почечного канальца человека и современные методики оценки цитотоксичности. Дальнейшая перспектива разработки клеточных моделей для скрининга нефротоксичности — оптимизация и стандартизация систем *in vitro*, которые позволили бы на доклиническом этапе прогнозировать нефротоксичность лекарственного средства *in vivo*.
Ключевые слова: клеточные культуры; нефротоксичность *in vitro*; эпителиальные клетки проксимальных почечных канальцев; прогнозирование нефротоксичности

Для цитирования: Мазеркина ИА, Евтеев ВА, Прокофьев АБ, Муслимова ОВ, Демченкова ЕЮ. Экспериментальные модели клеточных линий для скрининга нефротоксичности. *Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2021;11(3):160–166. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2021-11-160-166>

* **Контактное лицо:** Мазеркина Ирина Анатольевна, mazerkina@expmed.ru

Experimental Cell Line Models for Nephrotoxicity Screening

I. A. Mazerkina*, V. A. Evteev, A. B. Prokofiev, O.V. Muslimova, E. Yu. Demchenkova

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

Abstract. The aim of the study was to review literature data on cell models for experimental assessment of drug nephrotoxicity *in vitro*. Because of nephrotoxicity, 2% of new investigational medicinal products are discarded at the stage of preclinical *in vivo* studies in laboratory animals, and 19%—after phase III clinical trials. Prediction of toxicity in cell models could make drug development more cost-effective and help to reduce/avoid animal testing. At present, there are no official international guidelines for assessment of nephrotoxicity *in vitro*, but there is a lot of research underway. The main toxicity target in kidneys is renal proximal tubule epithelial cells, therefore the main research is focused on the development of renal proximal tubule epithelial cell lines with stable functional characteristics. Another important aspect in nephrotoxicity modeling is the choice of relevant test methods and end points which would reflect potential toxicity mechanisms. The paper reviews existing human renal proximal tubule epithelial cell lines and current test methods for assessing cytotoxicity. Promising areas for future development of cell models for nephrotoxicity assessment— are optimisation and standardisation of *in vitro* systems that would help to make preclinical predictions of drug nephrotoxicity *in vivo*.

Key words: cell cultures; nephrotoxicity *in vitro*; renal proximal tubule epithelial cells; nephrotoxicity prediction

For citation: Mazerkina IA, Evteev VA, Prokofiev AB, Muslimova OV, Demchenkova EYu. Experimental cell line models for nephrotoxicity screening. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya* = *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2021;11(3):160–166. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2021-11-160-166>

* **Corresponding author:** Irina A. Mazerkina, mazerkina@expmed.ru

Основная цель разработки клеточных моделей для изучения нефротоксичности лекарственных средств (ЛС) *in vitro* — создание систем, которые могли бы на доклиническом этапе прогнозировать возможность и условия развития нефротоксичности *in vivo*. Это актуально при изучении новых

ЛС, поскольку может сэкономить средства и остановить разработку токсичного ЛС на ранних этапах. Нефротоксичность является причиной отказа от дальнейшей разработки нового ЛС только в 2% случаев по результатам доклинических исследований *in vivo* на лабораторных животных и в 19% — после

исследований III фазы [1]. Исследования *in vivo* на лабораторных животных воспроизводят комплексность поражения почек при воздействии нефротоксических веществ, однако межвидовые фенотипические различия кровообращения, метаболизма, экспрессии транспортеров не всегда позволяют экстраполировать результаты исследований на человека [2]. Недостатком проведения исследований *in vivo* также является высокая себестоимость. Кроме того, в настоящее время большое внимание уделяется соблюдению этических принципов исследований в рамках концепции 3R (Reduction, Refinement, Replacement): уменьшение количества тестируемых животных, модификация методик, направленная на минимизацию страдания и стресса животных, и замена тестов на животных на исследования на волонтерах и модели *in vitro* и *in silico* [3]. Таким образом, в настоящее время являются актуальными разработка и совершенствование моделей для изучения лекарственной токсичности *in vitro*, достоинствами которых являются снижение стоимости исследований и соблюдение этических принципов.

Европейское агентство по лекарственным средствам (European Medicines Agency, EMA) и Управление по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств США (Food and Drug Administration, FDA) при разработке новых ЛС в случае выведения почками более 25% вещества рекомендуют проводить исследования *in vitro* для определения почечного транспорта посредством транспортеров органических анионов OAT1 и OAT3, однако не существует официально рекомендованных клеточных моделей для исследования нефротоксичности *in vitro*. Основным требованием, предъявляемым к клеточным системам при исследованиях *in vitro*, является наличие экспрессии тех же транспортеров, с которыми предполагается взаимодействие *in vivo*¹. Данный подход позволяет определить, является ли данное ЛС субстратом и/или ингибитором OAT, и прогнозировать возможность межлекарственного взаимодействия.

Развитие клеточного моделирования нефротоксичности ЛС включает несколько аспектов и направлений. С одной стороны, это создание и стандартизация клеточных культур, обладающих органоспецифичными и видоспецифичными свойствами зрелых почечных клеток человека. Другой важный аспект — это выбор информативных критериев оценки цитотоксичности ЛС с учетом его механизма действия.

Цель работы — обзор клеточных моделей, используемых при экспериментальной оценке нефротоксичности ЛС *in vitro*, по данным литературных источников.

КЛЕТЧНЫЕ ЛИНИИ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ НЕФРОТОКСИЧНОСТИ

Поскольку основные транспортные и концентративные процессы происходят в проксимальном отделе почечных канальцев, в большинстве клеточных моделей нефротоксичности воспроизводятся функция и свойства эпителиальных клеток проксимального отдела почечного канальца. Эпителиальные клетки дистальных почечных канальцев относятся к кубическому эпителию и образуют плотный слой с поляризацией на базолатеральную поверхность, контактирующую с интерстицием и кровью, и апикальную поверхность с щеточной каемкой со стороны просвета почечного канальца.

За канальцевую секрецию и реабсорбцию ЛС и многих экзогенных и эндогенных веществ отвечают экспрессированные в эпителиальных клетках проксимальных почечных канальцев трансмембранные белки-транспортеры. Транспортеры относятся к двум большим семействам: семейство транспортеров растворенных веществ (solute carrier transporters, SLC) и семейство аденозинтрифосфат-связывающих кассетных транспортеров (ATP-binding cassette transporters, ABC). Наличие мембранного клеточного потенциала обуславливает различие при переносе ионизированных молекул ЛС в клетку и из нее, поэтому в транспорте одного вещества участвует не менее двух транспортеров. В процессе канальцевой секреции транспортеры, расположенные на базолатеральной поверхности эпителиальных клеток, осуществляют захват ЛС в клетку из крови (инфлюкс), а транспортеры, расположенные на апикальной поверхности, — выброс ЛС из клетки в просвет канальца (эффлюкс) [4, 5]. Со стороны щеточной каемки располагаются белки-рецепторы мегалин и кубилин, которые участвуют в процессе обратного захвата путем эндоцитоза низкомолекулярных белков и некоторых ЛС [6]. Процесс транспорта против электрического градиента является энергозатратным и поэтому более чувствительным к ишемии [7]. Клетки эпителия проксимального почечного канальца характеризуются наличием большого количества митохондрий, которые не только обеспечивают энергозатратные процессы ресурсами, но также участвуют в активации апоптоза [8].

Необходимые свойства клеточных систем для исследования нефротоксичности

Методики, использующиеся при исследовании накопления ЛС внутри клетки или мембранных микропузырьков, подходят для оценки взаимодействия ЛС с транспортерами — это дает информацию о возможном межлекарственном взаимодействии на уровне транспортеров. Ингибирование почечных

¹ Guideline on the investigation of drug interactions. CPMP/EWP/560/95/Rev. 1 Corr. 2**. EMA; 2012.

Clinical drug interaction studies — Cytochrome P450 enzyme and transporter-mediated drug interactions. Guidance for industry. FDA; 2020.

транспортёров может привести к накоплению ЛС в клетке [9] или интерстиции в токсичных дозах [10].

Определение прямого токсического действия на клетки, выращенные на плашках, для исследования органоспецифической токсичности малоинформативно. Z. Lin и соавт. провели масштабное исследование цитотоксичности с применением 273 гепатотоксичных, 191 кардиотоксичного и 85 нефротоксичных веществ на различных линиях клеток: HepG2 (гепатоцеллюлярная карцинома), H9c2 (миокард эмбриона) и NRK-52E (проксимальный почечный каналец). Исследование показало, что абсолютное большинство веществ оказывало сходное действие независимо от типа клеток, то есть прямое цитотоксическое воздействие на клетки само по себе не может оцениваться как органоспецифическое [11].

Для оценки нефротоксичности клетки должны обладать функциональными свойствами, максимально приближенными к таковым *in vivo*. Для комплексной оценки нефротоксичности видоспецифические клетки выращивают на специальных полупроницаемых мембранах в виде монослоя, добиваясь характерных плотных межклеточных связей, поляризации клеток на базолатеральную и апикальную поверхности. Для подтверждения валидности таких систем проводятся тесты по определению морфологических показателей: наличие плотных межклеточных связей, ресничек, а также по определению функциональных свойств: активность транспортёров, наличие обусловленного рецепторами мегалин/кубилиновой системы эндоцитоза, экспрессия и функция метаболических энзимов, продукция цитокинов, лактатдегидрогеназы (ЛДГ), аденозинтрифосфата (АТФ) и других маркеров. В некоторых случаях, например при выращивании клеток почечного эпителия из стволовых клеток, определяют маркеры, характеризующие их зрелость и принадлежность к почечному эпителию [12, 13].

Видо- и органоспецифичные клеточные линии для исследования нефротоксичности

Линии рекомбинантных клеток НЕК 293 (human embryonic kidney 293). Широко использовались для оценки взаимодействия ЛС с транспортёрами, однако поскольку в клетках НЕК 293 содержатся нейрональные маркеры, предполагается, что данные клетки не являются клетками почечного эпителия [14] и поэтому не подходят под категорию органоспецифичных клеток для исследования нефротоксичности.

Клетки НК-2 (human kidney-2). Были получены путем иммортализации с помощью генов вируса папилломы человека, при росте демонстрируют специфические маркеры эпителиальных клеток проксимальных почечных канальцев [15], однако для экспрессии некоторых транспортёров,

например ОАТ и транспортёров органических катионов (organic cation transporter, OCT), требуется их дополнительная трансфекция [16]. Также была показана слабая экспрессия мегалина — рецептора, который участвует в обратном захвате путем эндоцитоза аминокгликозидов. В результате клетки НК-2 оказались нечувствительны к токсическому действию гентамицина [17].

Первичные клетки проксимальных почечных канальцев человека HPTC (Human Proximal Tubular Cells). Получают непосредственно от доноров. В работе Y. Li и соавт. было показано преимущество использования первичных донорских клеток по сравнению с НК-2. Исследовались 41 ЛС с известной нефротоксичностью, и модель с использованием HPTC показала прогностическую ценность на уровне 76–85% [18]. В HPTC определяется экспрессия ОАТ, транспортёра органических катионов/карнитина 2 OCTN-2 (organic cation / carnitine transporter-2), белка, ассоциированного с множественной лекарственной устойчивостью (multidrug resistance-associated protein, MRP), Р-гликопротеина, белка резистентности рака молочной железы (breast cancer resistance protein, BCRP). Дополнительно в этих клетках экспрессированы различные метаболические ферменты: гамма-глутамилтрансфераза (ГГТ), гамма-глутамилцистеин синтетаза, глутатион-S-трансфераза и другие [19]. К недостаткам первичных донорских клеток относятся большая межиндивидуальная вариабельность, ограниченная способность к размножению и склонность к потере дифференцировки и потере экспрессии транспортёров при пассажах.

Клетки, подобные эпителиальным клеткам проксимального почечного канальца, полученные из стволовых клеток эмбриона человека (HPTC-like cells). Была разработана методика выращивания из эмбриональных клеток человека клеток, подобных клеткам проксимального почечного канальца [13], с которыми было проведено исследование токсичности 41 ЛС. При сравнении была отмечена более низкая по сравнению с HPTC чувствительность клеток, полученных из стволовых клеток, однако сохранялось преимущество по сравнению с линией НК-2. К недостаткам HPTC-like cells относится низкая экспрессия мегалина, следствием чего является ложноотрицательный результат на нефротоксичность с гентамицином. К достоинствам эпителиальных клеток, выращенных из стволовых клеток, можно отнести их большую доступность и сохранение свойств при пассажах [12].

Клетки проксимального канальца человека, иммортализованные с помощью человеческой обратной транскриптазы теломеразы RPTEC/TERT1 (human telomerase reverse transcriptase, hTERT). Были получены M. Wieser и соавт. [20] и обладают морфологическими и функциональными характеристиками эпителиальных клеток проксимального канальца

человека, имея микроворсинки, плотные контакты, активность ГГТ, эндоцитоз, функционирующие транспортеры. Бессмертные RPTEC/TERT1 могут прожить не менее 90 удвоений популяции.

Условно immortalized эпителиальные клетки проксимальных почечных канальцев ciPTEC (conditionally immortalized human proximal tubule cell). Клетки, полученные из мочи добровольцев с трансфекцией hTERT и чувствительного к температуре антигена SV40T, благодаря которому клетки размножаются при 33 °C и созревают при 37 °C [21]. Эти клетки также обладают морфологическими и функциональными характеристиками эпителиальных клеток проксимального почечного канальца, однако из-за быстрого снижения экспрессии OAT1 и OAT3 была предложена их дополнительная трансфекция [22].

Псевдоimmortalized первичные клетки эпителия проксимальных почечных канальцев человека SA7K. Получены из первичных клеток эпителия проксимальных почечных канальцев человека путем трансфекции фактора, выключившего белок клеточного цикла (cell cycle protein), в результате чего данные клетки получили пролонгированную способность к размножению. Клетки SA7K характеризуются экспрессией основных транспортеров, сопоставимой с таковой у первичных эпителиальных клеток почечных канальцев при ранних пассажах, а также чувствительностью к некоторым известным нефротоксикантам. Данная линия клеток предлагается также для исследования нефротоксичности при многократном лекарственном воздействии [23].

Влияние условий культивирования на функциональные свойства клеток

Существенную роль в изменении функциональных свойств клеток играют способы и условия их культивирования. Культивирование в виде монослоя на полупроницаемых мембранах (2.5D) позволило более точно оценить влияние захватывающих и поглощающих транспортеров на транспорт ксенобиотиков. Другое перспективное направление — симуляция напряжения сдвига потока, которое испытывают клетки со стороны потока жидкости в канальце в физиологических условиях. Осуществляется подобная симуляция различными способами, в том числе ротацией или покачиванием системы. Была показана связь напряжения сдвига потока с формированием ресничек и уровнем экспрессии некоторых транспортеров, усилением транспорта альбуминов мегалин/кубилиновой системой, реорганизацией актина и клеточного скелета [24]. Другое направление — выращивание трехмерных культур в специальных средах. P. F. Secker и соавт. показали, что при выращивании клеток RPTEC/TERT1 в специальной среде формируются высоко дифференцированные стабильные

трубочки, у которых экспрессия транспортеров превосходила экспрессию в 2D-культуре [25]. Недостатком 3D-культур является их малая воспроизводимость и сложность стандартизации результатов оценки.

ОЦЕНКА НЕФРОТОКСИЧНОСТИ НА КЛЕТОЧНЫХ МОДЕЛЯХ

Для оценки токсического действия *in vitro* важно знать не только последствия в виде морфологических и функциональных изменений клетки, но и механизм токсического действия, поскольку он неодинаков у различных соединений.

Механизмы нефротоксичности

Мишенью для повреждения может стать любой из процессов, происходящих в эпителиальных клетках проксимального канальца: инфлюкс, эффлюкс, эндоцитоз, внутриклеточный метаболизм. Нефротоксичность некоторых ЛС может иметь одновременно несколько механизмов. Например, нефротоксичность цисплатина обусловлена повреждением митохондрий и клеточных ядер, активацией апоптоза, образованием активных форм кислорода и воспалением [26]. Еще один механизм токсичности — ингибирование транспортеров как частный случай межлекарственного взаимодействия. Ингибирование на уровне эффлюксных транспортеров может привести к токсическому накоплению вещества в эпителиальной клетке [9], если же ингибирование происходит на уровне инфлюксных транспортеров, токсические вещества могут накапливаться в интерстиции [10].

Конечные точки при оценке нефротоксичности на клеточных моделях

Результат исследований на клеточных культурах во многом зависит от информативности используемых конечных точек, поэтому методы исследования играют не меньшую роль, чем культуры, на которых эти исследования проводятся.

Развитие и освоение новых методик оценки изменений, происходящих под действием нефротоксикантов, тесно связаны с развитием и возможностями современных технологий. Наряду с простыми методиками ручного подсчета живых и мертвых клеток используются методики визуализации высокого разрешения, ядерно-магнитный резонанс, иммуноферментный анализ, гистохимические исследования и другие. Ниже кратко перечислены наиболее широко используемые.

Оценка жизнеспособности. Заключается в подсчете живых и мертвых клеток и вычислении доли живых клеток в общем количестве. Наиболее распространены методы, основанные на проникновении красителей в клетку при нарушении целостности мембраны (накопление трипанового синего) либо при изменении метаболической активности клеток (самый известный метаболический

краситель — МТТ, бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия), также используют флуоресцентные метаболитические красители. Преимуществом выбора флуоресцентных красителей является возможность использования для регистрации результатов простого метода — флуориметрии [27, 28].

Оценка апоптоза. Определяются морфологические изменения клеток при апоптозе (фазово-контрастная микроскопия): сжатие клетки, конденсация хроматина, формирование полостей в цитоплазме и формирование апоптотических телец; активность каспаз, количественная оценка нуклеосом (иммунноферментный анализ); регистрация апоптоза методом двойного окрашивания аннексин/V-ФИТЦ (флуоресцеин изотиоцианат) [29].

Оценка изменения электрофизиологических показателей. Изменения электрофизиологических показателей, происходящие при нарушении целостности клеточного монослоя, определяются измерением трансэпителиального электрического сопротивления (transepithelial electrical resistance, TEER) [30] либо электрического импеданса [31] и характеризуют жизнеспособность клеток. Определение митохондриального мембранного потенциала — количественная оценка мембранного потенциала митохондрий с использованием флуоресценции для оценки нарушений целостности мембраны [32], поскольку это нарушение может быть результатом токсического воздействия.

Оценка метаболитических изменений. Определение ЛДГ, выявление остаточного лактата [33], глутатион-S-трансферазы (GST) и др. [19]. Также проводят оценку оксидативного стресса путем определения активных форм кислорода [34].

Исследование транскриптома. Оценка изменения генной регуляции при воздействии токсических факторов. L. Aschauer и соавт. на клетках RPTEC/TERT1 изучали транскриптомные профили при повторяющемся воздействии известных нефротоксических веществ и гипоксии и показали, что изменение транскриптома, то есть регуляция генов, является специфичным показателем для некоторых нефротоксикантов [35].

Появились работы с определением *in vitro* биомаркеров острого почечного повреждения (ОПП), что является перспективным направлением ранней клинической диагностики этого состояния. В 2009 г. Консорциумом по тестовому прогнозированию безопасности (Predictive Safety Testing Consortium, PSTC) молекула почечного повреждения (kidney injury molecule-1, KIM-1), фактор трилистника 3 (urinary trefoil factor 3, TFF-3), бета-2 микроглобулин (urinary beta-2 microglobulin, B2M), цистатин С (CysC), альбумин мочи (uALB), общий белок мочи (uTP) и кластерин (CLU) были квалифицированы как маркеры первостепенной

важности для исследования почечного повреждения на крысах [36].

В исследовании Y. Li и соавт., изучавших нефротоксичность на первичных эпителиальных клетках проксимальных почечных канальцев, отмечалась исходно повышенная экспрессия мезенхимального маркера виментина (mesenchymal marker vimentin, VIM), KIM-1 и липокалина, ассоциированного с желатиназой нейтрофилов (neutrophil gelatinase-associated lipocalin, NGAL). Максимальную чувствительность к токсическому воздействию продемонстрировало повышение экспрессии провоспалительных цитокинов интерлейкина-6 и интерлейкина-8 [18]. В недавнем исследовании X. Qiu и соавт. было изучено 18 биомаркеров почечного повреждения на клетках RPTEC/TERT1. Авторами показано повышение регуляции кластерина, цистатина С, GSTπ и тканевого ингибитора металлопротеиназ TIMP-1 при воздействии цисплатина, циклоспорина, аристолохиевой кислоты и гентамицина [37].

Таким образом, проводится постоянное совершенствование методик определения нефротоксичности *in vitro*. Улучшение характеристик клеточных систем и приближение их к физиологическим свойствам *in vivo* позволяет применять в исследованиях некоторые биомаркеры острого почечного повреждения и показатели, используемые в клинической медицине.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Конечная цель разработки моделей для оценки нефротоксичности *in vitro* — создание информативных, высокопроизводительных и хорошо воспроизводимых методик. Отмечается значительный прогресс в этом направлении: разработаны клеточные линии, длительно сохраняющие функции эпителиальной клетки проксимального почечного канальца, расширяется панель методик комплексной оценки токсического действия и методы биоинформатической оценки и прогноза. Вопросы стандартизации методик во многом решаются наличием банков клеточных культур и производством специальных тестовых систем. Дальнейшее накопление опыта в этой области позволит выйти на уровень рутинных исследований нефротоксичности *in vitro* и выявлять побочные эффекты ЛС на более ранних этапах, до исследований *in vivo*.

Вклад авторов. И. А. Мазеркина — анализ литературы, ответственность за все аспекты работы, надлежащее изучение и решение вопросов, связанных с достоверностью данных или целостностью всех частей статьи; В. А. Егшеев — анализ и интерпретация результатов работы, критический пересмотр содержания; А. Б. Прокофьев — критический пересмотр содержания, утверждение окончательного варианта статьи для публикации; О. В. Муслимова — сбор данных литературы, участие в редактировании текста; Е. Ю. Демченкова — работа с источниками литературы, анализ данных.

Authors' contributions. *Irina A. Mazerkina*—analysis of scientific literature, overall responsibility for all aspects of the study, thorough assessment of data reliability and ensuring integrity of all parts of the paper; *Vladimir A. Evteev*—analysis and interpretation of the study results, review of the paper contents; *Aleksey B. Prokofiev*—review of the paper contents, approval of the final version of the paper for publication; *Olga V. Muslimova*—data collection, editing the text; *Elena Yu. Demchenkova*—literature review, analysis of data.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00005-21-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121022400082-4).

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00005-21-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121022400082-4).

Конфликт интересов. А. Б. Прокофьев является членом редакционной коллегии журнала «Вестник НЦЭСМП», остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest. Aleksey B. Prokofiev 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. Redfern WS, Ewart L, Hammond TG, Bialecki R, Kinter L, Lindgren S, et al. Impact and frequency of different toxicities throughout the pharmaceutical life cycle. *Toxicologist*. 2010;114(S1):1081.
2. Zou L, Stecula A, Gupta A, Prasad B, Chien HC, Yee SW, et al. Molecular mechanisms for species differences in organic anion transporter 1, OAT1: implications for renal drug toxicity. *Mol Pharmacol*. 2018;94(1):689–99. <https://doi.org/10.1124/mol.117.111153>
3. Steinberg N, Bertero A, Chiono V, Dell'Era P, Di Angelantonio S, Hartung T, et al. iPS, organoids and 3D models as advanced tools for in vitro toxicology. *ALTEX*. 2020;37(1):136–40. <https://doi.org/10.14573/altex.1911071>
4. Nigam SK, Wu W, Bush KT, Hoenig MP, Blantz RC, Bhatnagar V. Handling of drugs, metabolites, and uremic toxins by kidney proximal tubule drug transporters. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015;10(11):2039–49. <https://doi.org/10.2215/CJN.02440314>
5. Giacomini KM, Huang SM, Tweedie DJ, Benet LZ, Brouwer KL, Chu X, et al. Membrane transporters in drug development. *Nat Rev Drug Discov*. 2010;9(3):215–36. <https://doi.org/10.1038/nrd3028>
6. Eshbach ML, Weisz OA. Receptor-mediated endocytosis in the proximal tubule. *Annu Rev Physiol*. 2017;79(1):425–48. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034234>
7. Bhargava P, Schnellmann RG. Mitochondrial energetics in the kidney. *Nat Rev Nephrol*. 2017;13(10):629–46. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2017.107>
8. Linkermann A, Chen G, Dong G, Kundendorf U, Krautwald S, Dong Z. Regulated cell death in AKI. *J Am Soc Nephrol*. 2014;25(12):2689–701. <https://doi.org/10.1681/ASN.2014030262>
9. Li Q, Guo D, Dong Z, Zhang W, Zhang L, Huang SM, et al. Ondansetron can enhance cisplatin-induced nephrotoxicity via inhibition of multiple toxin and extrusion proteins (MATEs). *Toxicol Appl Pharmacol*. 2013;273(1):100–9. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.08.024>
10. Zhou Y, Yang Y, Wang P, Wei M, Ma Y, Wu X. Adefovir accumulation and nephrotoxicity in renal interstitium: Role of organic anion transporters of kidney. *Life Sci*. 2019;224:41–50. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.03.042>
11. Lin Z, Will Y. Evaluation of drugs with specific organ toxicities in organ-specific cell lines. *Toxicol Sci*. 2012;126(1):114–27. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr339>
12. Li Y, Kandasamy K, Chuah JK, Lam YN, Toh WS, Oo ZY, Zink D. Identification of nephrotoxic compounds with embryonic stem-cell-derived human renal proximal tubular-like cells. *Mol Pharm*. 2014;11(7):1982–90. <https://doi.org/10.1021/mp400637s>
13. Narayanan K, Schumacher K, Tasnim F, Kandasamy K, Schumacher A, Ni M, et al. Human embryonic stem cells differentiate into functional renal proximal tubular-like cells. *Kidney Int*. 2013;83(4):593–603. <https://doi.org/10.1038/ki.2012.442>
14. Shaw G, Morse S, Ararat M, Graham FL. Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *FASEB J*. 2002;16(8):869–71. <https://doi.org/10.1096/fj.01-0995fje>
15. Ryan MJ, Johnson G, Kirk J, Fuerstenberg SM, Zager RA, Torok-Storb B. HK-2: an immortalized proximal tubule epithelial cell line from normal adult human kidney. *Kidney Int*. 1994;45(1):48–57. <https://doi.org/10.1038/ki.1994.6>
16. Jenkinson SE, Chung GW, van Loon E, Bakar NS, Dalzell AM, Brown CDA. The limitations of renal epithelial cell line HK-2 as a model of drug transporter expression and function in the proximal tubule. *Pflügers Arch*. 2012;464(6):601–11. <https://doi.org/10.1007/s00424-012-1163-2>
17. Wu Y, Connors D, Barber L, Jayachandra S, Hanumegowda UM, Adams SP. Multiplexed assay panel of cytotoxicity in HK-2 cells for detection of renal proximal tubule injury potential of compounds. *Toxicol In Vitro*. 2009;23(6):1170–8. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.06.003>
18. Li Y, Oo ZY, Chang SY, Huang P, Eng KG, Zeng JL, et al. An *in vitro* method for the prediction of renal proximal tubular toxicity in humans. *Toxicol Res*. 2013;2(5):352–65. <https://doi.org/10.1039/c3tx50042j>
19. Lash LH, Putt DA, Cai H. Drug metabolism enzyme expression and activity in primary cultures of human proximal tubular cells. *Toxicology*. 2008;244(1):56–65. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2007.10.022>
20. Wieser M, Stadler G, Jennings P, Streubel B, Pfaller W, Ambros P, et al. hTERT alone immortalizes epithelial cells of renal proximal tubules without changing their functional characteristics. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008;295(5):F1365–75. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.90405.2008>
21. Wilmer MJ, Saleem MA, Masereeuw R, Ni L, van der Velden TJ, Russell FG, et al. Novel conditionally immortalized human proximal tubule cell line expressing functional influx and efflux transporters. *Cell Tissue Res*. 2010;339(2):449–57. <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0882-y>
22. Nieskens T, Peters J, Schreurs M, Smits N, Woestenenk R, Jansen K, et al. A human renal proximal tubule cell line with stable organic anion transporter 1 and 3 expression predictive for antiviral-induced toxicity. *AAPS J*. 2016;18(2):465–75. <https://doi.org/10.1208/s12248-016-9871-8>
23. Li S, Zhao J, Huang R, Steiner T, Bourner M, Mitchell M, et al. Development and application of human renal proximal tubule epithelial cells for assessment of compound toxicity. *Curr Chem Genom Transl Med*. 2017;11:19–30. <https://doi.org/10.2174/2213988501711010019>
24. Birdsall H, Hammond T. Role of shear stress on renal proximal tubular cells for nephrotoxicity assays. *J Toxicol*. 2021;2021:6643324. <https://doi.org/10.1155/2021/6643324>
25. Secker PF, Luks L, Schlichenmaier N, Dietrich DR. RPTEC/TERT1 cells form highly differentiated tubules when cultured in a 3D matrix. *ALTEX*. 2018;35(2):223–34. <https://doi.org/10.14573/altex.1710181>
26. Bernal-Barquero CE, Vazquez-Zapian GJ, Mata-Miranda MM. Revisión de las alteraciones en la expresión génica y vías apoptóticas provocadas en la nefrotoxicidad inducida por cisplatino. *Nefrología*. 2019;39:362–71. <https://doi.org/10.1016/j.nefro.2018.11.012>
27. Stoddart MJ. Cell viability assays: introduction. *Methods Mol Biol*. 2011;740:1–6. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-108-6_1
28. Трусов ГА, Чапленко АА, Семенова ИС, Мельникова ЕВ, Олещук ЮВ. Применение проточной цитометрии для оценки качества биомедицинских клеточных продуктов. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2018;18(1):16–24. [Trusov GA, Chaplenko AA, Semenova IS, Melnikova EV, Olefir YuV. Use of flow cytometry for quality evaluation of biomedical cell products. *BIO-preparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2018;18(1):16–24 (In Russ.)] <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-1-16-24>

29. Camaño S, Lazaro A, Moreno-Gordaliza E, Torre AM, de Lucas C, Humanes B, et al. Cilastatin attenuates cisplatin-induced proximal tubular cell damage. *J Pharmacol Exp Ther*. 2010;334(2):419–29. <https://doi.org/10.1124/jpet.110.165779>
30. Chen S, Einspanier R, Schoen J. Transepithelial electrical resistance (TEER): a functional parameter to monitor the quality of oviduct epithelial cells cultured on filter supports. *Histochem Cell Biol*. 2015;144(5):509–15. <https://doi.org/10.1007/s00418-015-1351-1>
31. Ke N, Wang X, Xu X, Abassi YA. The xCELLigence system for real-time and label-free monitoring of cell viability. *Methods Mol Biol*. 2011;740:33–43. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-108-6_6
32. Sakamuru S, Attene-Ramos MS, Xia M. Mitochondrial membrane potential assay. *Methods Mol Biol*. 2016;1473:17–22. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6346-1_2
33. Limonciel A, Aschauer L, Wilmes A, Prajczek S, Leonard MO, Pfaller W, et al. Lactate is an ideal non-invasive marker for evaluating temporal alterations in cell stress and toxicity in repeat dose testing regimes. *Toxicol In Vitro*. 2011;25(8):1855–62. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.05.018>
34. Sies H., Jones D.P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2020;21(7):363–83. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0230-3>
35. Aschauer L, Limonciel A, Wilmes A, Stanzel S, Kopp-Schneider A, Hewitt P, et al. Application of RPTEC/TERT1 cells for investigation of repeat dose nephrotoxicity: A transcriptomic study. *Toxicol In Vitro*. 2015;30(1 Pt A):106–16. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.10.005>
36. Dieterle F, Sistare F, Goodsaid F, Papaluca M, Ozer JS, Webb CP, et al. Renal biomarker qualification submission: a dialog between the FDA-EMA and Predictive Safety Testing Consortium. *Nat Biotechnol*. 2010;28(5):455–62. <https://doi.org/10.1038/nbt.1625>
37. Qiu X, Miao Y, Geng X, Zhou X, Li B. Evaluation of biomarkers for in vitro prediction of drug-induced nephrotoxicity in RPTEC/TERT1 cells. *Toxicol Res (Camb)*. 2020;9(2):91–100. <https://doi.org/10.1093/toxres/tfaa005>

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Мазеркина Ирина Анатольевна, канд. мед. наук. *Irina A. Mazerkina*, Cand. Sci. (Med.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-3733-6822>

Евтеев Владимир Александрович. *Vladimir A. Evteev*. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-6150-5796>

Прокофьев Алексей Борисович, д-р мед. наук. *Aleksey B. Prokofiev*, Dr. Sci. (Med.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-7024-5546>

Муслимова Ольга Валерьевна, канд. мед. наук. *Olga V. Muslimova*, Cand. Sci. (Med.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-1009-9609>

Демченкова Елена Юрьевна, канд. фарм. наук. *Elena Yu. Demchenkova*, Cand. Sci. (Pharm.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-1972-4386>

Статья поступила 29.06.2021

После доработки 09.08.2021

Принята к печати 20.09.2021

Article was received 29 June 2021

Revised 9 August 2021

Accepted for publication 20 September 2021

АКТУАЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Совет Евразийской экономической комиссии предложил внести изменения в утвержденные Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 78 Правила регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения (далее — Правила). Соответствующее решение Совета Евразийской экономической комиссии проходит процедуру общественного обсуждения. С принятием этого документа будет расширен доступ пациентов к незарегистрированным лекарственным препаратам при угрозах возникновения чрезвычайных ситуаций, а также к группам лекарственных средств высокотехнологической терапии, orphanным препаратам. В частности, предлагается сократить сроки рассмотрения регистрационных досье при проведении процедуры взаимного признания и обеспечения возможности внесения изменений в досье в процессе его экспертизы государством признания. Также появится возможность подачи документов на регистрацию лекарственных средств в дистанционном режиме в условиях эпидемиологических ограничений.

