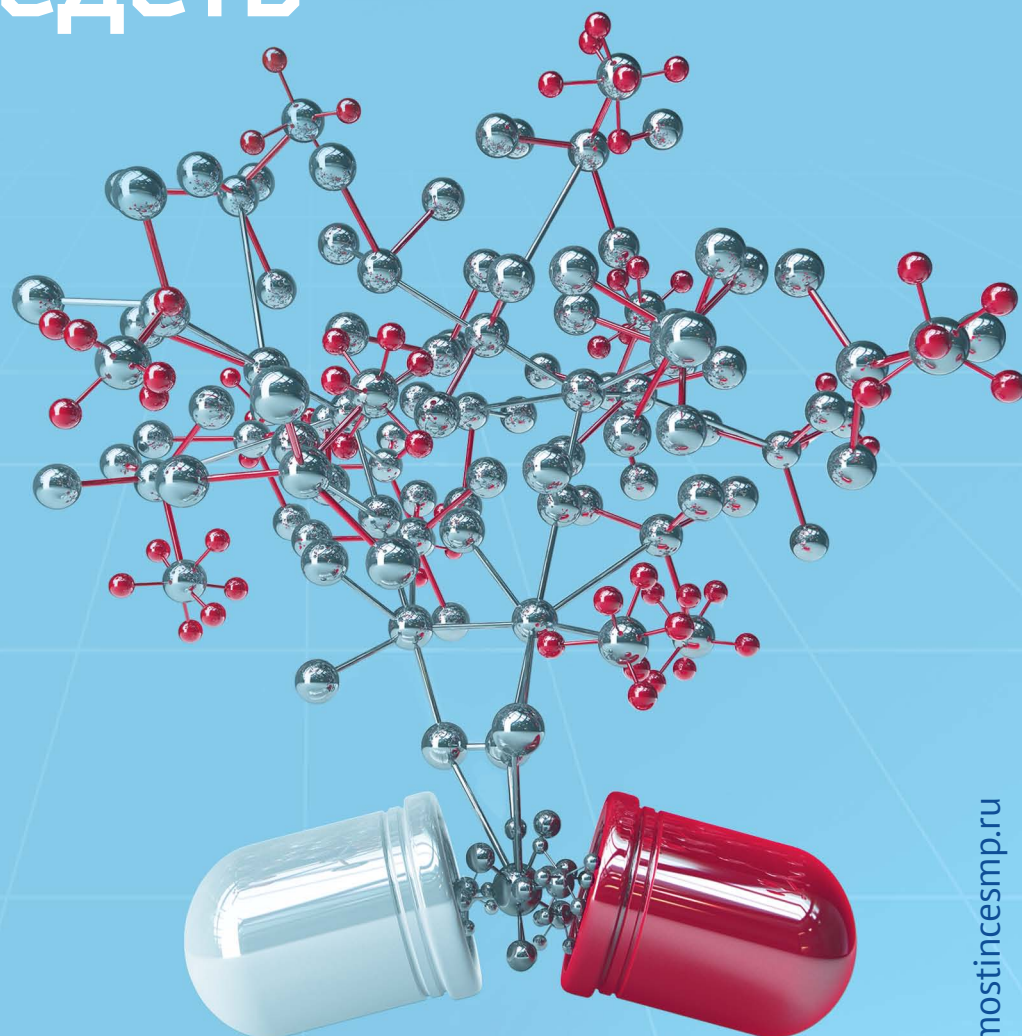


Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств



ГЛАВНАЯ ТЕМА

Вопросы разработки и регистрации лекарственных
средств различных фармакологических групп

QR-гид: документы в мгновенном доступе

Нормативные правовые акты, регулирующие обращение лекарственных средств



Федеральный закон Российской Федерации от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств»



Соглашение о единых принципах и правилах обращения лекарственных средств в рамках Евразийского экономического союза от 23.12.2014



Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 78 «О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения»



Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза»



Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 15.09.2020 № 111 «Об утверждении Руководства по фармакокинетическому и клиническому изучению биоэквивалентности липосомальных лекарственных препаратов для внутривенного введения»



Рекомендация Коллегии Евразийской экономической комиссии от 15.09.2020 № 15 «О руководствах по оценке качества и исследованию биоэквивалентности отдельных групп лекарственных препаратов»



Рекомендация Коллегии Евразийской экономической комиссии от 12.01.2021 № 2 «Об актуализированном Информационном справочнике понятий, применяемых в рамках Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств»

Расширенный перечень нормативных документов в области регулирования экспертизы и регистрации лекарственных средств представлен на сайте ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России <https://www.regmed.ru/activity/normativnye-pravovye-akty-ls/>





Уважаемые коллеги!

Одной из важнейших целей государственной политики в сфере охраны здоровья граждан, обозначенных в Стратегии развития фармацевтической промышленности Российской Федерации на период до 2030 года, является разработка и внедрение новых медицинских технологий и лекарственных средств, а также своевременное устранение дефектуры лекарственных препаратов.

Для обеспечения стратегической независимости государства от внешних и внутренних вызовов и угроз необходимо наличие локального производства лекарственных средств и компетенций по их разработке. При этом особое внимание должно быть уделено созданию высокотехнологичных инновационных лекарственных препаратов, в том числе для лечения тяжелых патологий. Не случайно главная тема данного выпуска журнала посвящена вопросам разработки и регистрации лекарственных средств различных фармакологических групп.

В представленных в номере статьях рассматриваются подходы к созданию инновационных препаратов генной терапии, антибиотиков, инсулинов и препаратов магния. Особо обращаю внимание читателей журнала на обзор, посвященный препаратам, полученным с помощью технологии редактирования генома. Такие препараты могут с успехом использоваться для терапии трудноизлечимых заболеваний высокой социальной значимости – орфанных, онкологических, синдрома приобретенного иммунодефицита и других.

Важное место в номере занимают материалы, связанные с разработкой и внедрением новых вспомогательных веществ, а также инновационных систем доставки лекарственных препаратов. Такие вещества могут сами не обладать биологически активными свойствами, однако с их помощью может быть реализована таргетная терапия.

Надеемся, что материалы этого номера будут способствовать достижению успехов отечественных исследователей в сфере локализации фармацевтического производства в Российской Федерации.

*Искренне ваша,
главный редактор*

**Косенко
Валентина Владимировна**

Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств

Рецензируемый научно-практический журнал

Учредитель и издатель:

ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России)

Главный редактор:

Косенко Валентина Владимировна,
канд. фарм. наук

Шеф-редактор:

Федотова Ольга Федоровна
тел.: +7 (495) 121-06-00 (доб. 63-05)
Fedotovaof@expmed.ru

Ответственный редактор:

Гойкалова Ольга Юрьевна, канд. биол. наук, доц.

Ответственный редактор тематического выпуска:

Бунятян Наталья Дмитриевна, д-р фарм. наук, проф.

Научные редакторы:

Молчан Нина Валерьевна, канд. фарм. наук
Хрущева Мария Леонидовна, канд. хим. наук

Редактор:

Калиничев Сергей Анатольевич, канд. фарм. наук

Редактор перевода:

Балтина Любовь Александровна

Адрес учредителя и редакции:

127051, Москва, Петровский б-р, д. 8, стр. 2
тел.: +7 (499) 190-18-18
(доб. 63-41, 63-65)
vedomosti@expmed.ru

www.vedomostincesmp.ru

Журнал основан в 2005 году.

Выходит ежеквартально (четыре выпуска в год).

Журнал открытого доступа, индексируется в российских и международных реферативных и индексных базах данных:

Chemical Abstracts (CAS), Embase, Российский индекс научного цитирования (РИНЦ), Russian Science Citation Index (RSCI), его архив включен в базы крупнейших агрегаторов научных ресурсов и библиотек WorldCat, DOAJ, Российская государственная библиотека, Академия Google (Google Scholar), КиберЛенинка, BASE, Dimensions, Open Archives Initiative, ResearchBib, ЭБС ЛАНБ, Соционет, Research4life, Lens.org, Openaire.eu, Ulrichsweb, Mendeley, Unpaywall, OpenCitations и др.

Двухлетний импакт-фактор РИНЦ – 0,627.

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.

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 высокотехнологические 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 медицинским, фармацевтическим и химическим отраслям науки и следующим научным специальностям:

- Промышленная фармация и технология получения лекарств; Фармацевтическая химия, фармакогнозия; Организация фармацевтического дела;
- Фармакология, клиническая фармакология;
- Аналитическая химия.

Плата за публикацию статьи и рецензирование рукописи не взимается
Контент доступен по лицензии Creative Commons Attribution International 4.0 CC-BY

Подписано в печать:	10.07.2023
Дата выхода в свет	17.07.2023
Подписной индекс	в каталоге «Пресса России» – 57942, в каталоге агентства «Урал-Пресс» – 57942

© Оформление, составление. ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, 2023

Редакционная коллегия

Главный редактор

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

Заместители главного редактора

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

Родин Игорь Александрович, д-р хим. наук, проф., МГУ им. М.В. Ломоносова, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Ответственный секретарь

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

Члены редакционной коллегии

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

Бобизода Гуломкодир Мукамал, 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. (Бонн, Германия)

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

Кузьмина Наталия 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)

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, акад. РАН, д-р мед. наук, проф., РМАНПО (Москва, Россия)

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

Темердашев Азамат Зауалевич, д-р хим. наук, КубГУ (Краснодар, Россия)

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

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

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

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)

Регистрация	Журнал зарегистрирован в Федеральной службе по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций. Свидетельство ПИ № ФС77-82931 от 14 марта 2022 г.
Исполнитель	ООО «НЭИКОН ИСП»: 115114, Москва, ул. Летниковская, д. 4, стр. 5
Типография	ООО «Издательство «Триада»: 170034, Тверь, пр. Чайковского, д. 9, оф. 514
Тираж	150 экз. Цена свободная

Regulatory Research and Medicine Evaluation

Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya
Regulyatornye issledovaniya i ekspertiza lekarstvennykh sredstv

A peer-reviewed research and practice journal

Founder and publisher:

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

Editor-in-Chief:

Valentina V. Kosenko,
Cand. Sci. (Pharm.)

Managing Editor:

Olga F. Fedotova
tel.: +7 (495) 121-06-00 (ext. 63-05)
Fedotovaof@expmed.ru

Executive Editor:

Olga Yu. Goykalova, Cand. Sci. (Biol.), Assoc. Prof.

Guest Editor for the Special Issue:

Natalia D. Bunyatyan, Dr. Sci. (Pharm.), Prof.

Science Editor:

Nina V. Molchan, Cand. Sci. (Pharm.)
Maria L. Khrushcheva, Cand. Sci. (Chem.)

Editor:

Sergey A. Kalinichev, Cand. Sci. (Pharm.)

Translation Editor:

Liubov A. Baltina

Postal address of the founder and editorial office:

8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051
tel.: +7 (499) 190-18-18
(ext. 63-41, 63-65)
vedomosti@expmed.ru

www.vedomostincesmp.ru

Founded in 2005

Published quarterly (four issues per year)

This is an open access journal indexed in Russian and international abstracting and indexing databases: Chemical Abstracts (CAS), Embase, Russian Index of Science Citation (RISC) and Russian Science Citation Index (RSCI), with the archive included in major aggregator databases, such as WorldCat, DOAJ, Russian State Library, Google Scholar, CyberLeninka, BASE, Dimensions, Open Archives Initiative, ResearchBib, Lan' ELS, Socionet, Research4life, Lens.org, Openaire.eu, Ulrichsweb, Mendeley, Unpaywall, OpenCitations, etc.

The journal's two-year impact factor is 0.627.

The journal is included in the official List of peer-reviewed scientific journals which guarantee acknowledgement of the published research by the State Commission that grants Candidate of Science and Doctor of Science degrees.

The journal covers advances in the areas of standardisation and quality control of various groups of medicines, development and improvement of analytical test procedures, approaches to evaluation of medicinal products, including assessment of medicine interchangeability, discusses new sophisticated methods of preclinical and clinical research, relevant issues of pharmacology, clinical medicine, rational use of medicines based on personalised medicine principles.

The journal publishes reviews and original articles, brief communications, guidance materials related to medical and pharmaceutical sciences and the following specialist fields:

- Pharmaceutical formulation and manufacturing; Pharmaceutical chemistry and pharmacognosy; Pharmaceutical management;
- Pharmacology, clinical pharmacology;
- Analytical chemistry.

The content is licensed under Creative Commons Attribution International CC-BY 4.0.

There is no fee for publishing an article and reviewing a manuscript
The content is licensed under Creative Commons Attribution International 4.0 CC-BY

Passed for printing:	10.07.2023
Date of publication:	17.07.2023
Subscription codes	Pressa Rossii catalogue: 57942
	Ural-Press agency catalogue: 57942

Editorial Board

Editor-in-Chief

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

Deputy Editor-in-Chief

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

Igor A. Rodin, Dr. Sci. (Chem.), Prof., Lomonosov Moscow State University, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Executive Secretary

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

Editorial Board Members

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., Aini 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., I.M. 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. (Bonn, Germany)

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

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

Marina N. Makarova, Dr. Sci. (Med.), Research and Manufacturing Company 'HOME OF PHARMACY' (Leningrad Region, Russia)

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

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

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

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

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

Dmitry A. Sychev, Academician 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)

Azamat Z. Temerdashev, Dr. Sci. (Chem.), Kuban State University (Krasnodar, Russia)

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

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

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

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

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

Registration	The journal is registered as mass media by the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technologies and Mass Communications. Certificate PI No. FS77-82931 dated March 14, 2022
Contract publisher	NEICON ISP LLC: 4/5 Letnikovskaya St., Moscow 115114
Printing office	Triada Publishing House: 9 Tchaikovsky Ave, office 514, Tver 170034
Print run	150 copies. Free price

Содержание

Том 13, №2-1 2023

ГЛАВНАЯ ТЕМА:		ВОПРОСЫ РАЗРАБОТКИ И РЕГИСТРАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ РАЗЛИЧНЫХ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ ГРУПП
		ПРЕПАРАТЫ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ
Н.С. Покровский, М.А. Водякова, Е.В. Мельникова, В.А. Меркулов	248	Разработка препаратов, полученных путем редактирования генома: регуляторная практика
		АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ ПРЕПАРАТЫ
О.Н. Высочанская, С.И. Кулешова, Е.П. Симонова	261	Гликопептидные антибиотики: структурно-функциональные аспекты, применение в медицине и стандартизация
И.Ю. Якупов, С.И. Кулешова, Е.П. Симонова, А.С. Демидов	271	Применение ионно-парной хроматографии для определения компонентов и родственных примесей капреомицина сульфата
С.В. Моисеев, Н.Е. Кузьмина, Е.Ю. Северинова, Е.П. Симонова, В.В. Косенко	283	Идентификация и количественное определение компонентного состава фармацевтической субстанции «Гентамицина сульфат» методами ^1H и ^{13}C ЯМР-спектроскопии
		ИНСУЛИНЫ
П.В. Шадрин, Л.В. Симутенко, Т.А. Батуашвили, Н.П. Неугодова, Е.О. Чечетова	292	Определение биологической активности инсулина и его аналогов на животных
		ПРЕПАРАТЫ МАГНИЯ
Н.Н. Еременко, Е.В. Ших, Н.Е. Уварова	302	Фармакокинетические исследования (исследования биодоступности) препаратов магния
		ЛИПИДНЫЕ НАНОСТРУКТУРЫ
Н.И. Бурдаев, Л.Л. Николаева, В.В. Косенко, З.С. Шпрах, Н.Д. Бунятян	316	Липосомы как носители лекарственных средств: классификация, методы получения и применение
		ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ ВЕЩЕСТВА
Е.О. Бахрушина, В.С. Пыжов, П.С. Сахарова, Н.Б. Демина, Д.А. Чиждова, Т.В. Табанская, М.Ф. Лутфуллин	333	Блок-сополимеры этиленоксида и пропиленоксида: перспективы применения в отечественной медицине и фармации
		РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ПО ПРОЦЕДУРЕ ЕАЭС
Е.М. Рычихина, О.Г. Ткаченко, В.В. Косенко	345	Рекомендации для специалистов по регистрации лекарственных препаратов в целях оптимизации работ по процедурам ЕАЭС

Contents

Volume 13, No. 2-1 2023

MAIN TOPIC:		ISSUES OF DEVELOPMENT AND REGISTRATION OF MEDICINES OF VARIOUS PHARMACOLOGICAL GROUPS
		GENE THERAPY DRUGS
<i>N.S. Pokrovsky, M.A. Vodyakova, E.V. Melnikova, V.A. Merkulov</i>	248	Development of Medicinal Products Based on Gene-Editing Technology: Regulatory Practices
		ANTIBACTERIAL DRUGS
<i>O.N. Vysochanskaya, S.I. Kuleshova, E.P. Simonova</i>	261	Glycopeptide Antibiotics: Structural and Functional Aspects, Human Medicinal Use, and Standardisation
<i>I.Yu. Yakupov, S.I. Kuleshova, E.P. Simonova, A.S. Demidov</i>	271	Ion-Pair Chromatography for the Determination of Capreomycin Sulfate Components and Related Substances
<i>S.V. Moiseev, N.E. Kuz'mina, E.Yu. Severinova, E.P. Simonova, V.V. Kosenko</i>	283	Identification and Quantification of the Component Composition of the Active Substance Gentamicin Sulfate by ^1H and ^{13}C NMR Spectroscopy
		INSULINS
<i>P.V. Shadrin, L.V. Simutenko, T.A. Batuashvili, N.P. Neugodova, E.O. Chechetova</i>	292	Determination of the Biological Activity of Insulin and Its Analogues in Animals
		MAGNESIUM PREPARATIONS
<i>N.N. Eremenko, E.V. Shikh, N.E. Uvarova</i>	302	Pharmacokinetic (Bioavailability) Studies of Magnesium Preparations
		NANOSYSTEMS FOR DRUG DELIVERY
<i>N.I. Burdaev, L.L. Nikolaeva, V.V. Kosenko, Z.S. Shprakh, N.D. Bunyatyan</i>	316	Liposomes as Drug Carriers: Classification, Preparation Methods, and Medicinal Use
		EXCIPIENTS
<i>E.O. Bakhrushina, V.S. Pyzhov, P.S. Sakharova, N.B. Demina, D.A. Chizhova, T.V. Tabanskaya, M.F. Lutfullin</i>	333	Block Copolymers of Ethylene Oxide and Propylene Oxide: Prospects for Medical and Pharmaceutical Application in Russia
		REGISTRATION OF MEDICINAL PRODUCTS ACCORDING TO THE EAEU PROCEDURE
<i>E.M. Rychikhina, O.G. Tkachenko, V.V. Kosenko</i>	345	Recommendations on the EAEU Marketing Authorisation Procedures to Optimise the Performance of Regulatory Affairs Specialists



Н.С. Покровский¹ 
М.А. Водякова¹ 
Е.В. Мельникова¹ 
В.А. Меркулов^{1,2} 

Разработка препаратов, полученных путем редактирования генома: регуляторная практика

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 «Первый Московский государственный медицинский
университет им. И.М. Сеченова» (Сеченовский Университет)
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Трубецкая ул., д. 8, стр. 2, Москва, 119991, Российская Федерация

✉ Покровский Никита Станиславович; pokrovsky.ns@gmail.com

РЕЗЮМЕ

Новейшим подходом в генной терапии является использование систем редактирования генома соматических клеток для лечения пациентов с наследственными моногенными, онкологическими заболеваниями и инфицированных вирусом иммунодефицита человека. Редактирование генома позволяет изменить дефектный ген или провести его полное удаление с помощью систем «нуклеазы с цинковыми пальцами» (ZFN), «эффektorные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции» (TALEN) и «короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами с CRISPR-ассоциированным белком 9» (CRISPR-Cas9).