Предлагается дополнить раздел об установлении пострегистрационных мер Правил специальными процедурами и приложениями по регистрации лекарственных препаратов в исключительных случаях, условной регистрации и ускоренной экспертизе. Также планируется расширить условия доступа ввозимых в государство — член Союза незарегистрированных лекарственных препаратов для оказания медицинской помощи по жизненным показаниям конкретного пациента либо оказания медицинской помощи ограниченному контингенту пациентов с редкой или особо тяжелой патологией.

Публикуется по: Е. Сидорова. Совет ЕЭК предложил сократить сроки рассмотрения регистрационных досье лекарств. Фармацевтический вестник от 16 августа 2021 ¹.

¹ <https://pharmvestnik.ru/content/news/Sovet-EEK-predlozil-sokratit-sroki-rassmotreniya-registracionnyh-dose-lekarstv.html>

Выбор конечных точек для клинических исследований офтальмологических препаратов

М. О. Комарова

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. Эффективные методы лечения некоторых социально значимых офтальмологических заболеваний до настоящего времени отсутствуют. Разработка терапевтических методов лечения таких заболеваний осложняется трудностью диагностирования и выбора конечных точек клинических исследований. Цель работы — анализ существующих подходов к выбору конечных точек клинических исследований препаратов, применяющихся для лечения офтальмологических заболеваний. При проведении клинических исследований эффективности новых лекарственных препаратов наряду с клиническими конечными точками используют суррогатные конечные точки. Используемые на настоящий момент суррогатные конечные точки не всегда релевантны и не отражают в полной мере динамику состояния пациента при заболеваниях глаз, отличающихся длительным и прогрессирующим течением. На основании данных научной литературы проведен анализ подходов к выбору конечных точек в исследованиях офтальмологических препаратов, предназначенных для лечения глаукомы, увеита, синдрома сухого глаза, возрастной макулярной дегенерации. Показано, что выбор суррогатных конечных точек для проведения клинического исследования должен учитывать особенности конкретного заболевания. Для оценки динамики изменения зрительных функций в большинстве случаев необходим комплексный подход, позволяющий получить наиболее полную характеристику состояния органа зрения при этом заболевании. В работе проанализирована возможность использования потенциальных суррогатных конечных точек для исследований наиболее распространенных глазных заболеваний и показано, что ни одна из них на настоящий момент не рекомендована для применения в ходе клинических исследований или в рутинной клинической практике.

Ключевые слова: первичная конечная точка; суррогатная конечная точка; глаукома; внутриглазное давление; возрастная макулярная дегенерация; синдром сухого глаза; увеит

Для цитирования: Комарова МО. Выбор конечных точек для клинических исследований офтальмологических препаратов. *Вестник Научного Центра экспертизы средств медицинского применения*. 2021;11(3):167–173. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2021-11-2-167-173>

Контактное лицо: Комарова Марина Олеговна; KomarovaMO@expmed.ru

Selection of Endpoints for Clinical Studies of Ophthalmic Drugs

М. О. Komarova

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

Abstract. Until now, there have been no effective treatments for some ophthalmic diseases that have high social significance. Development of therapeutic approaches to such diseases may be complicated due to challenges in diagnosis and selection of clinical trial endpoints. The aim of the study was to analyse current approaches to selection of endpoints in clinical trials of ophthalmic drugs. Clinical efficacy studies of new medicinal products use surrogate endpoints in addition to clinical endpoints. However, currently used surrogate endpoints are not always relevant and do not fully reflect changes in the status of patients with chronic or progressive diseases. The study analysed published approaches to the selection of endpoints in clinical studies of ophthalmic drugs intended for the treatment of glaucoma, uveitis, dry eye syndrome, and age-related macular degeneration. It was demonstrated that the choice of surrogate endpoints in a clinical trial should take into account specific aspects of a particular disease. The assessment of dynamic patterns of changes in visual functions generally requires a complex approach for a comprehensive characterisation of the eye condition in a particular disease. The paper analyses the possibility of using potential surrogate endpoints in studies of the most common eye diseases, and highlights that none of them has been recommended for use in clinical trials or routine clinical practice.

Key words: primary endpoint; surrogate endpoint; glaucoma; intraocular pressure; age-related macular degeneration; dry eye syndrome; uveitis

For citation: Komarova MO. Selection of endpoints for clinical studies of ophthalmic drugs. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2021;11(3):167–173. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2021-11-2-167-173>

Corresponding author: Marina O. Komarova; KomarovaMO@expmed.ru

Одним из наиболее важных этапов планирования клинического исследования является выбор показательной конечной точки — заранее выбранного варианта исхода, для которого возможно проведение статистического анализа и определение эффекта терапевтического вмешательства.

Для ряда офтальмологических заболеваний в настоящее время отсутствуют эффективные методы фармакотерапии, поэтому разработка новых препаратов, позволяющих купировать патологический процесс или замедлить его прогрессирование, является актуальной. Общепринятые в исследованиях эффективности офтальмологических препаратов конечные точки могут не отражать в полной мере клинический эффект исследуемого вида вмешательства или быть труднодостижимыми, что ведет к увеличению длительности клинических исследований и количества включенных в исследование пациентов. В свою очередь, увеличение длительности исследования отсрочит получение доступа к инновационной терапии пациентам с тяжелыми заболеваниями. Сократить длительность клинических исследований и существенно снизить их стоимость позволяет применение суррогатных конечных точек [1].

Цель работы — анализ существующих подходов к выбору конечных точек клинических исследований препаратов, применяющихся для лечения офтальмологических заболеваний.

ОСОБЕННОСТИ ВЫБОРА КОНЕЧНЫХ ТОЧЕК В ОФТАЛЬМОЛОГИЧЕСКИХ КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Для оценки эффекта исследуемой терапии на основе эпидемиологических, терапевтических, патофизиологических или других научных данных в клинических исследованиях наиболее часто используют такой параметр, как суррогатная конечная точка. С помощью суррогатных конечных точек можно получить комплексную информацию о прогрессировании заболевания, степени риска развития осложнений и прогнозировании дальнейшего течения. Выбор определенного набора суррогатных конечных точек дает возможность подобрать оптимальную стратегию диагностического поиска и оценки эффективности лечения. Такой подход соответствует задачам персонализированной медицины, предполагающей индивидуальный подбор терапии на основании уникальной клинической, генетической, геномной информации о каждом пациенте [2].

В клинических исследованиях препаратов для терапии офтальмологических заболеваний применяются следующие суррогатные конечные точки: динамика изменения максимально скорректированной остроты зрения, динамика проявления симптомов заболеваний, динамика изменения уровня внутриглазного давления (ВГД). Для некоторых заболеваний общепринятые конечные точки оказываются нерелевантны. Так, использование

в качестве конечной точки при исследовании противоглаукомных препаратов динамики изменения скорректированной остроты зрения не отражает проявлений заболевания, так как пациент при глаукоме при сохранном центральном зрении может испытывать затруднения при ориентировании в пространстве и при выполнении рутинных действий ввиду значительного сужения полей зрения [3].

Выбор конечных точек для оценки эффективности применения лекарственного препарата в ходе клинической разработки должен быть тщательно обоснован. Особое внимание необходимо уделить подтверждению взаимосвязи выбранной конечной точки с клиническими особенностями исследуемого заболевания. Конечные точки могут быть оценены объективными методами, как, например, острота зрения, или носить субъективный характер: к этой группе можно отнести оценку пациентом динамики своего состояния, в том числе симптомов заболевания. Для ряда заболеваний, к которым можно отнести, например, синдром сухого глаза (ССГ), в качестве суррогатной конечной точки могут быть рассмотрены биомаркеры (их наличие и/или динамика изменения).

При выборе суррогатной конечной точки следует исходить из цели ее применения. Она может служить заменой стандартных методов оценки зрительной функции (оценка полей зрения или остроты зрения) или оценки функционального состояния зрения (например, чтение или ориентирование в пространстве) [3].

Применение суррогатной конечной точки должно быть обосновано в случае, если она используется для выбора определенной популяции пациентов (например, пациенты с потенциально более выраженной восприимчивостью к терапии). Еще одна область возможного использования суррогатной конечной точки — ограничение количества субъектов исследования или продолжительности исследования в том случае, если исследуемая терапия предположительно позволяет добиться более быстрого клинического эффекта, чем стандартные методы.

Ниже будут рассмотрены конечные точки, которые могут использоваться в клинических исследованиях препаратов для лечения наиболее распространенных и влияющих на качество жизни офтальмологических заболеваний (глаукома, возрастная макулярная дегенерация, увеит, синдром сухого глаза).

КОНЕЧНЫЕ ТОЧКИ В ИССЛЕДОВАНИЯХ ПРОТИВОГЛАУКОМНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Первичная открытоугольная глаукома представляет собой группу нейродегенеративных заболеваний с характерными изменениями в слое ганглиозных клеток сетчатки, диске зрительного нерва, которые сопровождаются сужением полей зрения.

На сегодняшний день сложилось мнение, что уровень внутриглазного давления (ВГД) — основной критерий, использующийся при оценке степени риска глаукомного поражения. Однако превышение верхней границы установленной нормы ВГД не всегда свидетельствует о диагнозе, поскольку у пациентов с нормотензивной глаукомой изменения диска зрительного нерва и полей зрения отмечаются и при показателях ВГД, соответствующих норме [4]. Также отсутствует прямая корреляция между повышенным ВГД и исходами заболевания. У некоторых пациентов при наличии высоких показателей офтальмотонуса могут отсутствовать глаукомные изменения в течение многих лет [5].

Достоверно показано, что повышение ВГД оказывает отрицательное влияние на ширину полей зрения, однако проведение местной гипотензивной терапии при глаукоме не гарантирует отсутствия дальнейшего сужения полей зрения. В ряде случаев гипотензивный эффект препарата ярко выражен, но развивающиеся на фоне его приема нежелательные явления снижают воздействие на клинический результат терапии. И наоборот, лекарственные средства, которые характеризуются менее выраженным гипотензивным эффектом, могут оказывать положительное влияние на поля зрения вследствие наличия дополнительных механизмов действия [6]. Несмотря на то что измерение ВГД широко применяется для оценки эффективности противоглаукомных препаратов, в литературе отсутствуют данные о валидации этого параметра в качестве суррогатной конечной точки.

Одним из стандартных методов исследования при глаукоме наряду с оценкой ВГД является компьютерная периметрия. Анализ результатов производится на основании индексов, которые позволяют получить информацию о суммарной потере светочувствительности, влиянии катаракты на результат исследования, степени влияния на поля зрения локальных дефектов и другие параметры. Высокая корреляция результатов, полученных при проведении у больных глаукомой оптической когерентной томографии, с данными компьютерной периметрии и конфокальной офтальмоскопии подтверждается многочисленными исследованиями (см., например, [7, 8]). Однако проведение только компьютерной периметрии, без применения дополнительных методов исследования, не позволяет в полной мере осуществлять контроль за динамикой зрительных функций у больных глаукомой, а применяемые в ходе исследования индексы на сегодняшний день не подходят для использования как суррогатные конечные точки для оценки глаукоматозной нейродегенерации, поскольку позволяют получить лишь ограниченные данные о динамике заболевания у конкретного пациента.

Конфокальная сканирующая лазерная офтальмоскопия относится к дополнительным методам

диагностики пациентов с глаукомой. Метод позволяет получить трехмерное изображение структур заднего отрезка глазного яблока, а также объективные, подлежащие измерению данные об анатомических структурах глазного дна: диаметре и глубине экскавации диска зрительного нерва, площади и объеме нейроретинального пояса, толщине слоя нервных волокон сетчатки. Получение достоверных данных с помощью конфокальной сканирующей лазерной офтальмоскопии затруднено, поскольку в ходе проведения обследования требуется вручную выделять границы диска зрительного нерва и оценивать стереометрические параметры, основываясь на базисной плоскости. Размеры дисков зрительных нервов отличаются высокой индивидуальной вариабельностью, следствием чего является значительный разброс в оценке данных как у здоровых людей, так и у пациентов с изменениями полей зрения, что не позволяет рекомендовать показатели, полученные с помощью данного метода исследования, в качестве конечных точек.

Таким образом, оценка динамики изменения зрительных функций при глаукоме в рамках клинических исследований требует комплексного подхода и не приемлет выбора единой конечной точки, позволяющей оптимизировать диагностический поиск и получить исчерпывающую характеристику состояния органа зрения при этом заболевании.

КОНЕЧНЫЕ ТОЧКИ В ИССЛЕДОВАНИЯХ ПРЕПАРАТОВ, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫХ ДЛЯ ТЕРАПИИ УВЕИТОВ

Внутриглазное воспаление (увеит) является одной из ведущих причин слепоты: на его долю приходится от 5 до 20% случаев в развитых странах и 25% в развивающихся странах [9]. Заболевания, при которых воспалительный процесс локализуется в сосудистой оболочке глаза, представляют собой серьезную терапевтическую проблему, учитывая неоднородность заболеваний спектра увеита и необходимость в индивидуально подобранной терапии. Патогенетические особенности увеитов различной этиологии имеют минимальные различия, несмотря на многообразие триггеров внутриглазного воспаления [10, 11].

Стандартная противовоспалительная или иммунодепрессивная терапия при увеитах характеризуется высокой эффективностью, но ее существенными недостатками являются отсутствие специфичности и частое возникновение системных побочных эффектов. С развитием экспериментальной и клеточной биологии появились сведения о нескольких ассоциированных с увеитом биомаркерах, например об определенных гаплотипах главного комплекса гистосовместимости (HLA). Показано также, что ряд увеитов ассоциированы с выработкой специфических цитокинов. Таким образом, цитокины признаны потенциальными биологическими

маркерами некоторых внутриглазных воспалительных заболеваний, однако особенности их применения в диагностике и лечении увеитов требуют дальнейшего изучения [11]. Выявлена потенциальная взаимосвязь наличия биомаркеров и течения специфических форм увеита, однако отсутствуют убедительные доказательства причинно-следственной связи между ними. До сих пор не определено, является ли выявление воспалительных цитокинов маркером наличия заболевания [12].

Необходимо отметить, что основной проблемой широкого диагностического поиска, основанного на выявлении биомаркеров во внутриглазной жидкости, является высокая стоимость таких исследований. Именно это обстоятельство ограничивает подбор индивидуального лечения при системных заболеваниях, одним из проявлений которых является увеит.

В клинических исследованиях препаратов, предназначенных для лечения передних увеитов, оценка эффективности терапии проводится на основании наличия и динамики изменений признаков воспалительной реакции в передней камере глаза. В случае задних увеитов главным показателем эффективности терапии является помутнение стекловидного тела, так как именно этот симптом отражает интенсивность воспаления и в большинстве случаев может использоваться в качестве основной конечной точки. Однако при промежуточном или заднем увеите степень помутнения стекловидного тела не обязательно коррелирует с тяжестью течения заболевания. Многие формы увеита могут протекать без снижения остроты зрения или с минимальными ее изменениями, поэтому признано, что параметр «максимально скорректированная острота зрения» нечувствителен и не может являться подходящей первичной конечной точкой эффективности в исследованиях лекарственных препаратов, предназначенных для лечения увеита.

Таким образом, в отношении увеитов сохраняется потребность в введении в практику клинических исследований конечных точек, которые могли бы обеспечить всестороннюю оценку течения внутриглазного воспаления, например комплексных показателей, включающих как структурные изменения (отек желтого пятна, воспалительные изменения сосудов сетчатки), так и оценку симптомов непосредственно пациентом.

КОНЕЧНЫЕ ТОЧКИ В ИССЛЕДОВАНИЯХ ПРЕПАРАТОВ, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫХ ДЛЯ ТЕРАПИИ ВОЗРАСТНОЙ МАКУЛЯРНОЙ ДЕГЕНЕРАЦИИ

Возрастная макулярная дегенерация (ВМД) является одним из заболеваний, ведущих к прогрессирующему и необратимому снижению зрительных функций. Клиническая картина заболевания разнообразна и может включать следующие признаки: образование друз, изменения в пигментном

эпителии сетчатки (гипопигментация или гиперпигментация), географическая атрофия пигментного эпителия (ГА) и хориокапиллярного слоя, неоваскулярная макулопатия, субретинальный фиброз. Характерным симптомом макулярной дегенерации являются выраженные нарушения центрального зрения: снижение остроты зрения, изменение цветовосприятия, искажение предметов. Изменения периферического зрения нехарактерны, поэтому пациент не теряет способности ориентироваться в пространстве [12, 13].

При выборе конечных точек при исследовании препаратов для лечения сухой формы ВМД, сопровождающейся ГА, наиболее подходящими были признаны анатомические параметры, например изменение площади ГА или объема друзы [12]. В некоторых исследованиях II и III фазы с участием пациентов с ГА в качестве основного критерия оценки было выбрано увеличение области атрофического поражения [13]. Прогностическое значение влияния площади области ГА на зрительную функцию подтверждено данными научной литературы, поэтому оценка распространенности ГА может быть использована в качестве первичной конечной точки при изучении эффективности лекарственного препарата.

Вторичные клинически значимые критерии эффективности терапии ВМД могут включать максимально скорректированную остроту зрения, контрастную чувствительность, скорость чтения, периметрию.

Оценка функциональных характеристик зрения имеет не менее важное значение для клинических исследований, направленных на получение дополнительной информации о соотношении риска и пользы терапии у пациентов с нарушением центрального зрения. В 2016 г. Европейским агентством по лекарственным средствам было опубликовано письмо об использовании таких параметров, как скорость чтения и индекса функциональной независимости чтения (Functional Reading Independence Index, FRI) в качестве одного из критериев оценки эффективности лекарственных средств, предназначенных для лечения пациентов с ГА¹. Индекс функциональной независимости чтения дает возможность получить представление о взаимосвязи между размерами ГА и функциональным состоянием зрения и изучить потенциальное влияние лечения на скорость чтения. Однако применение индекса в практике клинических исследований требует получения дополнительных сведений о его чувствительности и точности, а также проведения долгосрочной оценки влияния лучше видящего глаза на полученные результаты.

Скорость чтения также может быть использована как один из инструментов для подтверждения лечебного эффекта в отношении уменьшения площади географической атрофии. В настоящее время ведутся исследования возможностей применения

этого диагностического маркера, однако требуется время для того, что получить представление о параметрах индекса FRI, таких как критерии клинически значимого изменения, влияние вариабельности, взаимосвязь между расположением очага поражения и скоростью чтения, степень влияния сопутствующих факторов, выявление потенциальных эффектов обучения, адекватность стандартизации, согласованность с другими функциональными показателями¹.

Результаты оценки зрительных функций по опроснику National Eye Institute 25-Item Visual Function Questionnaire (NEI VFQ-25) широко используются в клинических исследованиях офтальмологических препаратов в качестве многокомпонентной конечной точки [13]. Так, в исследовании ANCHOR использование опросника NEI VFQ-25 помогло установить, что лечение неоваскулярной ВМД с помощью интравитреального введения ингибитора фактора роста сосудистого эндотелия ранибизумаба позволяет добиться более значимого улучшения зрительных функций по сравнению с фотодинамической терапией [14]. В 2000 г. был разработан опросник для изучения качества жизни пациентов с ВМД — Macular Degeneration Quality of Life (MacDQoL) [15, 16]. В отличие от ранее применявшихся опросников он учитывает изменения каждого оцениваемого параметра в связи с развитием макулодистрофии. Были доказаны надежность MacDQoL и его корреляция с объективными показателями зрительных функций, такими как острота зрения для дали и для близи, контрастная чувствительность [15].

В исследовании J.A. Sahel и соавт. [17] с помощью опросника оценивали влияние остроты зрения лучше и хуже видящего глаза на качество жизни пациентов с возрастной макулярной дегенерацией. Было установлено, что качество жизни определяется остротой зрения обоих глаз, как лучше, так и хуже видящего. Кроме того, было показано, что и MacDQoL, и NEI-VFQ-25 как специализированные офтальмологические опросники демонстрируют корреляцию с тяжестью ВМД.

Однако применение опросника NEI VFQ-25 возможно не для всех показаний и не характеризуется специфичностью по отношению к конкретной патологии, что не позволяет рассматривать его результаты в качестве суррогатной конечной точки.

В 2016 г. получил одобрение проект MACUSTAR [18]. Целью исследования является определение и валидация диагностических параметров, которые могут быть использованы для обнаружения малозаметных изменений течения различных стадий возрастной макулярной дегенерации. Проведение клинических исследований в рамках проекта предполагает длительное (в течение 3 лет) медицинское

сопровождение более 700 пациентов с возрастной макулярной дегенерацией и контроль течения заболевания, включающий применение методов визуализации структур глазного дна, оценку остроты зрения, учет результатов опросников, заполняемых пациентами. Получение указанной информации позволит оценить как возможность отследить изменения, которые могут иметь прогностическое значение, так и взаимосвязь между полученными данными и качеством жизни пациента. Еще одним направлением поиска в рамках исследования является выявление факторов риска, наличие которых вызывает более быстрое прогрессирование заболевания у ряда пациентов.

КОНЕЧНЫЕ ТОЧКИ В ИССЛЕДОВАНИЯХ ПРЕПАРАТОВ, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫХ ДЛЯ ТЕРАПИИ СИНДРОМА СУХОГО ГЛАЗА

Синдром сухого глаза (ССГ) представляет собой воспалительное заболевание, характеризующееся дискомфортом в глазах, нарушениями зрения, нестабильностью слезной пленки, повышенной осмолярностью слезы и воспалением. Диагностика ССГ затруднена в связи с многофакторным характером заболевания [19, 20]. Разработка фармакологических методов лечения также затруднена вследствие отсутствия объективных показателей для оценки результатов клинических исследований новых видов терапии. Поскольку воспаление является ключевым компонентом синдрома, исследования слезной жидкости, направленные на поиск конечных точек для клинических исследований, включали определение маркеров слезы, свидетельствующих о воспалительном характере заболевания, таких как цитокины/хемокины, факторы роста, муцины, нейромедиаторы и липиды.

Протеомный подход для обнаружения конечных точек, отражающих динамику изменения симптомов, составляющих ССГ, в слезной жидкости с помощью 2D-электрофореза и дифференциального гель-электрофореза, был использован S.V. Aluru и соавт. [21]. Авторы обнаружили, что выработка протеина 4, богатого пролином лизоцима (LPRR4), значительно подавляется при некоторых типах ССГ. На основании различий в экспрессии и корреляции уровней LPRR4 в слезной жидкости с тяжестью заболевания этот белок был предложен в качестве потенциального биомаркера ССГ [21].

Было обнаружено, что содержание лизоцима и лактоферрина снижается у пациентов с синдромом Шегрена и/или глаукомой (с сопутствующим хроническим медикаментозно индуцированным ССГ) с более высокой специфичностью (95%) и чувствительностью (72%) лактоферрина по сравнению с лизоцимом. За последние десятилетия получило значительное развитие использование тест-системы

¹ Letter of support for reading speed and functional reading independence (FRI) index in geographic atrophy. EMA/727910/2016. EMA; 2016.

для идентификации цитокинов, хемокинов и хемокиновых рецепторов в качестве биомаркеров слезной жидкости. Повышение уровней IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, IL-21, интерферона-гамма (IFN- γ), фактора некроза опухоли альфа (TNF- α), CXCL9, CXCL10, CXCL11, IL-1Ra, CCL5/RANTES характерно для пациентов с различными формами ССГ [22].

Отмечается корреляция между количественным содержанием цитокинов и хемокинов и тяжестью ССГ при ассоциированном с синдромом Шегрена ССГ в сравнении с аналогичными показателями у пациентов с ССГ, не ассоциированным с синдромом Шегрена. Для пациентов с ССГ характерна также повышенная экспрессия протеазы MMP-9, участвующей в индукции повреждения глазной поверхности и воспалительной передаче сигналов [23].

Необходимо отметить, что повышение активности MMP-9 не специфично для ССГ, поскольку при акантамебном и герпетическом кератите, а также у пациентов с глазными формами розacea также отмечается повышение ее содержания. В то же время было показано, что уровни MMP-9 коррелируют с тяжестью заболевания и могут применяться для оценки его течения [23].

Таким образом, показатели качественного состава и количественного содержания различных биомаркеров в слезной жидкости могут быть использованы для проведения дифференциальной диагностики между Шегрен-ассоциированными и другими патогенетическими вариантами ССГ, а также для определения степени тяжести процесса. Однако отсутствие стандартизации, сложность проведения анализа и малый объем слезной жидкости, доступный для забора пробы, ограничивают применение указанных методов как в рутинной клинической практике, так и в ходе разработки новых методов терапии ССГ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Широко применяемые в клинических исследованиях офтальмологических препаратов конечные точки (динамика изменения максимально корригированной остроты зрения, динамика изменения уровня внутриглазного давления, динамика изменения полей зрения) могут быть не релевантны в связи с недостаточной специфичностью при наиболее распространенных глазных заболеваниях. Поиск информации в научной литературе позволил выявить перспективные конечные точки для таких заболеваний, как синдром сухого глаза (биомаркеры слезной жидкости), возрастная макулярная дегенерация (скорость чтения и индекс функциональной независимости чтения). Однако указанные конечные точки на настоящий момент не нашли применения в рамках клинических исследований, что не позволяет оптимизировать процедуру оценки эффективности и безопасности новых офтальмологических лекарственных препаратов и расширить терапевтические подходы к лечению прогрессирующих заболеваний органа зрения, существенно влияющих на качество жизни пациентов.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00005-21-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121021800098-4).

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00005-21-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121021800098-4).

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest. The author declares no conflict of interest requiring disclosure in this article.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther.* 2001;69(3):89–95. <https://doi.org/10.1067/Mcp.2001.113989>
2. Waldman S, Terzic A. Targeted diagnostics and therapeutics for individualized patient management. *Biomark Med.* 2007;1(1):3–8. <https://doi.org/10.2217/17520363.1.1.3>
3. Wickstrom K, Moseley J. Biomarkers and surrogate endpoints in drug development: a European regulatory view. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2017;58(6):BIO27–BIO33. <https://doi.org/10.1167/iov.17-21778>
4. Киселева ОА, Балацкая НВ, Бессмертный АМ, Котелин ВИ. Возможности диагностики и мониторинга оптической нейропатии при первичной открытоугольной глаукоме. Сообщение 1. *Российский офтальмологический журнал.* 2019;12(2):74–82. [Kiseleva OA, Balatskaya NV, Bessmertny AM, Kotelin VI. Facilities of diagnosis and monitoring of optic neuropathy in primary open-angle glaucoma. Part 1. *Rossiyskiy oftal'mologicheskyy zhurnal = Russian Ophthalmological Journal.* 2019;12(2):74–82 (In Russ.)] <https://doi.org/10.21516/2072-0076-2019-12-2-74-82>
5. Shields MB. Normal-tension glaucoma: is it different from primary open-angle glaucoma? *Curr Opin Ophthalmol.* 2008;19(2):85–8. <https://doi.org/10.1097/ICU.0b013e3282f3919b>
6. Kass MA, Heuer DK, Higginbotham EJ, Johnson CA, Keltner JL, Miller JP, et al. The Ocular Hypertension Treatment Study: a randomized trial determines that topical ocular hypotensive medication delays or prevents the onset of primary open-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol.* 2002;120(6):701–13; discussion 829–30. <https://doi.org/10.1001/archoph.120.6.701>
7. Krupin T, Liebmann JM, Greenfield DS, Ritch R, Gardiner S. A randomized trial of brimonidine versus timolol in preserving visual function: results from the Low-Pressure Glaucoma Treatment Study. *Am J Ophthalmol.* 2011;151(4):671–81. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2010.09.026>
8. Cvenkel B, Kontestabile AS. Correlation between nerve fibre layer thickness measured with spectral domain OCT and visual field in patients with different stages of glaucoma. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2011;249(4):575–84. <https://doi.org/10.1007/s00417-010-1538-z>
9. Егоров ЕА, Курмангалиева ММ, Федотовских ГВ. Морфологическое исследование сетчатки глаз больных глаукомой. *Клиническая офтальмология.* 2004;5(2):54–6. [Egorov EA, Kurmangalieva MM, Fedotovskikh GV. Morphological study of the retina of patients with glaucoma. *Klinicheskaya oftal'mologiya = Clinical Ophthalmology.* 2004;5(2):54–6 (In Russ.)]
10. Gritz DC, Wong IG. Incidence and prevalence of uveitis in Northern California; the Northern California Epidemiology of Uveitis Study.