Цель работы: анализ мирового опыта и нормативных требований к разработке препаратов, полученных с использованием технологии редактирования генома постнатальных соматических клеток.

В работе описаны принципы методов редактирования генов CRISPR, ZFN, TALEN, сравнение преимуществ и недостатков каждого подхода. Разработка, производство и оценка препаратов, полученных с использованием технологий редактирования генома, так же как и этические аспекты их применения, требуют особого подхода со стороны регуляторных и законодательных органов. В настоящее время требования и рекомендации к разработке таких препаратов ограничиваются преимущественно необходимостью оценки возникновения нецелевых эффектов и рисков отложенных по времени нежелательных явлений; возможностью адаптации дизайна клинических исследований в аспекте применения суррогатных конечных точек, исключения из исследований здоровых добровольцев и групп сравнения, выбора начальной дозы для клинических исследований на основе научных данных. Кроме того, должны быть разработаны регуляторные подходы для государственной регистрации препаратов на основе систем редактирования генома.

Ключевые слова: генная терапия; системы редактирования генома; моногенные заболевания; мутации; доклинические исследования; клинические исследования; регистрация препаратов; CRISPR

Для цитирования: Покровский Н.С., Водякова М.А., Мельникова Е.В., Меркулов В.А. Разработка препаратов, полученных путем редактирования генома: регуляторная практика. *Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств.* 2023;13(2-1):248–260. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-481>

N.S. Pokrovsky¹ 
M.A. Vodyakova¹ 
E.V. Melnikova¹ 
V.A. Merkulov^{1,2} 

Development of Medicinal Products Based on Gene-Editing Technology: Regulatory Practices

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

² I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University),
8/2 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russian Federation

✉ Nikita S. Pokrovsky; pokrovsky.ns@gmail.com

ABSTRACT

Somatic cell genome-editing systems are the most recent gene therapy technology to treat patients with monogenic hereditary cancer or HIV. Gene editing allows for changing or completely removing a defective gene with regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR), zinc-finger nuclease (ZFN), and transcription activator-like effector nuclease (TALEN) systems.

The aim of the study was to analyse the existing international experience and regulatory requirements relating to the development of medicinal products based on genome editing of postnatal somatic cells.

This article describes the mechanism of action of CRISPR, ZFN, and TALEN systems and compares their advantages and disadvantages. Regulatory and legislative authorities should take a special approach to the development, manufacture, and assessment of medicinal products based on genome editing, as well as to the ethical aspects of their use. Current requirements and recommendations for the development of medicinal products based on genome editing are mostly limited to the need to evaluate the risks of off-target effects and late-onset adverse events and the possibility to adapt clinical trial design to surrogate endpoints, exclude healthy volunteers and comparison groups, and select initial doses for clinical trials based on scientific data. Thus, a regulatory approach should also be developed for the marketing authorisation of medicinal products based on genome-editing systems.

Key words: gene therapy; genome-editing systems; monogenic diseases; mutations; non-clinical trials; clinical trials; marketing authorisation; CRISPR

For citation: Pokrovsky N.S., Vodyakova M.A., Melnikova E.V., Merkulov V.A. Development of medicinal products based on gene-editing technology: regulatory practices. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2023;13(2-1):248–260. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-481>

В настоящее время проводится множество исследований в области генной терапии с использованием систем редактирования генома соматических клеток [1]. Объектами для изучения эффективных механизмов действия препаратов на основе таких систем обычно являются пациенты с моногенными, онкологическими заболеваниями, а также инфицированные вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ) [2–5].

Основным преимуществом инструментов редактирования является контролируемый характер изменений, вносимых в геном, чего невозможно достичь с помощью классических вирусных векторов. Использование систем редактирования генома является актуальным для терапии наследственных моногенных заболеваний, вызванных дефектами в генах, когда ген имеет

слишком большой размер для доставки его правильной копии с помощью вирусных векторов (емкость вирусных векторов ограничена). В этом случае могут быть использованы «редакторы генома» для устранения мутации природного гена и восстановления его функции. Подобная стратегия, например, описана для лечения редкого генетического заболевания, приводящего к потере зрения в детском возрасте, — врожденного амавроза Лебера 10-го типа, вызванного мутацией в гене *CEP290* [6].

Другим распространенным применением «редакторов генома» в терапии является выключение гена: стратегия сайт-специфической модификации гена-рецептора *CCR5* ВИЧ изучается как при непосредственном введении вирусного вектора с «редактором генома» (генная терапия

in vivo), так и при генетической модификации собственных клеток пациента *ex vivo* с последующим возвращением их в организм [7].

Вероятным применением систем редактирования генома в настоящее время считается также их использование в персонализированном лечении отдельных пациентов с заболеваниями, причинами которых являются редкие единичные мутации (N=1) [8].

Необходимо отметить работу, связанную с редактированием генома эмбрионов человека китайским биофизиком Н. Jiankui, в результате которого в 2018 г. родились девочки-близняшки (отец — положительный по ВИЧ-инфекции) с мутациями в гене *CCR5*, кодирующем белок, позволяющий ВИЧ проникать в клетки [9]. Исследователь имитировал мутацию, приводящую к невосприимчивости к заражению ВИЧ, присутствующую примерно у 10% европейцев [10, 11]. Эта работа вызвала широкий общественный резонанс со стороны всего мирового научного и регуляторного сообщества, обсуждения продолжаются до сих пор. Последствия для жизни самих детей могут быть оценены еще не скоро, поскольку необходимо определить, были ли внесены мутации в другие части генома (нецелевые эффекты), а также насколько нокаут гена *CCR5* критичен для длительного функционирования организма, так как продукт мутации гена имеет функции, связанные с ответом организма на другие инфекции [9].

Инновационный подход к лечению тяжелых жизнеугрожающих заболеваний в отсутствие других эффективных методов лечения, предполагающий непосредственное воздействие на геном пациента, подразумевает необходимость рассмотрения особенностей разработки, изучения в доклинических (ДКИ) и клинических исследованиях (КИ), дополнительной оценки последствий медицинского применения таких препаратов. В настоящее время опубликованы рекомендации Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), описывающие лишь некоторые аспекты применения технологий редактирования генома, риски и возможные последствия, ассоциированные с ними. В документе обращается внимание на необходимость формирования этических принципов и установления международных стандартов и механизмов контроля применения технологий редактирования генома в медицинской практике и создания для этих целей комитета для регулярного мониторинга

КИ; обмена информацией между регуляторными органами на международном уровне; создания реестров КИ и одобрения экспертами таких исследований до начала их проведения; разработки протоколов оценки КИ для выявления потенциально опасных случаев¹. Подходы к разработке группы препаратов на основе систем редактирования генома также частично описаны в руководствах регуляторных органов Европейского союза (ЕС), США, Японии, Китая, Южной Кореи по препаратам генной терапии. В России в настоящее время только готовится проект регламентирующих решений для разработки препаратов генной терапии в рамках законодательной базы Евразийского экономического союза (ЕАЭС), однако особенностям разработки препаратов на основе систем редактирования генома так же, как и в руководствах ЕС, будет уделено небольшое внимание.

Цель работы — анализ мирового опыта и нормативных требований к разработке препаратов, полученных с использованием технологии редактирования генома постнатальных соматических клеток. В статье не рассматривается применение технологии редактирования генома для репродуктивных технологий (эмбрионов и половых клеток).

Системы редактирования генома

Системы редактирования генома активно стали изучаться только в последние два десятилетия (табл. 1). Методы редактирования генома эволюционировали от трансфекции путем совместного культивирования, электропорации и микроинъекции ДНК внутрь клетки до широко используемых в настоящее время систем ZFN (zinc-finger nucleases, «нуклеазы с цинковыми пальцами»), TALEN (transcription activator-like effector nucleases, эффекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции) и CRISPR-Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами с CRISPR-ассоциированным белком 9) (рис. 1, табл. 2) [12–15]. Все системы редактирования генома используют встроенные в клетку механизмы для репарации разрывов ДНК. Таким образом, внося направленный разрыв на определенном участке генома, встроенные в клетку механизмы помогают сшить два конца цепи после удаления нежелательного участка либо встроить между ними новую целевую последовательность. Внесение разрывов

¹ WHO Expert Advisory Committee on developing global standards for governance and oversight of human genome editing. Human genome editing: recommendations. Geneva: World Health Organisation; 2021.

Таблица 1. Количество статей, посвященных изучению методов редактирования генома, индексирующихся в «PubMed»

Table 1. Number of papers on genome-editing techniques indexed in PubMed

Год Year	Количество статей по запросу в «PubMed» Number of papers retrieved from PubMed		
	CRISPR-Cas9	Zinc-finger nucleases	TALEN
2010	0	88	8
2012	3	113	60
2014	368	193	294
2016	1612	153	353
2018	3048	130	244
2020	4138	92	195
2022 (июнь/ June)	2249	32	77

Примечание. CRISPR-Cas9 – короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами с CRISPR-ассоциированным белком 9; TALEN – эффекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции; zinc-finger nucleases – «нуклеазы с цинковыми пальцами».

PubMed – <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>

Note. CRISPR-Cas9, clustered regularly interspaced short palindromic repeats with CRISPR-associated protein 9; TALEN, transcription activator-like effector nucleases.

осуществляется нуклеазами специфично и с высокой эффективностью. Результатом редактирования может быть замена мутантного гена на его функциональный аналог, удаление нежелательных участков из генома, а также встраивание нового участка в геном.

В настоящее время ни один генотерапевтический препарат на основе систем редактирования генома не разрешен в мире регуляторными органами для применения в медицинской практике, однако в 2020–2021 гг. Европейское агентство по лекарственным средствам (European Medicines Agency, EMA) присвоило статус препарата приоритетной медицины PRIME препарату для лечения серповидно-клеточной анемии и β-талассемии, представляющему собой отредактированные CRISPR аутологичные гемопоэтические клетки (autologous CD34⁺ haematopoietic stem cells with a CRISPR-edited erythroid enhancer region of the *BCL11A* gene) на основе представленных данных доклинических исследований и клинического исследовательского опыта².

Состав препаратов на основе технологий редактирования генома в качестве активной фармацевтической субстанции может включать отредактированные клетки (генная терапия *ex vivo*) либо конструкции (экспрессирующие вирусные векторы и плазмиды; РНК и белок), несущие «редакторы генома» для редактирования генов целевых клеток непосредственно в организме человека (генная терапия *in vivo*).

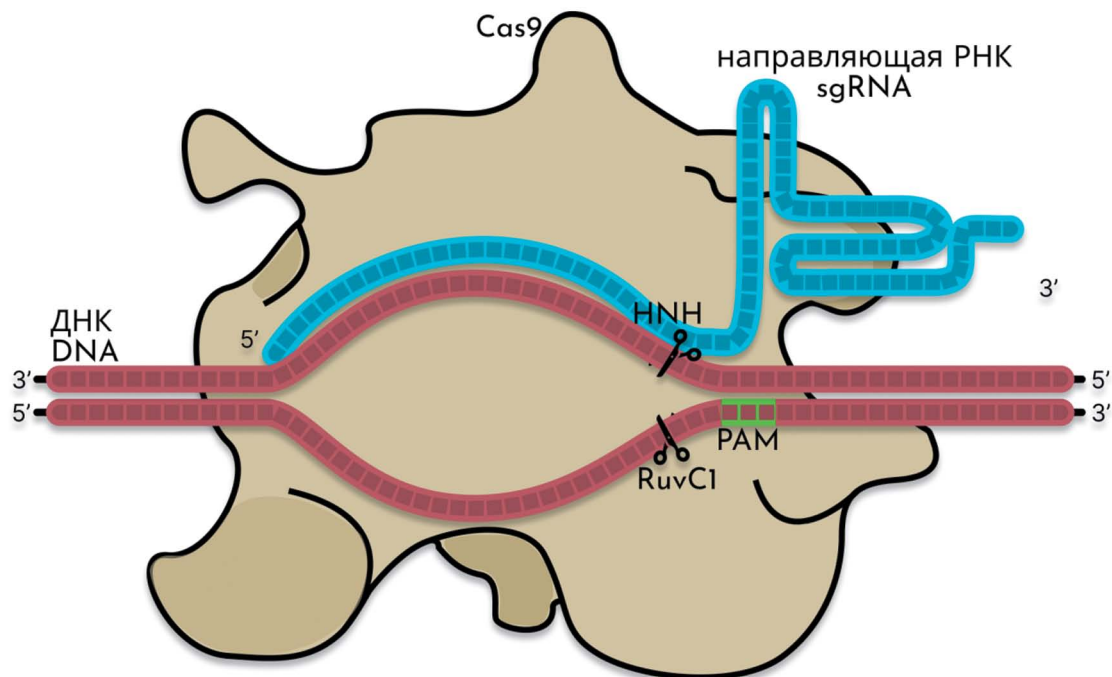
Исследования в области разработки лекарственных препаратов на основе систем редактирования генома

Наиболее распространенными заболеваниями, при которых возможно применение препаратов на основе технологий редактирования генома, являются моногенные заболевания, поражающие около 250 млн человек в мире. Современные генетические технологии позволяют довольно быстро проводить скрининг уже известных или новых мутаций в геноме человека, а также проводить исследования на моделях связанных с такими мутациями заболеваний (табл. 3 «Примеры изучения потенциала систем редактирования генома для лечения заболеваний *in vitro* и *in vivo*», опубликовано на сайте журнала³). По мнению одного из создателей системы редактирования генома CRISPR J. Doudna, подходящими моделями для данной терапии являются серповидно-клеточная анемия и миодистрофия Дюшенна [20, 21]. Основным подходом в лечении серповидно-клеточной анемии является *ex vivo* редактирование гемопоэтических стволовых клеток пациента и последующее их возвращение в организм, причем может быть применено две стратегии: исправление вызывающей заболевание мутации в β-глобине (А-Т, приводящая к замене глутамата на валин) либо активирование экспрессии γ-глобина, фетальной формы гемоглобина, который может функционально заменить дефектный β-глобин. Стратегия и дизайн

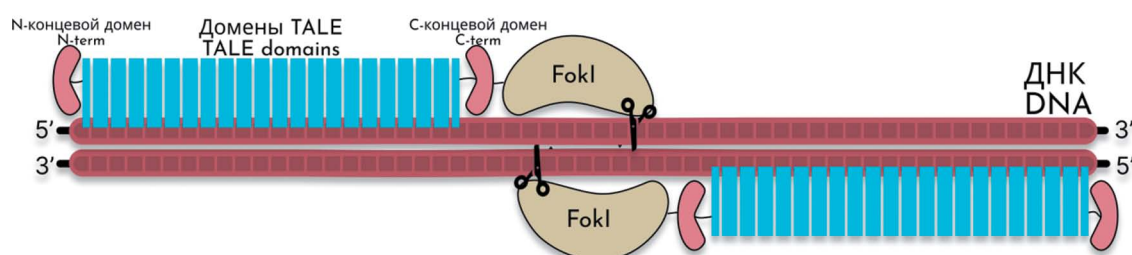
² List of medicines currently in PRIME scheme, 23 May 2022. EMA/521657/2016.

³ <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-13-481-tabl3>

a



b



c

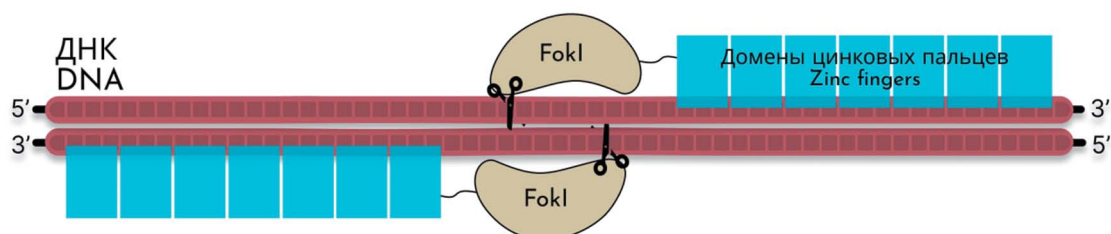


Рис. 1. Схематичное изображение механизма действия: (a) системы CRISPR-Cas9. Направляющая (гидовая) РНК, прикрепленная к белку Cas9, находит комплементарный участок ДНК вблизи домена мотива, смежного с протоспейсером (PAM – protospacer adjacent motif), и вносит двухцепочечный разрыв с помощью RuvC1 и HNH; (b) системы TALEN. Повторяющиеся домены TALE, с двух концов ограниченные концевыми доменами, комплементарны определённому основанию и связываются с соответствующим участком ДНК, внося двухцепочечный разрыв доменом FokI в димерной форме в каждую из цепей ДНК; (c) системы «цинковых пальцев» (ZFN). «Пальцы» связываются с комплементарными им триплетами на обеих цепочках ДНК, после чего FokI вносит двухцепочечный разрыв цепи

Fig. 1. Schematic mechanisms of action of (a) the CRISPR-Cas9 system: a Cas9-sgRNA complex finds a complementary DNA site next to a protospacer adjacent motif (PAM) domain and induces a double-strand break with the help of RuvC1 and HNH domains; (b) the TALEN system: TALE repeats with terminal domains at both chain ends each have nucleotide complementarity and bind to the corresponding DNA site, inducing a double-strand break with the help of the dimeric FokI domain; and (c) the ZFN system: zinc fingers bind to complementary nucleotide triplets on both DNA chains, allowing the FokI domain to induce a double-strand break

разработки препаратов на основе систем редактирования генома при серповидноклеточной анемии позволят применить препарат у большинства пациентов, поскольку заболевание вызвано в большинстве случаев одной и той же мутацией.

При мышечной дистрофии Дюшенна разработка препаратов осложняется генетическим разнообразием мутаций среди пациентов: более 3000 различных мутаций могут вызвать заболевание, хотя большинство из них затрагивают определенные локусы гена дистрофина. С одной

Таблица 2. Характеристики систем редактирования генома

Table 2. Characteristics of different genome-editing techniques

Наименование <i>Name</i>	Система редактирования <i>Editing system</i>		
	CRISPR-Cas9	Zinc-finger nucleases (ZFN)	TALEN
Год открытия <i>Year of discovery</i>	2012 [16]	1996 [17]	2010 [18]
Нуклеазный домен <i>Nuclease domain</i>	RuvC1, HNH	FokI	FokI
Участок узнавания <i>Recognition site</i>	Гидовая РНК, РАМ <i>sgRNA, PAM</i>	«Цинковый палец» <i>Zinc finger</i>	TAL-эффектор <i>TAL-effector</i>
Разрыв цепи <i>Chain break</i>	Двухцепочечный <i>Double-strand</i>		
Использование в клинических исследованиях <i>Use in clinical trials</i> [19]	+++	++	+
Возможности диагностики <i>Diagnostic utility</i> [19]	+++	+	+
Достоинства <i>Advantages</i> [19]	Высокая специфичность и эффективность, низкая стоимость <i>Highest specificity and effectiveness, low cost</i>	Низкая стоимость <i>Low cost</i>	Меньше нецелевых узнаваний по сравнению с ZFN <i>Less off-target recognitions compared to ZFN</i>
Недостатки <i>Disadvantages</i>	Необходимость наличия РАМ участка вблизи мишени <i>Requires PAM to be located near the target</i>	Менее специфична из-за связывания трех нуклеотидов одним «пальцем», сравнительно высокая цитотоксичность <i>Less specific as 1 zinc finger binds to 3 nucleotides, relatively high cytotoxicity</i>	Высокая стоимость <i>High cost</i> [19]

Примечание. РАМ – мотив, смежный с протоспейсером; +, ++, +++ – условные показатели (низкий, средний и высокий соответственно).

Note. PAM, protospacer adjacent motif; +, ++, and +++ are arbitrary comparative indicators (low, medium, and high, respectively).

стороны, это осложняет клиническую разработку из-за требуемой персонализации препарата и набора необходимого количества пациентов для тестирования, с другой – показывает преимущества платформ технологии редактирования генома по созданию персонализированных препаратов по одной схеме для разных мутаций [22].

КИ с использованием платформы CRISPR также проводятся для повышения эффективности Т-клеток с химерным антигенным рецептором (CAR), лечения других наследственных заболеваний крови, а также для предотвращения прогрессирования или лечения моногенных заболеваний в офтальмологии (табл. 4. «Примеры использования систем редактирования генома в клинической практике», опубликовано на сайте журнала⁴) [23].

Лечение ВИЧ является одним из приоритетных направлений в исследованиях лекарственных препаратов на основе редактирования генома [24]. Существует несколько подходов к лечению ВИЧ путем редактирования генома: дезактивация генов *CCR5/CXCR4*, приводящая к снижению восприимчивости клеток для ВИЧ [25], непосредственное разрушение генома вируса в клетках организма путем лигирования его длинных концевых повторов [26] и инактивация вируса в зараженных клетках [27]. Другие методы редактирования также активно исследуются и используются в разработке подходов к лечению ВИЧ [28–30].

При создании препаратов на основе технологий редактирования генома необходимо обосновать систему и тип редактирования, требуемый способ доставки клеток с отредактированным

⁴ <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-13-481-tabl4>

геномом или непосредственно конструкций, степень нокаута или восстановления структуры гена, которые обеспечат терапевтическую эффективность. Например, было показано, что при миодистрофии Дюшенна восстановление экспрессии дистрофина на уровне ~15% от нормального уровня приводит к снижению клинических проявлений заболевания вплоть до полного исчезновения [31].

Для государственной регистрации препаратов на основе технологии редактирования генома необходима разработка рекомендаций регуляторных органов по проведению ДКИ и КИ.

Государственное регулирование обращения препаратов, получаемых с помощью технологий редактирования генома

Регулирование обращения препаратов, получаемых с помощью технологий редактирования генома, осуществляется согласно нормативным документам по генной терапии (табл. 5. «Примеры нормативных документов, регулирующих разработку препаратов на основе технологии редактирования генома соматических клеток», опубликовано на сайте журнала⁵).

В декабре 2018 г. ВОЗ учредила многопрофильный Консультативный комитет экспертов по разработке глобальных стандартов управления и надзора за редактированием генома человека для изучения научных, этических, социальных и юридических проблем, связанных с редактированием генома человека (соматических клеток, эмбрионов и половых клеток), включающий 18 экспертов из каждого региона ВОЗ. Результатом работы данного комитета явилась разработка руководств⁶. В компетенцию комитета не входило рассмотрение вопросов, связанных с безопасностью и эффективностью применения препаратов. Потенциальными преимуществами редактирования генома человека были определены новые стратегии диагностики, лечения и профилактики генетических нарушений; новые способы лечения бесплодия; новые способы повышения устойчивости к болезням; вклад в разработку вакцин и получение новых знаний о биологии человека. Основными аспектами неопределенности в отношении

ожидаемой пользы к возможному риску применения редактирования генома указаны нецелевые эффекты и отложенные риски применения этой технологии.

Редактирование генома *in vivo* сопряжено, главным образом, с такой технической проблемой, как определение эффективной дозы (количество копий вирусного(ых) вектора(ов), несущего(их) компоненты редактирования генома) для соблюдения следующих условий: обеспечение адресного действия на определенную последовательность генома; исправление генетического дефекта в достаточной доле клеток для обеспечения клинической пользы; отсутствие неблагоприятных целевых эффектов (незапланированные изменения последовательности нуклеотидов в сайтах редактирования) и нецелевых эффектов; отсутствие иммунного ответа на компоненты редактирования генома, включая вирусный вектор.

Также документ ВОЗ⁷ описывает некоторые особенности возможных сценариев изучения препаратов на основе технологий редактирования генома, например КИ препаратов, используемых для терапии серповидноклеточной анемии, целесообразно проводить в странах Западной Африки, поскольку именно там данное заболевание наиболее распространено. В рекомендациях по проведению КИ препаратов для терапии поздних стадий хореи Хантингтона отмечена целесообразность применения в качестве конечных точек суррогатных маркеров, свидетельствующих об улучшении качества или продолжительности жизни пациентов (например, могут использоваться клинические маркеры, демонстрирующие уменьшение симптомов проявления заболевания, или молекулярные, гистологические, рентгенологические или физиологические биомаркеры, которые, как ожидается, будут коррелировать с долгосрочными клиническими результатами). В этом случае необходимо рассмотреть вопрос о том, насколько хорошо суррогатные конечные точки коррелируют с долгосрочными клиническими исходами и подтверждаются ими. Дизайн исследования, включая количество участников исследования, должен быть тщательно продуман, чтобы ответить на вопрос об эффективности при существующих отсроченных по времени

⁵ <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-13-481-tabl5>

⁶ WHO Expert Advisory Committee on developing global standards for governance and oversight of human genome editing. Human genome editing: recommendations. Geneva: World Health Organization; 2021.

WHO Expert Advisory Committee on developing global standards for governance and oversight of human genome editing. Human genome editing: a framework for governance. Geneva: World Health Organization; 2021.

⁷ WHO Expert Advisory Committee on developing global standards for governance and oversight of human genome editing. Human genome editing: a framework for governance. Geneva: World Health Organization; 2021.

нежелательных явлениях. Сценарий применения редактирования генома в терапии хорей Хантингтона также учитывает тот факт, что это лечение может быть единственным возможным вариантом в настоящее время.

Рекомендации по характеристике качества препаратов на основе систем редактирования генов наиболее четко и сжато представлены в руководстве по оценке качества таких лекарственных препаратов Республики Корея⁸ (рис. 2).

В США заявки на проведение КИ нового разрабатываемого ЛП⁹ могут классифицироваться как коммерческие или исследовательские. Такие заявки на препараты, полученные с помощью инновационных технологий, включая редактирование генома, как правило, сначала классифицируют как исследовательские.

Среди необходимых ДКИ, которые должны быть выполнены до первого применения у человека: исследования биологической активности (оценка внесенных изменений в геном клеток, экспрессии эндогенного гена, экспрессии трансгенов; активности трансгенных продуктов), обоснование доз, исследования абсорбции ЛП (если применимо) и биораспределения на моделях *in vivo*, а также токсикологические исследования *in vivo* (помимо стандартных исследований – токсичность, связанная с экспрессией трансгена; риск инсерционного мутагенеза; векторная мобилизация и рекомбинация; для препаратов на основе систем редактирования генома обязательной является оценка нецелевых эффектов исследуемого препарата)¹⁰ [1].

Для генетически модифицированных клеток с отредактированным геномом необходимо подтверждать *in vitro* точность и специфичность редактирования для целевой геномной последовательности в соответствующих клетках при использовании модифицирующего фермента или направляющей (гидовой) РНК. Кроме прогнозирования потенциальной нецелевой активности, которое может включать анализ *in silico*, также необходимо оценивать нецелевую активность по всему геному *in vitro*. Наконец, следует оценить предсказуемость

доклинических данных о нецелевой активности, например с учетом видоспецифических различий, различий в (пато-) физиологическом состоянии клеток или особенностей различных типов клеток. Влияние редактирования генома на фенотип клеток и физиологические функции следует также анализировать. Большое внимание должно быть уделено выбору соответствующей модели животного для тестирования токсичности. Выбранная модель животного и продолжительность исследований токсичности должны позволить оценить последствия токсичности, вызванной нецелевыми эффектами, и потенциальной иммуногенности в отношении клеток с отредактированным геномом¹¹.

Среди особенностей КИ препаратов на основе технологии редактирования генома необходимо отметить следующие.

1. Неопределенность нормативных требований в отношении персонализированных препаратов, полученных с использованием одной технологии редактирования для пациентов с одним заболеванием, но разными мутациями, его вызывающими (редактирование направлено на разные участки генома). В настоящее время не ясно, можно ли рассматривать персонализированные препараты с одним редактором как один исследовательский продукт.
2. Исследовательская терапия препаратами, созданными с привлечением технологии редактирования генов, преимущественно будет применяться для лечения редких заболеваний, поскольку многие из них имеют моногенную этиологию, при этом эффективная терапия иными препаратами отсутствует [47]. Таким образом, привлечение здоровых добровольцев к КИ таких препаратов недопустимо из-за сопутствующего риска токсичности и (или) возможности необратимых последствий¹². Выборка участников КИ также может быть ограничена кругом пациентов, у которых присутствуют признаки и симптомы плохо контролируемого заболевания, несмотря на лечение одобренными методами. Для облегчения взаимодействия исследователей и пациентов могут быть созданы реестры пациентов с редкими заболеваниями [48].

⁸ Guideline on quality assessment for gene-editing based advanced therapy medicinal products. Ministry of Food and Drug Safety, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation; 2020.

⁹ Chemistry, manufacturing, and control (CMC) information for human gene therapy Investigational New Drug applications (INDs). Guidance for industry. FDA; 2020.

¹⁰ Guidance for industry. Preclinical assessment of investigational cellular and gene therapy products (FDA-2012-D-1038). FDA; 2013.

¹¹ Guideline on quality, non-clinical and clinical aspects of medicinal products containing genetically modified cells (EMA/CAT/GTWP/671639/2008 Rev. 1. Corr.). EMA; 2020.

¹² Guidance for industry. Preclinical assessment of investigational cellular and gene therapy products (FDA-2012-D-1038). FDA; 2013.

¹² Human gene therapy for rare diseases: Guidance for industry (FDA-2018-D-2258). FDA; 2020.

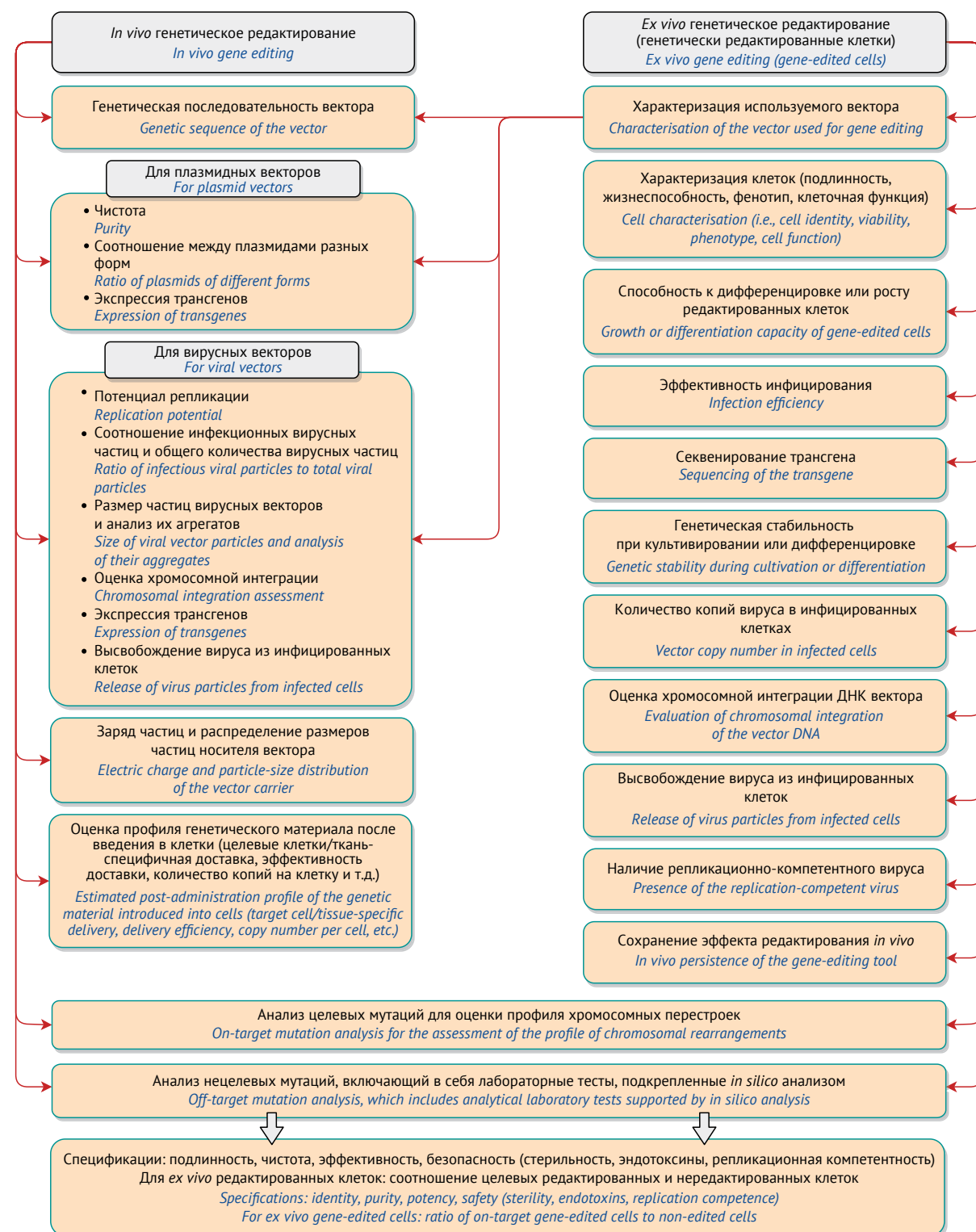


Рис. 2. Оценка характеристик качества препаратов, полученных на основе систем редактирования генома (по материалам Guideline on quality assessment for gene-editing based advanced therapy medicinal products. Ministry of Food and Drug Safety, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation; 2020)

Fig. 2. Assessment of quality characteristics of products based on gene-editing systems (based on the Guideline on quality assessment for gene-editing based advanced therapy medicinal products. Ministry of Food and Drug Safety, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation; 2020)

3. Выбор конечных точек при использовании группы сравнения не всегда возможен для КИ препаратов для лечения редких заболеваний, поэтому эффективность лечения и клиническая польза могут быть оценены в рамках первого КИ без группы сравнения. Эффективность препарата на основе технологии редактирования генов должна быть связана с конечными точками, которые основаны на демонстрации клинической пользы (улучшение самочувствия, функций или выживаемости пациента), однако могут быть использованы и суррогатные конечные точки при условии предварительного их согласования с регуляторными органами¹³.

4. Дизайн КИ препаратов для терапии на основе технологии редактирования генов будет в значительной степени зависеть от способа доставки (например, редактирование *in vivo* или *ex vivo*, аутологичный или аллогенный клеточный продукт) [1].

5. Выбор начальной дозы для КИ может быть основан на научно-исследовательских данных, например, для *ex vivo* аутологичной терапии гемопоэтическими клетками может быть принята доза клеток, способная восстановить гемопоэз хозяина [49], в то время как другие способы доставки могут потребовать разработки схемы увеличения дозы на ранней стадии КИ.

6. Оценка безопасности терапии, основанной на редактировании генов, должна включать понимание потенциальных рисков, определенных на основе анализа неклинических токсикологических данных, включая нецелевые эффекты, конкретный способ доставки и состояние основного заболевания. Учитывая возможность необратимых изменений геномов клеток-хозяев и отсроченных побочных эффектов, клинические протоколы по редактированию генов должны включать долгосрочные периоды наблюдения за безопасностью, которые могут длиться до 15 лет¹⁴.

В настоящее время клинические доказательства, основанные на *ex vivo* генетической модификации клеток (особенно для технологии редактирования генома), являются недостаточными для того, чтобы сформулировать четкие требования проведения КИ¹⁵. Тем не менее должен

соблюдаться единый принцип КИ — положительное соотношение «польза–риск» применения таких препаратов. Дизайн КИ должен быть построен таким образом, чтобы наилучшим образом обеспечить возможность оценки соотношения «польза–риск».