- Ophthalmology*. 2004;111(3):491–500; discussion 500. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2003.06.014>
11. Caspi R. Autoimmunity in the immune privileged eye: pathogenic and regulatory T cells. *Immunol Res*. 2008;42(1–3):41–50. <https://doi.org/10.1007/s12026-008-8031-3>
 12. Luger D, Caspi RR. New perspectives on effector mechanisms in uveitis. *Semin Immunopathol*. 2008;30(2):135–43. <https://doi.org/10.1007/s00281-008-0108-5>
 13. Sunness JS, Margalit E, Srikumaran D, Applegate CA, Tian Y, Perry D, et al. The long-term natural history of geographic atrophy from age-related macular degeneration: enlargement of atrophy and implications for interventional clinical trials. *Ophthalmology*. 2007;114(2):271–7. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2006.09.016>
 14. Bressler NM, Chang TS, Fine JT, Dolan CM, Ward J. Improved vision-related function after ranibizumab vs photodynamic therapy: a randomized clinical trial. *Arch Ophthalmol*. 2009;127(1):13–21. <https://doi.org/10.1001/archophth.2008.562>
 15. Mitchell J, Wolffsohn JS, Woodcock A, Anderson SJ, McMillan CV, Ffytche T, et al. Psychometric evaluation of the MacDQoL individualized measure of the impact of macular degeneration on quality of life. *Health Qual Life Outcomes*. 2005;3:25. <https://doi.org/10.1186/1477-7525-3-25>
 16. Mitchell J, Wolffsohn J, Woodcock A, Anderson SJ, Ffytche T, Rubinstein M, et al. The MacDQoL individualized measure of the impact of macular degeneration on quality of life: reliability and responsiveness. *Am J Ophthalmol*. 2008;146(3):447–54. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2008.04.031>
 17. Sahel JA, Bandello F, Augustin A, Maurel F, Negrini C, Berdeaux GH. Health-related quality of life and utility in patients with age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol*. 2007;125(7):945–51. <https://doi.org/10.1001/archophth.125.7.945>
 18. Finger RP, Schmitz-Valckenberg S, Schmid M, Rubin GS, Dunbar H, Tufail A, et al. MACUSTAR: Development and clinical validation of functional, structural, and patient-reported endpoints in intermediate age-related macular degeneration. *Ophthalmologica*. 2019;241(2):61–72. <https://doi.org/10.1159/000491402>
 19. Moore JE, Graham JE, Goodall EA, Dartt DA, Leccisotti A, McGilligan VE, Moore TC. Concordance between common dry eye diagnostic tests. *Br J Ophthalmol*. 2009;93(1):66–72. <https://doi.org/10.1136/bjo.2007.131722>
 20. Nichols KK, Nichols JJ, Mitchell GL. The lack of association between signs and symptoms in patients with dry eye disease. *Cornea*. 2004;23(8):762–70. <https://doi.org/10.1097/01.icc.0000133997.07144.9e>
 21. Aluru SV, Agarwal S, Srinivasan B, Iyer GK, Rajappa SM, Tatu U, et al. Lacrimal proline rich 4 (LPRR4) protein in the tear fluid is a potential biomarker of dry eye syndrome. *PLoS One*. 2012;7(12):e51979. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051979>
 22. D'Souza S, Tong L. Practical issues concerning tear protein assays in dry eye. *Eye Vis (Lond)*. 2014;1:6. <https://doi.org/10.1186/s40662-014-0006-y>
 23. Hagan S, Martin E, Enriquez-de-Salamanca A. Tear fluid biomarkers in ocular and systemic disease: potential use for predictive, preventive and personalized medicine. *EPMA J*. 2016;7(1):15. <https://doi.org/10.1186/s13167-016-0065-3>

ОБ АВТОРЕ / AUTHOR

Комарова Марина Олеговна. Marina O. Komarova. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0065-4990>

Статья поступила 12.04.2021

После доработки 15.07.2021

Принята к печати 20.09.2021

Article was received 12 April 2021

Revised 15 July 2021

Accepted for publication 20 September 2021

АКТУАЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

О рекомендации Экспертного комитета по лекарственным средствам Евразийской экономической комиссии № 14 от 21 июля 2021 г.

До перехода на Фармакопею ЕАЭС в документах по качеству допускаются ссылки на фармакопеи стран Союза — к такому решению пришли члены Экспертного комитета по лекарственным средствам, утвердив рекомендации по указанию ссылок на фармакопеи в нормативном документе по качеству лекарственного препарата при проведении экспертизы регистрационного досье. Документ принят с учетом обращений представителей фармацевтического бизнеса.

Согласно принятому документу, в разделе «Методы (методики) испытаний» спецификации нормативного документа по качеству в случае отсутствия необходимой статьи в Фармакопее ЕАЭС следует указывать ссылки на соответствующие статьи всех государственных фармакопей государств — членов Евразийского экономического союза (а также фармакопей, которые разрешены к использованию в государствах — членах Евразийского экономического союза в соответствии с законодательством этих государств), в которых планируется обращение лекарственного препарата. Заявителям и экспертным организациям следует руководствоваться согласованным подходом в отношении указания ссылок на общие и частные фармакопейные статьи, не включенные в Фармакопею ЕАЭС.

Публикуется по: Фармпром.РФ от 18 августа 2021 г.¹

¹ <https://pharmprom.ru/do-perexoda-na-farmakopeyu-eaes-v-dokumentax-po-kachestvu-dopuskayutsya-ssylki-na-farmakopei-stran-coyuza/>

Анализ витамина А в поливитаминных препаратах

А. С. Алексеева, Т. Б. Шемерянкина, М. Н. Лякина, М. С. Смирнова,
Е. П. Федорова*, С. Д. Кахраманова

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. Витамин А в поливитаминных лекарственных препаратах представлен преимущественно в виде эфиров ретинола: ретинола ацетата, ретинола пальмитата, а также бетакаротена — предшественника (димера) ретинола, содержащегося в растениях и способного превращаться в ретинол в клетках печени. В составе лекарственных средств ретинол анализируется преимущественно методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с предварительной очисткой и выделением витамина методом жидкостной экстракции. Однако в научной литературе встречаются и другие способы подготовки пробы и анализа этих соединений. Важным аспектом является также разделение витамина А с другими жирорастворимыми витаминами, которые наряду с витамином А входят в состав поливитаминных препаратов. Цель работы — анализ и обобщение данных литературы о современных методах определения витамина А и его производных в лекарственных препаратах. Проведен анализ номенклатуры препаратов, содержащих витамин А и зарегистрированных в Российской Федерации, а также методов анализа, используемых согласно нормативной документации производителей этих препаратов. Показано, что наиболее распространенным методом анализа эфиров ретинола является ВЭЖХ в изократическом режиме элюирования на октадецилсилильных сорбентах в обращенно-фазовом режиме, реже на аминопропилсилильных сорбентах в нормально-фазовом режиме элюирования. Бетакаротен в лекарственных средствах определяется преимущественно методом спектрофотометрии.

Ключевые слова: ВЭЖХ; ретинол; бетакаротен; ретинола ацетат; ретинола пальмитат; лекарственные формы; нормативная документация производителей лекарственных средств

Для цитирования: Алексеева АС, Шемерянкина ТБ, Лякина МН, Смирнова МС, Федорова ЕП, Кахраманова СД. Анализ витамина А в поливитаминных препаратах. *Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2021;11(3):174–184. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2021-11-174-184>

* Контактное лицо: Федорова Елена Павловна; fedorovaep@expmed.ru

Analysis of Vitamin A in Multivitamin Products

A. S. Alekseeva, T. B. Shemeryankina, M. N. Lyakina, M. S. Smirnova,
E. P. Fedorova*, S. D. Kakhramanova

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

Abstract. Vitamin A is present in multivitamin products mainly in the form of retinol esters: retinyl acetate, retinyl palmitate, and beta carotene—retinol precursor (dimer) found in plants, which is capable of converting into retinol in liver cells. Retinol is determined in medicinal products primarily by high performance liquid chromatography (HPLC), with preliminary purification and vitamin isolation by liquid-liquid extraction. However, scientific literature also describes other methods of sample preparation and analysis of such compounds. An important issue is differentiation of vitamin A from other fat-soluble vitamins often included as components in multivitamin products. The aim of the study was to analyse and summarise data on current methods used for determination of vitamin A and its derivatives in medicinal products. The authors analysed the range of vitamin A products authorised in the Russian Federation, and the test methods described in their product specification files. The study demonstrated that the test method most often used for determination of retinol esters was HPLC with isocratic elution mode using octadecylsilyl packing in the reverse-phase mode, and, less frequently, aminopropylsilyl packing in the normal phase mode. Determination of beta carotene in medicinal products is most often performed using spectrophotometry.

Key words: HPLC; retinol; beta carotene; retinyl acetate; retinyl palmitate; dosage forms; product specification files

For citation: Alekseeva AS, Shemeryankina TB, Lyakina MN, Smirnova MS, Fedorova EP, Kakhramanova SD. Analysis of vitamin A in multivitamin products. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya* = *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2021;11(3):174–184. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2021-11-174-184>

* Corresponding author: Elena P. Fedorova; fedorovaep@expmed.ru

Симптомы дефицита витамина А были описаны еще в папирусе Эберса (1500 г. до н. э.) и Лондонском медицинском папирусе. Однако первые исследования витаминов, их свойств и биологической активности появились только в конце XIX века. В 1906–1913 гг. проводились исследования, позволившие обнаружить в спиртовом экстракте молока, сливочном масле и яичном желтке жирорастворимый фактор, стимулирующий рост экспериментальных животных [1]. В результате дальнейших исследований структуры каротиноидов и ретиноидов и витаминно-зависимых процессов в организме была показана роль ретиналя в образовании зрительных пигментов. В конце 1940-х гг. О. Isler и соавт. синтезировали полностью *транс*-ретинол [цит. по 1], что позволило широко использовать его как в пищевых продуктах, так и в лекарственных препаратах. Для изучения метаболизма витамина А и его количественного определения используются различные химические и физико-химические методы анализа [2, 3].

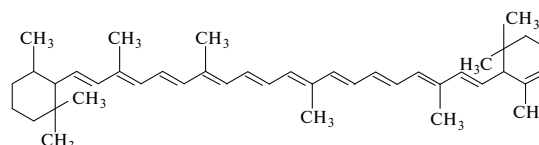
Цель работы — анализ и обобщение данных литературы о современных методах определения

витамина А и его производных в лекарственных препаратах.

Для достижения поставленной цели необходимо было установить, в каких лекарственных формах встречается витамин А в поливитаминных препаратах, а также провести анализ литературы и нормативной документации производителей (отечественных/зарубежных), выпускающих препараты, содержащие витамин А.

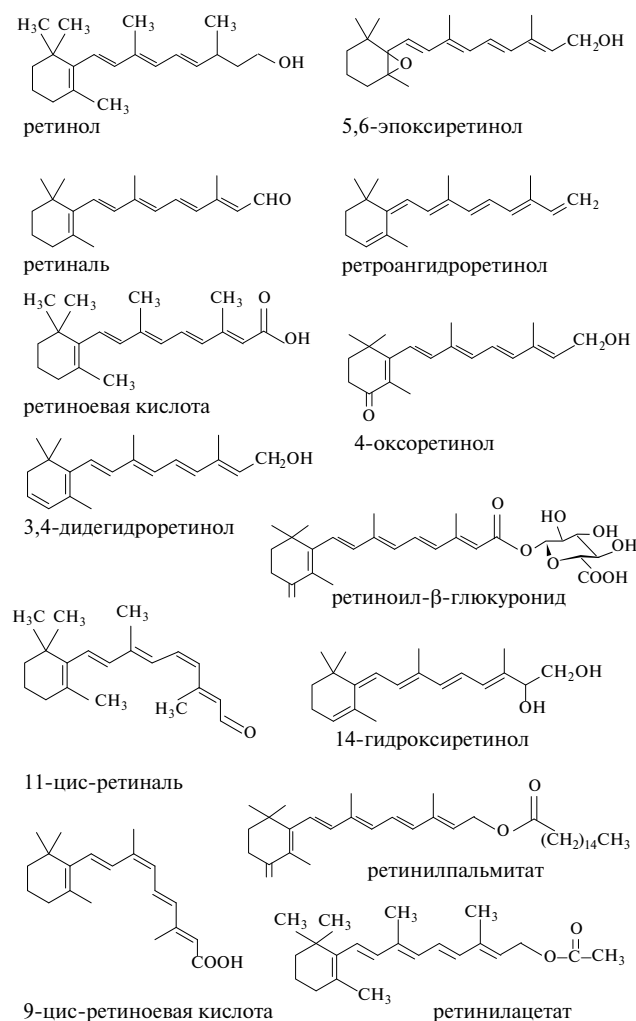
Витамин А — группа близких по химическому строению веществ, которая включает ретинол (витамин А₁, аксерофтол, полностью *транс*-ретинол) и другие ретиноиды, обладающие сходной биологической активностью: дегидроретинол (витамин А₂), ретиналь (ретинен, альдегид витамина А₁) и ретиновую кислоту [1]. В природе витамин А в основном встречается в виде сложного эфира — ретинола, хорошо растворимого в органических растворителях и не растворимого в водных растворах. Структура и названия основных соединений группы витамина А представлены на схеме.

Провитамин А состоит из каротиноидов, в том числе α-каротина и β-криптоксантина, которые синтезируются исключительно растениями. Основным провитамином А является бетакаротен (β-каротин):



Из него в клетках слизистой оболочки кишечника и печени в результате окислительного расщепления при воздействии фермента каротиндиоксигеназы образуется ретинол. Бетакаротен нерастворим в воде, но растворяется в органических растворителях (как и ретинол) и зарегистрирован в качестве пищевой добавки Е160а [4]. Известно около 500 каротиноидов (α- и β-каротин, лютеин, ликопин, зеаксантин и т. п.), которые находят применение в медицине [5].

Бетакаротен является мощным антиоксидантом, характеризуется иммуностимулирующим и адаптогенным действием [6]. При приеме внутрь бетакаротен усваивается организмом всего на 25–33% и превращается в ретинол только 1/7 часть всосавшегося каротина. Один эквивалент ретинола равен 6 мкг бетакаротена, где 1 мкг = 3,33 МЕ [7]. Как было отмечено Д. Д. Панковым и соавт., в отличие от лекарственных препаратов, из пищи усваивается не более 15–20% витамина. Ни один из продуктов не может восполнить дефицит витамина А, поэтому в случае его дефицита необходим его дополнительный прием в виде лекарственных препаратов [8]. Однако во многих исследованиях была выявлена неоднозначная роль применения высоких доз бетакаротена. Показано



Схема

отсутствие влияния синтетического бетакаротена на снижение риска сердечно-сосудистых заболеваний или рака у людей с полноценным питанием. Повышенный риск развития рака легких у курильщиков связывают, в том числе, с применением бетакаротена в составе пищевых добавок [6, 9, 10].

Ретинол (истинный витамин А) в чистом виде нестабилен, поэтому производится и используется в виде полностью *транс*-ретинола ацетата и полностью *транс*-ретинола пальмитата (табл. 1). Как сложные эфиры эти соединения обладают более высокой стабильностью и лучшей растворимостью в жирах и в липофильных компонентах препаратов. Эфиры ретинола могут быть также включены в желатиновую матрицу, которая защищает их от окисления на какой-то период времени, даже если они подверглись термическому воздействию.

Для анализа витамина А и его аналогов в лекарственных препаратах является пригодным методом и широко применяется нормально-фазовая и/или обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) с ультрафиолетовым (аналитическая длина волны — 325 нм), флуориметрическим или масс-спектрометрическим детектором [1, 11, 12].

При нормально-фазовом варианте ВЭЖХ элюируют сначала гидрофобные соединения, а затем — более полярные соединения, тогда как в обращенно-фазовом варианте наблюдается обратный порядок элюирования. Изомеры ретинола лучше всего разделяются методом нормально-фазовой хроматографии, тогда как эфиры ретинола лучше разделяются при использовании обращенно-фазового варианта. Каротиноиды также могут быть успешно проанализированы методом ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектором, как пра-

вило, при длине волны 450 нм; ретиноиды — при длинах волн, соответствующих максимуму их спектра поглощения.

К другим возможным методам анализа ретинола и его эфиров следует отнести флуориметрию, основанную на регистрации интенсивности их зеленовато-желтой флуоресценции [13]. Поскольку и другие природные соединения способны флуоресцировать (например, витамин К₁), для обеспечения необходимой специфичности методики обычно используют хроматографическое разделение смеси с помощью ВЭЖХ или других методов.

Газовая хроматография с масс-спектрометрией была использована на селективных капиллярных колонках для изучения кинетики ретинола, в частности распределения дейтерированного ретинола в организме [14]. Кроме того, при исследовании бетакаротена, меченного углеродом-13, масс-спектрометрия изотопных отношений позволила получить важную информацию о его метаболизме у человека.

Колориметрическое/спектрофотометрическое определение [2, 15, 16] основано на измерении оптической плотности окрашенного комплекса, образующегося в результате дегидратации витамина А в присутствии кислот Льюиса при длине волны 620 нм и снижении поглощения при 325 нм при инактивации витамина А УФ-излучением. Для ряда лекарственных препаратов используются именно спектрофотометрические методики количественного определения эфиров ретинола и бетакаротена.

Биологические тесты анализа ретинола описаны в научной литературе и используются, когда не удастся выбрать другие подходящие химические или физико-химические методы. Ряд биологических

Таблица 1. Свойства и характеристики *транс*-ретинола и его эфиров (по R. B. Rucker и соавт. [1], с изменениями)

Table 1. Properties and characteristics of *trans*-retinol and its esters (adapted from R. B. Rucker et al. [1])

Свойства Properties	Ретинол Retinol	Ретинола ацетат Retinyl acetate	Ретинола пальмитат Retinyl palmitate
Формула Formula	C ₂₀ H ₃₀ O	C ₂₂ H ₃₂ O ₂	C ₃₆ H ₆₀ O ₂
Молекулярная масса Molecular weight	286,44	328,48	524,84
Температура плавления, °C Melting point, °C	63–64	57–59	28–29
Удельный показатель поглощения (E _{1cm} ^{1%}) в 2-пропанол Specific absorbance (E _{1cm} ^{1%}) in 2-propanol	1820	1530	960
Максимум поглощения в 2-пропанол, нм Maximum absorbance in 2-propanol, nm	325	326	326
Флуоресценция: Fluorescence:			
Длина волны возбуждения, нм Excitation wavelength, nm	325	325	325
Длина волны эмиссии, нм Emission wavelength, nm	470	470	470

методов основан на реакции роста экспериментальных животных в ответ на поступление витамина А в организм животного, однако эти процедуры в настоящее время используются редко. Для измерения биологической активности и токсичности ретиноидов могут использоваться системы клеточных культур [1].

Поскольку, согласно данным литературы, наиболее распространенным методом анализа и разделения ретинола и его эфиров является ВЭЖХ, были проанализированы условия определения ретинола в исследованиях, проводимых с различными целями (табл. 2).

Кроме того, были проанализированы нормативные документы, регламентирующие анализ витамина А в премиксах методом ВЭЖХ (табл. 3).

Также были проанализированы методы и условия проведения испытаний для витамина А методом ВЭЖХ, описанные в монографиях Европейской фармакопеи и Фармакопеи США (табл. 4). Было установлено, что в данных источниках под витамином А также подразумеваются ретинола ацетат и пальмитат. Бетакаротен анализируется отдельно как самостоятельная субстанция.

Согласно исследованиям, описанным в большинстве проанализированных источников,

Таблица 2. Условия анализа ретинола, описанные в публикациях

Table 2. Retinol determination conditions described in scientific literature

Авторы и год выхода публикации Authors and date of publication	Цель исследования Aim of the study	Условия ВЭЖХ HPLC conditions
D. D. Bankson, R. M. Russell, J. A. Sadowski, 1986 [17]	Совместный анализ четырех основных эфиров ретинола в виде единого пика с последующим пересчетом на ретинола ацетат Simultaneous analysis of the four major retinol esters coeluting as a single peak with subsequent recalculation with reference to retinyl acetate	НФ: LiChrosorb Si 60 125×4 мм, 5 мкм (нормально-фазовая хроматография); предколонка LiChrosorb Si 60 30×4 мм, 10 мкм; ПФ А: диоксан–гексан (5:1000); ПФ Б: диоксан (градиентное элюирование с линейным увеличением доли ПФ Б после 1 мин анализа); скорость ПФ: 2,5 мл/мин; детектор: УФ, 325 нм Column: LiChrosorb Si 60 125×4 mm, 5 µm (normal-phase chromatography); pre-column: LiChrosorb Si 60 30×4 mm, 10 µm; Mobile phase A: dioxane–hexane (5:1000); Mobile phase B: dioxane (gradient elution with a linear increase in the proportion of Mobile phase B starting from minute 1 after the injection); Flow rate: 2.5 mL/min; Detector: UV, 325 nm
E. J. Johnson, S. D. Krasinski, et al., 1992 [18]	Определение ретинола отдельно от его эфиров Determination of retinol separately from its esters	Условия аналогичны использованным в работе [18] The same conditions as above [18]
S. Scalia, G. Ruberto, F. Bonina, 1995 [19]	Выделение ретинола, токоферола и их эфиров (ацетата или пальмитата) из матриц таблеток с использованием сверхкритической жидкостной экстракции. Экстракция лекарственной формы в среде углекислого газа при температуре 40 °С и давлении 250 атм. Isolation of retinol and tocopherol and their acetate or palmitate esters from tablets using supercritical fluid extraction. Carbon dioxide extraction of the dosage form at 40 °C and at the pressure of 250 atm.	НФ: Lichrospher CH-8, 250×4 мм, 5 мкм; ПФ: метанол–ацетонитрил (75:25); скорость ПФ: 1,3 мл/мин; концентрация каждого витамина: 10 мг/мл; растворитель: тетрагидрофуран; детектор: УФ, витамин Е — 280 нм, витамин А — 325 нм Column: Lichrospher CH-8, 250×4 mm; 5 µm; Mobile phase: methanol–acetonitrile (75:25); Flow rate: 1.3 mL/min; Concentration of each vitamin: 10 mg/mL; Solvent: tetrahydrofurane; Detector: UV, 280 nm — vitamin E, 325 nm — vitamin A
L. H. Wang, S. H. Huang, 2002 [20]	Разделение и определение витаминов А, Е, К и D в сыворотке крови телят, косметических и лекарственных средствах, лекарственных растениях Separation and determination of vitamins A, E, K, and D in bovine serum, cosmetic products, pharmaceutical products, Chinese herbs	НФ: Hypersil ODS 250×4,6 мм, 5 мкм; ПФ: ацетонитрил–дихлорметан–метанол (60:20:20); скорость ПФ: 1,0 мл/мин; детектор: УФ, 325 и 267 нм; время анализа: 12–14 мин; объем пробы: 25 мкл Column: Hypersil ODS 250×4.6 mm, 5 µm; Mobile phase: acetonitrile–dichlormethane–methanol (60:20:20) Flow rate: 1.0 mL/min; Detector: UV, 325 and 267 nm; Run time: 12–14 min; Injection volume: 25 µL

Продолжение таблицы 2
Table 2 (continued)

Авторы и год выхода публикации Authors and date of publication	Цель исследования Aim of the study	Условия ВЭЖХ HPLC conditions
L. A. Kozhanova, G. A. Fedorova, G. I. Baram, 2002 [21]	Определение витаминов А и Е в поливитаминных препаратах (в присутствии витаминов В ₁ и В ₂ , никотиновой кислоты, никоти-намида, пантотеновой кислоты, фолиевой кислоты, витаминов В ₆ , В ₁₂ , К ₃ , D ₂ и D ₃ , биотина) Determination of vitamins A and E in multivitamin products (which also contain vitamins B ₁ and B ₂ , nicotinic acid, nicotinamide, panto-thenic acid, folic acid, vitamins B ₆ , B ₁₂ , K ₃ , D ₂ and D ₃ , biotin)	НФ: Nucleosil 100–5 C18 75×2 мм, 5 мкм; ПФ: ацетонитрил–вода (95:5); скорость ПФ: 100 мкл/мин; температура колонки: 35 °С; объем пробы: 2–10 мкл; детектор: УФ, 260, 270, 280, 290, 300 и 320 нм Column: Nucleosil 100–5 C18 75×2 mm, 5 μm; Mobile phase: acetonitrile–water (95:5); Flow rate: 100 μL/min; Column temperature: 35 °C; Injection volume: 2–10 μL; Detector: UV, 260, 270, 280, 290, 300, and 320 nm
Q. Midttun, P. M. Ueland, 2011 [22]	Определение ретинола, эргокальциферола, колекальциферола и α-токоферола в плазме крови человека Determination of retinol, ergo-calciferol, cholecalciferol, and α-tocopherol in human plasma	НФ: Ascentis Express C18 50×4,6 мм, 2,7 мкм; ПФ А: 0–4 мин 2,5 мМ аммония формиата в метаноле; ПФ Б: 4,1–5,0 мин метанол–вода (80:20); температура колонки: 55 °С; время удерживания ретинола 1,69 мин; скорость ПФ: 1,1 мл/мин; детектор: МС/МС с электрораспылением Column: Ascentis Express C18 50 4.6 mm, 2.7 μm; Mobile phase A: 0–4 min 2.5 mM ammonium formate in methanol; Mobile phase B: 4.1–5.0 min methanol–water (80:20); Column temperature: 55 °C; Retention time: retinol = 1.69 min; Flow rate: 1.1 mL/min; Detector: electrospray MS/MS
Z. Temova-Rakuza, E. Srećnik, R. Roskar, 2017 [23]	Одновременное определение вита-минов D ₃ , токоферола ацетата, К ₁ , β-каротина, ретинола пальмитата и кофермента Q10 Simultaneous determination of vi-tamin D ₃ , tocopherol acetate, K ₁ , β-carotene, retinyl palmitate, and coenzyme Q10	НФ: Luna C18 150×4,6 мм, 5 мкм; ПФ: ацетонитрил–тетрагидрофуран–вода (50:45:5); скорость ПФ: 1 мл/мин; объем пробы: 20 мкл; детектор: УФ, 270 нм; время анализа: 8 мин Column: Luna C18 150×4.6 mm, 5 μm; Mobile phase: acetonitrile–tetrahydrofuran–water (50:45:5); Flow rate: 1 mL/min; Injection volume: 20 μL; Detector: UV, 270 nm; Run time: 8 min
R. Cruz Quiroz, N. Chotyakul et al., 2020 [24]	Анализ аскорбиновой кислоты, ретинола, β-каротина и α-токоферола в цельном молоке после термической обработки под давлением (ПАТР) Analysis of ascorbic acid, retinol, β-carotene, and α-tocopherol in whole milk subjected to pressure-assisted thermal processing (PATP)	НФ: Phenomenex Luna C18 150×4,6 мм, 5 мкм; предколонка: 4×2 мм, 5 мкм; ПФ: ацетонитрил–метанол (65:35); скорость ПФ: 1 мл/мин; температура колонки: 35 °С; объем пробы: 100 мкл для α-токоферола, ретинола и β-каротина; детектор: УФ, 245, 296, 326 и 450 нм; время анализа: 30 мин Column: Phenomenex Luna C18 150×4.6 mm, 5 μm; pre-column: 4×2 mm, 5 μm; Mobile phase: acetonitrile–methanol (65:35); Flow rate: 1 mL/min; Column temperature: 35 °C; Injection volume: 100 μL for α-tocopherol, retinol, and β-carotene; Detector: UV, 245, 296, 326, and 450 nm; Run time: 30 min

Примечание. ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография; НФ — неподвижная фаза; ПФ — подвижная фаза; УФ — ультрафиолетовый; МС — масс-спектрометр.

Note. HPLC—high performance liquid chromatography; UV—ultraviolet; MS—mass spectrometer.

Таблица 3. Условия анализа ретинола методом ВЭЖХ согласно государственным стандартам (ГОСТ)

Table 3. Conditions of retinol HPLC determination described in the national standards

Наименование и номер ГОСТ National standard	Наименование методики по ГОСТ Test procedure included in the standard	Условия ВЭЖХ HPLC conditions
ГОСТ 32043–2012 ¹ Премиксы. Методы определения витаминов А, D, E GOST 32043–2012 ¹ Premixes. Methods for determination of vitamins A, D, E	Определение витаминов А (ретинола ацетата), Е (токоферола ацетата) методом обращенно-фазовой ВЭЖХ Determination of vitamins A (retinyl acetate) and E (tocopherol acetate) by reversed phase HPLC	НФ: колонка хроматографическая одного из размеров: 2×64, 2×80 или 2×120 мм, с числом теоретических тарелок не менее 4000, заполненная одним из следующих сорбентов: Силасорб С18, Силасорб SPH C18, Сепарон C18; ПФ: ацетонитрил–пропанол–вода (42:50:8); скорость ПФ: 0,15 мл/мин; объем пробы: 6 мкл; детектор: УФ, 328 нм Column: 2×64, 2×80, or 2×120 mm, number of theoretical plates not less than 4,000, packed with one of the following packing materials: Silasorb C18, Silasorb SPH C18, Separon C18; Mobile phase: acetonitrile–propanol–water (42:50:8); Flow rate: 0.15 mL/min; Injection volume: 6 µL; Detector: UV, 328 nm
	Омыление анализируемой пробы премикса водно-спиртовым раствором калия гидроксида, экстракции витаминов А (ретинола ацетата), D (эргокальциферола), Е (токоферола ацетата) гексаном с анализом нормально-фазовой ВЭЖХ и пересчетом содержания витамина D ₂ (эргокальциферола) на D ₃ (холекальциферол) Saponification of the tested premix sample with hydroalcoholic solution of potassium hydroxide, extraction of vitamins A (retinyl acetate), D (ergocalciferol), E (tocopherol acetate) with hexane, analysis by normal phase HPLC, and subsequent recalculation of vitamin D ₂ (ergocalciferol) content with reference to D ₃ (cholecalciferol)	НФ: Сепарон SGX 150×3 мм, 7 мкм; ПФ: гексан–этанол (99,5:0,5); скорость ПФ: 0,5–2,0 мл/мин; объем пробы: 3–20 мкл; детектор: УФ, витамины А, Е — 289 нм, витамин D ₂ — 254 нм Column: Separon SGX 150×3 mm, 7 µm; Mobile phase: hexane–ethanol (99.5:0.5); Flow rate: 0.5–2.0 mL/min; Injection volume: 3–20 µL; Detector: UV, 289 nm — vitamins A, E, 254 nm — vitamin D ₂
ГОСТ 26573.1–93 ² Премиксы. Методы определения витамина А GOST 26573.1–93 ² Premixes. Methods for determination of vitamin A	Определение витамина А методом обращенно-фазовой ВЭЖХ после экстрагирования из премикса смесью 2-пропанол–вода (97:3) Determination of vitamin A by reversed phase HPLC after extraction from premix with 2-propanol–water (97:3)	НФ: колонка хроматографическая одного из размеров: 2×64, 2×80 или 2×120 мм с числом теоретических тарелок не менее 4000, заполненная одним из следующих сорбентов: Силасорб С18, Силасорб SPH C18, Сепарон C18; ПФ: ацетонитрил–2-пропанол–вода (42:50:8); скорость ПФ: 0,15 мл/мин; объем пробы: 6 мкл; детектор: УФ, 328 нм Column: 2×64, 2×80, or 2×120 mm, number of theoretical plates not less than 4,000, packed with one of the following packing materials: Silasorb C18, Silasorb SPH C18, Separon C18; Mobile phase: acetonitrile–2-propanol–water (42:50:8); Flow rate: 0.15 mL/min; Injection volume: 6 µL; Detector: UV, 328 nm

Примечание. ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография; НФ — неподвижная фаза; ПФ — подвижная фаза; УФ — ультрафиолетовый.