Важным преимуществом использования систем редактирования генома является возможность создания производственных платформ, позволяющих получать персонализированные препараты с учетом конкретных мутаций у каждого пациента. Однако в этом случае возникает вопрос регулирования разработки препаратов на основе редактирования генома при использовании платформы одной технологии редактирования генома для создания персонализированных препаратов терапии одного и того же заболевания, но вызванного мутациями в разных генах или локусах гена, когда редактирование должно быть направлено на разные участки генома. До настоящего времени ни один регуляторный орган в мире не рассматривал регистрацию препарата, произведенного по одной технологии, но с разными адресными мишенями его действия. Этот случай может быть рассмотрен по аналогии с регистрацией аутологичных препаратов клеточной терапии, при производстве которых используется одна производственная платформа, но исходный материал клеток индивидуален для каждого пациента. Другим возможным решением внедрения технологий редактирования генома в клиническую практику могут стать механизмы, подобные «hospital exemptions»¹⁶ (ЕС), когда лекарственный препарат изготавливается на нерутинной основе для одного пациента и применяется в медицинской организации, или «expanded access»¹⁷ (США), когда исследуемый препарат предназначен для лечения пациентов с серьезными или жизнеугрожающими заболеваниями при отсутствии альтернатив терапии. При применении препаратов, основанных на технологии редактирования генома, следует учитывать, что на сегодняшний день данные об их эффективности и безопасности в плане отсроченных по времени нежелательных явлений, недостаточны.

¹³ Human gene therapy for rare diseases. Guidance for industry (FDA-2018-D-2258). FDA; 2020.

Demonstrating substantial evidence of effectiveness for human drug and biological products. Guidance for industry (FDA-2019-D-4964). FDA; 2019.

¹⁴ Long term follow-up after administration of human gene therapy products. Guidance for industry (FDA-2018-D-2173). FDA; 2020.

¹⁵ Quality, non-clinical and clinical aspects of medicinal products containing genetically modified cells (EMA/CAT/GTWP/671639/2008 Rev. 1. Corr.). EMA; 2021.

¹⁶ Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council of 6 November 2001 on the Community code relating to medicinal products for human use (2001L0083). EMA; 2001.

¹⁷ Expanded access to investigational drugs for treatment use — questions and answers. Guidance for industry. FDA; 2016.

Закключение

Несмотря на существующие перспективы применения технологии редактирования генома соматических клеток для терапии тяжелых жизнеугрожающих заболеваний, связанных, главным образом, с нарушениями структуры генов, в настоящее время регуляторными органами не сформулированы четкие требования или рекомендации по обращению таких препаратов на фармацевтическом рынке.

Основными факторами неопределенности отношения ожидаемой пользы к возможному риску применения метода редактирования генома признаны нецелевые эффекты и отложенные по времени риски применения этой технологии. Основной проблемой разработки препаратов на основе технологии редактирования генома *in vivo* является определение оптимальной

эффективной дозы, введение которой обеспечит адресное действие препарата, получение достаточного количества клеток с отредактированным геномом для проявления терапевтического эффекта, минимальный риск возникновения нецелевых эффектов и иммунного ответа организма пациента на препарат. В доклинических исследованиях выбор моделей животных должен быть обоснован с учетом возможности оценки последствий нецелевой токсичности, потенциальной иммуногенности и достаточной продолжительности исследований токсичности. Среди особенностей клинических исследований препаратов на основе технологии редактирования генома можно отметить ограниченное число пациентов (часто с редкими заболеваниями или плохо контролируемым заболеванием), возможное отсутствие группы сравнения и использование суррогатных конечных точек.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Rees HA, Minella AC, Burnett CA, Komor AC, Gaudelli NM. CRISPR-derived genome editing therapies: progress from bench to bedside. *Mol Ther*. 2021;29(11):3125–39. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2021.09.027>
2. Howard HC, van El CG, Forzano F, Radojkovic D, Rial-Sebbag E, de Wert G, et al. One small edit for humans, one giant edit for humankind? Points and questions to consider for a responsible way forward for gene editing in humans. *Eur J Hum Genet*. 2018;26(1):1–11. <https://doi.org/10.1038/s41431-017-0024-z>
3. Reardon S. Leukaemia success heralds wave of gene-editing therapies. *Nature*. 2015;527(7577):146–7. <https://doi.org/10.1038/nature.2015.18737>
4. Tebas P, Stein D, Tang WW, Frank I, Wang SQ, Lee G, et al. Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. *N Engl J Med*. 2014;370(10):901–10. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1300662>
5. Orkin SH, Bauer DE. Emerging genetic therapy for sickle cell disease. *Annu Rev Med*. 2019;70:257–71. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-041817-125507>
6. Ledford H. CRISPR treatment inserted directly into the body for first time. *Nature*. 2020;579(7798):185. <https://doi.org/10.1038/d41586-020-00655-8>
7. Sather BD, Romano Ibarra GS, Sommer K, Curinga G, Hale M, Khan IF, et al. Efficient modification of CCR5 in primary human hematopoietic cells using a megaTAL nuclease and AAV donor template. *Sci Transl Med*. 2015;7(307):307ra156. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aac5530>
8. Urnov FD. Imagine CRISPR cures. *Mol Ther*. 2021;29(11):3103–6. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2021.10.019>
9. Cyranoski D. The CRISPR-baby scandal: what's next for human gene-editing. *Nature*. 2019;566(7745):440–2. <https://doi.org/10.1038/d41586-019-00673-1>
10. Jessen H, Allen TM, Streeck H. How a single patient influenced HIV research — 15-year follow-up. *New Engl J Med*. 2014;370(7):682–3. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1308413>
11. Lederman MM, Penn-Nicholson A, Cho M, Mosier D. Biology of CCR5 and its role in HIV infection and treatment. *JAMA*. 2006;296(7):815–26. <https://doi.org/10.1001/jama.296.7.815>
12. Горяев АА, Савкина МВ, Мефед КМ, Бондарев ВП, Меркулов ВА, Тарасов ВВ. Редактирование генома и биомедицинские клеточные продукты: современное состояние, безопасность и эффективность. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2018;18(3):140–9. Goryaev AA, Savkina MV, Mefed KM, Bondarev VP, Merkulov VA, Tarasov VV. Genome-editing and biomedical cell products: current state, safety and efficacy. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2018;18(3):140–9 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-3-140-149>
13. Doudna JA, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*. 2014;346(6213):1258096. <https://doi.org/10.1126/science.1258096>
14. Joung JK, Sander JD. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013;14(1):49–55. <https://doi.org/10.1038/nrm3486>
15. Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, Zhang HS, Gregory PD. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet*. 2010;11(9):636–46. <https://doi.org/10.1038/nrg2842>
16. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012;337(6096):816–21. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>

17. Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93(3):1156–60. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.3.1156>
18. Christian M, Cermak T, Doyle EL, Schmidt C, Zhang F, Hummel A, et al. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics*. 2010;186(2):757–61. <https://doi.org/10.1534/genetics.110.120717>
19. Khan SH. Genome-editing technologies: concept, pros, and cons of various genome-editing techniques and bioethical concerns for clinical application. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2019;16:326–34. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.02.027>
20. Doudna JA. The promise and challenge of therapeutic genome editing. *Nature*. 2020;578(7794):229–36. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-1978-5>
21. Min YL, Bassel-Duby R, Olson EN. CRISPR correction of Duchenne muscular dystrophy. *Annu Rev Med*. 2019;70:239–55. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-081117-010451>
22. Wilson RC, Carroll D. The daunting economics of therapeutic genome editing. *CRISPR J*. 2019;2(5):280–4. <https://doi.org/10.1089/crispr.2019.0052>
23. Porteus MH. A new class of medicines through DNA editing. *N Engl J Med*. 2019;380(10):947–59. <https://doi.org/10.1056/NEJMr1800729>
24. Saayman S, Ali SA, Morris KV, Weinberg MS. The therapeutic application of CRISPR/Cas9 technologies for HIV. *Expert Opin Biol Ther*. 2015;15(6):819–30. <https://doi.org/10.1517/14712598.2015.1036736>
25. Allers K, Schneider T. CCR5Δ32 mutation and HIV infection: basis for curative HIV therapy. *Curr Opin Virol*. 2015;14:24–29. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.06.007>
26. Ebina H, Misawa N, Kanemura Y, Koyanagi Y. Harnessing the CRISPR/Cas9 system to disrupt latent HIV-1 provirus. *Sci Rep*. 2013;3:2510. <https://doi.org/10.1038/srep02510>
27. Hu W, Kaminski R, Yang F, Zhang Y, Cosentino L, Li F, et al. RNA-directed gene editing specifically eradicates latent and prevents new HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;111(31):11461–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.1405186111>
28. Benjamin R, Berges BK, Solis-Leal A, Igbiniedion O, Strong CL, Schiller MR. TALEN gene editing takes aim on HIV. *Hum Genet*. 2016;135(9):1059–70. <https://doi.org/10.1007/s00439-016-1678-2>
29. Didigu CA, Wilen CB, Wang J, Duong J, Secreto AJ, Danet-Desnoyers GA, et al. Simultaneous zinc-finger nuclease editing of the HIV coreceptors *ccr5* and *cxcr4* protects CD4+ T cells from HIV-1 infection. *Blood*. 2014;123(1):61–9. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-08-521229>
30. Yuan J, Wang J, Crain K, Feams C, Kim KA, Hua KL, et al. Zinc-finger nuclease editing of human *cxcr4* promotes HIV-1 CD4(+) T cell resistance and enrichment. *Mol Ther*. 2012;20(4):849–59. <https://doi.org/10.1038/mt.2011.310>
31. Long C, McAnally JR, Shelton JM, Mireault AA, Bassel-Duby R, Olson EN. Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA. *Science*. 2014;345(6201):1184–8. <https://doi.org/10.1126/science.1254445>
32. Wang L, Yang Y, Breton C, Bell P, Li M, Zhang J, et al. A mutation-independent CRISPR-Cas9-mediated gene targeting approach to treat a murine model of ornithine transcarbamylase deficiency. *Sci Adv*. 2020;6(7):eaax5701. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax5701>
33. Estève J, Blouin JM, Lalanne M, Azzi-Martin L, Dubus P, Bidet A, et al. Targeted gene therapy in human-induced pluripotent stem cells from a patient with primary hyperoxaluria type 1 using CRISPR/Cas9 technology. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019;517(4):677–83. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.07.109>
34. Zuris JA, Thompson DB, Shu Y, Guilinger JP, Bessen JL, Hu JH, et al. Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing *in vitro* and *in vivo*. *Nat Biotechnol*. 2015;33(1):73–80. <https://doi.org/10.1038/nbt.3081>
35. Pavel-Dinu M, Wiebking V, Dejene BT, Srifa W, Mantri S, Nicolas CE, et al. Gene correction for SCID-X1 in long-term hematopoietic stem cells. *Nat Commun*. 2019;10(1):5624. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09614-y>
36. Park H, Oh J, Shim G, Cho B, Chang Y, Kim S, et al. In vivo neuronal gene editing via CRISPR-Cas9 amphiphilic nanocomplexes alleviates deficits in mouse models of Alzheimer's disease. *Nat Neurosci*. 2019;22(4):524–28. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0352-0>
37. Bengtsson NE, Hall JK, Odom GL, Phelps MP, Andrus CR, Hawkins RD, et al. Muscle-specific CRISPR/Cas9 dystrophin gene editing ameliorates pathophysiology in a mouse model for Duchenne muscular dystrophy. *Nat Commun*. 2017;8:16007. <https://doi.org/10.1038/ncomms14454>
38. Alapati D, Zacharias WJ, Hartman HA, Rossidis AC, Stratigis JD, Ahn NJ, et al. *In utero* gene editing for monogenic lung disease. *Sci Transl Med*. 2019;11(488):eaav8375. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aav8375>
39. Brusson M, Miccio A. Genome editing approaches to β-hemoglobinopathies. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2021;182:153–83. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2021.01.025>
40. Modarai SR, Kanda S, Bloh K, Opdenaker LM, Kmiec EB. Precise and error-prone CRISPR-directed gene editing activity in human CD34+ cells varies widely among patient samples. *Gene Ther*. 2021;28:105–13. <https://doi.org/10.1038/s41434-020-00192-z>
41. Palmer DC, Guittard GC, Franco Z, Crompton JG, Eil RL, Patel SJ, et al. *Cish* actively silences TCR signaling in CD8+ T cells to maintain tumor tolerance. *J Exp Med*. 2015;212(12):2095–113. <https://doi.org/10.1084/jem.20150304>
42. Osborn MJ, Webber BR, Knipping F, Lonetree C, Tenis N, DeFeo AP, et al. Evaluation of TCR gene editing achieved by TALENs, CRISPR/Cas9, and megaTAL nucleases. *Mol Ther*. 2016;24(3):570–81. <https://doi.org/10.1038/mt.2015.197>
43. Tran E, Ahmadzadeh M, Lu YC, Gros A, Turcotte S, Robbins PF, et al. Immunogenicity of somatic

- mutations in human gastrointestinal cancers. *Science*. 2015;350(6266):1387–90.
<https://doi.org/10.1126/science.aad1253>
44. Hu Z, Ding W, Zhu D, Yu L, Jiang X, Wang X, et al. TALEN-mediated targeting of HPV oncogenes ameliorates HPV-related cervical malignancy. *J Clin Invest*. 2015;125(1):425–36.
<https://doi.org/10.1172/JCI78206>
45. DiGiusto DL, Cannon PM, Holmes MC, Li L, Rao A, Wang J, et al. Preclinical development and qualification of ZFN-mediated CCR5 disruption in human hematopoietic stem/progenitor cells. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2016;3:16067.
<https://doi.org/10.1038/mtm.2016.67>
46. Choi M, Han E, Lee S, Kim T, Shin W. Regulatory oversight of gene therapy and cell therapy products in Korea. *Adv Exp Med Biol*. 2015;871:163–79.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-18618-4_9
47. Claussnitzer M, Cho JH, Collins R, Cox NJ, Dermitzakis ET, Hurler ME, et al. A brief history of human disease genetics. *Nature*. 2020;577(7789):179–89.
<https://doi.org/10.1038/s41586-019-1879-7>
48. Turro E, Astle WJ, Megy K, Gräf S, Greene D, Shamardina O, et al. Whole-genome sequencing of patients with rare diseases in a national health system. *Nature*. 2020;583(7814):96–102.
<https://doi.org/10.1038/s41586-020-2434-2>
49. Frangoul H, Altshuler D, Cappellini MD, Chen YS, Domm J, Eustace BK, et al. CRISPR-Cas9 gene editing for sickle cell disease and β -thalassemia. *New Engl J Med*. 2021;384(3):252–60.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa2031054>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: Н.С. Покровский — сбор и систематизация данных, написание текста; М.А. Водякова — анализ и обобщение данных, написание и доработка текста; Е.В. Мельникова — идея, концепция и дизайн исследования, написание и доработка текста; В.А. Меркулов — интерпретация результатов, окончательное утверждение версии рукописи для публикации.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00052-23-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121021800098-4).

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

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. Nikita S. Pokrovsky collected and collated data and drafted the manuscript. Marina A. Vodyakova analysed and summarised the data, drafted and revised the manuscript. Ekaterina V. Melnikova elaborated the idea, design, and concept of the study, drafted and revised the manuscript. Vadim A. Merkulov interpreted the results and approved the final version of the manuscript for publication.

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of publicly funded research project No. 056-00052-23-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121021800098-4).

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

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Покровский Никита Станиславович

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2355-0879>

pokrovsky.ns@gmail.com

Водякова Марина Андреевна

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6008-0554>

vodyakova@expmed.ru

Мельникова Екатерина Валерьевна, канд. биол. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9585-3545>

MelnikovaEV@expmed.ru

Меркулов Вадим Анатольевич, д-р мед. наук, проф.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4891-973X>

merkulov@expmed.ru

Поступила 07.07.2022

После доработки 13.09.2022

Принята к публикации 21.11.2022

Online first 20.04.2023

Nikita S. Pokrovsky

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2355-0879>

pokrovsky.ns@gmail.com

Marina A. Vodyakova

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6008-0554>

vodyakova@expmed.ru

Ekaterina V. Melnikova, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9585-3545>

MelnikovaEV@expmed.ru

Vadim A. Merkulov, Dr. Sci. (Med.), Professor

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4891-973X>

merkulov@expmed.ru

Received 7 July 2022

Revised 13 September 2022

Accepted 21 November 2022

Online first 20 April 2023



О.Н. Высочанская ,
С.И. Кулешова ,
Е.П. Симонова 

Гликопептидные антибиотики: структурно-функциональные аспекты, применение в медицине и стандартизация

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

✉ Кулешова Светлана Ивановна; Kuleshova@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

В последние годы для лечения тяжелых бактериальных инфекций широко применяются гликопептидные антибиотики. Длительное использование в медицинской практике антибиотиков первого поколения этой группы соединений (ванкомицин и тейкопланин) способствовало появлению устойчивых к ним бактерий. Для решения проблемы резистентности были разработаны три новых гликопептидных антибиотика: далбаванцин, телаванцин и оритаванцин. Цель работы — анализ и обобщение данных литературы и действующих стандартов качества, касающихся антибиотиков гликопептидной природы. В работе приведены основные сведения об истории открытия антибиотиков-гликопептидов природного происхождения (ванкомицин, тейкопланин) и их производных (телаванцин, оритаванцин, далбаванцин). Охарактеризована структура гликопептидных антибиотиков, описаны их основные свойства, применение и распространение на фармацевтическом рынке. Приведена информация о спектре антибактериальной активности ванкомицина, тейкопланина и их полусинтетических производных. Рассмотрены подходы к стандартизации ванкомицина и тейкопланина, приведены основные требования ведущих фармакопей к качеству ванкомицина, тейкопланина и препаратов на их основе. Проведенное исследование показало, что гликопептидные антибиотики продолжают оставаться крайне востребованными благодаря высокой эффективности при лечении заболеваний, вызванных грамположительными бактериями. Однако на настоящий момент разработаны и введены в ведущие зарубежные фармакопей стандарты качества только на два представителя этой группы антибиотиков: ванкомицин и тейкопланин. Обобщение данных литературных источников показало, что дальнейшая разработка модификаций гликопептидных антибиотиков направлена на создание соединений, характеризующихся пролонгированным действием и большей эффективностью действия против патогенных микроорганизмов. Таким образом, внимание исследователей должно быть направлено на дальнейшую стандартизацию новейших производных гликопептидных антибиотиков: телаванцин, оритаванцин и далбаванцин.