Note. HPLC—high performance liquid chromatography; UV—ultraviolet.

для анализа ретинола и его эфиров предлагается использовать метод обращенно-фазовой ВЭЖХ; в качестве неподвижной фазы, как правило, используется октадецилсилильный, октилсилильный, реже аминопропилсилильный силикагель. В качестве подвижной фазы — неводная фаза, как изократическое элюирование, так

и градиентное элюирование, причем для разделения жирорастворимых витаминов А, D, Е, К возможно использование изократического режима. Также в результате анализа источников можно отметить преимущества сверхкритической жидкостной экстракции в пробоподготовке и выделении витамина А.

¹ ГОСТ 32043–2012. Премиксы. Методы определения витаминов А, D, Е. М.: Стандартинформ; 2013.

² ГОСТ 26573.1–93. Премиксы. Методы определения витамина А. М.: Стандартинформ; 1994.

Таблица 4. Условия анализа ретинола согласно Европейской фармакопее и Фармакопее США

Table 4. Retinol determination conditions described in the European Pharmacopoeia and the United States Pharmacopoeia

Фармакопея Pharmacopoeia	Название монографии и характеристика лекарственных препаратов Monographs and product characteristics	Условия ВЭЖХ HPLC conditions
Фармакопея США ³ United States Pharmacopoeia ³	«Витамин А, жидкость для перорального применения» — эмульсии, суспензии или растворы, содержащие ретинола ацетат или ретинола пальмитат, в количестве, эквивалентном 90,0–120,0% от заявленного содержания ретинола (C ₂₀ H ₃₀ O) “Vitamin A Oral Liquid Preparation”, an emulsion, suspension, or solution that contains retinyl acetate or retinyl palmitate in an amount equivalent to 90.0–120.0% of the labeled amount of retinol (C ₂₀ H ₃₀ O)	НФ: силикагель аминопропилсилильный для хроматографии, 150×4,6 мм, 3 мкм; ПФ: гексан; скорость ПФ: 1 мл/мин; объем пробы: 40 мкл; детектор: УФ, 325 нм Column: aminopropylsilyl silica gel for chromatography, 150×4.6 mm, 3 μm; Mobile phase: hexane; Flow rate: 1 mL/min; Injection volume: 40 μL; Detector: UV, 325 nm
	«Таблетки витамина А» содержат ретинола ацетат или ретинола пальмитат в количестве, эквивалентном 95,0–120,0% от заявленного содержания ретинола (C ₂₀ H ₃₀ O) “Vitamin A Tablets” contain retinyl acetate or retinyl palmitate in an amount equivalent to 95.0–120.0% of the labeled amount of retinol (C ₂₀ H ₃₀ O)	Вариант 1: изократическое элюирование в условиях, описанных для жидких форм витамина А. Вариант 2: градиентное элюирование НФ: силикагель октадецилсилильный для хроматографии, 100×4,6 мм, 3 мкм; ПФ А: метанол–вода (90:10); ПФ Б: метанол–2-пропанол (55:45), линейное увеличение доли ПФ Б от 0 до 100% за первые 8 мин анализа; скорость ПФ: 1 мл/мин; объем пробы: 20 мкл; детектор: УФ, 325 нм Procedure 1: isocratic elution under the conditions described for liquid forms of vitamin A. Procedure 2: gradient elution. Column: octadecylsilyl silica gel for chromatography 100×4.6 mm, 3 μm; Mobile phase A: methanol–water (90:10); Mobile phase B: methanol–2-propanol (55:45), a linear increase in the proportion of Mobile phase B from 0 to 100% in the first 8 minutes after the injection; Flow rate: 1 mL/min; Injection volume: 20 μL; Detector: UV, 325 nm
Европейская фармакопея ⁴ European Pharmacopoeia ⁴	«Концентрат витамина А (масляная форма) синтетический»; «Концентрат витамина А (солюбилизат/эмульсия) синтетический»; «Концентрат витамина А (порошок) синтетический» “Vitamin A concentrate (oily form), synthetic”; “Vitamin A concentrate (solubilisate/emulsion) synthetic”; “Vitamin A concentrate (powder form), synthetic”	НФ: силикагель октадецилсилильный для хроматографии, 125×4,0 мм, 5 мкм; ПФ: вода–метанол (5:95); скорость ПФ: 1 мл/мин; объем пробы: 10 мкл; детектор: УФ, 325 нм; время удерживания ретинола около 3 мин; время анализа: 1,5-кратное от времени удерживания пика ретинола Column: octadecylsilyl silica gel for chromatography, 125×4.0 mm, 5 μm; Mobile phase: water–methanol (5:95); Flow rate: 1 mL/min; Injection volume: 10 μL; Detector: UV, 325 nm; Retention time: retinol about 3 min; Run time: 1.5 times the retention time of retinol

Примечание. ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография; НФ — неподвижная фаза; ПФ — подвижная фаза; УФ — ультрафиолетовый.

Note. HPLC—high performance liquid chromatography; UV—ultraviolet.

В исследование были включены 54 лекарственных препарата, зарегистрированных в Российской Федерации⁵, содержащих витамин А и/или бетакаротен (оказывает А-витаминоподобное действие и применяется также для профилактики и лечения

дефицита витамина А). Из них 43 препарата содержали ретинола ацетат или ретинола пальмитат. Преимущественно препараты относились к группе «Поливитамины» и «Поливитамины+Минералы» (табл. 5).

³ United States Pharmacopoeia. 42nd ed. Rockville, MD; 2019.

⁴ European Pharmacopoeia. 10th ed. Strasbourg: EDQM; 2019.

⁵ <https://grls.rosminzdrav.ru>

При анализе номенклатуры препаратов, содержащих витамин А, было установлено, что наиболее распространенной лекарственной формой являются «таблетки, покрытые пленочной оболочкой». Реже всего встречается витамин А в составе лекарственных форм: «капли для приема внутрь», «лиофилизат для приготовления растворов для внутривенного введения», «раствор для местного и наружного применения», «таблетки шипучие» (табл. 6).

Были проанализированы нормативные документы производителей зарегистрированных на территории Российской Федерации поливитаминных препаратов, содержащих эфиры ретинола и бетакаротен. В этой группе препаратов наиболее широко

представлены витамины отечественного производства и США. Реже встречаются витамины производства Сербии, Словении, Великобритании, Германии, Швейцарии, Турции, Белоруссии, Италии и Франции (табл. 7).

В результате анализа нормативной документации производителей препаратов витамина А было выявлено, что ретинола ацетат/пальмитат в поливитаминных препаратах определяют преимущественно методом обращенно-фазовой ВЭЖХ (с одновременным определением токоферола ацетата); бетакаротен определяют преимущественно методом спектрофотометрии в видимой области (табл. 8).

Таблица 5. Формы витамина А в препаратах, зарегистрированных в Российской Федерации

Table 5. Vitamin A forms used in medicinal products authorised in the Russian Federation

Форма витамина А в препарате Vitamin A form used in the product	Количество препаратов Number of products
Бетакаротен Beta carotene	11
Ретинола ацетат Retinyl acetate	18
Ретинола пальмитат Retinyl palmitate	15
Ретинола ацетат + Бетакаротен Retinyl acetate + Beta carotene	8 (из них в 3 препаратах оба компонента нормируются суммарно) 8 (the total content of the two components is controlled in 3 out of 8 products)
Ретинола ацетат и/или ретинола пальмитат Retinyl acetate and/or retinyl palmitate	2

Таблица 6. Многокомпонентные лекарственные препараты, содержащие витамин А, и их лекарственные формы

Table 6. Multi-component products containing vitamin A, and their dosage forms

Лекарственная форма Dosage form	Количество наименований препара- тов, содержащих эфиры ретинола и бетакаротен Number of products containing retinol esters and beta carotene	Количество наименований препа- ратов содержащих только ретинола ацетат/пальмитат Number of products containing only retinyl acetate/palmitate
Драже Dragee	3	3
Капли для приема внутрь Oral drops	1	1
Лиофилизат для приготовления раствора для внутривенного введения Lyophilisate for solution for intravenous administration	1	1
Капсулы Capsules	10	2
Мазь для наружного применения Cutaneous ointment	2	2
Раствор для местного и наружного применения Solution for topical administration	1	1
Сироп для детей Syrup for children	1	1
Таблетки, покрытые пленочной оболочкой Film-coated tablets	17	16
Таблетки жевательные Chewable tablets	7	6
Таблетки, покрытые оболочкой Coated tablets	9	9
Таблетки шипучие Effervescent tablets	1	1

Так как наиболее распространенным методом анализа эфиров ретинола является ВЭЖХ, были проанализированы соответствующие ВЭЖХ-методики определения эфиров ретинола в препаратах (табл. 9) и выявлены следующие особенности:

- наиболее распространенным режимом элюирования при анализе эфиров ретинола в поливитаминных препаратах является изократический;
- из возможных сорбентов преимущественно используется силикагель октадецилсилильный (С18);
- наиболее часто используемой подвижной фазой является метанол;
- помимо обращенно-фазового варианта хроматографии достаточно часто используется нормально-фазовая хроматография с сочетанием аминопропилсилильного силикагеля в качестве

неподвижной фазы и гексана в качестве подвижной фазы.

ВЫВОДЫ

1. На основании проведенных информационно-аналитических исследований установлено, что лекарственные препараты на основе ретинола ацетата, ретинола пальмитата представлены преимущественно в лекарственной форме «таблетки» отечественного и зарубежного производства и относятся к группам: «Поливитамины», «Поливитамины+минералы», «Поливитамины+прочие препараты».

2. Наиболее часто используемым аналитическим методом для установления подлинности и содержания ретинола и его эфиров

Таблица 7. Страны, в которых производятся препараты витамина А, зарегистрированные на отечественном рынке

Table 7. Countries that produce multivitamin products containing vitamin A, which are authorised in the Russian Federation

Страны, витамины которых представлены на отечественном рынке Countries that produce vitamins which are authorised in Russia	Количество наименований препаратов, содержащих эфиры ретинола и бетакаротен Number of products containing retinol esters and beta carotene	Количество наименований препаратов, содержащих только эфиры ретинола Number of products containing only retinol esters
Россия / Russia	34	34
США / USA	13	9
Словения / Slovenia	7	6
Белоруссия / Republic of Belarus	5	1
Великобритания / United Kingdom	4	2
Италия / Italy	3	3
Германия / Germany	2	2
Сербия / Serbia	1	1
Швейцария / Switzerland	1	1
Турция / Turkey	1	1
Франция / France	1	1

Таблица 8. Методы определения витаминов группы А в препаратах, зарегистрированных в Российской Федерации

Table 8. Test methods used for vitamin A determination in products authorised in Russia

Метод определения Test method	Анализируемое вещество Test substance	
	Бетакаротен Beta carotene	Ретинола ацетат/пальмитат Retinyl acetate/palmitate
СФМ/колориметрия Spectrophotometry/colorimetry	13	8/1
ВЭЖХ HPLC	3	22
ВЭЖХ или СФМ HPLC or spectrophotometry	—	3
ВЭЖХ, одновременно с токоферола ацетатом HPLC, with simultaneous determination of tocopherol acetate	2	17
ВЭЖХ, одновременно с колекальциферолом HPLC, with simultaneous determination of cholecalciferol	—	1
ВЭЖХ, одновременно с токоферола ацетатом и колекальциферолом HPLC, with simultaneous determination of tocopherol acetate and cholecalciferol	—	3
ВЭЖХ, одновременно с бутилгидрокситолуолом и бутилгидроксианизолом HPLC, with simultaneous determination of butylhydroxytoluene and butylhydroxyanisole	—	1

Примечание. ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография; СФМ — спектрофотометрия.

Note. HPLC—high performance liquid chromatography;

Таблица 9. Наиболее частые сочетания неподвижной и подвижной фаз, используемые при анализе эфиров ретинола методом ВЭЖХ согласно нормативной документации производителей лекарственных средств
Table 9. The most frequent combinations of HPLC stationary and mobile phases used for retinol esters determination, according to product specification files

Неподвижная и подвижная фазы Stationary phase Mobile phase	Изократическое элюирование Isocratic elution	Градиентное элюирование Gradient elution
НФ: силикагель аминопропилсилильный ПФ: гексан Stationary phase: aminopropylsilyl silica gel Mobile phase: hexane	9	—
НФ: C8 ПФ: метанол—вода (98:2) Stationary phase: C8 Mobile phase: methanol-water (98:2)	1	—
НФ: C18 ПФ: метанол—вода (98:2) Stationary phase: C18 Mobile phase: methanol-water (98:2)	2	—
НФ: C18 ПФ: метанол Stationary phase: C18 Mobile phase: methanol	14	—
НФ: C18 ПФ: 2-пропанол—ацетонитрил (1:1) Stationary phase: C18 Mobile phase: 2-propanol-acetonitrile (1:1)	4	—
НФ: C8 ПФ: ацетонитрил—метанол—диоксан—вода (700:300:40:55) Stationary phase: C8 Mobile phase: acetonitrile-methanol-dioxane-water (700:300:40:55)	3	—
НФ: Силикагель 60 ПФ: диоксан-1-октанол-гексан (2:1:97) Stationary phase: silica gel 60 Mobile phase: dioxane-1-octanol-hexane (2:1:97)	1	—
НФ: C18; C8 ПФ: сочетания липофильных растворителей с водой и буферными растворами Stationary phase: C18; C8 Mobile phase: combinations of lipophilic solvents with water and buffers	—	9

Примечание. ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография; НФ — неподвижная фаза; ПФ — подвижная фаза.
Note. HPLC—high performance liquid chromatography.

является обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография (возможно одновременное определение с токоферола ацетатом); бетакаротен в лекарственных средствах определяется преимущественно методом спектрофотометрии.

3. При анализе условий определения ретинола методом ВЭЖХ было выявлено, что чаще всего применяется изократический режим элюирования, среди сорбентов преимущественно используется силикагель октадецилсилильный (C18).

4. Полученные результаты могут быть использованы при подготовке проектов фармакопейных статей на лекарственные препараты из группы «Поливитамины», «Поливитамины+минералы», содержащие ретинол.

Вклад авторов. А. С. Алексеева — сбор материалов, анализ и систематизация полученных данных, написание текста

статьи; Т. Б. Шемерянкина — разработка концепции работы, участие в анализе и систематизации данных, интерпретация результатов работы; М. Н. Лякина — редактирование текста, утверждение окончательного варианта статьи для публикации; М. С. Смирнова — сбор данных литературы; Е. П. Федорова — редактирование текста; С. Д. Кахраманова — сбор данных литературы, редактирование текста.

Authors' contributions. Anastasia S. Alekseeva—compilation of materials, analysis and systematisation of the obtained data, writing of the text; Tatiana B. Shemeryankina— elaboration of the study concept, participation in analysis and systematisation of the obtained data, interpretation of the study results; Marina N. Lyakina—editing of the text, approval of the final version of the paper for publication, Maria S. Smirnova—compilation of literature data; Elena P. Fedorova—editing of the text; Sabina D. Kakhramanova— compilation of literature data, editing of the text.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00005-21-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121021800098-4).

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00005-21-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121021800098-4).

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

- Rucker RB, Suttie JW, McCormick DB, eds. *Handbook of Vitamins*. 3rd ed. New York: Taylor & Francis; 2001.
- Ambar, Asghar M, Ameen F, Al-Nadhari S, Waseem A, Yaqoob M, et al. A flow injection chemiluminescence method for the determination of retinol in pharmaceutical formulations by using luminol-diperiodatoargentate (III) reaction. *J Nutr Sci Vitaminol*. 2020;66(1):10–8. <https://doi.org/10.3177/jnsv.66.10>
- Furr HC. Analysis of retinoids and carotenoids: problems resolved and unsolved. *J Nutr*. 2004;134(1):281S–5S. <https://doi.org/10.1093/jn/134.1.281S>
- Конькова ЮВ, Мамаев АВ, Родина НД. Сливочное масло с функциональным обогащением каротиноидсодержащим препаратом растительного происхождения. *Наука и хозяйство*. 2014;(5):71–2. [Kon'kova YuV, Mamaev AV, Rodina ND. Functionally enriched butter with a carotene-containing herbal preparation. *Nauka i khozyaistvo = Science and Economy*. 2014;(5):71–2 (In Russ.)]
- Мирзабекова КА. Возрастная макулярная дегенерация: профилактика и лечение. Обзор. *Офтальмология*. 2014;11(2):4–9. [Mirzabekova KA. Age-related macular degeneration: prevention and treatment. A review. *Oftal'mologiya = Ophthalmology in Russia*. 2014;11(2):4–9 (In Russ.)]
- Patrick L. Beta-carotene: the controversy continues. *Altern Med Rev*. 2000;5(6):530–45. PMID: 11134976
- Громова ОА, Торшин ИЮ, Тетрашвили НК, Коденцова ВМ, Рудаков КВ. Витамин А в акушерстве: фундаментальные и клинические исследования. *Медицинский алфавит*. 2019;1(1):59–69. [Gromova OA, Torshin IYu, Tetruashvili NK, Kodentsova VM, Rudakov KV. Vitamin A in obstetrics: basic and clinical research. *Meditinskiy alfavit = Medical Alphabet*. 2019;1(1):59–69 (In Russ.)] [https://doi.org/10.33667/2078-5631-2019-1-1\(376\)-59-69](https://doi.org/10.33667/2078-5631-2019-1-1(376)-59-69)
- Панков ДД, Ковригина ЕС, Ключникова ИВ, Панков ДД (мл.). Применение бета-каротина в комплексной терапии острых респираторных инфекций у детей. *Вопросы практической педиатрии*. 2011;6(2):102–6. [Pankov DD, Kovrigina ES, Klyuchnikova IV, Pankov DD (Jr.). Use of beta-carotene in complex therapy of acute respiratory infections in children. *Voprosy prakticheskoy pediatrii = Clinical Practice in Pediatrics*. 2011;6(2):102–6 (In Russ.)]
- Pryor WA, Stahl W, Rock CL. Beta carotene: from biochemistry to clinical trials. *Nutr Rev*. 2000;58(2 Pt 1):39–53. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2000.tb07810.x>
- Omenn GS, Goodman GE, Thornquist MD, Balmes J, Cullen MR, Glass A, et al. Risk factors for lung cancer and for intervention effects in CARET, the Beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial. *J Natl Cancer Inst*. 1996;88(21):1550–9. <https://doi.org/10.1093/jnci/88.21.1550>
- Zhang Y, Zhou W, Yan J, Liu M, Zhou Y, Shen X, et al. A review of the extraction and determination methods of thirteen essential vitamins to the human body: an update from 2010. *Molecules*. 2018;23(6):1484. <https://doi.org/10.3390/molecules23061484>
- Weinmann AR, Oliveira MS, Jorge SM, Martins AR. Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of retinol by fluorometry and of tocopherol by ultraviolet absorbance in the serum of newborns. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 1999;729(1–2):231–6. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(99\)00155-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(99)00155-3)
- Wu SC, Capomacchia AC, Price JC. Fluorometric determination of all-trans retinol in rat serum. *J Pharm Sci*. 1981;70(6):685–7. <https://doi.org/10.1002/jps.2600700630>
- Tang G, Qin J, Dolnikowski G. Deuterium enrichment of retinol in humans determined by gas chromatography electron capture negative chemical ionization mass spectrometry. *J Nutr Biochem*. 1998;9(7):408–14. [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(98\)00026-6](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(98)00026-6)
- Jadoon S, Malik A, Qazi MH, Aziz M. Spectrophotometric method for the determination of Vitamin A and E using Ferrozine-Fe(II) complex. *Asian J Res Chem*. 2013;6(4):334–40.
- Zasada M, Budzisz E, Kolodziejaska J, Kalinowska-Lis U. An evaluation of the physicochemical parameters and the content of the active ingredients in original formulas containing retinol. *J Cosmet Dermatol*. 2020;19(9):2374–83. <https://doi.org/10.1111/jocd.13286>
- Bankson DD, Russell RM, Sadowski JA. Determination of retinyl esters and retinol in serum or plasma by normal-phase liquid chromatography: method and applications. *Clin Chem*. 1986;32(1 Pt 1):35–40. <https://doi.org/10.1093/clinchem/32.1.35>
- Johnson EJ, Krasinski SD, Howard LJ, Alger SA, Dutta SK, Russell RM. Evaluation of vitamin A absorption by using oil-soluble and water-miscible vitamin A preparations in normal adults and in patients with gastrointestinal disease. *Am J Clin Nutr*. 1992;55(4):857–64. <https://doi.org/10.1093/ajcn/55.4.857>
- Scalia S, Ruberto G, Bonina F. Determination of vitamin A, vitamin E and their esters in tablet preparations using supercritical fluid extraction and HPLC. *J Pharm Sci*. 1995;84(4):433–6. <https://doi.org/10.1002/jps.2600840409>
- Wang LH, Huang SH. Determination of vitamins A, D, E, and K in human and bovine serum, and β -Carotene and vitamin A palmitate in cosmetic and pharmaceutical products, by isocratic HPLC. *Chromatographia*. 2002;55(5–6):289–96. <https://doi.org/10.1007/BF02491661>
- Kozhanova LA, Fedorova GA, Baram GI. Determination of water- and fat-soluble vitamins in multivitamin preparations by high-performance liquid chromatography. *J Anal Chem*. 2002;57(1):40–5. <https://doi.org/10.1023/A:1013657607698>
- Midtun Q, Ueland PM. Determination of vitamins A, D and E in a small volume of human plasma by a high-throughput method based on liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2011;25(14):1942–8. <https://doi.org/10.1002/rcm.5073>
- Temova-Rakuza Z, Srećnik E, Roskar R. Novel HPLC-UV method for simultaneous determination of fat-soluble vitamins and coenzyme Q10 in medicines and supplements. *Acta Chim Slov*. 2017;64(3):523–9. <https://doi.org/10.17344/acsi.2016.2856>
- De la Cruz Quiroz R, Chotyakul N, Saraiva J, Perez-Lamela C, Torres JA. Retention of ascorbic acid, retinol, β -carotene, and α -tocopherol in milk subjected to pressure-assisted thermal processing (PATP). *Food Eng Rev*. 2020. <https://doi.org/10.1007/s12393-020-09242-z>

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Алексеева Анастасия Сергеевна, канд. фарм. наук. *Anastasia S. Alekseeva*, Cand. Sci. (Pharm.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-6094-8990>
Шемерянкина Татьяна Борисовна, канд. фарм. наук. *Tatiana B. Shemeryankina*, Cand. Sci. (Pharm.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-3720-9687>

Лякина Марина Николаевна, доктор фарм. наук. *Marina N. Lyakina*, Dr. Sci (Pharm.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-8220-1054>

Смирнова Мария Сергеевна. *Maria S. Smirnova*. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-0305-5934>

Федорова Елена Павловна, канд. фарм. наук. *Elena P. Fedorova*, Cand. Sci. (Pharm.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-4499-2190>

Кахраманова Сабина Джейхуновна. *Sabina D. Kakhramanova*. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-8160-7829>

Статья поступила 28.05.2021

После доработки 05.08.2021

Принята к печати 20.09.2021

Article was received 28 May 2021

Revised 5 August 2021

Accepted for publication 20 September 2021

Анализ фолиевой кислоты в поливитаминных препаратах методом обращенно-фазовой ВЭЖХ

А. С. Алексеева^{1*}, М. В. Гаврилин³, Т. Б. Шемерянкина¹, М. С. Смирнова¹,
Е. П. Федорова¹, Т. М. Каргина¹, О. О. Новиков², С. А. Ковалева², Н. Н. Бойко²

¹ 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

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
«Российский университет дружбы народов»,
Миклухо-Маклая ул., д. 6, Москва, 117198, Российская Федерация

³ Общество с ограниченной ответственностью «Фармакор Продакшн»,
Репищева ул., д. 14, Санкт-Петербург, 197378, Российская Федерация

Резюме. Поливитаминные препараты, содержащие фолиевую кислоту, значительно различаются по своему составу. Предлагаемые производителями методы и условия анализа фолиевой кислоты также различаются, в связи с чем необходима унификация методик анализа фолиевой кислоты для близких по составу препаратов. **Цель работы:** сравнение результатов апробации методик анализа фолиевой кислоты в поливитаминных препаратах методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии в изократическом режиме подачи подвижной фазы. **Материалы и методы:** хроматограф жидкостный Agilent 1260 Infinity II LC с диодно-матричным детектором, аналитическая длина волны 280 нм. Колонки хроматографические с неподвижной фазой на основе силикагеля с привитыми группами C8 и C18. Режим подачи подвижной фазы — изократический. Модельные смеси, содержащие фолиевую кислоту, цианокобаламин, железа сульфат и калия йодид. **Результаты:** наименьшие значения относительного стандартного отклонения площади пика фолиевой кислоты ($RSD = 0,09\%$) и фактора асимметрии пика ($A_s = 1,04$) отмечены при анализе модельной смеси «железа сульфат+фолиевая кислота+цианокобаламин» на колонке 250×4,0 мм с силикагелем октилсилильным (C8) эндкепированным с использованием в качестве подвижной фазы смеси метанол — фосфатный буферный раствор pH 6,6 (12:88) при температуре 25 °С. Показана возможность одновременного определения примеси птероевой кислоты в данных условиях анализа и осаждения мешающих ионов железа при использовании в качестве растворителя пробы раствора, содержащего этилендиаминтетрауксусную кислоту, с pH 9,5. **Выводы:** при выборе оптимальной унифицированной методики анализа фолиевой кислоты в комплексных препаратах можно рекомендовать метод обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии. Для проверки пригодности хроматографической системы рекомендуется использовать раствор, содержащий фолиевую и птероевую кислоты.

Ключевые слова: фолиевая кислота; ВЭЖХ; поливитаминные препараты; фактор асимметрии; относительное стандартное отклонение; эффективность хроматографической колонки

Для цитирования: Алексеева АС, Гаврилин МВ, Шемерянкина ТБ, Смирнова МС, Федорова ЕП, Каргина ТМ, Новиков ОО, Ковалева СА, Бойко НН. Анализ фолиевой кислоты в поливитаминных препаратах методом обращенно-фазовой ВЭЖХ. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2021;11(3):185–192. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2021-11-2-185-192>

* Контактное лицо: Алексеева Анастасия Сергеевна; AlekseevaAS@expmed.ru

Determination of Folic Acid in Multivitamin Preparations by Reversed Phase HPLC

A. S. Alekseeva^{1*}, M. V. Gavrilin³, T. B. Shemeryankina¹, M. S. Smirnova¹, E. P. Fedorova¹,
T. M. Kargina¹, O. O. Novikov², S. A. Kovaleva², N. N. Boyko²

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

² Peoples' Friendship University of Russia
6 Miklukho-Maklaya St., Moscow 117198, Russian Federation

³ "Pharmacor Production", Ltd.,
14 Repishcheva St., St.-Petersburg 197378, Russian Federation

Abstract. A great variety of components in multivitamin preparations containing folic acid, and a variety of test methods and conditions of folic acid determination proposed by manufacturers, require alignment of test procedures for products with similar composition. **The aim of the study** was to compare the results of experimental verification of folic acid determination procedures which use reversed phase high-performance liquid chromatography (RP HPLC) with isocratic elution mode. **Materials and methods:** The Agilent 1260 Infinity II LC system with a diode array detector (280 nm), isocratic elution mode, C8- and C18-bonded silica gel chromatographic columns, model mixtures containing folic acid, cyanocobalamin, ferrous sulfate, and potassium iodide, were used in the study. **Results:** The lowest relative standard deviation of the folic acid peak area ($RSD=0.09\%$), and the lowest

asymmetry factor ($A_s=1.04$) for folic acid were observed for the model mixture “ferrous sulfate+folic acid+cyanocobalamin” and the following test conditions. Column: 250×4.0 mm, silica gel for chromatography, octylsilyl (C8), endcapped; mobile phase: methanol–phosphate buffer (12:88), pH 6.6; column temperature: 25 °C. The study demonstrated the feasibility of using these conditions for determination of pteric acid impurity with simultaneous precipitation of interfering ferrous ions, using ethylenediaminetetraacetic acid solution, pH 9.5, as a solvent. **Conclusions:** RP HPLC can be recommended as an optimal aligned test procedure for determination of folic acid in combination products. It is recommended to use a solution containing folic and pteric acids for system suitability testing.

Key words: folic acid; HPLC; multivitamin preparations; asymmetry factor; relative standard deviation; column efficiency

For citation: Alekseeva AS, Gavrilin MV, Shemeryankina TB, Smirnova MS, Fedorova EP, Kargina TM, Novikov OO, Kovalova SA, Boyko NN. Determination of folic acid in multivitamin preparations by reversed phase HPLC. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya* = *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2021;11(3):185–192. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2021-11-2-185-192>

* **Corresponding author:** Anastasia S. Alekseeva; AlekseevaAS@expmed.ru

Разработка и совершенствование методов определения витаминов является актуальной задачей, от решения которой зависит качество и безопасность фармацевтической продукции [1].

Фолиевая кислота является водорастворимым витамином, который участвует в ряде ключевых клеточных процессов, в частности синтезе пиримидина, нуклеопротеинов, в регуляции активности генов, является кофактором метаболизма гомоцистеина, повышение уровня которого связано с рисками возникновения сердечно-сосудистых заболеваний, прогрессированием хронических болезней почек, тяжелой формы прогрессирующего атеросклероза [2, 3]. Исследования показали, что высокое потребление фолатов с пищей ведет к повышению риска развития колоректальных аденом [4, 5]. Фолаты играют важную роль в предупреждении формирования дефектов нервной трубки у эмбриона [6], также фолиевая кислота используется в терапии и диагностике некоторых онкологических заболеваний, включая опухоли легких и яичников [7, 8].

Фолиевая кислота входит в состав 44 поливитаминных препаратов, зарегистрированных в Российской Федерации. Среди лекарственных форм, представленных на отечественном рынке, содержащих фолиевую кислоту, наиболее распространенными являются таблетки, покрытые пленочной оболочкой (14 наименований), таблетки, покрытые оболочкой (10). Также фолиевая кислота в поливитаминных препаратах присутствует в виде таблеток жевательных (9), капсул (5), таблеток (2), драже, сиропа, лиофилизата для приготовления раствора для инфузий и лиофилизата для приготовления раствора для внутривенного введения (по 1 наименованию).

При выборе методики для анализа фолиевой кислоты в поливитаминных препаратах следует учитывать физико-химические свойства этого вещества и его нестабильность [9]. В воде фолиевая кислота практически нерастворима, в кислых и щелочных растворах растворима, в органических растворителях нерастворима. В щелочной среде ее стабильность выше, чем в кислой, поэтому стандартные образцы производных фолиевой кислоты принято использовать в виде щелочных растворов [9].