Ключевые слова: гликопептидные антибиотики; ванкомицин; тейкопланин; телаванцин; оритаванцин; далбаванцин; структура; механизм антибактериального действия; спектр антибактериального действия; стандартизация

Для цитирования: Высочанская О.Н., Кулешова С.И., Симонова Е.П. Гликопептидные антибиотики: структурно-функциональные аспекты, применение в медицине и стандартизация. *Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств.* 2023;13(2-1):261–270. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2022-447>

O.N. Vysochanskaya 
S.I. Kuleshova 
E.P. Simonova 

Glycopeptide Antibiotics: Structural and Functional Aspects, Human Medicinal Use, and Standardisation

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

✉ Svetlana I. Kuleshova; Kuleshova@expmed.ru

ABSTRACT

In recent years, glycopeptide antibiotics have been widely used to treat severe bacterial infections. The long-term use of first-generation antibiotics of this group (vancomycin, teicoplanin) has contributed to the emergence of bacteria resistant to them. The problem of resistance has motivated the development of three new glycopeptide antibiotics: dalbavancin, telavancin, and oritavancin. The aim of this study was to consolidate and analyse the data from literature and current quality standards related to glycopeptide antibiotics. The article presents basic information about the discovery of glycopeptide antibiotics of natural origin (vancomycin, teicoplanin) and their derivatives (telavancin, oritavancin, dalbavancin). It briefly characterises the structures of the glycopeptide antibiotics under consideration and describes their main properties, application, and distribution in the pharmaceutical market. The article also gives information on the spectra of antibacterial activity of vancomycin, teicoplanin, and their semi-synthetic derivatives. It considers approaches to vancomycin and teicoplanin standardisation and covers the main requirements of leading pharmacopoeias for the quality of vancomycin, teicoplanin, and the corresponding medicinal products. According to the study results, glycopeptide antibiotics are still widely prescribed because of their high effectiveness in diseases caused by Gram-positive bacteria. However, at present, leading pharmacopoeias have developed and implemented quality standards only for two antibiotics of the group: vancomycin and teicoplanin. According to the results of literature consolidation, further modification of glycopeptide antibiotics is aimed at creating compounds characterised by prolonged action and greater effectiveness against pathogenic microorganisms. Thus, the attention of researchers should be directed to further standardisation of the newest derivatives of glycopeptide antibiotics: telavancin, oritavancin, and dalbavancin.

Key words: glycopeptide antibiotics; vancomycin; teicoplanin; telavancin; oritavancin; dalbavancin; structure; mechanism of antibacterial action; spectrum of antibacterial action; standardisation

For citation: Vysochanskaya O.N., Kuleshova S.I., Simonova E.P. Glycopeptide antibiotics: structural and functional aspects, human medicinal use, and standardisation. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2023;13(2-1):261–270. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2022-447>

Введение

В последние годы для лечения тяжелых бактериальных инфекций широко применяются гликопептидные антибиотики. Антибиотики первого поколения этой группы, ванкомицин и тейкопланин, являются природными соединениями. Длительное применение этих антибиотиков в медицинской практике привело к появлению устойчивых к ним бактерий. Решению проблемы резистентности к антибиотикам-гликопептидам способствовала разработка новых гликопептидных антибиотиков: далбаванцина, телаванцина

и оригаванцина. Как правило, эти лекарственные средства активны в отношении грамположительных аэробных и анаэробных бактерий, включая метициллинрезистентные штаммы, вследствие чего являются одними из основных препаратов для борьбы с инфекциями, вызванными резистентными к пенициллиновой группе микроорганизмами.

Цель работы — анализ и обобщение данных литературы и действующих стандартов качества, касающихся антибиотиков гликопептидной природы.

Общая характеристика

Антибиотики-гликопептиды представляют собой соединения, построенные из сахаров и аминокислот. Первым открытым антибиотиком класса гликопептидов был ванкомицин, выделенный в 1953 г. из почвенной бактерии *Amycolatopsis orientalis* [1]. Ванкомицин состоит из семичленной

пептидной цепи, образующей трициклическую кольцевую структуру, к которой присоединен дисахарид, состоящий из ванкозамина и глюкозы (рис. 1). Пять из семи остатков ванкомицина являются ароматическими, два – алифатическими аминокислотами. Ковалентное взаимодействие между аминокислотными остатками

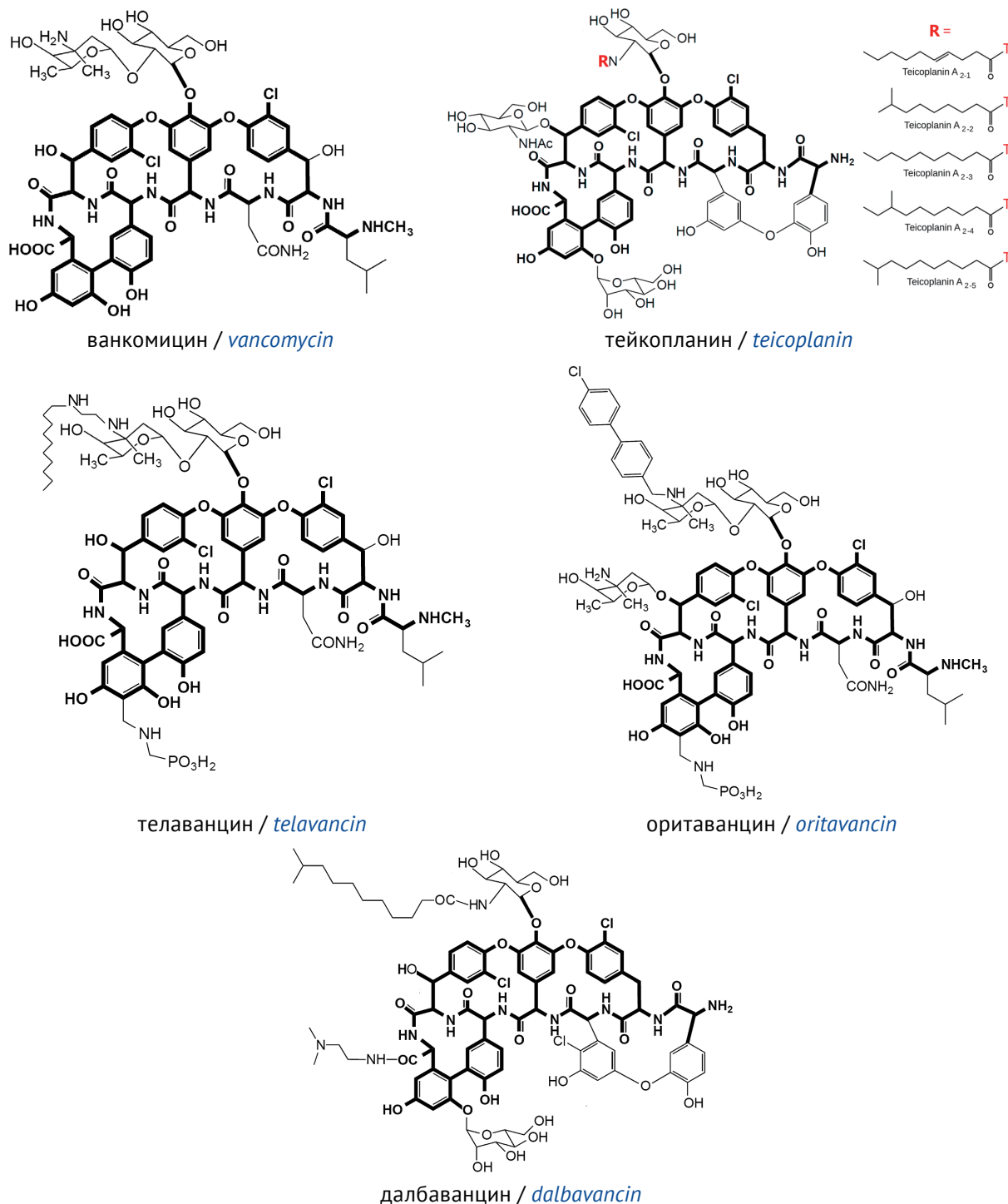


Рис. 1. Структура гликопептидных антибиотиков. Жирным выделен общий остов

Fig. 1. Structures of glycopeptide antibiotics with the common backbone highlighted in bold

боковых цепей гептапептидного основания приводит к образованию трициклической структуры и жесткого каркаса с вогнутым карманом, который играет важную роль в связывании клеточной мишени антибиотика [2].

Ванкомицин проявляет активность по отношению к золотистому стафилококку (*Staphylococcus aureus*), включая метициллинрезистентный стафилококк (MRSA), стрептококки (*Streptococcus*), энтерококки (*Enterococcus*) и др. [3]. Препараты ванкомицина приобретают особое значение при лечении инфекций, вызванных штаммами микроорганизмов, устойчивых к пенициллину, метициллину или цефалоспоринолу.

Лекарственные препараты ванкомицина широко применяются при лечении тяжелых или угрожающих жизни инфекционно-воспалительных заболеваний, а именно: бактериальный эндокардит, сепсис, остеомиелит, менингит, пневмония, абсцесс легких [4]. Российские ученые подтвердили эффективность лекарственного препарата, содержащего ванкомицин, при лечении ожоговых, гнойных ран кожи и мягких тканей [5]. На российском рынке зарегистрировано более 20 различных препаратов ванкомицина в лекарственных формах лиофилизата или порошка для приготовления раствора для инфузий и приема внутрь¹.

Второй введенный в медицинскую практику природный антибиотик-гликопептид, тейкопланин, вырабатываемый почвенным микроорганизмом *Actinoplanes teichomyceticus* nov. sp., представляет собой смесь гликопептидов: 5 основных компонентов (A_{2-1} – A_{2-5} , рис. 1). Все структуры имеют гликопептидное ядро, состоящее из семи ароматических аминокислот, к которому присоединены три углевода (манноза и N-ацетилглюкозамин, N-ацилглюкозамин), отличаются друг от друга строением боковой цепи (R) [6, 7]. Кроме того, тейкопланин содержит минорный компонент A_3 , а также дополнительные четыре минорных компонента, которые являются продуктами разложения групп A_2 и A_3 [7]. Наличие липофильного заместителя (боковой цепи) обеспечивает закрепление гликопептида в мембране бактериальной клетки, потенциально вызывая изменение целостности мембраны.

Механизм действия тейкопланина на клеточную стенку бактерий аналогичен ванкомицину, а липофильный заместитель в молекуле тейкопланина обеспечивает усиление антимикробной

активности [8]. Липофильные группы также способствуют лучшему проникновению вещества в клетки и ткани и медленному выведению обратно в кровь. Более длительный период полувыведения тейкопланина (до 120 ч) по сравнению с ванкомицином (4–8 ч) обуславливает возможность применения тейкопланина однократно в сутки [9, 10]. В отличие от ванкомицина тейкопланин обладает кислотными свойствами и способен образовывать водорастворимые соли, что позволяет вводить тейкопланин внутримышечно.

По спектру антимикробной активности тейкопланин, как и ванкомицин, активно используется при лечении пациентов с инфекцией кожи, мягких тканей, костей и суставов, дыхательных и мочевыводящих путей, сепсисом, эндокардитом, перитонитом [11]. Проведя исследования в области безопасности гликопептидных препаратов, авторы работы [12] пришли к заключению, что при приеме тейкопланина частота побочных эффектов, например нефротоксичность и гиперемия (синдром красного человека) ниже, чем при приеме ванкомицина. Лекарственная форма тейкопланина представляет собой лиофилизат для приготовления раствора для внутривенного и внутримышечного введения и приема внутрь. В России зарегистрированы четыре препарата тейкопланина.

Телаванцин — липогликопептид второго поколения, разработанный компанией Theravance Biopharma (США). Телаванцин образован путем присоединения к молекуле ванкомицина липофильной (дециламиноэтил-) и гидрофильной (фосфонометиламинометил-) групп (рис. 1) [13]. Наличие в молекуле гидрофильной фосфонометиламинометильной группы способствует увеличению периода полураспада антибиотика, тем самым оказывая влияние на улучшение фармакокинетических характеристик лекарственного средства при его воздействии на ткани. Благодаря наличию дециламиноэтильной группы в структуре телаванцин проявляет активность против грамположительных бактерий с пониженной чувствительностью к ванкомицину [4].

В 2009 г. Управление по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств (Food and Drug Administration, FDA) одобрило телаванцин для лечения осложненных инфекций кожи и мягких тканей². Единственным производителем лекарственных средств на основе телаванцина

¹ <https://grls.rosminzdrav.ru>

² Theravance and Astellas announce FDA approval of Vibativ (telavancin) for the treatment of complicated skin and skin structure infections. Theravance, Inc. and Astellas Pharma US, Inc. 2009-09-11.

является компания Hospira Inc. (США), выпускающая лиофилизат для приготовления раствора для инфузий. Основными показаниями к применению препарата являются осложнения инфекций кожи и мягких тканей, а также нозокомиальная пневмония, в том числе ИВЛ-ассоциированная пневмония [14]. В Российской Федерации на сегодняшний день зарегистрирован один препарат с международным непатентованным названием телаванцин, лиофилизат для приготовления раствора для инфузий.

Оритаванцин — полусинтетический липогликопептидный антибиотик, разработанный The Medicines Company для лечения острых бактериальных инфекций кожи, одобренный к применению FDA в 2014 г. Оритаванцин является синтетическим производным природного гликопептида хлорэремомицина. Структурными отличиями оритававанцина от ванкомицина являются наличие дополнительного моносахарида 4-эпиванкозамина к аминокислотному остатку и N-алкил-п-хлорфенилбензильного заместителя к дисахариду (рис. 1) [15]. Считается, что такая структура молекулы приводит к повышению противомикробной активности в отношении чувствительных к ванкомицину энтерококков. Оритаванцин, как и другие гликопептиды, нарушает синтез пептидогликанов клеточной стенки бактерий за счет ингибирования трансгликозилирования и транспептидации.

Период полувыведения оритававанцина составляет 245 ч, что, при учете его высокой степе-

ни связывания с белками плазмы крови, позволяет вводить дозу препарата однократно. Лекарственные препараты оритававанцина применяют при лечении острых бактериальных инфекций кожи, оритававанцин не метаболизируется в печени человека [16]. В Российской Федерации на сегодняшний день зарегистрированы два препарата оритававанцина: лиофилизированный порошок для приготовления раствора для внутривенного введения и раствор для внутривенного введения.

Далбававанцин представляет собой полусинтетическое производное второго поколения тейкопланиноподобного антибиотика «A4092662» [17]. Разработка далбававанцина проводилась при сотрудничестве четырех фармацевтических компаний и длилась более 15 лет, в 2014 г. препарат был одобрен FDA для лечения острых бактериальных инфекций кожи и кожных структур.

Основным структурным отличием далбававанцина от тейкопланина является удлиненная липофильная боковая цепь (рис. 1), которая позволяет молекуле димеризоваться и закрепляться на мембране клетки бактерии, повышая эффективность препаратов на основе далбававанцина, продлевая период полувыведения и тем самым позволяя увеличивать интервалы дозирования препарата [17]. Дополнительная боковая амидированная карбоксильная группа усиливает активность гликопептида против стафилококков.

В таблице 1 приведены характеристики гликопептидных антибактериальных препаратов.

Таблица 1. Общие характеристики ванкомицина, тейкопланина и их полусинтетических производных

Table 1. General characteristics of vancomycin, teicoplanin, and their semisynthetic derivatives

Название <i>Name</i>	Брутто-формула <i>Molecular formula</i>	Год разработки <i>Year of development</i>	Происхождение <i>Source</i>	Доза / режим дозирования <i>Dose/dosing schedule</i>	Период полувыведения, ч <i>Half-life period, h</i>
Ванкомицин <i>Vancomycin</i>	$C_{66}H_{75}Cl_2N_9O_{24}$	1953	Выделен из / <i>isolated from Amycolatopsis orientalis</i>	25 мг/кг, 2 раза/сут <i>25 mg/kg twice a day</i>	4–8
Тейкопланин <i>Teicoplanin</i>	$C_{78}H_{77}Cl_2N_9O_{32}R$	1978	Выделен из / <i>isolated from Actinoplanes teichomyceticus</i>	12 мг/кг, 1 раз/сут <i>12 mg/kg once a day</i>	до / <i>up to</i> 120
Телаванцин <i>Telavancin</i>	$C_{80}H_{106}Cl_2N_{11}O_{27}P$	2009 (одоброно FDA / <i>approved by FDA</i>)	Производное ванкомицина / <i>vancomycin derivative</i>	10 мг/кг, 1 раз/сут <i>10 mg/kg once a day</i>	7–9
Оритаванцин <i>Oritavancin</i>	$C_{86}H_{97}Cl_3N_{10}O_{26}$	2014 (одоброно FDA / <i>approved by FDA</i>)	Производное хлорэремомицина / <i>chloroeremomycin derivative</i>	1500 мг, однократно <i>1500 mg as a single dose</i>	до / <i>up to</i> 245
Далбававанцин <i>Dalbavancin</i>	$C_{88}H_{100}Cl_2N_{10}O_{28}$	2014 (одоброно FDA / <i>approved by FDA</i>)	Производное тейкопланина / <i>teicoplanin derivative</i>	1200 мг, однократно <i>1200 mg as a single dose</i>	до / <i>up to</i> 405

Примечание. FDA — Управление по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств.

Note. FDA, Food and Drug Administration.

В ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе» был выделен оригинальный антибиотик эремомицин [18], более активный *in vivo*, чем тейкопланин и ванкомицин, и, как все природные антибиотики-амингликозиды, неактивный в отношении гликопептидорезистентных энтерококков. В настоящее время препараты эремомицина на фармацевтическом рынке России не представлены.

Механизм действия

Основным механизмом бактерицидного действия гликопептидов считается блокада синтеза клеточной стенки микроорганизмов. Гликопептидное ядро антибиотика связывается с концевыми остатками D-аланин-D-аланина мономеров пептидогликана (липид II) посредством образования водородных связей и гидрофобных взаимодействий, что, в свою очередь, ведет к нарушению поперечных связей между цепями пептидогликана. Таким образом, происходит подавление трансгликозилирования (полимеризация) за счет стерических препятствий на поздней стадии биосинтеза клеточной стенки бактерии. Необходимость прямого доступа гликопептидов к целевому предшественнику пептидогликана объясняет избирательное действие против грамположительных микроорганизмов. На поверхности цитоплазматической мембраны таких бактерий присутствуют предшественники пептидогликана, тогда как грамотрицательные бактерии защищены внешней липополисахаридной мембраной, непроницаемой для крупных биомолекул [19].

При взаимодействии ванкомицина с клеточной стенкой бактерии антибиотик ингибирует восстановление клеточной стенки или автолиз [20]. На активность ванкомицина значительное влияние оказывает способность к нековалентной самоассоциации через водородные связи, что приводит к образованию гомодимеров. Димеризация дополнительно усиливает связывание остатков D-аланин-D-аланина с гликопептидным ядром за счет расположения антибиотика вблизи места биосинтеза клеточной стенки. Интересно отметить, что данная особенность образования димеров у тейкопланина отсутствует [21]. Однако гидрофобный фрагмент молекулы тейкопланина (боковая цепь жирных кислот) взаимодействует с липидным бислоем бактериальной мембраны, что также приводит к закреплению агента на мембране.

Полусинтезированный гликопептид оритаванцин имеет дополнительный механизм действия. За счет наличия в структуре 4'-хлорбифенилметильной боковой цепи оритаванцин способен связываться с пентаглицидовым мостиком, являющимся вторичным сайтом в пептидогликане, что позволяет ингибировать биосинтез резистентных к ванкомицину энтерококков. Боковая 4'-хлорбифенилметильная цепь также считается причиной повышенной проницаемости мембраны и ее деполяризации [15]. Известно, что телаванцин также причастен к нарушению функции мембранного барьера, однако точный механизм нарушения остается не выявленным. Возможно, связывание телаванцина с липидом II локализует липофильную боковую цепь телаванцина

Таблица 2. Механизм действия ванкомицина, тейкопланина и их полусинтетических производных

Table 2. Mechanisms of action of vancomycin, teicoplanin, and their semisynthetic derivatives

Антибиотик <i>Antibiotic</i>	Блокада синтеза клеточной стенки <i>Cell-wall synthesis blockage</i>			Ингибирование автолиза <i>Autolysis inhibition</i>	Нарушение функции мембранного барьера <i>Impairment of membrane barrier function</i>
	Связывание с D-аланин-D-аланином <i>D-alanine-D-alanine binding</i>	Димеризация <i>Dimerisation</i>	Закрепление на мембране <i>Membrane anchoring</i>		
Ванкомицин <i>Vancomycin</i>	+	+	–	+	–
Тейкопланин <i>Teicoplanin</i>	+	–	+	+	–
Телаванцин <i>Telavancin</i>	+	+	+	–	+
Оритаванцин <i>Oritavancin</i>	+	+	+	+	+
Далбаванцин <i>Dalbavancin</i>	+	–	+	–	–

Примечание. «+» – присутствует, «–» – отсутствует.

Note. +, present; –, absent.

Таблица 3. Требования к лекарственным средствам на основе ванкомицина, приведенные в зарубежных фармакопеях

Table 3. Acceptance criteria for vancomycin-based medicinal products in the European, American, and British pharmacopoeias

Показатель <i>Parameter</i>	Нормативные требования <i>Regulatory requirements</i>		
	Европейская фармакопея (Ph. Eur.) ³	Фармакопея США (USP) ⁴	Британская фармакопея (BP) ⁵
Подлинность <i>Identification</i>	Ванкомицин — ВЭЖХ (сравнение времени удерживания испытуемого раствора со стандартом) Хлориды — качественная реакция с раствором AgNO ₃ <i>Vancomycin: HPLC (retention time of the test solution vs. the standard)</i> <i>Clorides: identification test with AgNO₃</i>		
рН раствора <i>pH of solution</i>	2,5–4,5		
Родственные примеси <i>Related substances</i>	Общая сумма примесей <9,0% • примеси А, Н: каждая не более 3,0%; • сумма примесей В и Е: не более 2,0%; • примесь J: не более 1,6%; • примеси D, F, М: каждая не более 1,5%; • примеси G, I, К: каждая не более 1,2%; • примесь С: не более 1,0%; • прочие примеси, элюирующие до Ванкомицина В: максимум 0,8% для единичных примесей и не более 0,30% для не более 5 примесей; • прочие примеси, элюирующие после Ванкомицина В: максимум 0,8% для единичных примесей и не более 0,3% для не более 3 примесей; <i>Total impurities <9.0%;</i> • <i>impurities A, H: not more than 3.0% each;</i> • <i>sum of impurities B and E: not more than 2.0%;</i> • <i>impurity J: not more than 1.6%;</i> • <i>impurities D, F, M: not more than 1.5% each;</i> • <i>impurities G, I, K: not more than 1.2% each;</i> • <i>impurity C: not more than 1.0%;</i> • <i>any other impurity eluting before vancomycin B: for each impurity, maximum 0.8 per cent, and not more than 5 such impurities exceed 0.30 per cent;</i> • <i>any other impurity eluting after vancomycin B: for each impurity, maximum 0.8 per cent, and not more than 3 such impurities exceed 0.3 per cent</i>	Единичная примесь / <i>any individual impurity <4,0%</i>	Единичная примесь / <i>any individual impurity <4,0%</i> Общая сумма примесей / <i>total impurities <7,0%</i>
Ванкомицин В <i>Vancomycin B</i>	>91,0%	>85,0%	>93,0%
Вода <i>Water</i>	< 5,0%		
Сульфатная зола <i>Sulfated ash</i>	<1,0%	–	<1,0%
Бактериальные эндотоксины <i>Bacterial endotoxins</i>	Гель-тромб тест: не более 0,25 ЕЭ/мг <i>Gel-clot test: not more than 0.25 EU/mg</i>	Гель-тромб тест: не более 0,33 ЕЭ/мг <i>Gel-clot test: not more than 0.33 EU/mg</i>	Гель-тромб тест: не более 0,33 ЕЭ/мг <i>Gel-clot test: not more than 0.33 EU/mg</i>
Активность <i>Potency</i>	>1050 МЕ/мг (на безводное вещество) <i>>0.25 IU/mg (on the anhydrous basis)</i>	>900 мкг/мг (на безводное вещество) <i>>900 µg/mg (on the anhydrous basis)</i>	>1050 МЕ/мг (на безводное вещество) <i>>1050 IU/mg (on the anhydrous basis)</i>

Примечание. «–» — не нормируется.

Note. —, not specified.

³ Monograph 04/2021:1058 Vancomycin Hydrochloride. European Pharmacopoeia 10th ed. Strasbourg. EDQM; 2021.

⁴ United States Pharmacopoeia. USP 43-NF38.

⁵ British Pharmacopoeia. Monographs: Medicinal and Pharmaceutical Substances. 2009.

к мембране, что позволяет ему нарушать липидный бислой [22].

Обобщенная информация о механизме действия гликопептидных антибиотиков приведена в таблице 2.

Стандарты качества

Для оценки качества антибактериальных препаратов может быть применен широкий спектр методов анализа, в том числе спектроскопические методы (спектрометрия в инфракрасной области, спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях), хроматографические методы (высокоэффективная хроматография (ВЭЖХ), тонкослойная хроматография); методы биологического анализа; методы химического анализа (титриметрия, качественные реакции и т.д.).

Количественное определение гликопептидных лекарственных средств, как правило, выполняется микробиологическим методом, который основан на способности гликопептидов угнетать рост микроорганизмов. В зависимости от выбора среды микробиологическое определение активности антибиотиков проводят либо методом

диффузии в агар (на твердых средах), либо турбидиметрическим методом (в жидких средах).

Для определения примесей и их содержания наиболее часто выбирают ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектированием. В последнее время все чаще используют ультраэффективную жидкостную хроматографию, позволяющую значительно увеличить разделительную способность хроматографической системы и сократить время анализа.

Ванкомицин включен в список основных лекарственных средств Всемирной организации здравоохранения, которая классифицирует ванкомицин как критически важный препарат для медицинского применения. Монографии на ванкомицин присутствуют во всех международных фармакопеях. К основным определяемым показателям качества препаратов ванкомицина относят: подлинность (идентификация), активность, бактериальные эндотоксины, примеси ванкомицина, содержание основного компонента (ванкомицина В). В таблице 3 представлены нормы и требования к ванкомицину согласно ведущим зарубежным фармакопеям.

Таблица 4. Требования к лекарственным средствам на основе тейкопланина, указанные в Европейской фармакопее⁶

Table 4. Acceptance criteria for teicoplanin-based medicinal products in the European Pharmacopoeia⁶

Показатель <i>Parameter</i>	Нормативные требования <i>Regulatory requirements</i>
Подлинность <i>Identification</i>	Абсорбционная спектрометрия в инфракрасной области ВЭЖХ (сравнение времени удерживания испытуемого со стандартным образцом) <i>Infrared absorption spectrometry</i> <i>HPLC (retention time of the test solution vs. the standard)</i>
pH раствора <i>pH of solution</i>	6,5–7,5
Примеси/состав <i>Impurities / composition</i>	ВЭЖХ/HPLC Группы / <i>groups</i> A ₂ – 84–98%; A ₂₋₁ – 10–19%; A ₂₋₅ – 7–17%; A ₂₋₃ – 5–11%; A ₃ – 4–12%; Группа тейкопланин-подобного родственного соединения / <i>teicoplanin-like related substance group</i> A ₂₋₆ <5,0% (включая / <i>including</i> A _{2-6c} , A _{2-6a} , A _{2-6b}) A ₂₋₁ – 2–7% A ₂₋₂ – 37–50% A ₂₋₃ – 4–8,5% A ₂₋₄ – 7–15% A ₂₋₅ – 7–15% Примесь / <i>impurity</i> A _{2-1a} – 0,5–5,5% Примесь / <i>impurity</i> A _{2-1b} – 0,5–4% Примесь / <i>impurity</i> A _{2-6c} <2,5% Примесь / <i>impurity</i> A _{2-6a} <1,5% Примесь / <i>impurity</i> A _{2-6b} <1,5% Единичная нетейкопланиновая примесь / <i>any non-teicoplanin-like impurity</i> <0,5% Сумма нетейкопланиновых примесей / <i>total non-teicoplanin-like impurities</i> <1,5%
Вода <i>Water</i>	<15,0%
Активность <i>Potency</i>	> 900 МЕ/мг (на безводное вещество) > 900 IU/mg (on the anhydrous basis)

⁶ Monograph 04/2022:2358. Teicoplanin. European Pharmacopoeia 10th ed. Strasbourg: EDQM; 2021.

Тейкопланин нашел широкое применение в Европе, Азии и Южной Америке, однако не одобрен для использования в США, ввиду чего монография на данное лекарственное средство в Фармакопее США отсутствует. Из-за сложного состава тейкопланина в монографии, приведенной в Европейской фармакопее, введен дополнительный показатель «Состав» для количественного определения компонентов гликопептида и его сопутствующих примесей. Испытание проводят методом нормализации с использованием ВЭЖХ, нормы на все основные показатели приведены в *таблице 4*.

Монографии на телаванцин, оритаваксин и далбаваксин отсутствуют в USP, Ph. Eur. и ВР.

Заключение

Обобщение данных литературных источников о номенклатуре, структуре, механизме действия

антибиотиков группы гликопептидов показало, что соединения этой группы являются востребованными благодаря их высокой эффективности при лечении заболеваний, вызванных грамположительными бактериями. Разработка модификаций подобных соединений направлена на создание препаратов, характеризующихся пролонгированным действием и большей эффективностью действия против патогенных микроорганизмов.

Разработаны и введены в ведущие зарубежные фармакопеи стандарты качества на ванкомицин и тейкопланин, отсутствуют монографии на телаванцин, оритаваксин и далбаваксин. Таким образом, внимание исследователей должно быть направлено на дальнейшую стандартизацию новейших производных гликопептидных антибиотиков.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Levin DP. Vancomycin: a history. *Clin Infect Dis*. 2006; 42 Suppl 1:S5–12. <https://doi.org/10.1086/491709>
2. Phillips-Jones MK, Lithgo R, Dinu V, Gillis RB, Harding JE, Adams GG, Harding SE. Full hydrodynamic reversibility of the weak dimerization of vancomycin and elucidation of its interaction with VanS monomers at clinical concentration. *Sci Rep*. 2017;7(1):12697. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12620-z>
3. Zeng D, Debabov D, Hartsell TL, Cano RJ, Adams S, Schuyler JA, et al. Approved glycopeptide antibacterial drugs: mechanism of action and resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016;6(12):a026989. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026989>
4. Lambert M. IDSA Guidelines on the treatment of MRSA infections in adults and children. *Am Fam Physician*. 2011;84(4):455–63.
5. Блатун ЛА, Крутиков МГ, Гришина ИА, Бобровников АЕ, Алексеев АА, Светухин АМ, Яковлев ВП. Клинико-лабораторная оценка эффективности ванкомицина (эдицин) при лечении гнойных ран кожи и мягких тканей, ожоговых ран и инфекционных осложнений ожоговой болезни. *Антибиотики и химиотерапия*. 2000;45(2):22–7. [Blatun LA, Krutikov MG, Grishina IA, Bobrovnikov AE, Alekseev AA, Svetukhin AM. Clinical and laboratory evaluation of vancomycin (Edicin®) efficacy in the treatment of purulent wounds of the skin and soft tissues, burn wounds and infectious complications of burn disease. *Antibiotiki i khimioterapiya = Antibiotics and Chemotherapy*. 2000;45(2):22–7 (In Russ.)]
6. Barna JC, Williams DH, Strazzolini P, Malabarba A, Leung TW. Structure and conformation of epimers derived from the antibiotic teicoplanin. *J Antibiot (Tokyo)*. 1984;37(10):1204–8. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.37.1204>
7. Borghi A, Coronelli C, Faniuolo L, Allievi G, Pallanza R, Gallo GG. Teichomycins, new antibiotics from actinoplanes teichomyceticus nov. sp. IV. Separation and characterization of the components of teichomycin (teicoplanin). *J Antibiot (Tokyo)*. 1984;37(6):615–20. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.37.615>
8. Mackay JP, Gerhard U, Beauregard DA, Westwell MS, Searle MS, Williams DH. Glycopeptide antibiotic activity and the possible role of dimerization: a model for biological signaling. *J Am Chem Soc*. 1994;116(11):4581–90. <https://doi.org/10.1021/ja00090a006>
9. Дмитриева НВ, Петухова ИН, Григорьевская ЗВ, Багирова НС, Терещенко ИВ, Ключникова ИА, Дьякова СА. Сравнительный анализ активности гликопептидов и линезолида в отношении нозокомиальных штаммов грамположительных микроорганизмов, выделенных от онкологических пациентов. *Сибирский онкологический журнал*. 2021;20(5):93–9 [Dmitrieva NV, Petukhova IN, Grigoryevskaya ZV, Bagirova NS, Tereshchenko IV, Klyuchnikova IA, Dyakova SA. Comparative analysis of the activity of glycopeptides and linezolid against nosocomial strains of gram-positive microorganisms isolated from cancer patient. *Sibirskiy onkologicheskii zhurnal = Siberian Journal of Oncology*. 2021;20(5):93–9 (In Russ.)] <https://doi.org/10.21294/1814-4861-2021-20-5-93-99>
10. Harding I, Sorgel F. Comparative pharmacokinetics of teicoplanin and vancomycin. *J Chemother*. 2000;12 Suppl 5:15–20. <https://doi.org/10.1080/1120009X.2000.11782313>
11. Lewis P, Garaud JJ, Parenti F. A multicentre open clinical trial of teicoplanin in infections caused by Gram-positive bacteria. *J Antimicrob Chemother*. 1988;21(Suppl A):61–7. https://doi.org/10.1093/jac/21.suppl_a.61
12. Svetitsky S, Leibovici L, Paul M. Comparative efficacy and safety of vancomycin versus teicoplanin: systematic review and meta-analysis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(10):4069–79. <https://doi.org/10.1128/aac.00341-09>

13. Van Bambeke F. Glycopeptides in clinical development: pharmacological profile and clinical perspectives. *Curr Opin Pharmacol.* 2004;4(5):471–8. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2004.04.006>
14. Nawar T, Kanafani ZA. Telavancin (VIBATIV) for the treatment of complicated skin and skin structure infections. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2015;13(7):825–33. <https://doi.org/10.1586/14787210.2015.1043889>
15. Markham A. Oritavancin: first global approval. *Drugs.* 2014;74(15):1823–8. <https://doi.org/10.1007/s40265-014-0295-4>
16. Zhanel GG, Calic D, Schweizer F, Zelenitsky S, Adam H, Lagace-Wiens PRS, et al. New lipoglycopeptides: a comparative review of dalbavancin, oritavancin and telavancin. *Drugs.* 2010;70(7):859–86. <https://doi.org/10.2165/11534440-000000000-00000>
17. Smith JR, Roberts KD, Rybak MJ. Dalbavancin: a novel lipoglycopeptide antibiotic with extended activity against gram-positive infections. *Infect Dis Ther.* 2015;4(3):245–58. <https://doi.org/10.1007/s40121-015-0077-7>
18. Павлов АЮ, Преображенская МН. Химическая модификация гликопептидных антибиотиков. *Биоорганическая химия.* 1998;24(9):644–62. [Pavlov AYU, Preobrazhenskaya MN. Chemical modification of glycopeptide antibiotics. *Bioorganicheskaya khimiya = Bioorganic Chemistry.* 1998;24(9):644–62 (In Russ.)]
19. Kahne D, Leimkuhler C, Lu W, Walsh Ch. Glycopeptide and lipoglycopeptide antibiotics, *Chem Rev.* 2005; 105(2):425–48. <https://doi.org/10.1021/cr030103a>
20. Sieradzki K, Tomasz A. Inhibition of cell wall turnover and autolysis by vancomycin in a highly vancomycin-resistant mutant of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 1997;179(8):2557–66. <https://doi.org/10.1128/jb.179.8.2557-2566.1997>
21. Beauregard DA, Williams DH, Gwynn MN, Knowles DJ. Dimerization and membrane anchors in extracellular targeting of vancomycin group antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39(3):781–5. <https://doi.org/10.1128/aac.39.3.781>
22. Lunde CS, Hartouni SR, Janc JW, Mammen M, Humphrey PP, Benton BM. Telavancin disrupts the functional integrity of the bacterial membrane through targeted interaction with the cell wall precursor Lipid II. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(8):3375–83. <https://doi.org/10.1128/aac.01710-08>

Вклад авторов. О.Н. Высочанская — подбор материалов, анализ литературных источников и написание текста рукописи; С.И. Кулешова — идея, планирование структуры статьи и анализ литературных источников; Е.П. Симонова — анализ литературных источников.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00001-22-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121021800098-4).

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

Authors' contributions. Olga N. Vysochanskaya — selection of materials, analysis of literature, and writing of the text of the manuscript; Svetlana I. Kuleshova — elaboration of the idea, planning of the article structure, and analysis of literature; Elena P. Simonova — analysis of literature.

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of publicly funded research project No. 056-00001-22-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No.121021800098-4).