Фолиевая кислота в водном растворе ведет себя как слабая кислота. В диапазоне pH от 4 до 12 структура молекулы находится в равновесии между амидом (кислотная форма) и фенолятом (основная форма). А. Thomas и соавт. в 2002 г. было отмечено, что кислотно-щелочной баланс соединений птерина, таких как фолиевая кислота, смещается (>99%) при pH 4,9–5,5 в сторону образования кислотной формы, а при pH 10,0–10,5 в сторону образования основной формы. В кислой среде под действием света и высокой температуры фолиевая кислота подвергается деградации. Термоустойчивость фолатов значительно варьирует. Так, стабильность тетрагидрофолиевой и 5-метилтетрагидрофолиевой кислот при нагревании значительно повышается при добавлении аскорбиновой кислоты [3, 9]. Авторами работы [3] проанализированы результаты исследований стабильности фолиевой кислоты. Указано, что в 1951 г. А. Biamonte и G. Schneller описали стабильность фолиевой кислоты в растворах, содержащих одно или несколько соединений из витаминов группы В, при pH от 3 до 7. Два десятилетия спустя, в 1975 г., J. O'Broin и соавт. описали стабильность фолиевой кислоты в различных буферных системах, установили период полураспада при разложении фолиевой кислоты при pH 5 или выше при температуре окружающей среды и обнаружили, что период полураспада составляет более 700 ч, однако резко снижается до 24–64 ч при значениях pH ниже 4. Тогда же было отмечено, что разложение фолиевой кислоты при pH 6 и 8 значительно снижалось при использовании фосфатного буферного раствора, но не других буферных композиций (цит. по [3]).

Выбор метода анализа для определения водорастворимых витаминов обусловлен рядом требований: пределом обнаружения метода в зависимости от содержания определяемых компонентов, допускаемой погрешностью, временными затратами, стоимостью анализа. Безусловно, предпочтение отдается методам, требующим минимальной пробоподготовки при максимальной информативности получаемых результатов. Таким требованиям удовлетворяет метод обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), который является

перспективным для анализа многокомпонентных смесей, содержащих водорастворимые витамины [3, 9, 10].

Методики определения водорастворимых витаминов на основе обращенно-фазовой ВЭЖХ разработаны как для градиентного, так и для изократического режимов хроматографирования. Выполнение анализа при градиентном элюировании требует дополнительного времени для установления равновесия в хроматографической системе при повторном анализе. При разделении смесей большого количества водорастворимых витаминов оптимальным вариантом, как было показано, является градиентное элюирование [11]. Однако для небольшого количества определяемых компонентов в смеси достаточно использовать изократическое элюирование, что может быть применимо и при разработке методик разделения водорастворимых витаминов методом обращенно-фазовой ВЭЖХ [12]. При анализе научных публикаций было выявлено, что для определения фолиевой кислоты могут применяться колонки Spherisorb ODS (250×4,6 мм, 5 мкм), Hypersil ODS (150×4,6 мм, 3 мкм) [13], Microsorb-MV C18 (150×4,6 мм, 3 мкм) [14] при температуре 25 °C [14] или 30 °C [13]. Диапазон длин волн, при которых проводилось обнаружение фолиевой кислоты, — 280–290 нм [13, 14]. В качестве подвижной фазы использовалась смесь 24% водного раствора метанола (об./об.) и буферного раствора (3,5 мМ калия дигидрофосфата и 3,2 мМ дикалия гидрофосфата), pH 6,8, содержащего 5 мМ дигидрофосфата тетрабутиламмония в качестве ион-парного агента [14].

Цель работы — сравнение результатов апробации методик анализа фолиевой кислоты в поливитаминных препаратах методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии в изократическом режиме подачи подвижной фазы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования были методики анализа, применяемые для контроля качества лекарственных средств, содержащих фолиевую кислоту. Для сравнения этих методик были проанализированы модельные смеси, соответствующие по составу поливитаминным лекарственным препаратам, зарегистрированным в Российской Федерации. Смеси содержали фармацевтические субстанции фолиевой кислоты (Sigma-Aldrich кат. № 1286005) (от 0,4 до 5 мг), цианокобаламина (Sigma-Aldrich кат. № C3000000) (от 2 до 10 мкг), железа сульфата (Sigma-Aldrich кат. № F7002) в количестве 112,6 мкг и калия йодида (Sigma-Aldrich кат. № 207969 ReagentPlus®) в количестве 262 мг.

Для проведения анализа модельных смесей использовали:

– хроматограф жидкостный Agilent 1260 Infinity II LC (Agilent Technologies) с диодно-матричным детектором, аналитическая длина волны 280 нм, режим подачи подвижной фазы — изократический. Используемое оборудование было надлежащим образом квалифицировано [15];

– хроматографические колонки:

1) 250×4,6 мм, силикагель октадецилсилильный (C18) деактивированный по отношению к основаниям, для хроматографии, размер частиц 5 мкм, размер пор 130 Å;

2) 250×4,0 мм, силикагель октилсилильный (C8) эндкепированный, для хроматографии, размер частиц 5 мкм, размер пор 100 Å;

3) 150×4,6 мм, силикагель октадецилсилильный (C18) эндкепированный, для хроматографии, размер частиц 5 мкм, размер пор 100 Å;

– стандартный образец фолиевой кислоты USP, чистота 98,9% (Sigma-Aldrich кат. № 1286005). Стандартный образец птероевой кислоты (примесь D фолиевой кислоты) (Sigma-Aldrich кат. № Y0001243);

– метанол и ацетонитрил квалификации для ВЭЖХ. Калия дигидрофосфат, натрия гидроксид и ортофосфорная кислота концентрированная квалификации х.ч.;

– фосфатный буферный раствор pH 6,0 ± 0,6, содержащий калия дигидрофосфат 13,6 г/л.

Условия определения фолиевой кислоты в анализируемых композициях поливитаминных препаратов методом обращенно-фазовой ВЭЖХ при изократической подаче подвижной фазы представлены в таблице 1.

В качестве критериев пригодности хроматографической системы использовали следующие параметры: фактор асимметрии пика фолиевой кислоты (A_s) не менее 0,80, но не более 1,50; относительное стандартное отклонение площади пика (RSD) не более 2,0%; число теоретических тарелок (N) не менее 1000; время удерживания вещества.

Статистическую обработку результатов анализа проводили согласно ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента»¹. Анализировали по две навески смесей в 6 повторностях каждую.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты апробации условий анализа фолиевой кислоты на модельных смесях представлены на рисунках 1–7.

Параллельно с модельными смесями были проанализированы растворы стандартного образца фолиевой кислоты и стандартного образца птероевой кислоты, которые являлись одновременно растворами для проверки пригодности хроматографической системы (рис. 2, 5, 7). Предусмотренное

¹ Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

Таблица 1. Условия определения фолиевой кислоты в анализируемых композициях поливитаминных препаратов

Table 1. Test conditions for determination of folic acid in multivitamin preparations

Параметры методики Parameter	Условия анализа модельных смесей следующего состава: Test conditions for the model mixtures with the following composition:		
	Калия йодид+фолиевая кислота+цианокобаламин Potassium iodide+Folic acid+Cyanocobalamin	Железа сульфат+фолиевая кислота+цианокобаламин Ferrous sulfate+Folic acid+Cyanocobalamin	Фолиевая кислота+цианокобаламин Folic acid+Cyanocobalamin
Подвижная фаза Mobile phase	Ацетонитрил — 0,05 М калия дигидрофосфата буферный раствор (рН 6,0) 5:95 Acetonitrile—0.05 M potassium dihydrogen phosphate buffer (pH 6.0), 5:95	Метанол — 0,1 М калия дигидрофосфата буферный раствор (рН 6,6) 12:88 Methanol—0.1 M potassium dihydrogen phosphate buffer (pH 6.6), 12:88	Ацетонитрил — 0,05 М калия дигидрофосфата буферный раствор (рН 6,0) 5:95 Acetonitrile—0.05 M potassium dihydrogen phosphate buffer (pH 6.0), 5:95
Концентрация фолиевой кислоты в анализируемом растворе Folic acid concentration in the test solution	0,016 мг/мл, ступенчатое разбавление сначала в 0,1 М растворе натрия гидроксида, затем в подвижной фазе 0.016 mg/mL, stepwise dilution in 0.1 M sodium hydroxide and in the mobile phase	0,052 мг/мл, ступенчатое разбавление сначала в растворе этилендиаминтетрауксусной кислоты 0,372% (рН 9,5), затем в подвижной фазе 0.052 mg/mL, stepwise dilution in 0.372% ethylenediaminetetraacetic acid (pH 9.5) and in the mobile phase	0,0176 мг/мл, ступенчатое разбавление сначала в 0,1 М растворе натрия гидроксида, затем в подвижной фазе 0.0176 mg/mL, stepwise dilution in 0.1 M sodium hydroxide and in the mobile phase
Параметры колонки Column parameters	C18 250×4,6 мм, 5 мкм 250×4.6 mm, 5 µm	C8 250×4,0 мм, 5 мкм 250×4.0 mm, 5 µm	C18 150×4,6 мм, 5 мкм 150×4.6 mm, 5 µm
Модификация сорбента Stationary phase	Деактивация по отношению к основаниям Base deactivated	Эндкепинг Endcapped	Эндкепинг Endcapped
Объем вводимой пробы, мкл Injection volume, µL	20	10	20
Температура, °С Temperature, °C	25	25	25
Скорость подвижной фазы, мл/мин Flow rate, mL/min	1,0	0,6	1,0
Время анализа, мин Run time, min	5	15	20

в методике анализа для модельной смеси «железа сульфат+фолиевая кислота+цианокобаламин» использование стандартного образца птероевой кислоты, который прибавляют к раствору стандартного образца фолиевой кислоты (рис. 5), отличает эту методику от двух других. Птероевая кислота является примесью D фармацевтической субстанции фолиевой кислоты и может использоваться как для оценки пригодности хроматографической системы, так и для одновременной оценки примесей в препарате, что позволяет повысить информативность анализа. На эту возможность, безусловно, следует обратить внимание при выборе унифицированной методики для анализа фолиевой кислоты.

На хроматограммах наблюдается, что время удерживания фолиевой кислоты в условиях анализа для модельной смеси «калия йодид+фолиевая кислота+цианокобаламин» (C18 250×4,6 мм, 5 мкм, сорбент деактивированный по отношению к основаниям) составляет 3,4 мин, для модельной смеси «железа сульфат+фолиевая кислота+цианокобаламин» (C8, 250×4,0 мм, 5 мкм, сорбент эндкепированный

— 9 мин), для модельной смеси «фолиевая кислота+цианокобаламин» (C18, 150×4,6 мм, 5 мкм, сорбент эндкепированный) — 8,07 мин. Вероятно, на время удерживания фолиевой кислоты критическое влияние оказывает тип сорбента хроматографической колонки. Удерживание на колонке с октадецилсилильным силикагелем (C18) в определенной мере больше, чем на колонке с октилсилильным силикагелем (C8). Использование силикагеля, деактивированного по отношению к основаниям, приводит к уменьшению времени удерживания фолиевой кислоты.

Средние значения критериев пригодности хроматографической системы и время удерживания вещества в исследуемых условиях, представлены в таблице 2.

Для всех трех вариантов условий анализа выполняются критерии пригодности хроматографической системы для определения фолиевой кислоты в комплексных поливитаминных препаратах. Наименьшее значение относительного стандартного отклонения площади пика ($RSD = 0,09\%$) и фактора асимметрии пика ($A_s = 1,04$) для фолиевой

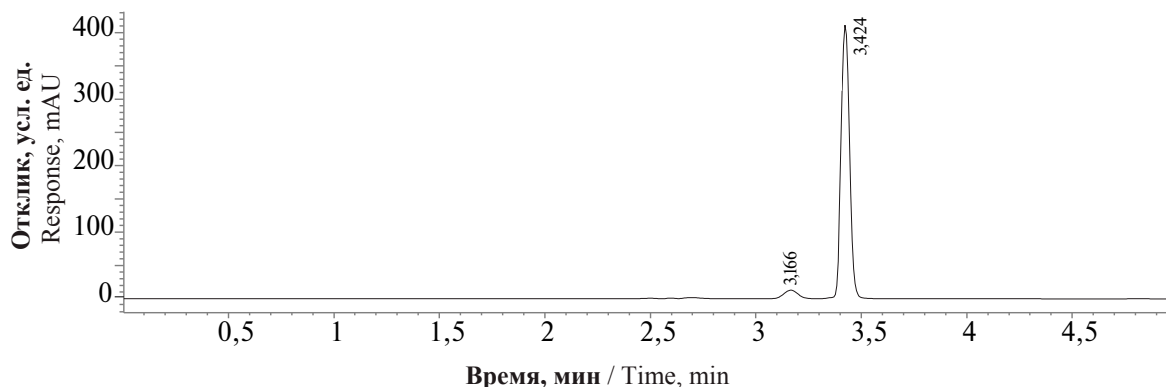


Рис. 1. Хроматограмма модельной смеси «калия йодид+фолиевая кислота+цианокобаламин». Условия анализа: колонка размером 250×4,6 мм, силикагель октадецилсилильный (C18) деактивированный по отношению к основаниям, 5 мкм; подвижная фаза: ацетонитрил — 0,05 М KH_2PO_4 (5:95); детектирование 280 нм; время удерживания фолиевой кислоты — около 3,4 мин.

Fig. 1. Chromatogram of the model mixture “Potassium iodide+Folic acid+Cyanocobalamin”. Column: 250×4.6 mm, silica gel for chromatography, octadecylsilyl (C18), base-deactivated, 5 μm . Mobile phase: acetonitrile–0.05 M KH_2PO_4 (5:95). Detection at 280 nm. The retention time of folic acid is about 3.4 min.

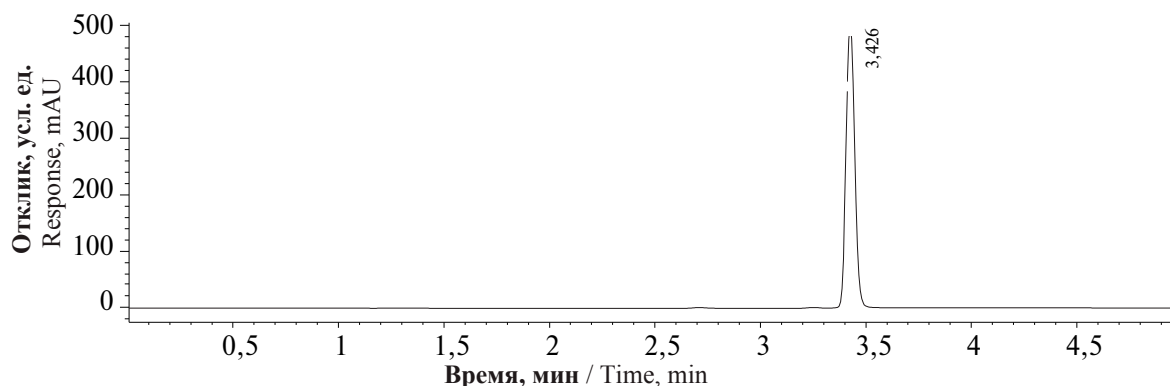


Рис. 2. Хроматограмма раствора стандартного образца фолиевой кислоты. Условия анализа: колонка 250×4,6 мм, силикагель октадецилсилильный (C18) деактивированный по отношению к основаниям, 5 мкм; подвижная фаза: ацетонитрил — 0,05 М KH_2PO_4 (5:95); детектирование 280 нм; время удерживания фолиевой кислоты — около 3,4 мин.

Fig. 2. Chromatogram of the folic acid reference standard. Column: 250×4.6 mm, silica gel for chromatography, octadecylsilyl (C18), base-deactivated, 5 μm . Mobile phase: acetonitrile–0.05 M KH_2PO_4 (5:95). Detection at 280 nm. The retention time of folic acid is about 3.4 min.

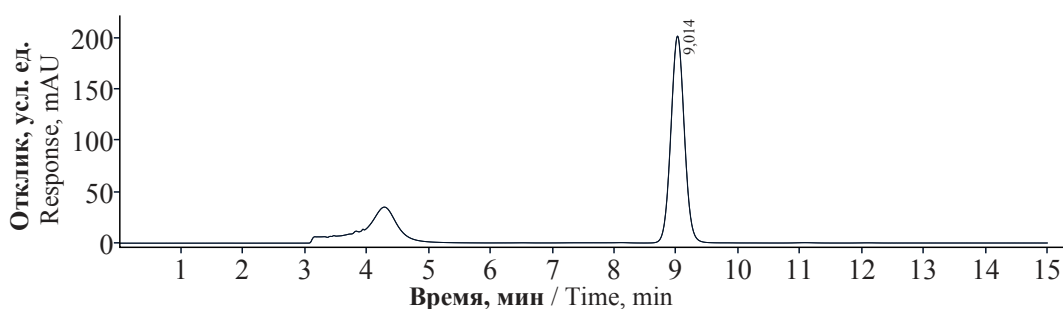


Рис. 3. Хроматограмма модельной смеси: «железа сульфат+фолиевая кислота+цианокобаламин». Условия анализа: колонка 250×4,0 мм силикагель октилсилильный (C8) эндкепированный, 5 мкм; подвижная фаза: метанол — 0,1 М KH_2PO_4 (12:88); детектирование 280 нм; время удерживания фолиевой кислоты — около 9,0 мин.

Fig. 3. Chromatogram of the model mixture “Ferrous sulfate+Folic acid+Cyanocobalamin”. Column: 250×4.0 mm, silica gel for chromatography, octylsilyl (C8), endcapped, 5 μm . Mobile phase: methanol–0.1 M KH_2PO_4 (12:88). Detection at 280 nm. The retention time of folic acid is about 9.0 min.

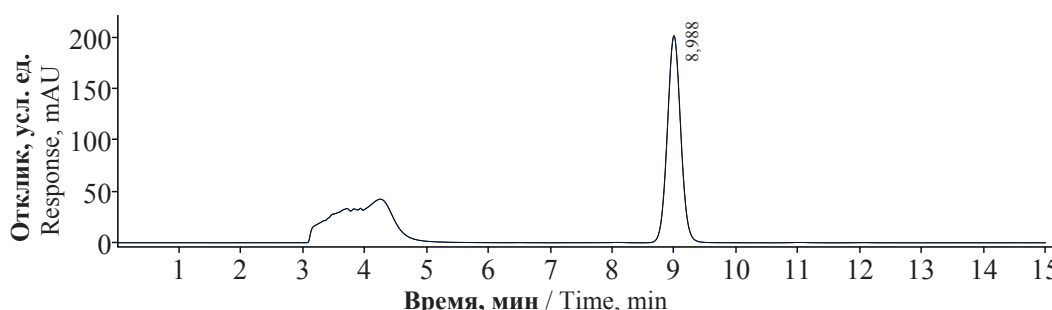


Рис. 4. Хроматограмма раствора стандартного образца фолиевой кислоты. Условия анализа: колонка 250×4,0 мм силикагель октилсилильный (C8) эндкепированный, 5 мкм; подвижная фаза: метанол — 0,1 М KH_2PO_4 (12:88); детектирование 280 нм; время удерживания фолиевой кислоты — около 9,0 мин.

Fig. 4. Chromatogram of the folic acid reference standard. Column: 250×4.0 mm, silica gel for chromatography, octylsilyl (C8), endcapped, 5 μm . Mobile phase: methanol—0.1 M KH_2PO_4 (12:88). Detection at 280 nm. The retention time of folic acid is about 9.0 min.

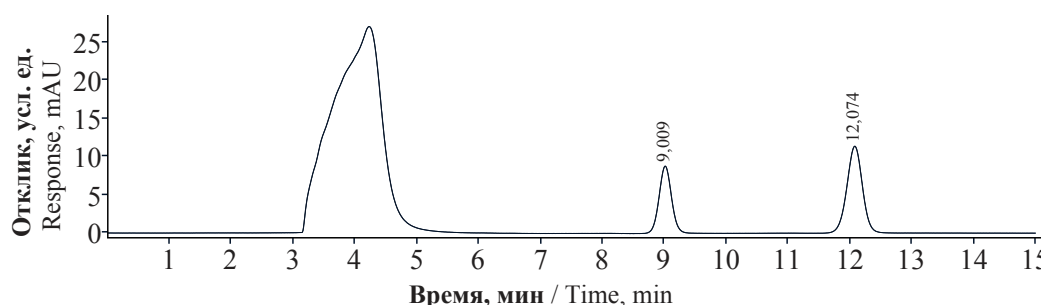


Рис. 5. Хроматограмма раствора для проверки пригодности хроматографической системы. Условия анализа: колонка 250×4,0 мм силикагель октилсилильный (C8) эндкепированный, 5 мкм; подвижная фаза: метанол — 0,1 М KH_2PO_4 (12:88); детектирование 280 нм; время удерживания фолиевой кислоты — около 9,0 мин, время удерживания птероевой кислоты — около 12,0 мин.

Fig. 5. Chromatogram of the system suitability solution. Column: 250×4.0 mm, silica gel for chromatography, octylsilyl (C8), endcapped, 5 μm . Mobile phase: methanol—0.1 M KH_2PO_4 (12:88). Detection at 280 nm. The retention time of folic acid is about 9.0 min, the retention time of pterioic acid—12.0 min.

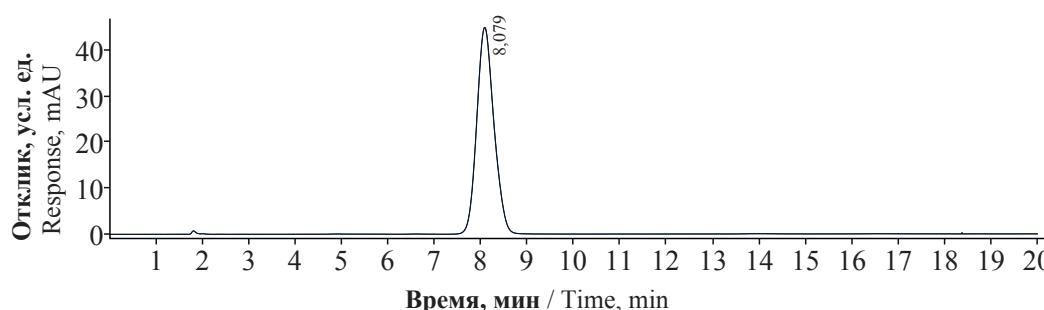


Рис. 6. Хроматограмма модельной смеси: «фолиевая кислота+цианокобаламин». Условия анализа: колонка 150×4,6 мм силикагель октадецилсилильный (C18) эндкепированный, 5 мкм; подвижная фаза: ацетонитрил — 0,05 М KH_2PO_4 (5:95); детектирование 280 нм; время удерживания фолиевой кислоты — около 8,1 мин.

Fig. 6. Chromatogram of the model mixture “Folic acid+Cyanocobalamin”. Column: 150×4.6 mm, silica gel for chromatography, octadecylsilyl (C18), endcapped, 5 μm . Mobile phase: acetonitrile—0.05 M KH_2PO_4 (5:95). Detection at 280 nm. The retention time of folic acid is about 8.1 min.

кислоты наблюдается в условиях, используемых для разделения смеси «железа сульфат+фолиевая кислота+цианокобаламин». В данных условиях возможно одновременное определение птероевой кислоты (родственной примеси D фармацевтической субстанции фолиевой кислоты), что не требует отдельных условий и колонки для контроля данной

примеси в препарате, а также значительно сокращает время и реактивы.

Еще одним преимуществом этой методики является состав растворителя для испытуемого образца (раствор, содержащий этилендиаминтетрауксусную кислоту с pH 9,5), использование которого позволяет избавиться от мешающих ионов железа,

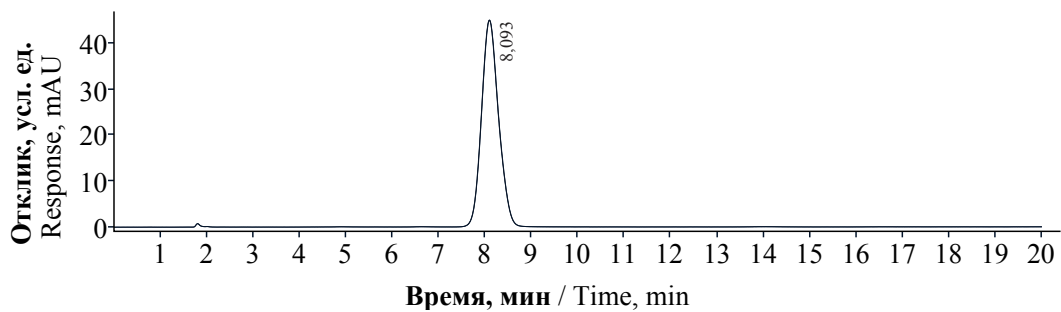


Рис. 7. Хроматограмма раствора стандартного образца фолиевой кислоты. Условия анализа: колонка 150×4,6 мм силикагель октадецилсилильный (C18) эндкепированный, 5 мкм; подвижная фаза: ацетонитрил — 0,05 М KH_2PO_4 (5:95); детектирование 280 нм; время удерживания фолиевой кислоты — около 8,1 мин.

Fig. 7. Chromatogram of the folic acid reference standard. Column: 150×4.6 mm, silica gel for chromatography, octadecylsilyl (C18), endcapped, 5 μm . Mobile phase: acetonitrile—0.05 M KH_2PO_4 (5:95). Detection at 280 nm. The retention time of folic acid is about 8.1 min.

Таблица 2. Средние значения критериев пригодности хроматографической системы для стандартного образца фолиевой кислоты в рассмотренных условиях анализа ($n = 6$, $P = 95\%$)

Table 2. Mean values of the system suitability criteria for the folic acid reference standard under the given test conditions ($n = 6$, $P = 95\%$)

Наименование модельной смеси Model mixture	Относительное стандартное отклонение площади пика (RSD), % Relative standard deviation of the peak area	Фактор асимметрии пика (A) Asymmetry factor	Число теоретических тарелок (N) Plate number	Время удерживания фолиевой кислоты, мин Folic acid retention time
«Калия йодид+фолиевая кислота+цианокобаламин» Potassium iodide+folic acid+cyanocobalamin	0,72	1,08 ± 0,05	31410 ± 1302	3,42 ± 0,02
«Железа сульфат+фолиевая кислота+цианокобаламин» Ferrous sulfate+folic acid+cyanocobalamin	0,09	1,04 ± 0,01	8166 ± 16	9,00 ± 0,01
«Фолиевая кислота+цианокобаламин» Folic acid+cyanocobalamin	0,10	1,13 ± 0,01	2220 ± 50	8,07 ± 0,01

Примечание. n — количество хроматограмм; P — доверительная вероятность.
Note. n —number of chromatograms; P —confidence probability.

в той или иной форме присутствующих в качестве действующего вещества в некоторых поливитаминных препаратах в сочетании с фолиевой кислотой.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сравнение условий анализа фолиевой кислоты методом обращенно-фазовой ВЭЖХ показало, что все рассмотренные варианты позволяют определять фолиевую кислоту в изократическом режиме подачи подвижной фазы для представленных модельных смесей. Выявлено, что методика, предполагающая использование в качестве подвижной фазы смеси «метанол — фосфатный буферный раствор» рН 6,6 (12:88) при температуре 25 °С, колонки размером 250×4,0 мм с силикагелем октилсилильным (C8) эндкепированным (размер частиц 5 мкм) обладает рядом преимуществ: наименьшие значения относительного стандартного отклонения площади пика ($RSD = 0,09\%$) и фактора асимметрии пика ($A_s =$

1,04) фолиевой кислоты, возможность определения в этой же системе примеси D фармацевтической субстанции фолиевой кислоты, наличие этилендиамин-тетрауксусной кислоты в составе растворителя (рН 9,5). При выборе оптимальной унифицированной методики для анализа фолиевой кислоты в препаратах можно рекомендовать вышеуказанные условия.

Вклад авторов. А. С. Алексеева — подбор и анализ материалов, написание текста статьи; М. В. Гаврилин — анализ и систематизация полученных данных; Т. Б. Шемерянкина — редактирование текста, утверждение окончательного варианта статьи для публикации; М. С. Смирнова — сбор данных литературы; Е. П. Федорова — редактирование текста публикации; Т. М. Каргина — редактирование текста публикации, О. О. Новиков — консультации, редактирование текста по экспериментальной части работы; С. А. Ковалева — выполнение экспериментальной части работы, редактирование текста; Н. Н. Бойко — выполнение экспериментальной части работы, редактирование текста.
Authors' contributions. Anastasia S. Alekseeva—search and analysis of materials, preparation of the draft of the paper; Mikhail

V. Gavrilin—analysis and systematisation of the obtained data; **Tatiana B. Shemeryankina**—editing of the text, approval of the final version of the paper for publication, **Maria S. Smirnova**—compilation of literature data; **Elena P. Fedorova**—editing of the text; **Tatiana M. Kargina**—editing of the text; **Oleg O. Novikov**—providing consultations, editing of the practical part of the paper; **Svetlana A. Kovaleva**—carrying out experimental part of the study, editing of the paper; **Nikolay N. Boyko**—carrying out experimental part of the study, editing of the paper.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00005-21-00 на проведение прикладных науч-

ных исследований (номер государственного учета НИР 121021800098-4).

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00005-21-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121021800098-4).