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

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Высочанская Ольга Николаевна

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4327-6640>

Vysochanskayaon@expmed.ru

Кулешова Светлана Ивановна, канд. биол. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9103-9239>

Kuleshova@expmed.ru

Симонова Елена Павловна

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2221-5534>

SimonovaE@expmed.ru

Olga N. Vysochanskaya

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4327-6640>

Vysochanskayaon@expmed.ru

Svetlana I. Kuleshova, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9103-9239>

Kuleshova@expmed.ru

Elena P. Simonova

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2221-5534>

SimonovaE@expmed.ru

Поступила 31.03.2022

После доработки 06.09.2022

Принята к публикации 21.11.2022

Online first 25.11.2022

Received 31 March 2022

Revised 6 September 2022

Accepted 21 November 2022

Online first 25 November 2022



И.Ю. Якупов 
С.И. Кулешова  
Е.П. Симонова 
А.С. Демидов 

Применение ион-парной хроматографии для определения компонентов и родственных примесей капреомицина сульфата

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

✉ Кулешова Светлана Ивановна; Kuleshova@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

Хроматографические методы определения продуктов деструкции антибиотиков широко внедрены в практику оценки качества лекарственных средств. Наиболее сложными соединениями для разработки методик определения родственных примесей являются природные многокомпонентные антибиотики, например капреомицин. В монографиях ведущих фармакопей на капреомицин сульфат нормирование примесей не предусмотрено. Основное требование предъявлено к сумме основных компонентов капреомицина, содержание которых рассчитывают методом нормализации по хроматограмме испытуемого раствора. В этой связи актуальна разработка методики определения не только компонентов капреомицина, но и его родственных примесей.

Цель работы: разработка методики одновременного определения содержания основных компонентов капреомицина (IA, IB, IIA, IIB) и его родственных примесей с применением ион-парной ультраэффективной жидкостной хроматографии.

Материалы и методы: в качестве объекта исследований использовали субстанцию — порошок капреомицина сульфата. Для подтверждения селективности и эффективности разделения экспериментальной хроматографической системы выполнено хроматографирование растворов капреомицина сульфата после искусственной деструкции (щелочной и кислотный гидролиз). Испытание проводили на жидкостном хроматографе Agilent 1100 с использованием хроматографических колонок Kinetex C18, YMC-Triart C18, ACQUITY UPLC BEH C18, ACQUITY UPLC BEH C8, ACQUITY UPLC BEH Phenyl, ACQUITY UPLC CSH C18; анализ по методике Международной фармакопеи — на колонках Acclaim C18, Zorbax SB-C18 и XBridge BEH130 C18.

Результаты: подобранные условия хроматографирования позволяют одновременно определить компонентный состав субстанции капреомицина и родственные примеси капреомицина, в отличие от фармакопейных методик, оценивающих только компонентный состав. Результат был достигнут за счет использования хроматографической колонки с размером частиц 1,7 мкм вместо колонок с размером частиц 5 мкм, предусмотренных фармакопейными методиками. Разработанная методика сохраняет возможность проведения испытания на жидкостном хроматографе с ограничением давления ≤400 бар в режиме двухфазного градиентного элюирования. Оптимальные результаты по оценке разделительной способности и эффективности были получены при использовании хроматографической колонки ACQUITY UPLC BEH C18 (150×2,1 мм, 1,7 мкм), обеспечивающей наилучшее разделение пиков изоформ капреомицина и пиков примесей, образующихся при искусственной деструкции капреомицина.

Вывод: разработанная методика на основе ион-парной ультравысокоэффективной хроматографии позволяет проводить оценку качества субстанции капреомицина по содержанию основных компонентов и примесных соединений как при производстве, так и при контроле стабильности лекарственных средств капреомицина.

Ключевые слова: ион-парная ультравысокоэффективная жидкостная хроматография; капреомицин; компонентный состав; родственные примеси; контроль качества

Для цитирования: Якупов И.Ю., Кулешова С.И., Симонова Е.П., Демидов А.С. Применение ион-парной хроматографии для определения компонентов и родственных примесей капреомицина сульфата. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств.* 2023;13(2-1):271–282. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-451>

I.Yu. Yakupov 
S.I. Kuleshova 
E.P. Simonova 
A.S. Demidov 

Ion-Pair Chromatography for the Determination of Capreomycin Sulfate Components and Related Substances

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

✉ **Svetlana I. Kuleshova;** Kuleshova@expmed.ru

ABSTRACT

Chromatographic methods for the analysis of antibiotic degradation products are widely used to evaluate the quality of medicines. Natural multicomponent antibiotics, such as capreomycin, are the most challenging compounds in terms of developing analytical procedures for related substances. Capreomycin sulfate monographs of the leading pharmacopoeias do not contain specifications for related substances. The key requirement concerns the sum of the main components of capreomycin calculated by normalising the peak areas in the test solution chromatogram. Therefore, it is important to develop an analytical procedure for determining not only the main components but also related substances of capreomycin.

The aim of the study was to develop an analytical procedure for determining both the main components (IA, IB, IIA, and IIB) and related substances of capreomycin by ion-pair ultra-high-performance liquid chromatography (UHPLC).

Materials and methods. This study examined capreomycin sulfate powder, an active pharmaceutical ingredient (API). Capreomycin sulfate solutions were analysed after artificial degradation (alkaline or acid hydrolysis) to demonstrate the resolution, selectivity, and efficiency of the experimental chromatographic system. The authors used an Agilent 1100 liquid chromatography instrument (Agilent Technologies) and chromatographic columns: Kinetex C18, YMC-Triart C18, ACQUITY UPLC BEH C18, ACQUITY UPLC BEH C8, ACQUITY UPLC BEH Phenyl, and ACQUITY UPLC CSH C18 (experimental procedure) or Acclaim C18, Zorbax SB-C18, and XBridge BEH130 C18 (The International Pharmacopoeia procedure).

Results. In contrast to pharmacopoeial procedures, which evaluate only the component composition, the experimental procedure under the selected chromatography conditions can determine both the component composition and related substances of capreomycin. This advantage results from substituting a column packed with 1.7 μm particles for a 5 μm column required for pharmacopoeial procedures. The experimental procedure remains suitable for liquid chromatography instruments with a pressure limit of no more than 400 bar in the gradient elution mode with two mobile phases. According to the efficiency and selectivity evaluation, ACQUITY UPLC BEH C18 columns (150 $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm) provide optimal peak resolution for capreomycin isoforms and related substances after artificial degradation of capreomycin.

Conclusions. This experimental procedure based on ion-pair UHPLC may be used in the production and stability testing of capreomycin medicines to evaluate the API quality by the content of its main components and related substances.

Key words: ion-pair ultra-high-performance liquid chromatography; capreomycin; component composition; related substances; quality control

For citation: Yakupov I.Yu., Kuleshova S.I., Simonova E.P., Demidov A.S. Ion-pair chromatography for the determination of capreomycin sulfate components and related substances. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation.* 2023;13(2-1):271–282. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-451>

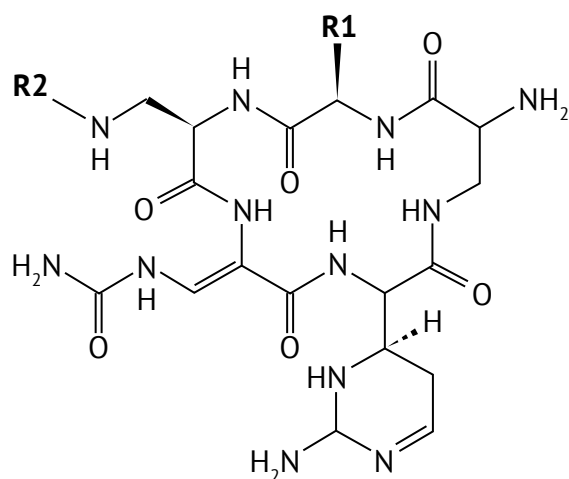
Введение

Хроматографические методы определения продуктов деструкции антибиотиков широко внедрены в практику оценки качества лекарственных средств. В настоящее время наиболее распространен метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Активно ведется разработка методик с применением ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии (УВЭЖХ), при использовании которых требуется более современное оборудование в связи с необходимостью поддержания высокого давления в системе из-за мелких частиц сорбента, но обеспечивается большая эффективность разделения.

Наиболее сложными соединениями для разработки методик определения родственных примесей являются природные многокомпонентные антибиотики, например капреомицин. Монографии на капреомицина сульфат представлены в Фармакопее США (USP)¹ и Международной фармакопее (IP)², однако ни в USP, ни в IP не предусмотрено нормирование содержания примесей. Основное требование предъявляют к сумме компонентов капреомицина, содержание которых рассчитывают методом нормализации по хроматограмме испытуемого раствора. В этой связи актуальна разработка аналитической методики, позволяющей проводить одновременное определение не только компонентов капреомицина, но и его родственных примесей.

Полипептидный антибиотик капреомицин, продуцируемый *Streptomyces capreolus*, выделен в 1960 г. [1]. Капреомицин представляет собой смесь четырех компонентов: IA, IB, IIA и IIB в соотношении ~25, 67, 3 и 6% соответственно³. Молекула капреомицина состоит из циклического пентапептида, содержащего два остатка 2,3-диаминопропионовой кислоты, один остаток уреидодегидроаланина, один остаток L-капреомицидина, один остаток серина (IA и IIA) или аланина (IB и IIB), а также остаток лизина в боковой цепи (IA и IB), которые проявляют сильные основные свойства и характеризуются высокой полярностью (рис. 1). Например, циклический гуанидин, расположенный на боковой цепи L-капреомицидина, является одним из самых сильных известных органических оснований ($pK_a \approx 14$) [2].

Лекарственные препараты капреомицина преимущественно используют для лечения туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью. Несмотря на высокие показатели эффективности, капреомицин считают препаратом второй линии⁴ из-за его серьезных нежелательных эффектов, таких как гепатотоксичность и нефротоксичность, потеря слуха и аллергическая реакция [3]. Согласно литературным данным, токсичность препаратов капреомицина в значительной степени зависит от содержащихся родственных примесей. При сравнении острой токсичности и фармакокинетических



Компонент <i>Component</i>	R1	R2
Капреомицин IA <i>Capreomycin IA</i>	OH	β -Lysyl
Капреомицин IB <i>Capreomycin IB</i>	H	β -Lysyl
Капреомицин IIA <i>Capreomycin IIA</i>	OH	H
Капреомицин IIB <i>Capreomycin IIB</i>	H	H

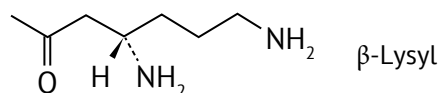


Рис. 1. Структура компонентов капреомицина

Fig. 1. Structure of capreomycin components

¹ Capreomycin sulfate. United States Pharmacopeia. USP43–NF38. Rockville, MD; 2020.

² Capreomycin sulfate. The International Pharmacopoeia. 11th ed. WHO; 2022.

³ The Merck Index. 14th ed. Merck Research Laboratories, USA; 2006.

⁴ Страчунский ЛС, Белоусов ЮБ, Козлов СН, ред. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии. НИИХА СГМА; 2000–2007.

профилей двух препаратов капреомицина с различным содержанием примесей показано, что лекарственное средство с меньшим количеством примесей проявляло гораздо меньшую токсичность [4].

Из-за сильных основных свойств и высокой полярности капреомицина определение примесей в содержащих его препаратах в значительной степени затруднено. Основными примесями капреомицина являются стерео- и цис-/транс-изомеры его изоформ [5], в молекулах других примесей капреомицина может наблюдаться изменение положения структурных элементов, замена аминокислотных остатков и добавление функциональных групп [6].

Вследствие особенности химической природы данного антибиотика хроматографическое разделение компонентов и примесей капреомицина является сложной задачей. S. Mallampati и соавт. [7] разработана методика на основе ион-парной высокоэффективной жидкостной хроматографии, в качестве ион-парного реагента использован натрия 1-гексансульфонат. В результате было получено хорошее разделение четырех активных компонентов капреомицина и обнаружено одиннадцать неизвестных примесей. Аналогичная методика приведена в монографии на капреомицин сульфат в Международной фармакопее.

Цель работы — разработка методики одновременного определения содержания основных компонентов капреомицина (IA, IB, IIA, IIB) и его родственных примесей с применением ион-парной ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии.

Материалы и методы

В качестве объекта исследований использовали субстанцию-порошок капреомицина сульфата (стандартизован по монографии USP⁵, степень чистоты более 96,0%). Поскольку препараты капреомицина не содержат вспомогательных веществ и представляют собой порошок или лиофилизат субстанции, то любой такой препарат может быть проанализирован по методике анализа субстанции. Испытания проводили на жидкостном хроматографе Agilent 1100 (Agilent Technologies). За основу при разработке методики были выбраны условия хроматографирования, приведенные в монографии на капреомицин сульфат в IP.

Выбранные условия проведения анализа существенно отличались от условий хроматографи-

рования IP. Хроматографические условия, приведенные в IP:

- буферный раствор pH 2,3, представляющий собой 54,4 г (0,4 моль) дигидрофосфата калия и 9,4 г (50 ммоль) гексансульфоната натрия, растворенные в 1500 мл воды очищенной. pH раствора доведен до значения 2,3 с помощью концентрированной фосфорной кислоты (85%, Sigma-Aldrich, кат. № 695017), объем раствора доведен до 2000 мл;
- подвижная фаза А (ПФ А): смесь ацетонитрила (99,9%, Thermo Fisher Scientific, кат. № 325730025) и буферного раствора pH 2,3 в соотношении 5:95 (об.:об.);
- подвижная фаза В (ПФ В): смесь ацетонитрила и буферного раствора pH 2,3 в соотношении 15:85 (об.:об.);
- хроматографическая колонка: C18, 250×4,6 мм, 5 мкм;
- скорость потока: 1 мл/мин;
- УФ-детектирование при длине волны 268 нм;
- объем вкола: 20 мкл (при концентрации испытуемого раствора 2 мг/мл, растворение в ПФ А).

Программа градиентного режима элюирования представлена в *таблице 1*. В методике IP не указаны стадии 2.1 и 3.1, но они были добавлены, поскольку программное обеспечение используемого хроматографа не позволяет менять состав подвижной фазы скачкообразно, а плавное его изменение позволяет избежать появления системных пиков, характерных для изменения состава подвижной фазы.

Для выбора хроматографической колонки применен изократический режим с использованием элюента, состоящего из смеси ПФ А и ПФ В (методика по IP), соотношение которых изменяли в зависимости от температуры термостатирования колонки. Интервал температур термостатирования колонок был выбран от 30 до 70 °С для ВЭЖХ колонок Zorbax SB-C18 (Agilent Technologies) и XBridge BEH130 C18 (Waters) и от 30 до 60 °С для колонки Acclaim C18 (Thermo Scientific). Подробные характеристики колонок приведены в *таблице 2*. При использовании ВЭЖХ колонок BEH C18, CSH C18, BEH C8, BEH Phenyl (Waters), YMC-Triart C18 (YMC Inc.) и Kinetex C18 (Phenomenex) устанавливали температуру термостатирования 70 °С. При этой температуре основными составами подвижной фазы являлись состав 1 (ПФ А : ПФ В 90:10) и состав 2 (ПФ А : ПФ В 80:20). При использовании ВЭЖХ колонок скорость потока составляла 1 мл/мин, ВЭЖХ колонок — 0,2 мл/мин. Объем

⁵ Capreomycin sulfate. United States Pharmacopeia. USP43–NF38. Rockville, MD; 2020.

Таблица 1. Программа градиентного режима элюирования методики Международной фармакопеи

Table 1. Gradient elution programme for the analytical procedure of The International Pharmacopoeia

Стадии <i>Stages</i>	Время, мин <i>Time, min</i>	Подвижная фаза А, % <i>Mobile phase A, %</i>	Подвижная фаза В, % <i>Mobile phase B, %</i>
1	0–25	55 → 52	45 → 48
2	25–40	52	48
2.1	40–41	52 → 30	48 → 70
3	41–60	30	70
3.1	60–61	30 → 55	70 → 45
4	61–70	55	45

Таблица 2. Основные характеристики использованных колонок

Table 2. Main characteristics of the columns used

Колонка <i>Column</i>	Привитая фаза <i>Ligand type</i>	Длина, мм <i>Length, mm</i>	Внутренний диаметр, мм <i>Inner diameter, mm</i>	Размер частиц, мкм <i>Particle size, µm</i>	Степень покрытия (доля углерода), % <i>Carbon load, %</i>	Площадь поверхности, м²/г <i>Surface area, m²/g</i>	Диаметр пор, Å <i>Pore size, Å</i>
Колонки ВЭЖХ <i>HPLC columns</i>							
Acclaim	C18	250	4,6	5	18	300	120
XBridge	C18	250	4,6	5	18	185	130
Zorbax SB	C18	250	4,6	5	10	180	80
Колонки УВЭЖХ <i>UHPLC columns</i>							
BEH	C18	150	2,1	1,7	17,7	185	130
Kinetex	C18	150	2,0	1,7	10	200	100
CSH	C18	100	2,1	1,7	15	185	130
YMC Triart	C18	150	2,0	1,9	20	360	120
BEH	C8	150	2,1	1,7	12,8	185	130
BEH	Phenyl	150	2,1	1,7	14,5	185	130

вкола при использовании ВЭЖХ колонок – 20 мкл (согласно методике IP), при использовании УВЭЖХ колонок – 5 мкл.

Для подтверждения эффективности разделительной способности экспериментальной хроматографической системы было проведено хроматографирование растворов капуреомидина сульфата после искусственной деструкции. Исходный раствор субстанции капуреомидина сульфата приготовлен при растворении 500 мг в 250 мл воды (раствор 1). Для проведения разложения в щелочной среде к 25 мл исходного раствора было добавлено 75 мкл 32% (50 мМ) раствора аммиака, полученные растворы выдерживали в течение 24 ч при температуре 60 °С (раствор 2) или 80 °С (раствор 3). Искусственное разложение в кислотной среде проводили

следующим образом: к 25 мл исходного раствора было добавлено 95 мкл раствора (50 мМ) трифторуксусной кислоты, затем полученные растворы выдерживали в течение 24 ч при температуре 60 °С (раствор 4) или 80 °С (раствор 5). Для проверки разрешающей способности был использован раствор, полученный при смешивании растворов 3 и 5 в пропорции 1:1 и дальнейшем 5-кратном разведении водой (раствор 6).