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. Слепченко ГБ, Мартынюк ОА, Шелеметьева ОВ. Разработка методики определения в грудном молоке витаминов группы В. *Известия Томского политехнического университета*. 2008;312(3):58–61. [Slepchenko GB, Martynuk OA, Shelemetieva OV. Development of techniques for determining vitamins of group B in breast milk. *Izvestiya Tomskogo politekhnicheskogo universiteta = Bulletin of the Tomsk Polytechnic University*. 2008;312(3):58–61 (In Russ.)]
2. Capelli I, Cianciolo G, Gasperoni L, Zappulo F, Tondolo F, Capuccilli M, La Manna G. Folic acid and vitamin B12 administration in CKD, why not? *Nutrients*. 2019;11(2):383. <https://dx.doi.org/10.3390%2Fnu11020383>
3. Gazzali AM, Lobry M, Colombeau L, Acherar S, Azais H, Mordon S, et al. Stability of folic acid under several parameters. *Eur J Pharm Sci*. 2016;93:419–30. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.08.045>
4. Jaszewski R, Misra S, Tobin M, Ullah N, Naumoff JA, Kucuk O, Levi E, Axelrod BN, Patel BB, Majumdar AP. Folic acid supplementation inhibits recurrence of colorectal adenomas: a randomized chemoprevention trial. *World J Gastroenterol*. 2008;14(28):4492–8. <https://doi.org/10.3748/wjg.14.4492>
5. Qin T, Du M, Du H, Shu Y, Wang M, Zhu L. Folic acid supplements and colorectal cancer risk: meta-analysis of randomized controlled trials. *Sci Rep*. 2015;5:12044. <https://doi.org/10.1038/srep12044>
6. Berry RJ, Li Z, Erickson JD, Li S, Moore CA, Wang H, et al. Prevention of neural-tube defects with folic acid in China. China-U.S. Collaborative Project for Neural Tube Defect Prevention. *New Engl J Med*. 1999;341(20):1485–90. <https://doi.org/10.1056/NEJM19991113412001>
7. Ledermann JA, Canevari S, Thigpen T. Targeting the folate receptor: diagnostic and therapeutic approaches to personalize cancer treatments. *Ann Oncol*. 2015;26(10):2034–43. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv250>
8. Narmani A, Rezvani M, Farhood B, Darkhor P, Mohammadnejad J, Amini B, et al. Folic acid functionalized nanoparticles as pharmaceutical carriers in drug delivery systems. *Drug Dev Res*. 2019;80(4):404–24. <https://doi.org/10.1002/ddr.21545>
9. Arcot J, Shrestha A. Folate: methods of analysis. *Trends Food Sci Technol*. 2005;16(6–7):253–66. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.03.013>
10. Konings EJ. A validated liquid chromatographic method for determining folates in vegetables, milk powder, liver and flour. *J AOAC Int*. 1999;82(1):119–27. PMID: 10028680
11. Бендрисhev АА, Пашкова ЕБ, Пирогов АВ, Шпигун ОА. Определение водорастворимых витаминов в поливитаминных премиксах, биологически-активных добавках и фармацевтических препаратах методом высоко-эффективной жидкостной хроматографии с градиентным элюированием. *Вестник Московского университета. Серия 2. Химия*. 2010;51(4):315–24. [Bendryshev AA, Pashkova EB, Pirogov AV, Shpigun OA. Determination of water soluble vitamins in multivitamin premixes, biologically active dietary supplements and pharmaceutical preparation by HPLC with gradient elution. *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 2. Khimiya = Moscow University Bulletin. Series 2. Chemistry*. 2010;51(4):315–24 (In Russ.)]
12. Филимонов ВН, Сирицо СИ, Макрушин НА. Особенности хроматографического разделения водорастворимых витаминов в изократической ОФ ВЭЖХ. *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2006;6(2):191–197 [Filimonov VN, Siritso SI, Makrushin NA. Features of chromatographic separation of water-soluble vitamins in isocratic RP HPLC. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy = Sorption and Chromatography Processes*. 2006;6(2):191–7 (In Russ.)]
13. Vahteristo L, Lehtikainen K, Ollilainen V, Varo P. Application of an HPLC assay for the determination of folate derivatives in some vegetables, fruits and berries consumed in Finland. *Food Chem*. 1997;59(4):589–97. [https://doi.org/10.1016/s0308-8146\(96\)00318-4](https://doi.org/10.1016/s0308-8146(96)00318-4)
14. Osseyi ES, Wehling RL, Albrecht JA. HPLC determination of stability and distribution of added folic acid and some endogenous folates during breadmaking. *Cereal Chem*. 2001;78(4):375–8. <https://doi.org/10.1094/CCHEM.2001.78.4.375>
15. Шинева НВ, Гаврилин МВ, Старчак ЮА, Макаров СВ. Метрологические требования к измерительному оборудованию (обзор). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(3):173–81. [Shineva NV, Gavrilin MV, Starchak YuA, Makarov SV. Metrological requirements to measuring equipment. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug Development and Registration*. 2020;9(3):173–81 (In Russ.)] <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-173-181>

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Алексеева Анастасия Сергеевна, канд. фарм. наук. Anastasia S. Alekseeva, Cand. Sci. (Pharm.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-6094-8990>
Гаврилин Михаил Витальевич, д-р фарм. наук, профессор. Mikhail V. Gavrilin, Dr. Sci (Pharm.). Professor. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-2988-8627>

Шемерянкина Татьяна Борисовна, канд. фарм. наук. Tatiana B. Shemeryankina, Cand. Sci. (Pharm.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-3720-9687>
Смирнова Мария Сергеевна. Maria S. Smirnova. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-0305-5934>

Федорова Елена Павловна, канд. фарм. наук. Elena P. Fedorova, Cand. Sci. (Pharm.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-4499-2190>

Каргина Татьяна Михайловна, канд. биол. наук Tatiana M. Kargina, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-3788-6338>

Новиков Олег Олегович, д-р фарм. наук, профессор. Oleg O. Novikov, Dr. Sci (Pharm.). Professor. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-3145-6783>

Ковалева Светлана Анатольевна, канд. хим. наук. Svetlana A. Kovaleva, Cand. Sci. (Chem.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-3183-4388>

Бойко Николай Николаевич, канд. фарм. наук, доцент. Nikolay N. Boyko, Cand. Sci. (Pharm.), Associate Professor. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-9222-2935>

Статья поступила 05.04.2021

После доработки 07.06.2021

Принята к печати 20.09.2021

Article was received 5 April 2021

Revised 7 June 2021

Accepted for publication 20 September 2021

Определение критических фаз экспериментальной части научно-исследовательской работы с использованием лабораторных животных: анализ рисков

С. В. Ходько*, М. Н. Макарова, В. Г. Макаров, С. С. Салынов, Н. В. Родионова

Акционерное общество «Научно-производственное объединение «ДОМ ФАРМАЦИИ»,
Заводская ул., д. 3, к. 245, г.п. Кузьмоловский, Всеволожский район,
Ленинградская область, 188663, Российская Федерация

Резюме. Критические фазы (этапы) доклинического исследования — процедуры или виды деятельности, точное и правильное исполнение которых является необходимым условием качества, достоверности и надежности получаемых результатов исследования. Российскими и зарубежными стандартами предусмотрено определение критических фаз каждого отдельного исследования службой обеспечения качества на основании проверки протокола (плана) исследования. **Цель работы:** определение критических фаз, характерных для большинства доклинических исследований, и оценка возникающих рисков путем инспектирования. **Материалы и методы:** исследование проведено путем анализа видов и последствий отказов, были проанализированы данные по численным показателям рисков по каждой критической фазе доклинического исследования, определенные экспертами службы обеспечения качества АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ». **Результаты:** установлено, что потенциальным отказом при всех установленных критических фазах является неверное выполнение процедуры, а последствием — получение некачественных данных. Совокупность неверно выполненных процедур по двум и более критическим фазам может представлять собой неприемлемый риск и вести к полной потере или невозможности обработки данных и, как следствие, к необходимости повторения исследования. **Выводы:** наибольший риск выявлен для таких критических фаз, как приготовление и введение готовых доз исследуемых объектов, выполнение физиологических тестов, сбор образцов биоматериала и работа с образцами биоматериала в смежных подразделениях. Обобщая полученные данные по рискам всех критических фаз, можно сделать вывод о том, что воздействие на риск должно представлять собой регулярные инспекции со стороны службы качества и руководителя исследования. Риск каждой критической фазы возможно сделать несущественным, регулируя частоту инспекций. **Ключевые слова:** критические фазы; доклиническое исследование; риск-менеджмент; система менеджмента качества; испытательный центр

Для цитирования: Ходько СВ, Макарова МН, Макаров ВГ, Салынов СС, Родионова НВ. Определение критических фаз экспериментальной части научно-исследовательской работы с использованием лабораторных животных: анализ рисков. *Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2021;11(3):193–201. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2021-11-193-201>

* **Контактное лицо:** Ходько Светлана Владимировна; khodko.sv@doclinika.ru

Determination of the Critical Phases of the Experimental Research Using Laboratory Animals: Risk Analysis

S. V. Khodko*, M. N. Makarova, V. G. Makarov, S. S. Salynov, N. V. Rodionova

Joint Stock Company “Scientific and Production Association ‘HOME OF PHARMACY’”,
3/245 Zavodskaya St., Kuzmolovsky urban-type settlement, Vsevolozhsky district,
Leningrad region 188663, Russian Federation

Abstract. Critical phases (stages) of preclinical studies are those procedures or types of research activities whose accurate and correct implementation is a prerequisite for obtaining valid and reliable results. Russian and foreign standards require determination of the critical phases of each individual study by quality assurance staff based on checking the study protocol (plan). **The aim of the study** was to identify critical phases typical for most preclinical studies, and assess the potential risks during inspections. **Materials and methods:** the study was carried out by analysing the types and consequences of failures. Numerical parameters of risks were analysed for each critical phase of the preclinical study identified by quality officers of the Joint Stock Company “Scientific and Production Association ‘HOME OF PHARMACY’”. **Results:** it was discovered that incorrect implementation of a procedure constituted a potential failure at all the identified critical phases, and a potential consequence was acquisition of low-quality data. A combination of incorrectly implemented procedures at two or more critical phases could pose an unacceptable risk and lead to complete loss of data or failure to process data, and, as a result, the need to repeat the study. **Conclusions:** the highest risk was identified for such critical phases as preparation and administration of final doses of test samples, performance of physiological tests, collection of biological material samples, and handling of biological material samples by other relevant departments. Summarising the data obtained on the risks of all the critical phases, it can be concluded that risk action should take the form of regular inspections by the quality assurance staff and the study director. By adjusting the frequency of inspections, the risk of each critical phase can be made insignificant.

Key words: critical phases; preclinical study; risk management; quality management system; testing centre

For citation: Khodko SV, Makarova MN, Makarov VG, Salynov SS, Rodionova NV. Determination of the critical phases of the experimental research using laboratory animals: risk analysis. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya* = *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2021;11(3):193–201. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2021-11-193-201>

* **Corresponding author:** Svetlana V. Khodko; khodko.sv@doclinika.ru

Правилами надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза (далее — Правила НЛП ЕАЭС), утвержденными Решением Совета Евразийской экономической комиссии, критические фазы определяются как «процедуры или виды деятельности в рамках исследования, точное и правильное исполнение которых является необходимым условием для качества, достоверности и надежности получаемых результатов исследования»¹.

Регламентирующие документы по определению критических фаз исследований отсутствуют, так как и российскими, и зарубежными стандартами² предусмотрено определение критических фаз каждого отдельного исследования сотрудниками службы обеспечения качества (СОК), которые, безусловно, должны иметь необходимый опыт и квалификацию. Критические фазы СОК определяют на основании проверки плана (протокола) исследования, и именно эти критические фазы должны быть проинспектированы с оформлением соответствующей документации. Проведение процедур критических фаз дизайна исследования, управления, проведения и отчетности должно быть регламентировано системой стандартных операционных процедур (СОП) конкретного испытательного центра. Вопросы проведения критических фаз, помимо руководящих документов, освещены и в научных публикациях российских и зарубежных авторов [1–3].

В стандарте ISO 9001:2015³ сделан значимый акцент на риск-ориентированное мышление. Особую роль в обеспечении качества доклинических исследований играет система управления рисками, которая способствует получению достоверных данных об исследуемом лекарственном средстве, что позволяет обеспечить его максимальную безопасность для человека. Хотя риск снижения качества является лишь одним из элементов общего риска при проведении доклинических исследований, он рассматривается как наиболее существенный для здоровья и безопасности участников дальнейших клинических исследований [4].

В целом риск-ориентированный подход для доклинических исследований позволяет:

- выявить «слабые места» системы менеджмента качества испытательного центра, например в контексте регламентирующих стандартов, когда

отсутствует четкое описание, кем и как должна быть выполнена процедура;

- идентифицировать риски, как возникающие спонтанно, так и те, которые известны изначально;
- документировать идентифицированные риски и ознакомить с этими документами персонал, участвующий в проведении исследования.

Основной целью риск-ориентированного подхода в системе менеджмента качества испытательных центров, выполняющих доклинические исследования, является минимизация рисков, управление ими и повышение качества исследований.

В соответствии с Правилами:

- программа обеспечения качества должна содержать описание систем и способов контроля исследований, в том числе должен быть определен характер планирования и проведения инспекций СОК, основанный на контроле критических этапов исследования;
- участие СОК в разработке СОП и планов исследований подразумевает, в числе прочего, определение критических этапов исследования;
- СОК должна быть полностью осведомлена о том, что представляют собой критические фазы исследований;
- руководство по проведению инспекций разрабатывается совместно руководителем исследования, ведущими исследователями и персоналом, участвующим в исследовании.

СОК испытательного центра, выполняющего доклинические исследования, в соответствии с требованиями Правилам НЛП ЕАЭС обязана проводить инспекции отдельных исследований. Однако отсутствует регламентация процедуры инспектирования, детализация перечня этапов исследования, периодичность и описание документации результатов их контроля. Каждый испытательный центр должен определить порядок проведения этих процедур самостоятельно, обеспечив при этом полную прослеживаемость исследования и гарантируя контроль правильности выполнения на всех этапах.

Цель работы — определение критических фаз, характерных для большинства доклинических исследований, анализ возникающих рисков и оценка возможности управления рисками путем инспектирования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

На основании многолетнего опыта проведения токсикологических, фармакодинамических

¹ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 81 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств».

² Good laboratory practice (GLP). Training manual. UNDP/World Bank/WHO; 2001.

Good laboratory practice (GLP). Quality practices for regulated non-clinical research and development. Handbook. UNDP/World Bank/WHO; 2001.

Quality practices in basic biomedical research. Handbook. UNDP/World Bank/WHO; 2006.

Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 81 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств».

³ ISO 9001:2015. Национальный стандарт Российской Федерации. Системы менеджмента качества. Требования (Quality management systems. Requirements). М.: Стандартинформ; 2020.

и фармакокинетических исследований нами определены следующие критические фазы экспериментальной части исследования.

Регистрация массы тела. Практически каждое неблагоприятное воздействие на организм может вызывать изменение массы тела животных. Критичность данной манипуляции в доклинических исследованиях очевидна и подтверждена многими публикациями о важности показателя массы тела для оценки полученных результатов [5, 6].

Формирование экспериментальных групп (рандомизация или стратификация). Рандомизация — это процесс случайного распределения объектов в группы с целью исключить всякую необъективность и связанное с ней вероятное смещение оценки. Применение рандомизации обеспечивает репрезентативность выборки, а также устранение вероятности систематической ошибки исследования. Стратификация — метод формирования выборки, при котором совокупность всех участников, соответствующих критериям включения в исследование, разделяют на группы (страты) на основе одной или нескольких характеристик (обычно масса тела), потенциально влияющих на изучаемый исход, а затем из каждой из этих групп (страт) независимо проводят отбор участников в экспериментальную и контрольную группы. Отсутствие предпочтений исследователя при выборе животных для формирования экспериментальных групп является обязательным условием доклинического исследования и должно проводиться согласно СОП испытательного центра с использованием ранее определенной методики [7–9].

Приготовление готовых доз исследуемых объектов для введения. Приготовление из готовой лекарственной формы суспензии, эмульсии, раствора и т.д., что позволит ввести экспериментальным животным исследуемый объект путем, указанным в плане (протоколе) исследования. Этому этапу уделено крайне мало внимания как со стороны исследователей и заказчиков, так и в научных публикациях, однако именно от правильного приготовления исследуемых объектов зависит возможность корректной оценки их воздействия на организм животного. На этом этапе определяется, в том числе, была ли проведена тестовая пробоподготовка, чтобы быть уверенными, что препарат удастся ввести животному (пройдет ли он через внутрижелудочный зонд, например), стабильна ли приготовленная суспензия и т.д. [10–12].

Введение исследуемых объектов. Является важнейшим этапом доклинического исследования для оценки влияния исследуемых объектов на органы-мишени и организм в целом. При контроле корректности проведения этапа имеет значение определение объемов доз, выбранных для введения экспериментальных животным, безболезненность

манипуляции для животного и правильность выполнения самой процедуры введения [13].

Клинический осмотр и наблюдение. Эти процедуры являются основой для постановки диагноза, описания картины интоксикации, от правильности их выполнения зависит полнота картины эффектов лекарственного средства в отношении организма животного [14, 15].

Постановка физиологических тестов. Отражает влияние исследуемого объекта на поведенческую и ориентировочно-исследовательскую активность животного и позволяет максимально полно оценить влияние лекарственного средства на организм [14].

Сбор образцов биоматериала. В зависимости от вида лабораторных исследований процедура может варьироваться, этот этап является неотъемлемой частью проведения доклинических исследований лекарственных средств, необходимой для оценки состояния органов-мишеней и организма в целом. Условия сбора материала напрямую определяют качество дальнейшего анализа [6, 16, 17].

Передача образцов биоматериала и их транспортировка между подразделениями, заказчику или субподрядчику. Критичность данного этапа заключается в том, что в ряде случаев необходимо тщательно следить за временем передачи образцов, также важна степень ответственности персонала, как передающего, так и принимающего образцы.

Индукция патологии. Важнейший этап исследования при оценке специфической фармакологической активности исследуемых объектов. От правильности формирования экспериментальной патологии целиком и полностью зависит возможность оценки фармакологического эффекта препарата.

Работа с образцами биоматериала в смежных подразделениях. Крайне важно отслеживать работу с образцами биологического материала после того, как они были переданы для определенных видов исследования в смежные подразделения. Необходимо отслеживать время выполнения анализа, правильность выполнения анализа, правильность и сохранность маркировки образцов; условия хранения образцов, в том числе при заморозке; получение и документирование первичных данных и т.д.

Проведение эвтаназии. В научно-исследовательской практике одним и ключевых этапов эксперимента и одновременно гуманной точкой эксперимента нередко является эвтаназия животных с последующим патологоанатомическим и гистологическим исследованием органов. Для получения достоверных данных очень важна стандартизация процедуры вскрытия и извлечения органов лабораторных животных [18–23].

На основании этих данных мы предприняли попытку выразить в численных значениях риск по каждой критической фазе доклинического

исследования. Данный анализ позволит отнести каждый из этапов доклинического исследования к определенной категории риска и выработать рекомендации по частоте контроля критических фаз.

Для анализа рисков критических фаз был применен метод анализа видов и последствий отказов (Failure Mode and Effects Analysis, FMEA) [4]. FMEA представляет собой методологию проведения анализа и выявления наиболее критических шагов производственных процессов с целью управления качеством продукции.

Оценка рисков в соответствии с FMEA включала в себя три составляющих, экспертная оценка которых осуществлялась по 5-балльной шкале: тяжесть вреда (S), вероятность возникновения (O) и вероятность выявления (D) опасности.

Балл тяжести вреда (последствий опасности) (S) — оценка значимости данного дефекта в зависимости от его возможных последствий (табл. 1). В случае доклинических исследований тяжесть вреда должна быть определена как ошибка в интерпретации полученных данных и выводов по оценке эффектов лекарственного средства.

Балл вероятности возникновения опасности (O) — оценка вероятности возникновения данного дефекта. Описание для каждого балла и вероятности возникновения опасности в таблице 2 представлено экспертами на основании анализа чек-листов инспекций доклинических исследований, выполненных в АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ» за последние 5 лет (1050 чек-листов).

Данная балльная шкала оценки вероятности возникновения опасности для каждого испытательного центра может отличаться и зависит от множества факторов, в том числе степени вовлеченности сотрудников службы качества в процесс контроля

отдельных исследований; квалификации и опытности сотрудников службы качества; длительности работы испытательного центра:

Балл вероятности обнаружения опасности (D) — оценка, соответствующая вероятности обнаружения дефекта.

Описание балльной шкалы вероятности обнаружения опасности представлено экспертами на основании того, что ошибка может быть выявлена самим сотрудником, сотрудниками того же подразделения с аналогичной или более высокой квалификацией и сотрудниками СОК. Также ошибка может быть достаточно очевидной (явной), менее очевидной (неявной) и намерено скрывающейся.

Комплексный риск — количественная оценка дефекта (приоритетное число риска), рассчитывали как произведение трех составляющих риска S, O и D. Категорию риска, т.е. оценку допустимости риска, проводили путем сравнения степени риска с принятыми критериями риска по методу FMEA (см. таблицу 4).

Экспертами в ходе оценки рисков выступили трое сотрудников СОК АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», имеющие подтвержденную квалификацию «Внутренний/ведущий аудитор системы менеджмента качества ISO 9001:2015» и опыт работы в доклинических исследованиях не менее 5 лет.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам оценки рисков было установлено, что потенциальным отказом (источником вреда) при всех установленных критических фазах является неверное выполнение процедуры, а последствием — получение некачественных данных. Представленные в таблице 5 данные являются результатом коллегиальной оценки, проведенной экспертами СОК АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ».

Таблица 1. Балльная шкала оценки тяжести вреда (последствий опасности) — S

Table 1. Rating scale for harm severity (hazard consequences) assessment—S

Баллы Scores	Тяжесть вреда Harm severity	Описание Description
1	Очень низкая Very low	Ошибка носит технический характер и не влияет на выводы по действию лекарственного средства A technical error that does not affect the conclusions made about the drug action
2	Низкая Low	Вносит незначительные искажения в полученные результаты, но не влияет на выводы по действию лекарственного средства An error introduces minor distortions into the results obtained, but does not affect the conclusions on the drug action
3	Серьезная Severe	Вносит искажения в полученные результаты, но в целом не влияет на выводы по действию лекарственного средства An error introduces distortions into the results obtained, but in general does not affect the conclusions on the drug action
4	Критическая Critical	Вносит существенные искажения по действию лекарственного средства и может привести к неверным выводам по действию лекарственного средства An error introduces significant distortions in the drug action and may result in incorrect conclusions on the drug action
5	Катастрофическая Catastrophic	Приводит к неверным выводам и заключению по действию лекарственного средства An error leads to wrong conclusions and decision on the drug action

Таблица 2. Балльная шкала оценки вероятности возникновения опасности — О

Table 2. Rating scale for hazard likelihood assessment—O

Баллы Scores	Вероятность возникновения Likelihood	%	Описание Description
1	Практически невозможно Highly unlikely	≤2	Ошибка не встречалась за последние 5 лет деятельности организации No such error during the last 5 years
2	Редко Unlikely	3–10	Ошибка встречалась от 1 до 3 раз за последние 5 лет деятельности организации 1–3 such errors during the last 5 years
3	Время от времени Occasional	11–20	Ошибка встречалась от 4 до 7 раз за последние 5 лет деятельности организации 4–7 such errors during the last 5 years
4	Часто Likely	21–50	Ошибка встречалась от 8 до 12 раз за последние 5 лет деятельности организации 8–12 such errors during the last 5 years
5	Очень часто Very likely	51–100	Ошибка встречалась от 13 до 18 раз за последние 5 лет деятельности организации 13–18 such errors during the last 5 years

Таблица 3. Балльная шкала оценки вероятности выявления опасности — Д

Table 3. Rating scale for assessing the probability of hazard detection—D

Баллы Scores	Вероятность обнаружения Detection probability	%	Описание Description
1	Высокая High	>98	Ошибка легко выявляется как самим сотрудником, допустившим ошибку, так и коллегами, (или сотрудниками того же подразделения и той же квалификации), руководителем подразделения и сотрудником службы обеспечения качества The error is easily detectable both by the employee who made it, and by their colleagues (or employees of the same department and the same qualification), Head of the department, and quality officers
2	Удовлетворительная Satisfactory	96–98	Ошибка выявляется коллегами (или сотрудниками того же подразделения и той же квалификации), руководителем подразделения и сотрудником службы обеспечения качества The error is detectable by the colleagues (or employees of the same department and the same qualification), Head of the department, and quality officers
3	Средняя Average	85–95	Ошибка выявляется руководителем подразделения, сотрудником этого же подразделения с более высокой квалификацией и сотрудником службы обеспечения качества The error is detectable by the Head of the department, colleagues of higher qualification, and quality officers
4	Низкая Low	80–85	Ошибка трудно выявляется при рутинной проверке сотрудником службы обеспечения качества The error is poorly detectable during routine inspections by the quality assurance staff
5	Очень низкая Very low	<80	Ошибка трудно выявляется при целевой проверке сотрудником службы обеспечения качества The error is poorly detectable during targeted inspections by the quality assurance staff

Таблица 4. Категории рисков

Table 4. Categories of risks

Приоритетное число риска, баллы Risk priority number, scores	Категория риска Risk category	Детализация понятия категории риска Details of the risk category concept
≤10	Несущественный риск Insignificant risk	Не влияет на ход деятельности организации и достоверность полученных данных Does not affect the organisation’s activities or the reliability of the obtained data
11–40	Приемлемый риск Acceptable risk	Может изменить ход деятельности организации, но не влияет на достоверность получаемых данных May have an impact on the organisation’s activities, but does not affect the reliability of the obtained data
41–70	Значительный риск Significant risk	Может привести к ухудшению качества (изменить ход деятельности организации) или к значительным изменениям функциональности приборов/оборудования/систем May lead to deterioration of quality (impact on the organisation’s activities) or significant changes in the performance characteristics of instruments/equipment/systems
≥71	Неприемлемый риск Unacceptable risk	Может привести к ухудшению качества (изменить ход деятельности организации), повлиять на достоверность получаемых данных по ключевым показателям May lead to deterioration of quality (impact on the organisation’s activities), affect the reliability of the data obtained for key parameters

Таблица 5. Результаты оценки рисков

Table 5. Risk assessment results

Причина (Критические фазы) Cause (Critical phases)	Тяжесть вреда (последствий опас- ности) — S Harm severity (hazard consequenc- es) —S	Вероятность возникно- вения опасности — O Hazard likelihood—O	Вероятность вы- явления опасно- сти — D Probability of haz- ard detection—D	Приоритетное число риска (ПЧР = $S \times O \times D$) Risk priority number (RPN = $S \times O \times D$)
Регистрация массы тела Body weight registration	3	3	4	36
Формирование экспериментальных групп Formation of experimental groups	3	2	2	12
Приготовление готовых доз исследу- емых объектов для введения Preparation of final doses of test samples for administration	5	3	3	45
Введение исследуемых объектов Administration of the doses	5	5	2	50
Клинический осмотр и наблюдение Clinical examination and observation	2	4	4	32
Физиологические тесты Physiological tests	3	4	4	48
Сбор образцов биоматериала Collection of biological material samples	4	5	3	60
Передача образцов биоматериала и их транспортировка Transfer and transportation of biologi- cal material samples	3	4	1	12
Индукция патологии Induction of pathology	5	3	2	30
Работа с образцами биоматериала в смежных подразделениях Handling of biological material samples in other relevant departments	4	5	3	60
Эвтаназия Euthanasia	4	3	2	24

Неверное выполнение большей части критических фаз характеризуется приемлемым риском; процедур приготовления и введения готовых доз исследуемых объектов, выполнения физиологических тестов, сбора образцов биоматериала и работы с образцами биоматериала в смежных подразделениях — значительным риском. Следует учесть, что совокупность неверно выполненных процедур по двум и более критическим фазам может увеличить степень риска до неприемлемого и привести к полной потере данных или невозможности их обработки и, как следствие, к необходимости полностью воспроизвести исследование.

Воздействие на риск должно представлять собой регулярные инспекции со стороны СОК и руководителя исследования, что подразумевает присутствие этих сотрудников во время выполнения критических фаз исследования. Проведение инспекций позволит снизить риск каждой критической фазы до категории незначительного за счет снижения тяжести последствий, вероятности возникновения опасности или увеличения вероятности выявления опасности.

В таблице 6 представлены экспертные рекомендации, основанные на следующем принципе: чем выше риск для каждой критической фазы, тем более частыми должны быть инспекции со стороны персонала СОК и руководителя исследования. Кратность проверок оценена для типовых дизайна и длительности исследования, однако может быть применена для любого исследования. При составлении рекомендаций учтена возможность увеличения категории риска до неприемлемого в случае двух и более некорректно выполненных процедур.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании данных по оценке рисков нами показано, что наиболее высокий риск возникает при нарушениях в ходе приготовления и введения готовых доз исследуемых объектов, выполнения физиологических тестов, сбора образцов биоматериала и работы с образцами биоматериала в смежных подразделениях.

Основным инструментом управления рисками в ходе выполнения научно-исследовательских работ в организации должны быть регулярные инспекции со

Таблица 6. Рекомендации по кратности проверки критических фаз в зависимости от длительности исследования
Table 6. Recommendations for the frequency of checking the critical phases depending on the study duration

Критические фазы Critical phases	Кратность Frequency
Регистрация массы тела Body weight registration	Все процедуры* For each procedure*
Формирование экспериментальных групп Formation of experimental groups	Все процедуры For each procedure
Приготовление готовых доз исследуемых объектов для введения Preparation of final doses of test samples for administration	Все процедуры (если дизайн исследования предполагает однократное приготовление). Еженедельно (если исследование длительное) For each procedure (if the study design includes one-time preparation). Weekly (if the study takes time)
Введение исследуемых объектов Administration of the doses	Все процедуры (если дизайн исследования предполагает однократное введение). Еженедельно (если исследование длительное) For each procedure (if the study design includes a single administration). Weekly (if the study takes time)
Клинический осмотр Clinical examination	Еженедельно Weekly
Физиологические тесты Physiological tests	Все процедуры For each procedure
Сбор образцов биоматериала Collection of biological material samples	Все процедуры For each procedure
Передача образцов биоматериала Transfer of biological material samples	Еженедельно Weekly
Индукция патологии Induction of pathology	Все процедуры For each procedure
Работа с образцами биоматериала в смежных подразделениях Handling of biological material samples in other relevant departments	Все процедуры For each procedure
Эвтаназия Euthanasia	Все процедуры For each procedure

* Проверка должна проводиться в каждом исследовании каждый раз, когда выполняется манипуляция. Обязательным условием является посещение сотрудниками службы обеспечения качества и/или руководителем исследования каждой повторяющейся в ходе экспериментальной части манипуляции не менее одного раза. Если выявлено несоответствие какой-либо манипуляции, повторный контроль является обязательным.

* A check should be performed for each study, each time the procedure is performed. Quality officers and/or the study director have to check at least once each procedure that is repeatedly performed during the experimental part of the research. If a nonconformity is revealed for any procedure, the follow-up control is required.

стороны службы обеспечения качества и руководителя исследования, что позволит испытательным центрам:

- осуществлять управление рисками, возникающими при выполнении исследований путем их идентификации и анализа;
- снизить идентифицированные риски, уменьшая их тяжесть, частоту встречаемости и вероятность возникновения;
- четко и детально планировать доклиническое исследование;
- эффективно распределить нагрузку персонала службы обеспечения качества в рамках инспекций отдельных исследований;
- повысить качество проведения доклинических исследований.

Вклад авторов. *С. В. Ходько* — расчет численных показателей по анализу рисков, написание статьи; *М. Н. Макарова* — основная идея формулирования перечня критических фаз по доклиническим исследованиям с использованием лабораторных животных; *В. Г. Макаров* — основная идея создания статьи о критических фазах в доклинических ис-

следованиях; *С. С. Салынов* — расчет численных показателей по анализу рисков; *Н. В. Родионова* — расчет численных показателей по анализу рисков.

Authors' contributions. *Svetlana V. Khodko*—calculation of numerical parameters for risk analysis, writing of the paper; *Marina N. Makarova*—elaboration of the main principle of formulation of the list of critical phases for preclinical studies using laboratory animals; *Valery G. Makarov*—elaboration of the main idea of the study on critical phases in preclinical research; *Sergey S. Salynov*—calculation of numerical parameters for risk analysis; *Natalia V. Rodionova*—calculation of numerical parameters for risk analysis.

Благодарности. Работа выполнена как инициативное исследование, без финансовой поддержки.

Acknowledgements. The study was performed as unsolicited independent research without financial support.

Конфликт интересов. М. Н. Макарова является членом редколлегии журнала «Вестник НЦЭСМП». Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest. Marina N. Makarova 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

- Макарова МН. Аудит доклинического центра: система координат. *Лабораторные животные для научных исследований*. 2019;(1):66–75. [Makarova MN. Audit of preclinical research center. Main directions. *Laboratornye zhivotnye dlya nauchnykh issledovaniy* = *Laboratory Animals for Science*. 2019;(1):66–75 (In Russ.)] <https://doi.org/10.29296/2618723X-2019-01-05>
- Li H, Pifat D, Klein G, Petteway S. Strengthening GLP compliance through internal audits. *Qual Assur J*. 2006;10(4):255–61. <https://doi.org/10.1002/qaj.390>
- Piton A. Risk-based assessment applied to QA GLP audits. How to fulfill regulatory requirements while making the best use of our common sense, knowledge, talents, and resources? *Ann Ist Super Sanita*. 2008;44(4):379–84. PMID: 19352000
- Бурова ЕД, Ходько СВ, Гущина СВ, Макарова МН, Макаров ВГ. Управление рисками для обеспечения качества доклинических исследований лекарственных средств. *Ведомости Научного Центра экспертизы средств медицинского применения*. 2017;7(1):25–32. [Burova ED, Khodko SV, Gushchina SV, Makarova MN, Makarov VG. Risk management for quality assurance of preclinical research. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya* = *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2017;7(1):25–32 (In Russ.)]
- Демакова НВ, Краснова МВ, Плиско ГА, Семивеличенко ЕД, Ивкин ДЮ, Оковитый СВ. Апробация метода биоимпедансометрии как инструмента прижизненной динамической оценки состава тела лабораторных животных. *Лабораторные животные для научных исследований*. 2021;(2):54–60. [Demakova NV, Krasnova MV, Plisko GA, Semivlichenko ED, Ivkin DYU, Okovityy SV. Impedansometry as an estimating method of tertiary endpoint in experimental modeling of alimentary impairments. *Laboratornye zhivotnye dlya nauchnykh issledovaniy* = *Laboratory Animals for Science*. 2021;(2):54–60 (In Russ.)] <https://doi.org/10.29296/2618723X-2021-02-07>
- Луговик ИА, Макарова МН. Токсикологические исследования. Референтные интервалы массовых коэффициентов внутренних органов на выборке, состоящей из 1000 аутобредных крыс. *Лабораторные животные для научных исследований*. 2021;(1):3–11. [Lugovik IA, Makarova MN. Toxicological studies. Reference intervals of mass coefficients of internal organs in a sample of 1000 rats. *Laboratornye zhivotnye dlya nauchnykh issledovaniy* = *Laboratory Animals for Science*. 2021;(1):3–11 (In Russ.)] <https://doi.org/10.29296/2618723X-2021-01-01>
- Altman DG, Bland JM. How to randomise. *BMJ*. 1999;319(7211):703–4. <https://doi.org/10.1136/bmj.319.7211.703>
- Bland M. *An Introduction to Medical Statistics*. 3rd edition. Oxford: Oxford University Press; 2000.
- Селезнева АИ, Макарова МН, Рыбакова АВ. Методы рандомизации животных в эксперименте. *Международный вестник ветеринарии*. 2014;(2):84–9. [Selezneva AI, Makarova MN, Rybakova AV. Randomization of experimental animals. *Mezhdunarodny vestnik veterinarii* = *International Bulletin of Veterinary Medicine*. 2014;(2):84–9 (In Russ.)]
- Гущина СВ, Косман ВМ, Макарова МН, Шиков АН. Доклинические исследования стабильности суспензий, приготовленных из готовых лекарственных препаратов. *Фармация*. 2017;66(3):27–32. [Gushchina SV, Kosman VM, Makarova MN, Shikov AN. Preclinical studies of the stability of suspensions prepared from ready-made drugs. *Farmatsiya* = *Pharmacy*. 2017;66(3):27–32 (In Russ.)]
- Гущина СВ, Макарова МН, Пожарицкая ОН. Сравнительное токсикологическое изучение носителей для лекарственных средств, применяемых в доклинических исследованиях. *Международный вестник ветеринарии*. 2015;(3):92–8. [Gushchina SV, Makarova MN, Pozharitskaya ON. A comparative toxicological study of the excipients for drugs used in preclinical studies. *Mezhdunarodny vestnik veterinarii* = *International Bulletin of Veterinary Medicine*. 2015;(3):92–8 (In Russ.)]
- Кириченко ДВ. Влияние физико-химических свойств компонентов препарата на выбор носителя для введения лабораторным животным. *Лабораторные животные для научных исследова-*
- ний. 2020;(2):76–81. [Kirichenko DV. The effect of physic-chemical properties of the components of dosage forms on the selection of vehicle for the administration to laboratory animals. *Laboratornye zhivotnye dlya nauchnykh issledovaniy* = *Laboratory Animals for Science*. 2020;(2):76–81 (In Russ.)] <https://doi.org/10.29296/2618723X-2020-02-09>
- Рыбакова АВ, Макарова МН, Кухаренко АЕ, Вичаре АС, Рюффер Ф. Существующие требования и подходы к дозированию лекарственных средств лабораторным животным. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2018;8(4):207–17. [Rybakova AV, Makarova MN, Kukharensko AE, Vichare AS, Rueffer FR. Current requirements for and approaches to dosing in animal studies. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya* = *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2018;8(4):207–17 (In Russ.)] <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2018-8-4-207-217>
- Енгальчева ГН, Сюбаев РД, Горячев ДВ. Исследования фармакологической безопасности лекарственных средств: экспертная оценка полученных результатов. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2017;7(2):92–7. [Engalychева GN, Syubaev RD, Goryachev DV. Safety pharmacology studies of medicinal products: evaluation of results. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya* = *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2017;7(2):92–7 (In Russ.)]
- Fentener van Vlissingen JM, Borrens M, Girod A, Lelovas P, Morrison F, Saavedra Torres Y. The reporting of clinical signs in laboratory animals: FELASA Working Group Report. *Lab Anim*. 2015;49(4):267–83. <https://doi.org/10.1177/0023677215584249>
- Трофимец ЕИ, Кательникова АЕ, Крышень КЛ. Получение образцов мочи у лабораторных животных (обзор). *Лабораторные животные для научных исследований*. 2021;(1):30–47. [Trofimets EI, Katelnikova AE, Kryshen KL. Urine collecting samples from laboratory animals (overview). *Laboratornye zhivotnye dlya nauchnykh issledovaniy* = *Laboratory Animals for Science*. 2021;(1):30–47 (In Russ.)] <https://doi.org/10.29296/2618723X-2021-01-04>
- Матичин АА, Кательникова АЕ, Крышень КЛ. Особенности отбора бронхоальвеолярного лаважа у лабораторных животных. *Лабораторные животные для научных исследований*. 2019;(4):6. [Matichin AA, Katelnikova AE, Kryshen KL. Specific techniques of bronchoalveolar lavage collecting from laboratory animals. *Laboratornye zhivotnye dlya nauchnykh issledovaniy* = *Laboratory Animals for Science*. 2019;(4):6 (In Russ.)] <https://doi.org/10.29296/2618723X-2019-04-06>
- Коптяева КЕ, Мужикян АА, Гушин ЯА, Беляева ЕВ, Макарова МН, Макаров ВГ. Методика вскрытия и извлечения органов лабораторных животных (крысы). *Лабораторные животные для научных исследований*. 2018;(2):71–93. [Koptayeva KE, Muzhikyan AA, Gushchin YaA, Belyaeva EV, Makarova MN, Makarov VG. Technique of dissection and extracting organs of laboratory animals. Message 1 (Rats). *Laboratornye zhivotnye dlya nauchnykh issledovaniy* = *Laboratory Animals for Science*. 2018;(2):71–93 (In Russ.)] <https://doi.org/10.29296/2618723X-2018-02-08>
- Коптяева КЕ, Мужикян АА, Гушин ЯА, Беляева ЕВ, Макарова МН, Макаров ВГ. Методика вскрытия и извлечения органов лабораторных животных. Сообщение 2: мышь. *Лабораторные животные для научных исследований*. 2018;(4):50–73. [Koptayeva KE, Muzhikyan AA, Gushchin YaA, Belyaeva EV, Makarova MN, Makarov VG. Technique of dissection and extracting organs of laboratory animals. Message 2: Mouse. *Laboratornye zhivotnye dlya nauchnykh issledovaniy* = *Laboratory Animals for Science*. 2018;(4):50–73 (In Russ.)] <https://doi.org/10.29296/2618723X-2018-04-05>
- Коптяева КЕ, Гушин ЯА, Беляева ЕВ, Макарова МН, Макаров ВГ. Методика вскрытия и извлечения органов лабораторных животных. Сообщение 3: хомячок. *Лабораторные животные для научных исследований*. 2019;(1):15–39. [Koptayeva KE, Gushchin YaA, Belyaeva EV, Makarova MN, Makarov VG. Technique of dissection and extracting organs of laboratory animals. Message 3: Hamster. *Laboratornye zhivotnye dlya nauchnykh issledovaniy* = *Laboratory Animals for Science*. 2019;(1):15–39 (In Russ.)] <https://doi.org/10.29296/2618723X-2019-01-02>

21. Коптяева КЕ, Гушин ЯА, Беляева ЕВ, Макарова МН, Макаров ВГ. Методика вскрытия и извлечения органов лабораторных животных. Сообщение 4: морская свинка, песчанка, дегу. *Лабораторные животные для научных исследований*. 2019;(2):5. [Koptyaeva KE, Gushchin YaA, Belyaeva EV, Makarova MN, Makarov VG. Technique of dissection and extracting organs of laboratory animals. Message 4: Guinea pig, gerbil, degu. *Laboratornye zhivotnye dlya nauchnykh issledovaniy* = *Laboratory Animals for Science*. 2019;(2):5 (In Russ.)] <https://doi.org/10.29296/2618723X-2019-02-05>
22. Коптяева КЕ, Устенко ЖЮ, Беляева ЕВ, Гушин ЯА, Макарова МН, Макаров ВГ. Методика вскрытия и извлечения органов лабораторных животных. Сообщение 5: кролик, хорек. *Лабораторные животные для научных исследований*. 2019;(3):5. [Koptyaeva KE, Ustenko ZhYu, Belyaeva EV, Gushchin YaA, Makarova MN, Makarov VG. Technique of dissection and extracting organs of laboratory animals. Message 5: Rabbit, ferret. *Laboratornye zhivotnye dlya nauchnykh issledovaniy* = *Laboratory Animals for Science*. 2019;(3):5 (In Russ.)] <https://doi.org/10.29296/2618723X-2019-03-05>
23. Беляева ЕВ, Устенко ЖЮ, Гушин ЯА. Методика вскрытия и извлечения органов лабораторных животных. Сообщение 6: карликовые свиньи. *Лабораторные животные для научных исследований*. 2019;(4):8. [Belyaeva EV, Ustenko ZhYu, Gushchin YaA. Technique of dissection and extracting organs of laboratory animals. Message 6: minipigs. *Laboratornye zhivotnye dlya nauchnykh issledovaniy* = *Laboratory Animals for Science*. 2019;(4):8 (In Russ.)] <https://doi.org/10.29296/2618723X-2019-04-08>

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Ходько Светлана Владимировна, канд. мед. наук. Svetlana V. Khodko, Cand. Sci. (Med.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6935-075X>
Макарова Марина Николаевна, д-р мед. наук, профессор. Marina N. Makarova, Dr. Sci. (Med.), Professor. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3176-6386>
Макаров Валерий Геннадьевич, д-р мед. наук, профессор. Valery G. Makarov, Dr. Sci. (Med.), Professor. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2447-7888>
Салынов Сергей Сергеевич. Sergey S. Salynov. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9579-1508>
Родионова Наталья Владимировна. Natalia V. Rodionova. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2431-240X>

Статья поступила 21.07.2021
После доработки 08.09.2021
Принята к печати 20.09.2021

Article was received 21 July 2021
Revised 08 September 2021
Accepted for publication 20 September 2021

АКТУАЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Минздрав России представил на общественное обсуждение обновленное Положение «Об организации клинической апробации методов профилактики, диагностики, лечения и реабилитации и оказания медицинской помощи в рамках клинической апробации методов профилактики, диагностики, лечения и реабилитации (в том числе положения об организации оказания медицинской помощи в рамках клинической апробации), типовой формы протокола клинической апробации методов профилактики, диагностики, лечения и реабилитации». В документе регламентирована возможность применения препаратов и медицинских изделий off-label. В соответствии с новыми требованиями, медицинская организация должна предоставить ссылки на клинические исследования об эффективности и безопасности применения таких лекарственных средств или медицинских изделий. В качестве обоснования использования препарата вне зарегистрированных показаний также предлагается использовать ссылки на публикации в ведущих отечественных и (или) зарубежных рецензируемых научных журналах и изданиях. Уточняется, что во время клинической апробации невозможно проведение клинических исследований лекарственных препаратов и клинических испытаний медицинских изделий.

В проекте документа детализируется, что именно входит в экспертную оценку Минздравом России протокола клинической апробации. Экспертный совет проверяет научную обоснованность выбранного метода лечения, соответствие нормативам указанных препаратов и медицинских изделий, а также обоснованность финансовых затрат на апробацию. В остальном предлагаемое к принятию положение не отличается от действующего: проект содержит те же правила применения протоколов клинической апробации, сроки их утверждения и критерии оценки эффективности. В пояснительной записке к проекту положения отдельно указано: документ «разработан с целью совершенствования оказания медицинской помощи» и для «устранения коррупциогенных факторов».

Медицинскую помощь по протоколам клинической апробации разрешено оказывать с 2015 г., когда было утверждено положение, действующее и в настоящее время. Протокол направлен на отработку новых методов профилактики, диагностики, лечения и реабилитации. Новые методы могут опробовать не только федеральные медицинские учреждения, но и научные и образовательные организации в сфере охраны здоровья. В мае 2021 г. Минздрав России предложил разрешить использовать препараты и медицинские изделия «вне инструкции» при реализации протоколов клинической апробации, но изменения пока приняты не были.

В случае утверждения проекта Положения документ вступит в законную силу с 1 марта 2022 г.

Публикуется по: Д. Камаев. Минздрав разработал обновленное положение о клинической апробации. Vademecum от 24 августа 2021 г.¹

¹ <https://vademec.ru/news/2021/08/18/minzdrav-razrabotal-obnovlennoe-polozhenie-o-klinicheskoy-aproboatsii/>

Планирование программы клинических исследований препаратов для лечения аксиального спондилоартрита

Д. В. Горячев

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. В последнее десятилетие критерии диагностики и классификация спондилоартритов претерпели существенные изменения. Появление новых диагностических методов и накопление информации по прогнозу исхода заболевания привели к выделению отдельной группы спондилоартритов — аксиального спондилоартрита. Выделение этого заболевания связано со специфическими механизмами его развития и высокой социальной значимостью. Разработка лекарственных препаратов, применяющихся при терапии больных аксиальным спондилоартритом, имеет ряд особенностей, что требует подготовки специальных рекомендаций для проведения клинических исследований лекарственных препаратов. Цель работы — формирование методического подхода к проведению клинических исследований и оценке эффективности и безопасности лекарственных средств для системного лечения аксиального спондилоартрита. Для гармонизации экспертной оценки результатов национальных и зарубежных клинических исследований работа была проведена с учетом требований/рекомендаций Европейского агентства по лекарственным средствам по планированию клинических исследований лекарственных препаратов для лечения аксиального спондилоартрита. В работе выделены этапы клинических исследований, определены критерии оценки эффективности для каждого из этапов. Охарактеризованы методы и инструменты анализа конечных точек клинических исследований, необходимых для оценки влияния терапевтических воздействий. Описаны особенности дизайнов клинических исследований и длительность их проведения. Выделены задачи поисковых и подтверждающих клинических исследований. Рассмотрены цели лечения, показатели результатов лечения. Результаты исследования целесообразно использовать при разработке рекомендаций по программе клинического изучения новых препаратов для лечения аксиального спондилоартрита.

Ключевые слова: клиническое исследование; аксиальный спондилоартрит; анкилозирующий спондилит; первичная конечная точка; биологические лекарственные препараты; оценка эффективности и безопасности

Для цитирования: Горячев ДВ. Планирование программы клинических исследований препаратов для лечения аксиального спондилоартрита. *Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2021;11(3):202–211. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2021-11-2-202-211>

Контактное лицо: Горячев Дмитрий Владимирович; gorachev@expmed.ru

Planning a Clinical Trial Programme for Medicinal Products for the Treatment of Axial Spondyloarthritis

D. V. Goryachev

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

Abstract. The criteria for diagnosis and classification of spondyloarthritides (SpAs) have undergone significant changes over the past 10 years. The emergence of new diagnostic methods and availability of new information on the prognosis of the disease outcome made it possible to distinguish a separate group of SpAs—axial SpA. Axial SpA is distinguished as a separate disease due to its high social significance, and special mechanisms of its development. The development of medicinal products for the treatment of axial SpA has some specific features, which requires preparation of specific recommendations for conducting clinical trials of such products. The aim of the study was to elaborate a methodological approach to clinical research and evaluation of efficacy and safety of medicinal products for systemic treatment of axial SpA. The study took into account the requirements/recommendations of the European Medicines Agency for planning clinical trials of medicinal products for the treatment of axial SpA, in order to streamline evaluation of national and foreign clinical trial results. The paper identifies the main stages of clinical trials, and proposes criteria for assessing product efficacy at each stage. It defines methods and tools for assessing clinical trial endpoints, which are necessary for evaluation of treatment effects. The paper describes specific aspects of clinical trial designs and their duration, and identifies the objectives of exploratory and confirmatory clinical trials. It also reviews treatment goals and treatment outcome evaluation. The study results could be used in elaboration of recommendations for clinical research of new medicinal products for axial SpA.

Key words: clinical trial; axial spondyloarthritis; ankylosing spondylitis; primary endpoint; biological medicinal products; efficacy and safety assessment

For citation: Goryachev DV. Planning a clinical trial programme for medicinal products for the treatment of axial spondyloarthritis. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya* = *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2021;11(3):202–211. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2021-11-2-202-211>

Corresponding author: Dmitry V. Goryachev; gorachev@expmed.ru

Спондилоартриты — это группа заболеваний, характеризующихся общими клиническими и генетическими признаками, в которую включают анкилозирующий спондилит (АС), псориатический артрит, артрит/спондилит с воспалительным заболеванием кишечника, реактивный артрит, а также недифференцированный артрит. Наиболее характерным фактором риска, общим для этих заболеваний и связанным с генетическими особенностями пациентов, является присутствие в крови человеческого лейкоцитарного антигена HLA-B27 [1].

АС является наиболее распространенным подтипом аксиального спондилоартрита. Как правило, АС развивается медленно, диагноз в среднем устанавливают спустя 8 лет с начала заболевания. Для диагностики используют Модифицированные Нью-Йоркские классификационные критерии 1984 г. (mNY) [2], включающие наличие рентгенологических признаков сакроилеита. Однако установлено, что тяжесть заболевания пациентов с аксиальным спондилоартритом (аксСПА) не зависит от наличия рентгенологических признаков сакроилеита [3]. В 2009 г. Международное общество по изучению спондилоартритов (Assessment in SpondyloArthritis International Society, ASAS) предложило критерии, которые позволяют диагностировать аксСПА в большей популяции на более ранних сроках заболевания, нежели при использовании критериев mNY. Диагноз «нерентгенологический аксСПА» может быть установлен по наличию клинических признаков аксСПА в сочетании с носительством HLA-B27 [4].

АксСПА представляет собой хроническое воспалительное заболевание, которое затрагивает в первую очередь крестцово-подвздошные суставы и осевой скелет. Распространенность аксСПА среди европейского населения (включая АС и нерентгенологические формы) достигает 0,4%, частота АС оценивается в ~75% от общего числа аксСПА. Хотя АС чаще встречается у мужчин (соотношение мужчин и женщин оценивается в 2:1—3:1), женщины несколько чаще страдают нерентгенологическим аксСПА. АксСПА, как правило, имеет более тяжелое течение у мужчин, у которых в патологический процесс чаще вовлечен позвоночник [5].

Первая манифестация аксСПА обычно возникает в позднем подростковом или раннем взрослом возрасте (средний возраст начала заболевания 26 лет) и редко — после 45 лет. Клинические проявления включают боль в пояснице с преобладанием ночных болей, утреннюю скованность и нарушение физической функции. Могут возникать боль в груди, боль и отек периферических суставов и внесуставная болезненность, а также некоторые внесуставные проявления (передний увеит, псориаз, воспалительные

заболевания кишечника). Возможны нарушения сердечной проводимости, развитие заболеваний аортального клапана или почек, главным образом в форме вторичного почечного амилоидоза.

АксСПА сопровождается выраженным болевым синдромом и приводит к инвалидизации пациента. Функциональные ограничения связаны с воспалением на ранних стадиях заболевания, они усиливаются с течением заболевания из-за образования новой костной ткани. В целом большинство пациентов способны поддерживать функциональную работоспособность, однако у некоторых пациентов заболевание прогрессирует, и в молодом возрасте развивается анкилоз. Достоверных прогностических параметров, кроме раннего рентгенологического прогрессирования, не существует, но мужской пол, признаки воспаления, выявляемые методом магнитно-резонансной томографии (МРТ) в крестцово-подвздошных суставах и позвоночнике, повышенный уровень С-реактивного белка (СРБ) и поражение тазобедренного сустава на ранних сроках течения заболевания связаны с неблагоприятным прогнозом [6].

Согласно клиническим рекомендациям, первую линию терапии при аксСПА составляют физиотерапия и нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП)¹. Физиотерапия способствует увеличению подвижности позвоночника, уменьшению болевого синдрома и скованности. НПВП используют для контроля боли с хорошим эффектом у 50–70% пациентов с аксСПА. Таким образом, благодаря высокой симптоматической эффективности и возможному болезнью-модифицирующему действию НПВП считаются препаратами выбора для большинства пациентов с аксСПА. Если длительная терапия НПВП удовлетворительно переносится, то эти препараты обычно сохраняют в качестве фоновой терапии у пациентов с неполным ответом [6].

При воспалении крестцово-подвздошных или периферических суставов может быть рекомендовано внутрисуставное введение кортикостероидов. Традиционные болезнью-модифицирующие антиревматические препараты ограниченно применяются для лечения аксСПА за исключением сульфасалазина, который продемонстрировал некоторое влияние на протекание периферических заболеваний и внесуставные проявления, однако доказательств его положительного эффекта при тяжелом заболевании или у пациентов с существенным поражением позвоночника не получено [7]. Лечение биологическими лекарственными средствами (например, антитела к фактору некроза опухолей (анти-ФНО), антитела к интерлейкину-17 (анти-ИЛ-17)) рекомендуется пациентам

¹ Насонов ЕЛ, ред. Ревматология: клинические рекомендации. 2-е изд. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2011.

с персистирующей высокой активностью заболевания, несмотря на традиционное применение НПВП и физиотерапии.

Цель работы — подготовка рекомендаций по клиническим исследованиям и оценке эффективности и безопасности лекарственных препаратов для системного лечения аксСПА.

За рубежом единственный формализованный свод требований к проведению клинических исследований (КИ) препаратов для лечения аксСПА принят только Европейским агентством по лекарственным средствам (European Medicines Agency, ЕМА). Это руководство стало основой рекомендаций по объему и дизайну исследований в программе разработки рассматриваемых препаратов². Хотя данные рекомендации касаются разработки новых препаратов, принципиальные аспекты отбора пациентов для КИ актуальны и для планирования исследований воспроизведенных и биоаналогичных препаратов. Вопросы необходимой численности выборки пациентов для включения в КИ биоаналогичных препаратов для лечения АС рассмотрены в более ранних статьях [8].

Современные терапевтические подходы и подходы к классификации АС в Российской Федерации базируются на стратегиях, разработанных ведущими ревматологическими организациями: Американской коллегией по ревматологии (American College of Rheumatology, ACR) и Европейской антиревматической лигой (European League Against Rheumatism, EULAR), в состав которых входят и российские специалисты. Таким образом, выработка согласованной позиции, в частности, по отношению к объему КИ, является важным шагом развития национальных регуляторных требований и создания руководства по проведению клинического изучения препаратов для лечения ревматических заболеваний на территории стран — членов Евразийского экономического союза.

ВЫБОР ПАЦИЕНТОВ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

АС и нерентгенологический аксСПА представляют собой формы аксСПА, единственным дифференцирующим клиническим признаком которых является наличие или отсутствие рентгенологического сакроилеита. У значительной части пациентов с аксСПА, диагноз которых не был подтвержден рентгенологически, в течение длительного времени заболевание не прогрессирует до АС даже при сохранении активности патологического процесса [3]. Таким образом, предпочтительно, чтобы разрабатываемые препараты демонстрировали эффективность и безопасность как при терапии АС, так и в случае пациентов с неподтвержденным рентгенологически аксСПА.

Отбор пациентов для включения в КИ проводится в соответствии с общепринятыми классификационными критериями (возраст, пол, ограничение по функции почек и т. д.). Обе группы пациентов (аксСПА и АС) могут быть изучены в одном исследовании при условии, что каждая группа количественно репрезентативна, что позволит провести анализ подгрупп, а также оценить согласованность с результатами исследования в целом для обеих групп.

Анкилозирующий спондилит. Общепринятыми критериями диагностики АС являются критерии mNY, характеризующиеся высокой специфичностью. Одним из основных признаков заболевания, согласно критериям, является симметричный сакроилеит [2].

Нерентгенологический аксСПА. Группу заболеваний, охватываемую термином «нерентгенологический аксСПА», определяют критерии ASAS 2009 г. [4]. Эти критерии были приняты для отбора в КИ пациентов, имеющих боли в спине воспалительного генеза и диагноз аксСПА. Основным недостатком критериев ASAS является высокая частота некорректного диагностирования нерентгенологического аксСПА при наличии специфических изменений, обнаруженных методом МРТ [9]. Таким образом, пациенты могут быть включены в КИ препаратов для терапии аксСПА только в случае обоснованного исключения других заболеваний.

Могут быть введены дополнительные ограничения отбора пациентов для КИ. Так, например, в исследование могут быть включены только пациенты с объективными признаками воспаления, установленными независимой централизованной оценкой МРТ, и повышением уровня СРБ, которое не может быть объяснено иными, кроме аксСПА, причинами. Уровень СРБ является важным маркером отбора пациентов, отвечающих на терапию НПВП или анти-ФНО.

Исходная характеристика исследуемой популяции. Пациенты, включенные в КИ, должны быть должным образом охарактеризованы, в том числе должны быть указаны демографические характеристики, продолжительность заболевания с момента постановки диагноза и появления симптомов, предшествующая и сопутствующая терапия, диагностические действия, предпринятые перед включением пациентов в КИ (например, проведение скрининга, позволяющего выявить латентный туберкулез), сопутствующие заболевания, в том числе специфические заболевания, связанные с аксСПА (передний увеит, псориаз, воспалительные заболевания кишечника или сердечно-сосудистые заболевания — нарушения проводимости, поражение клапанов сердца).

² Guideline on the clinical investigation of medicinal products for the treatment of axial spondyloarthritis. EMA/CPMP/EWP/4891/03 Rev.1, Corr 1*.

Для выявления субпопуляций с различными соотношениями «польза — риск» исследуемого препарата могут быть учтены дополнительные параметры, например тяжесть и степень заболевания, активность заболевания, вовлечение спинного мозга и периферических суставов, отсутствие ответа на предыдущую терапию.

Пациенты должны быть охарактеризованы в зависимости от ответа на предыдущую терапию аксСПА. Целевыми группами пациентов, которые могут быть включены в КИ, являются группы пациентов, ранее не получавших / получавших биологические лекарственные препараты. Включение в группу, в которую входят пациенты с отсутствием или недостаточностью ответа на НПВП (наивные по отношению к терапии биологическими лекарственными препаратами), либо в группу с недостаточностью ответа на один или несколько биологических препаратов требует строгой фиксации отсутствия ответа с указанием препарата, его дозы и продолжительности лечения.

Активность заболевания на момент включения пациента в исследование следует отличать от степени повреждения тканей и функциональной недостаточности или инвалидности пациента. Активность заболевания оценивают с помощью валидированных шкал BASDAI (Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index) или ASDAS (Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score) с учетом оценки степени проявления таких симптомов заболевания, как боль или скованность. Оценка заболевания пациентами может также осуществляться с помощью числовых рейтинговых шкал [10].

Для повышения объективности фиксации ответа на лечение в КИ включают пациентов, активность заболевания которых заметно выражена ($BASDAI \geq 4$ или $ASDAS \geq 2,1$ и оценка ночной/спинальной боли по рейтинговой шкале оценки (Numeric Rating Scale for Pain (NRS) или визуальной аналоговой шкале (ВАШ) ≥ 4). До начала исследования следует определить предполагаемую длительность активной фазы заболевания, определить начальный уровень показателей, которые впоследствии могут быть использованы для контроля эффективности исследуемого препарата (концентрации маркеров воспаления, таких как СРБ или скорость оседания эритроцитов (СОЭ), наличие признаков воспаления по данным МРТ и др.).

Тяжесть заболевания определяется и такими параметрами, как степень необратимого структурного повреждения, вовлечение в патологический процесс периферических суставов и других органов, сопутствующие заболевания и невосприимчивость к предыдущему лечению. В настоящее время не существует комплексной системы оценки степени тяжести заболевания, учитывающей одновременно все отмеченные элементы.

Сопутствующее лечение аксСПА должно быть приостановлено до рандомизации пациентов, получающих постоянную дозу исследуемого препарата в течение достаточного периода времени.

Целесообразно провести анализ клинически наиболее значимых подгрупп с учетом известных прогностических факторов. Для снижения риска дисбаланса прогностических факторов, таких как предшествующее применение биологических лекарственных средств и/или степень активности, и/или наличие или отсутствие объективных признаков воспаления, определяемых методом МРТ и/или уровнем СРБ в крови, рекомендуется использовать стратифицированную рандомизацию. При возможности следует рассмотреть стратификацию отдельных популяций по наличию АС и нерентгенологического аксСПА.

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА

Цели терапии аксСПА можно классифицировать следующим образом:

- снижение выраженности симптомов и признаков заболевания, таких как боль и скованность;
- улучшение физической функции;
- замедление или предотвращение структурных повреждений.

Основная конечная точка эффективности будет зависеть от механизма действия препарата и предполагаемой терапевтической цели.

Ключевыми релевантными конечными точками во всех группах пациентов аксСПА являются снижение выраженности симптомов и признаков заболевания, а также улучшение/поддержание физической функции³. Клинические аспекты могут быть оценены по отдельности или комплексно с использованием индексов, позволяющих выполнять оценку нескольких признаков одновременно. Следует отметить, что при использовании комбинированных индексов в качестве первичных или вторичных конечных точек приемлемы только валидированные составные конечные точки. Критерии ответа должны быть адекватно обоснованы, выбраны до начала исследования, а их пороговые значения должны быть заранее определены.

ПЕРВИЧНЫЕ КОНЕЧНЫЕ ТОЧКИ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРАПИИ

В КИ может быть использована оценка по критериям ASAS (ASAS 20, ASAS 40), которые определяются как улучшение не менее чем на 20 или 40% соответственно, по крайней мере трех из следующих параметров: общая оценка состояния пациента, оценка боли, физическая функция и утренняя скованность, воспаление (при условии отсутствия ухудшения по другим признакам) [11, 12]. В КИ

³ Насонов ЕЛ, ред. Ревматология: клинические рекомендации. 2-е изд. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2011.

ряда препаратов в качестве достаточной первичной конечной точки была принята доля пациентов, достигших ответа по критериям ASAS 20. Более выраженный клинический ответ, например критерии ASAS 40, рекомендуется использовать в качестве первичной конечной точки в КИ биологических лекарственных средств или препаратов новых терапевтических классов [13, 14].