Для оценки влияния различных катионов дигидрофосфата (реактива, который используют в качестве основного компонента буферного раствора) были приготовлены подвижные фазы на основе дигидрофосфата калия, натрия и аммония. Концентрации исходных буферных растворов были одинаковы (200 мМ по катиону, при доведении pH до 2,3 ортофосфорной

кислотой). К растворам солей добавляли 1-гексансульфонат натрия в таком количестве, чтобы его конечная концентрация составляла 25 мМ, затем буферный раствор смешивали с ацетонитрилом в соотношении 94:6 (аналогично составу 1).

Характеристики пиков, используемые как показатели эффективности разделения, рассчитывали как среднее значение показателя для 5 вколов проб растворов капреомицина.

После анализа влияния различных факторов на эффективность разделения компонентов и примесей фармакопейный метод анализа компонентов капреомицина был модифицирован и доработан.

Экспериментальные условия хроматографирования:

- буферный раствор pH 2,3, представляющий собой 48 г (0,4 моль) дигидрофосфата натрия и 9,4 г (50 ммоль) гексансульфоната натрия, растворенные в 1500 мл воды очищенной. pH раствора доведен до значения 2,3 с помощью концентрированной фосфорной кислоты (85%, Sigma-Aldrich), и объем доведен до 2000 мл;
- подвижная фаза А: смесь 5 объемов ацетонитрила (99,9%, Thermo Fisher Scientific) и 95 объемов буферного раствора pH 2,3;
- подвижная фаза В: смесь 10 объемов ацетонитрила (99,9%, Thermo Fisher Scientific) и 90 объемов буферного раствора pH 2,3;
- хроматографическая колонка: C18, 150×2,1 мм, 1,7 мкм (BEH C18, Waters);
- температура колонки: 70 °С, нагрев колонки при потоке элюента (~0,1–0,125 мл/мин);
- скорость потока: 0,2 мл/мин;
- УФ-детектирование при длине волны 268 нм;
- объем вкола: 5 мкл (при концентрации испытуемого раствора 0,4 мг/мл, растворение в подвижной фазе А);
- давление системы: ~300 бар.

Таблица 3. Программа градиентного режима элюирования разработанной методики

Table 3. Gradient elution programme for the experimental analytical procedure

Время, мин Time, min	Подвижная фаза А, % Mobile phase A, %	Подвижная фаза В, % Mobile phase B, %
0–80	100 → 20	0 → 80
80–81	20 → 0	80 → 100
81–95	0	100

Программа градиентного режима элюирования представлена в *таблице 3*.

Результаты и обсуждение

Препараты капреомицина представляют собой лиофилизат или порошок субстанции капреомицина сульфата без добавления вспомогательных веществ. Все пики, идентифицированные на хроматограммах, кроме пиков четырех компонентов капреомицина и системных пиков, можно считать пиками примесей.

Для проверки возможности определения примесей, являющихся продуктами разложения капреомицина, по фармакопейной методике хроматографировали растворы 1 и 6. Типичные хроматограммы данных растворов приведены на *рисунке 2* (опубликован на сайте журнала⁶).

По данным хроматограмм, полученным по методике ИР, были рассчитаны основные характеристики (количество теоретических тарелок, фактор асимметрии и разрешение) пиков капреомицина и пиков примесей. В *таблице 4* приведены усредненные результаты хроматографирования растворов 1 и 6.

При увеличении температуры термостатирования колонки на хроматограммах раствора 3 наблюдается разделение пика компонента капреомицина IB и пика неизвестной примеси, обозначенной A1. Площадь пика данной примеси сопоставима с площадью пика компонента IB. На *рисунке 3* (опубликован на сайте журнала⁷) приведена типичная хроматограмма, полученная на колонке, соответствующей требованиям ИР (XBridge BEH C18), при увеличении температуры термостатирования колонки до 70 °С. Характеристики пиков, полученные в данных условиях, приведены в *таблице 5*.

Одинаковые спектры поглощения элюата, полученного при временах удерживания максимумов пиков (*рис. 4*, опубликован на сайте журнала⁸), указывают на одинаковую основную хроматофорную группу у компонентов капреомицина IA и IB и примесей A1 и A2, а длина волны детектора 268 нм соответствует максимуму поглощения для этих пиков.

Увеличение температуры термостатирования колонки до 70 °С приводит к значительному уменьшению давления в хроматографической системе, что позволяет осуществить переход с колонок ВЭЖХ на колонки УВЭЖХ на прибор с ограничением давления не более 400 бар.

⁶ <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-13-451-fig2>

⁷ <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-13-451-fig3>

⁸ <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-13-451-fig4>

Таблица 4. Характеристики пиков компонентов капреомицина и разрешение с ближайшими пиками по методике IP**Table 4.** Characteristics of major capreomycin peaks and their resolution with the nearest peaks obtained according to The International Pharmacopoeia

Время удерживания, мин <i>Retention time, min</i>	Относительное время удерживания <i>Relative retention time, min</i>	Название пика <i>Peak name</i>	Число теоретических тарелок <i>Number of theoretical plates</i>	Фактор асимметрии <i>Tailing factor</i>	Разрешение с ближайшими пиками (до/после) <i>Resolution between the closest peaks (preceding/ following)</i>
Исходный раствор субстанции капреомицина сульфата <i>Stock solution of capreomycin sulfate</i>					
25,8	0,59	IIA	15176±245	1,0	2,4/2,3
30,4	0,70	IIB	15762±318	1,0	1,1/4,1
43,5	1,00	IB	14851±301	1,1	1,7/3,4
48,6	1,12	IIA	15588±212	1,1	3,4/1,9
Раствор субстанции капреомицина сульфата после щелочного гидролиза <i>Capreomycin sulfate solution after alkaline hydrolysis</i>					
28,4	0,60	IIA	15512±255	1,0	1,4/1,4
35,0	0,74	IIB	20766±332	0,9	1,2/1,7
47,4	1,00	IA	15583±285	1,0	1,9/1,6
51,7	1,09	IB	28480±365	1,1	1,5/1,6

Таблица 5. Характеристики пиков компонентов капреомицина и разрешение с ближайшими пиками на хроматограмме, полученной при использовании колонки XBridge BEH C18, при составе 1 подвижной фазы (буферный раствор pH 2,3 и ацетонитрил в соотношении 94:6) и температуре термостатирования колонки 70 °С**Table 5.** Characteristics of major capreomycin peaks and their resolution with the nearest peaks obtained on an XBridge BEH C18 column with mobile phase 1 (pH 2.3 phosphate buffer and acetonitrile (94:6)) at an oven temperature of 70 °C

Время удерживания, мин <i>Retention time, min</i>	Относительное время удерживания <i>Relative retention time, min</i>	Название пика <i>Peak name</i>	Число теоретических тарелок <i>Number of theoretical plates</i>	Фактор асимметрии <i>Tailing factor</i>	Разрешение с ближайшими пиками (до/после) <i>Resolution between the closest peaks (preceding/ following)</i>
Раствор субстанции капреомицина сульфата после щелочного гидролиза <i>Capreomycin sulfate solution after alkaline hydrolysis</i>					
44,2	0,60	IA	15892	1,17	3,0/4,2
50,9	0,74	IB	15261	1,16	1,0/1,5
53,4	1,00	A1	15539	1,07	1,5/2,5
93,6	1,09	A2	16230	1,12	11,9/н.о.*

* пик отсутствует.

* no peak detected.

Данный переход позволил увеличить эффективность при уменьшении расхода подвижной фазы. Температура хроматографической колонки была установлена на 70 °С, нагревание колонок до указанной температуры проводили при скорости потока элюента (~0,1–0,125 мл/мин), что позволяло не превышать предельное давление в системе. В дальнейшем при анализе скорость потока увеличили до 0,2 мл/мин.

Работа при температуре 70 °С существенно ограничила перечень хроматографических колонок, которые можно использовать при анализе. Тем не менее для подбора оптимальной хроматогра-

фической колонки с наилучшей селективностью было выбрано несколько колонок, в том числе колонки с привитой фазой, отличной от C18 (октилсилильной (BEH C8) и фенилсилильной (BEH Phenyl)). Рассчитанное относительное содержание компонентов капреомицина по отношению к сумме компонентов без учета примесей, время удерживания пиков капреомицина IB и близлежащей к нему примеси, обозначенной как A1, и разрешение между ними приведены в таблице 6. Компонентный состав рассчитан как отношение площадей пиков четырех компонентов капреомицина.

При хроматографировании раствора 6 по экспериментальной методике с использованием подвижной фазы (состав 1; 6% ацетонитрила) в качестве основного показателя эффективности колонки была выбрана оценка разрешения пиков капреомицина IB и примеси A1 (обозначение примеси произвольное, выбранное авторами). В случае, когда время удерживания пика примеси A1 превышало 80 мин, дополнительно проводили анализ с увеличением содержания ацетонитрила в подвижной фазе (состав 2; 7% ацетонитрила). Это позволило уменьшить время удерживания компонента IB и примеси A1 почти в 2 раза. Исходя из полученных результатов, наиболее эффективной оказалась колонка ВЕН C18 (150×2,1 мм, 1,7 мкм). Интересно отметить, что примесь A1, вероятно, является производным компонента IB, о чем свидетельствует

относительное содержание этого компонента капреомицина. При использовании колонки ВЕН C18 (150×2,1 мм, 1,7 мкм) оно составило 47,5%, при использовании колонки ВЕН C8 (150×2,1 мм, 1,7 мкм) – 60,6%, в последнем случае пик примеси A1 на хроматограмме не обнаружен.

Следующий этап работы был подбор оптимального состава элюента, в частности выбор катиона дигидрофосфата, составляющего основу буферного раствора в составе гидрофильного компонента подвижной фазы. Все три подвижные фазы имели одинаковые молярные концентрации по катиону дигидрофосфата, значение pH, содержание 1-гексансульфоната натрия и долю ацетонитрила. Хроматограммы раствора 6, полученные на колонке ВЕН C18 (150×2,1 мм, 1,7 мкм), представлены на рисунке 5

Таблица 6. Сравнение эффективности колонок при определении компонентного состава капреомицина

Table 6. Comparative performance of columns in determining the component composition of capreomycin

Колонка <i>Column</i>	Привитая фаза <i>Ligand type</i>	Относительный компонентный состав, % <i>Relative component composition, %</i>				Разделение пиков IB и A1 <i>IB and A1 peak resolution</i>			Число теоретических тарелок пика IB <i>Number of theoretical plates for the IB peak</i>
						Время удерживания мин <i>Retention time, min</i>		Разрешение <i>Peak resolution</i>	
		IIA	IIB	IA	IB	IB	A1		
Колонки ВЭЖХ <i>HPLC columns</i>									
Методика по Международной фармакопее <i>The International Pharmacopoeia procedure</i>									
Acclaim	C18	1,3±0,1	1,5±0,1	35,6±1,1	61,6±1,3	51,71±0,2	–	0	14843±125
Xbridge	C18	1,2±0,1	1,4±0,1	34,9±0,9	62,5±1,3	53,24±0,2	–	0	15321±101
Zorbax SB	C18	1,4±0,1	1,6±0,1	35,8±1,3	61,2±1,4	52,18±0,2	–	0	15110±96
Изократический режим при увеличении температуры <i>Isocratic mode with increasing temperature</i>									
Acclaim	C18	1,3±0,1	1,5±0,1	35,6±1,1	61,6±1,3	52,4±0,2	54,1±0,2	1,20±0,07	25534±225
Xbridge	C18	1,2±0,1	1,4±0,1	34,9±0,9	62,5±1,3	50,9±0,2	53,4±0,2	1,50± 0,06	29534±116
Zorbax SB	C18	1,4±0,1	1,6±0,1	35,8±1,3	61,2±1,4	49,3±0,2	51,3±0,2	1,43± 0,04	27534±102
Колонки УВЭЖХ <i>UHPLC columns</i>									
BEH	C18	1,6±0,1	0,7±0,1	50,2±1,2	47,5±1,3	85,7±0,2	91,3±0,2	2,07±0,07	17028±296
Kinetex	C18	1,6±0,1	0,9±0,1	51,5±1,3	46±1,5	75±0,1	79,5±0,1	1,43±0,02	10345±76
CSH	C18	1,5±0,1	1,6±0,1	45,4±1,9	51,4±1,6	40,7±0,1	43,2±0,1	1,12±0,01	13800±68
YMC Triart	C18	1,9±0,1	1,8±0,1	52,2±1,8	44±1,2	73,1±0,2	74,8±0,2	0,7±0,02	15528±241
BEH 7%	C18	1,7±0,1	1,6±0,1	49,9±1,3	46,3±0,6	45,5±0,1	49,2±0,1	1,66±0,03	18377±210
BEH	C8	0,9±0,1	0,6±0,1	37,8±1,6	60,6±1,2	53,4±0,1	–	0	14943±192
BEH	Phenyl	1,7±0,1	1±0,1	50,3±0,5	47±1,9	20,9±0,1	21,9±0,2	1,46±0,03	17124±214

«–» – пик отсутствует.

–, no peak detected.

(опубликован на сайте журнала⁹). Для подвижных фаз с использованием дигидрофосфата калия и дигидрофосфата натрия были получены схожие профили хроматограмм (рис. 5а, б, опубликован на сайте журнала¹⁰). В случае применения дигидрофосфата натрия обнаружено незначительное увеличение времени удерживания при увеличении эффективности разделения основных пиков. При применении дигидрофосфата аммония (рис. 5с, опубликован на сайте журнала¹¹) обнаружено значительное изменение профиля хроматограммы с изменением порядка выхода пиков, меньшая разрешающая способность для основных пиков и меньшее общее количество детектируемых минорных пиков, а также увеличение времени удерживания всех пиков. После анализа полученных данных было принято решение использовать в составе подвижной фазы дигидрофосфат натрия.

Для увеличения эффективности и сокращения времени проведения анализа был произведен переход от изократического к градиентному режиму. Согласно программе градиента содержание ацетонитрила в подвижной фазе увеличивалось с 5% в начальных условиях с клиренсом содержания ацетонитрила 0,05%/мин. В таком режиме наибольшее время выхода всех пиков, ассоциированных с капреомицином, составляло около 80 мин (при достижении содержания ацетонитрила 9%). Были получены хроматограммы исходного раствора капреомицина (раствор 1) и растворов 2–5. На их основе проведен качественный и количественный анализ обнаруживаемых продуктов деструкции капреомицина (рис. 6, опубликован на сайте журнала¹²). В зависимости от выявленного содержания были выделены две группы примесей: более 1,0% (А1–А14) и 0,1–1% (В1–В24). Максимальное число пиков

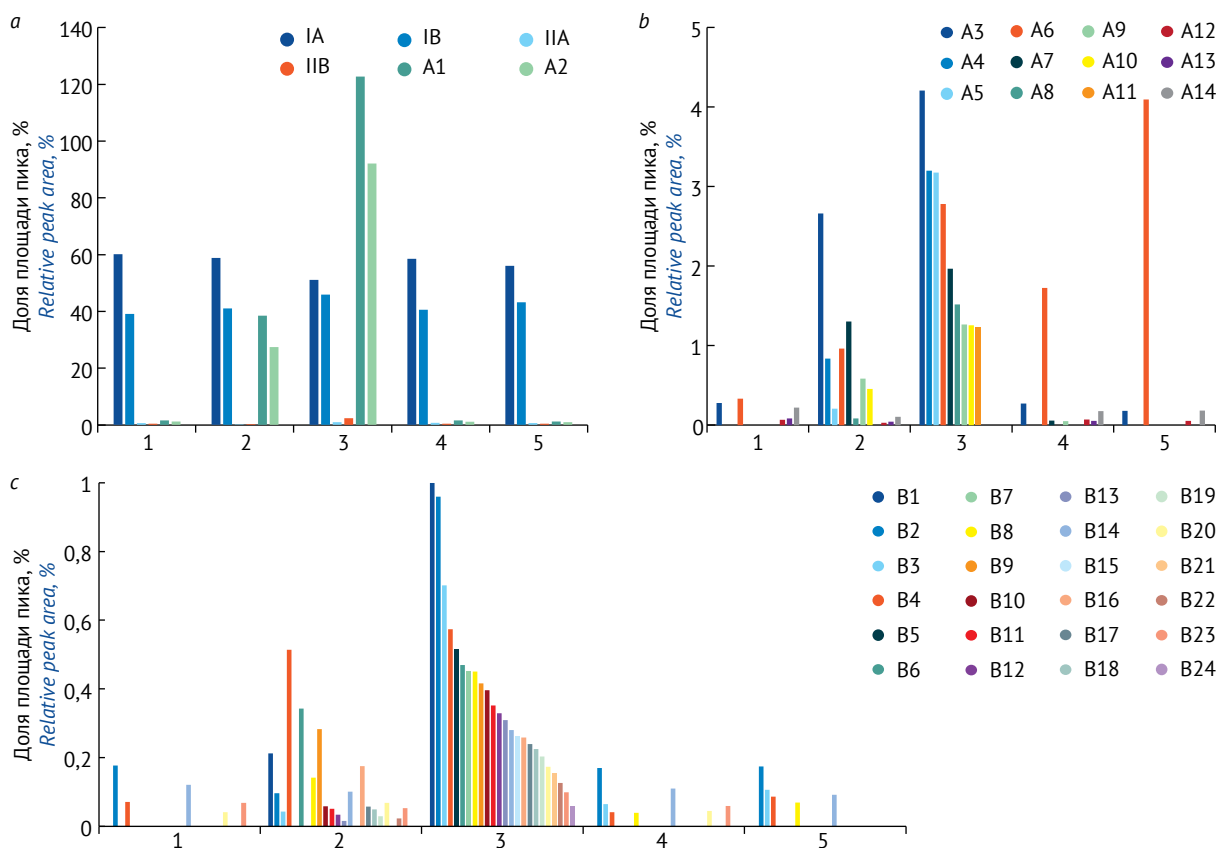


Рис. 7. Относительное содержание основных компонентов капреомицина и примесей А1 и А2 (а), примесей А3–А14 (б) и минорных примесей (с) в растворах в пересчете на сумму компонентов IA, IB, IIA, IIB (1 – исходный раствор, 2 – щелочной гидролиз при 60 °С, 3 – щелочной гидролиз при 80 °С, 4 – кислотный гидролиз при 60 °С, 5 – кислотный гидролиз при 80 °С).

Fig. 7. Relative content of the main components and impurities A1 and A2 (a), impurities A3–A14 (b), and minor impurities (c) in capreomycin solutions expressed as the sum of components IA, IB, IIA, and IIB (1 – stock solution; 2, solution after alkaline hydrolysis at 60 °C; 3, solution after alkaline hydrolysis at 80 °C; 4, solution after acid hydrolysis at 60 °C; 5, solution after acid hydrolysis at 80 °C).

⁹ <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-13-451-fig5>

¹