Другие валидированные и общепринятые методы оценки активности заболевания и физической функции предполагают использование индекса активности ASDAS. Чтобы облегчить интерпретацию клинической значимости наблюдаемого эффекта, предпочтение отдается анализу частоты тех или иных ответов, а не оценке средних значений абсолютных изменений, однако в оценке результатов исследования следует предусмотреть и то, и другое. В зависимости от значения показателя ASDAS заболевание квалифицируют по четырем степеням активности: неактивное (ASDAS < 1,3), низкое (от $\geq 1,3$ до <2,1), высокое (от $\geq 2,1$ до $\leq 3,5$) и очень высокое (>3,5). Для демонстрации улучшения могут быть использованы пороговые показатели ASDAS-CII (ASDAS — Clinically Important Improvement) — снижение от исходного уровня ASDAS на $\geq 1,1$, и ASDAS-MI (ASDAS — Major Improvement) — снижение от исходного уровня ASDAS на $\geq 2,0$ [15].

По мере появления новых эффективных методов лечения аксСПА в качестве цели терапии все чаще рассматривают ремиссию заболевания. КИ препаратов для терапии аксСПА ориентируются на достижение частичной ремиссии или низкой активности заболевания (критерии достижения: ASDAS < 1,3 (активность заболевания отсутствует), ASDAS < 2,1 (низкая активность заболевания), ASAS ≤ 2 (частичная ремиссия), BASDAI < 3), поскольку критерии полной ремиссии в настоящее время не определены и достижение полной ремиссии не может рассматриваться в качестве реалистичной цели⁴.

ВТОРИЧНЫЕ КОНЕЧНЫЕ ТОЧКИ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРАПИИ

Интегральные оценки. BASDAI — индекс, включающий оценку пациентами боли, дискомфорта, скованности и усталости. Количество пациентов, клинический ответ которых характеризуется улучшением балла BASDAI по крайней мере на 50%, может использоваться для оценки потенциальной пользы фармакотерапии [16].

Другими вторичными конечными точками могут быть отдельные компоненты оценки ASAS, а также оценки основных симптомов заболевания, включая боль и физическую функцию. Дополнительными

конечными точками могут быть критерии ASAS 20, 40, ASAS 5/6, а также количество болезненных суставов и припухших суставов (изменение от исходного уровня), если они не выбраны в качестве первичных конечных точек [17].

Подвижность позвоночника. Индекс ASAS не включает оценку подвижности позвоночника, которая является важным параметром эффективности препарата при терапии аксСПА. Таким образом, если в качестве первичной конечной точки выбран индекс ASAS, то он должен быть дополнен оценкой подвижности позвоночника в качестве вторичной конечной точки.

Оценка пациентом собственного состояния и качества жизни.

Маркеры острой фазы воспаления. Несмотря на то что уровень СРБ или СОЭ могут характеризовать активность заболевания и его прогноз, данные, подтверждающие обоснованность их использования в качестве суррогатных конечных точек для оценки эффективности лечения аксСПА, отсутствуют. У части пациентов высокая активность заболевания не сопровождается лабораторными изменениями [10]. В то же время уровень СРБ считается важным показателем, используемым при диагностике активного заболевания.

Периферические суставы и энтезы. У пациентов с поражениями энтезов и периферических суставов оценивают эффективность препаратов по отношению к уменьшению проявлений этих клинических симптомов.

Внесуставные проявления. Учитывая распространенность внесуставных проявлений спондилоартрита (увеит, воспалительные заболевания кишечника и псориаз), следует документировать анамнез и наличие этих проявлений и регистрировать их новое возникновение или усиление.

Структурные изменения костной ткани. Связь между воспалением и формированием новой костной ткани при аксСПА остается неясной, поскольку даже у пациентов, имеющих хороший ответ на лечение, могут быть отмечены рентгенологические признаки развития заболевания. На сегодняшний день в рандомизированных контролируемых КИ не продемонстрировано значимого влияния препаратов на предотвращение и торможение развития остеодеструктивных или остеопролиферативных изменений. Таким образом, предотвращение структурных повреждений считается возможной конечной точкой, подлежащей оценке, но не обязательной для подтверждения. Рекомендуется систематически отслеживать действие препаратов на структурные изменения во всех КИ, в том числе направленных на подтверждение влияния препарата на иные симптомы.

⁴ Guideline on the clinical investigation of medicinal products for the treatment of axial spondyloarthritis. EMA/CPMP/EWP/4891/03 Rev.1, Corr 1*.

МЕТОДЫ ОЦЕНКИ КРИТЕРИЕВ ЭФФЕКТИВНОСТИ

Воспалительная боль является основным симптомом аксСПА и оценивается пациентом самостоятельно с помощью шкалы ВАШ [17]. Пациент оценивает болезненные ощущения за недавний период (например, прошлая неделя или последние 48 ч) и отдельно боль в ночное время. Также для оценки боли применяется индекс активности BASDAI, характеризующий состояние пациента в течение последней недели, в том числе: боль, локализованную в области шеи, спины, бедер; общий уровень боли/отека в суставах, локализованных вне шеи, спины, бедра; общий дискомфорт любых областей, чувствительных к прикосновению или надавливанию. Оценку боли в спине и периферической боли/отека также можно выполнить, используя критерии ASDAS.

Подвижность позвоночника. Важным симптомом аксСПА является утренняя скованность позвоночника, уменьшающаяся при движении. Индекс BASDAI позволяет оценить ригидность путем оценки пациентом интенсивности утренней скованности по шкале ВАШ или числовой шкале измерения боли NRS, а также продолжительность периода скованности с момента пробуждения. Состояние оценивается за предшествующую неделю. Утреннюю скованность также можно оценить с помощью ASDAS.

Физическая функция. Наиболее часто используемым инструментом оценки функционального статуса является опросник BASFI (Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index) (функциональный индекс AC)⁵. Считается, что по сравнению с другими инструментами BASFI позволяет лучше отразить изменение состояния пациента и наиболее прост в использовании [18].

Общая оценка состояния пациента производится с помощью шкалы ВАШ.

Подвижность позвоночника. Основным клиническим проявлением поражения при аксСПА является нарастающее ограничение подвижности всех отделов позвоночника. На коротком промежутке времени изменения подвижности позвоночника обнаружить затруднительно, хотя часто этот показатель в большей степени отражает тяжесть заболевания, чем продолжающееся воспаление. Наиболее применяемыми инструментами для оценки подвижности являются экскурсия грудной клетки, модифицированный тест Шобера, боковое сгибание позвоночника и определение симптома Форестье (измерение расстояния от затылка до стены при положении человека стоя, прикасаясь пятками, туловищем и головой к стене), однако они характеризуются существенной изменчивостью результатов и невысокой надежностью.

Приемлемым методом оценки подвижности позвоночника и функции тазобедренного сустава является метрологический индекс анкилозирующего спондилита BASMI (Bath Ankylosing Spondylitis Metrology Index). При использовании индекса BASMI дополнительно может быть измерена экскурсия грудной клетки [10, 19].

Структурные изменения костной ткани. Оценка остеодеструктивных и остеопролиферативных изменений и их прогрессирования основана на методах лучевой диагностики (стандартная рентгенография, МРТ в режиме T1, двухэнергетическая рентгеновская абсорбциометрия, количественная компьютерная томография). При оценке необходимо дифференцировать острые и хронические процессы.

Наиболее предпочтительными валидованными и чувствительными методами оценки радиологических изменений являются модифицированный индекс SASSS (Stoke Ankylosing Spondylitis Spine Score) и RASSS (Radiographic Ankylosing Spondylitis Spinal Score) [20].

В системе подсчета баллов SPARCC (Spondyloarthritis Research Consortium of Canada) учитывают 6 наиболее сильно пораженных позвоночно-двигательных сегментов, хотя оценивают воспалительные процессы во всех отделах позвоночника. Оценку степени воспаления проводят в трех измерениях по трем последовательным сагитальным срезам обнаруженного участка поражения в режиме последовательной инверсии-восстановления спинного эха (Short Tau Inversion Recovery, STIR) и усилением сигнала T1 гадолинием пентатом в каждом из квадрантов. Оценку в баллах выполняют на дихотомической основе (1 — наличие; 0 — отсутствие) и повторяют для каждого из 3 последовательных сагитальных срезов. Дополнительные баллы начисляют в случае наличия на каждом из сагитальных срезов поражения с высокой интенсивностью МРТ-сигнала (сравнимой с сигналом, получаемым от цереброспинальной жидкости) в любом позвоночно-двигательном сегменте и повреждений с непрерывной глубиной ≥ 1 см, начинающихся от боковой пластины.

Метод SPARCC имеет преимущества с точки зрения надежности, в то время как альтернативный метод ASspiMRI-a (Ankylosing Spondylitis Spine MRI Score for Activity) и его модификация Berlin предпочтительнее для общей характеристики воспалительных процессов, протекающих в позвоночнике. Период времени, необходимый для оценки минимально значимых изменений, составляет не менее 24 недель [21].

Рентгенограммы должны быть сделаны в фиксированные и заранее определенные моменты времени и оценены, по крайней мере, двумя специалистами, ослепленными в отношении распределения

⁵ <https://revmatolog34.ru/patsientam/indeksy/indeks-basfi>

пациентов по виду лечения, хронологической последовательности рентгенограмм и первоначальной оценки другим специалистом. Следует оценить средние изменения исходной оценки.

Полученные методом МРТ позвоночника и крестцово-подвздошных суставов результаты не могут быть выбраны в качестве первичной конечной точки, поскольку метод не полностью валидирован для оценки изменений в динамике. Однако этот метод может быть использован для оценки наличия и последствий воспаления, особенно на до-рентгенологической стадии заболевания. Оценку, сделанную методами лучевой диагностики, необходимо дополнять демонстрацией влияния препарата на клинические признаки замедления или предотвращения структурного повреждения (т. е. влияния на подвижность позвоночника) [22].

Периферические суставы и энтезы. Влияние препарата на процессы в периферических суставах может быть определено путем оценки изменения количества припухших или болезненных суставов. Оценка зависит от степени вовлечения суставов и представляет собой суставной индекс, суммирующий оценку состояния 44 суставов (число болезненных и число припухших суставов). Для оценки энтезопатии было разработано несколько индексов, в том числе MASES (Maastricht AS Enthesitis Score), основанный на анализе 13 локализаций. Также могут применяться и другие валидированные методы оценки, учитывающие большие количества областей энтезов [23].

Качество жизни (QoL) может оцениваться как с помощью специализированных шкал, например ASQoL (Ankylosing Spondylitis Quality of Life questionnaire) [24], ASAS Health Index (ASAS Health Index Assessment of Spondyloarthritis international Society Health Index)⁶, так и с помощью общих инструментов, например SF-36 (36-Item Short Form Survey)⁷, FACIT-Fatigue (Functional Assessment of Chronic Illness Therapy — Fatigue)⁸, EQ-5D (EuroQol Group questionnaire)⁹ или WPAI-GH (Work Productivity and Activity Impairment Questionnaire)¹⁰. Использование последних может дать дополнительную информацию об эффективности препарата [19].

ДИЗАЙН ИССЛЕДОВАНИЯ

Фармакокинетика. Исследования фармакокинетики обычно проводят в соответствии с общими принципами, которые отражены в соответствующих международных руководствах (см., например,¹¹).

Фармакодинамика. Фармакодинамические свойства лекарственного средства должны быть исследованы в соответствии с существующими рекомендациями¹².

Взаимодействия. Должны быть проведены исследования взаимодействия с препаратами, которые могут применяться в клинической практике совместно с исследуемым препаратом (например, НПВП, синтетические болезнь-модифицирующие противоревматические препараты).

ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Поисковые исследования. Рекомендации по дозированию препаратов для лечения аксСПА, основанные на исследованиях их применения при иных ревматических заболеваниях, имеют ограниченную ценность, поскольку терапия различных заболеваний требует назначения препаратов в разных дозах (например, при воспалительных заболеваниях кишечника препараты назначаются в более высоких дозах). Таким образом, необходимо выполнение специфических исследований «доза — ответ» при аксСПА, в том числе в группах пациентов с различными характеристиками (например, активность заболевания, масса тела, длительность патологического процесса).

При выполнении поисковых КИ рекомендуется проведение плацебо-контролируемых параллельных исследований. Для оценки критериев эффективности терапии в краткосрочных исследованиях (12–24 недели) используются составные индексы ASAS 20 или 40 [12, 13].

Подтверждающие исследования. Традиционное лечение аксСПА заключается в применении НПВП в сочетании с физиотерапией, что обычно достаточно для контроля боли и улучшения физической функции у большинства пациентов. Новые препараты, относящиеся к терапевтическим классам, отличным от НПВП, изучают с целью возможности применения у пациентов, не отвечающих на терапию НПВП или плохо ее переносящих, наивных или не отвечающих на один или несколько биологических лекарственных препаратов. Пациенты, принимающие НПВП, но не достигающие необходимого контроля симптомов, должны продолжать терапию НПВП при условии сохранения стабильной дозы препарата до рандомизации. Особые требования к приему синтетических болезнь-модифицирующих противоревматических препаратов отсутствуют, поскольку их применение, как ожидается, будет ограничено при аксСПА.

⁶ <https://www.asas-group.org/instruments/asas-health-index/>

⁷ https://www.rand.org/health-care/surveys_tools/mos/36-item-short-form.html

⁸ <https://www.facit.org/measures/FACIT-F>

⁹ <https://euroqol.org/>

¹⁰ <https://eprovide.mapi-trust.org/instruments/work-productivity-and-activity-impairment-questionnaire-general-health-v2.0>

¹¹ Pharmacokinetic studies in man. 75/318/EEC. EMA; 1987.

¹² Руководство по общим вопросам клинических исследований. Приложение к Рекомендации Коллегии Евразийской экономической комиссии от 17 июля 2018 г. № 11.

Любые изменения в сопутствующей терапии должны быть тщательно документированы, а влияние изменений терапии на результаты лечения должно быть проанализировано на основе заранее разработанного алгоритма оценки влияния сопутствующей терапии, например влияние дополнительных анальгетиков может потребовать расчета интенсивности боли по значению, полученному до момента приема дополнительного препарата.

Пациенты с недостаточным ответом на НПВП (наивные по отношению к биологическим лекарственным препаратам). Исследования — рандомизированные двойные слепые проводят в параллельных группах. Эффективность препаратов, применяемых с целью снижения выраженности клинических симптомов и активности заболевания или улучшения физической функции, устанавливают по результатам плацебо-контролируемых исследований, запланированных по принципу дополнения терапии (add-on) при условии сохранения терапии НПВП и физиотерапевтических процедур. Для оценки соотношения «польза — риск» при исследовании препаратов, относящихся к новым терапевтическим классам, может потребоваться сопоставление с активным препаратом сравнения (например, анти-ФНО). Рекомендуется провести исследование в трех группах (группа плацебо, группа изучаемого препарата, группа стандартного препарата для базисной терапии), особенно при включении в КИ пациентов, не получавших биологические препараты.

Пациенты с недостаточным ответом на биологические лекарственные препараты. Эффективность препаратов, направленных на уменьшение симптомов и снижение активности заболевания или улучшение физической функции, может быть установлена путем проведения рандомизированных двойных слепых плацебо-контролируемых исследований в параллельных группах, которые могут быть запланированы по принципу дополнения терапии (add-on) (см., например, [13]). Альтернативой может быть активное контролируемое исследование превосходства или не меньшей эффективности, в котором пациенты в дополнение к сопутствующей традиционной терапии рандомизируются в группу получающих исследуемый препарат или в группу получающих иной известный биологический препарат (таким препаратом не может быть препарат, на который ранее не был получен адекватный ответ) [25].

Отбор пациентов. Эффективность биологических лекарственных препаратов может быть изучена отдельно в группах пациентов, не получавших и/или ранее получавших лечение, но не имевших достаточного ответа на применение этих препаратов.

Для определения популяции, чувствительной к препаратам, уменьшающим выраженность проявлений заболевания, необходим набор пациентов с достаточной степенью активности заболевания.

При отборе пациентов важно учитывать риски сохранения системного влияния препаратов, применяемых до периода рандомизации. С учетом этого пациенты, которые ранее получали биологический лекарственный препарат, могут быть рандомизированы только после соответствующего периода отмывки.

Время оценки конечных точек. Ожидается, что препараты для лечения аксСПА должны уменьшать проявления клинических симптомов и улучшать физическую функцию. Рекомендуются первичные конечные точки указаны выше и учитывают эту особенность. Оптимальное время достижения первичной конечной точки зависит от ожидаемого уровня ответа на лечение. В исследованиях препаратов, отличных от НПВП (например, анти-ФНО, других биологических препаратов), первичная конечная точка может быть оценена между 12 и 24 неделями с момента включения пациента в КИ.

Несмотря на то что эффективность препарата может быть продемонстрирована уже через 12–24 недели терапии, следует изучить сохранение эффекта в более длительных испытаниях (обычно не менее 1 года), поскольку АксСПА — хроническое заболевание и симптоматическое лечение может продолжаться в течение длительного периода.

Остаточное воспаление может привести к прогрессированию структурных повреждений, несмотря на адекватный контроль симптомов на краткосрочном периоде исследования. В связи с этим рекомендуется проводить мониторинг структурных изменений в течение длительного периода.

Особую информационную ценность представляет изучение возможности использования уменьшенной дозы, увеличенного интервала дозирования или прекращения лечения при сохранении контроля над заболеванием. Эти данные могут быть получены в пострегистрационной программе изучения препарата.

Замедление или предотвращение структурных повреждений. Подтверждающие исследования влияния на предотвращение структурных повреждений и нарушений функций, подвижность позвоночника и контроля инвалидности должны быть параллельными контролируемыми длительными (обычно не менее 2 лет) двойными слепыми плацебо-контролируемыми. Однако проведение длительных плацебо-контролируемых исследований может быть неприемлемым по этическим соображениям.

Пациенты с низкой активностью заболевания могут быть включены в длительное исследование при применении изучаемого препарата в дополнение к стандартной (НПВП и физиотерапия) терапии (add-on). Однако в некоторых случаях (например, частые/болезненные парентеральные введения) реализация длительного плацебо-контролируемого исследования также может быть затруднена.

С другой стороны, в данной популяции демонстрация предотвращения структурных повреждений может быть невозможной из-за медленного прогрессирования заболевания при его низкой активности.

Пациенты с высокой активностью заболевания не могут участвовать в плацебо-контролируемом исследовании в течение длительного периода при наличии эффективных методов лечения, отличных от терапии НПВП (например, применение биологических болезнь-модифицирующих препаратов), поэтому следует оценить возможность применения альтернативных дизайнов исследования. Возможной альтернативой может быть исследование с рандомизированной задержкой начала активного лечения. Различия между группами, имеющиеся в начале исследования, могут сохраняться в конце двух- или трехлетнего периода проведения КИ.

ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОФИЛЯ БЕЗОПАСНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА

Специфические нежелательные реакции. К моменту регистрации лекарственного препарата должна быть получена достаточная информация о его безопасности. Полезным дополнением могут быть данные о безопасности применения препарата, полученные в ходе исследований его применения по другим показаниям. Анализ данных должен быть направлен на изучение нежелательных реакций, связанных с механизмом действия конкретного лекарственного средства, или рисками, известными для класса веществ (например, для анти-ФНО и других биологических лекарственных средств такими реакциями могут быть развитие инфекционных заболеваний, злокачественные новообразования, реакции в месте инфузии или инъекции). Некоторые из специфических нежелательных реакций могут возникнуть после прекращения приема препарата, мониторинг таких реакций должен проводиться в течение длительного периода после окончания лечения.

При оценке безопасности потенциально токсичных препаратов желательно запланировать проведение исследований методами, позволяющими с максимальной вероятностью выявить наиболее полный спектр нежелательных реакций. Дополнительно оценивают функции иммунной системы (например, по содержанию сывороточных иммуноглобулинов и лимфоцитов) и иммуногенность биологических препаратов.

Долгосрочные побочные эффекты. База данных по безопасности, представляемая для оценки нового препарата, должна быть достаточно большой, должен быть учтен механизм действия препарата и сопутствующие заболевания пациентов. В случае если аксСПА является дополнительным показанием к применению уже зарегистрированного препарата или препарата, исследуемого по другим показаниям

(например, ревматоидный артрит или псориатический артрит), данные о безопасности, полученные в ходе исследований по другим показаниям, могут рассматриваться как дополнительные при условии, что режим дозирования одинаков.

При проведении подтверждающих исследований эффективности, а также других исследований, специфичных для аксСПА, могут быть получены и данные по безопасности применения препарата. В связи с хроническим характером заболевания и необходимостью длительного лечения период наблюдения в КИ должен превышать 12 месяцев (например, 18–24 месяца).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Планирование клинических исследований препаратов, применяемых при терапии аксСПА, следует проводить с учетом классификации заболевания, существенно изменившейся за последние годы. Дизайн клинического исследования должен учитывать специфику, механизм действия инновационных препаратов для лечения аутоиммунных заболеваний и особенности целевой популяции. Результаты анализа дизайнов клинических исследований препаратов, применяемых для лечения АС, а также международных рекомендаций показали, что длительность терапии в подтверждающих клинических исследованиях в целом не может составлять менее одного года. Особое внимание следует уделять сопутствующей терапии и активной терапии в группе сравнения. Критерии эффективности препаратов охватывают широкий спектр характеристик и существенным образом связаны с оценкой функционального состояния пациентов.

Результаты исследования целесообразно использовать при разработке рекомендаций по программе клинического изучения новых препаратов для лечения аксиального спондилоартрита. Рекомендации, гармонизированные с требованиями ведущего регуляторного органа Европейского союза, позволят повысить качество проводимых клинических исследований и уровень взаимного признания международных и отечественных исследований.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00005-21-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121021800098-4).

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00005-21-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121021800098-4).

Конфликт интересов. Д. В. Горячев является членом редколлегии журнала «Вестник НЦЭСМП».

Conflict of interest. Dmitry V. Goryachev is a member of the Editorial Board of *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Эрдес ШФ, Бадюкин ВВ, Бочкова АГ, Бугрова ОВ, Гайдуклова ИЗ, Годзенко АА и др. О терминологии спондилоартритов. *Научно-практическая ревматология*. 2015;53(6):657–60. [Erdes SF, Bado-kin VV, Bochkova AG, Bugrova OV, Gaidukova IZ, Godzenko AA, et al. On the terminology of spondyloarthritis. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*. 2015;53(6):657–60 (In Russ.)) <https://doi.org/10.14412/1995-4484-2015-657-660>
2. van der Linden S, Valkenburg HA, Cats A. Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis. A proposal for modification of the New York criteria. *Arthritis Rheum*. 1984;27(4):361–8. <https://doi.org/10.1002/art.1780270401>
3. Румянцева ДГ, Дубинина ТВ, Демина АБ, Румянцева ОА, Агафонова ЕМ, Смирнов АВ, Эрдес ШФ. Анкилозирующий спондилит и нерентгенологический аксиальный спондилоартрит: две стадии одной болезни? *Терапевтический архив*. 2017;89(5):33–7. [Rumyantseva DG, Dubinina TV, Demina AB, Rumyantseva OA, Agafonova EM, Smirnov AV, Erdes SHF. Ankylosing spondylitis and non-radiographic axial spondyloarthritis: Two stages of disease? *Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic Archive*. 2017;89(5):33–7 (In Russ.)) <https://doi.org/10.17116/terarkh201789533-37>
4. Rudwaleit M, van der Heijde D, Landewé R, Listing J, Akkoc N, Brandt J, et al. The development of Assessment of SpondyloArthritis international Society classification criteria for axial spondyloarthritis (part II): validation and final selection. *Ann Rheum Dis*. 2009;68(6):777–83. <https://doi.org/10.1136/ard.2009.108233>
5. Wang R, Ward M. Epidemiology of axial spondyloarthritis: an update. *Curr Opin Rheumatol*. 2018;30(2):137–43. <https://doi.org/10.1097/bor.0000000000000475>
6. Taurog J, Chhabra A, Colbert R. Ankylosing spondylitis and axial spondyloarthritis. *N Engl J Med*. 2016;374(26):2563–74. <https://doi.org/10.1056/nejmra1406182>
7. Chen J, Lin S, Liu C. Sulfasalazine for ankylosing spondylitis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014;(11):CD004800. <https://doi.org/10.1002/14651858.cd004800.pub3>
8. Горячев ДВ, Тельных ИО, Бунятян НД. Регуляторные подходы к оценке биоаналогов для лечения ревматических заболеваний. *Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2017;7(3):155–63. [Goryachev DV, Telnykh MYu, Bunyatyan ND. Regulatory approaches to evaluation of biosimilars for treatment of rheumatic diseases. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2017;7(3):155–63 (In Russ.))
9. Aouad K, Maksymowich W, Baraliakos X, Ziade N. Update of imaging in the diagnosis and management of axial spondyloarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2020;34(6):101628. <https://doi.org/10.1016/j.bberh.2020.101628>
10. Дубинина ТВ, Гайдуклова ИЗ, Годзенко АА, Лапшина СА, Ребров АП, Румянцева ОА и др. Рекомендации по оценке активности болезни и функционального состояния больных анкилозирующим спондилитом в клинической практике. *Научно-практическая ревматология*. 2017;55(4):344–50. [Dubinina TV, Gaidukova IZ, Godzenko AA, Lapshina SA, Rebrov AP, Rumyantseva OA, et al. Guidelines for the assessment of disease activity and functional status in patients with ankylosing spondylitis in clinical practice. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*. 2017;55(4):344–50 (In Russ.)) <https://doi.org/10.14412/1995-4484-2017-344-350>
11. Anderson JJ, Baron G, van der Heijde D, Felson DT, Dougados M. Ankylosing spondylitis assessment group preliminary definition of short-term improvement in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum*. 2001;44(8):1876–86. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(200108\)44:8%3C1876::aid-art326%3E3.0.co;2-f](https://doi.org/10.1002/1529-0131(200108)44:8%3C1876::aid-art326%3E3.0.co;2-f)
12. Бочкова АГ, Левшакова АВ, Бунчук НВ. Ранний диагноз анкилозирующего спондилита: оценка критериев аксиального спондилоартрита, предложенных Международной рабочей группой по изучению анкилозирующего спондилита (ASAS). *Научно-практическая ревматология*. 2010;48(2):36–43. [Bochkova AG, Levshakova AV, Bunchuk NV. Early diagnosis of ankylosing spondylitis: assessment the criteria for axial spondyloarthritis, proposed by the International Working Group of the Assessment of SpondyloArthritis Society (ASAS). *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*. 2010;48(2):36–43 (In Russ.)) <https://doi.org/10.14412/1995-4484-2010-1414>
13. Baeten D, Sieper J, Braun J, Baraliakos X, Dougados M, Emery P, et al. Secukinumab, an Interleukin-17A inhibitor, in ankylosing spondylitis. *N Engl J Med*. 2015;373(26):2534–48. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1505066>
14. van der Heijde D, Deodhar A, Wei JC, Drescher E, Fleischaker D, Hendriks T, et al. Tofacitinib in patients with ankylosing spondylitis: a phase II, 16-week, randomised, placebo controlled, dose-ranging study. *Ann Rheum Dis*. 2017;76(8):1340–7. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2016-210322>
15. Machado P, Landewé R, Lie E, Kvien TK, Braun J, Baker D, van der Heijde D. Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score (ASDAS): defining cut-off values for disease activity states and improvement scores. *Ann Rheum Dis*. 2011;70(1):47–53. <https://doi.org/10.1136/ard.2010.138594>
16. Garrett S, Jenkinson T, Kennedy LG, Whitelock H, Gaisford P, Calin A. A new approach to defining disease status in ankylosing spondylitis: the Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index. *J Rheumatol*. 1994;21(12):2286–91. PMID: 7699630
17. Годзенко АА, Корсакова ЮЛ, Бадюкин ВВ. Методы оценки воспалительной активности и эффективности терапии при спондилоартритах. *Современная ревматология*. 2012;6(2):66–76. [Godzenko AA, Korsakova YuL, Badoikin VV. Methods for the evaluation of inflammatory activity and therapy efficiency in spondyloarthritis. *Sovremennaya revmatologiya = Modern Rheumatology Journal*. 2012;6(2):66–76 (In Russ.)) <https://doi.org/10.14412/1996-7012-2012-730>
18. Landewé R, van Tubergen A. Clinical tools to assess and monitor spondyloarthritis. *Curr Rheumatol Rep*. 2015;17(7):47. <https://doi.org/10.1007/s11926-015-0522-3>
19. Zochling J. Measures of symptoms and disease status in ankylosing spondylitis. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2011;63(Suppl 11):S47–58. <https://doi.org/10.1002/acr.20575>
20. Ramiro S, van Tubergen A, Stolwijk C, Landewé R, van de Bosch F, Dougados M, van der Heijde D. Scoring radiographic progression in ankylosing spondylitis: should we use the modified Stoke Ankylosing Spondylitis Spine Score (mSASSS) or the Radiographic Ankylosing Spondylitis Spinal Score (RASSS)? *Arthritis Res Ther*. 2013;15(1):R14. <https://doi.org/10.1186/ar4144>
21. Lukas C, Braun J, van der Heijde D, Hermann KG, Rudwaleit M, Østergaard M, et al. Scoring inflammatory activity of the spine by magnetic resonance imaging in ankylosing spondylitis: a multireader experiment. *J Rheumatol*. 2007;34(4):862–70. PMID: 17407241
22. van der Heijde D, Braun J, Deodhar A, Baraliakos X, Landewé R, Richards HB, et al. Modified stoke ankylosing spondylitis spinal score as an outcome measure to assess the impact of treatment on structural progression in ankylosing spondylitis. *Rheumatology (Oxford)*. 2019;58(3):388–400. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/key128>
23. Heuft-Dorenbosch L, Spoorenberg A, van Tubergen A, Landewé R, Tempel H, Mielants H, et al. Assessment of enthesitis in ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis*. 2003;62(2):127–32. <https://doi.org/10.1136/ard.62.2.127>
24. Doward L, Spoorenberg A, Cook S, Whalley D, Helliwell P, Kay L, et al. Development of the ASQoL: a quality of life instrument specific to ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis*. 2003;62(1):20–6. <https://doi.org/10.1136/ard.62.1.20>
25. Deodhar A, Poddubnyy D, Pacheco-Tena C, Salvarani C, Lespes-silles E, Rahman P, et al. Efficacy and safety of Ixekizumab in the treatment of radiographic axial spondyloarthritis: sixteen-week results from a phase III randomized, double-blind, placebo-controlled trial in patients with prior inadequate response to or intolerance of tumor necrosis factor inhibitors. *Arthritis Rheumatol*. 2019;71(4):599–611. <https://doi.org/10.1002/art.40753>

ОБ АВТОРЕ / AUTHOR

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

Статья поступила 01.03.2021

После доработки 21.06.2021

Принята к печати 20.09.2021

Article was received 1 March 2021

Revised 21 June 2021

Accepted for publication 20 September 2021



**Подписку на журнал можно оформить
в любом отделении «Почты России».**

Подписной индекс издания:

- с любого номера в региональных агентствах подписки
Урал-Пресс (www.ural-press.ru) — 57942
- по объединенному каталогу
«Пресса России» (www.pressa-rf.ru) — T57942

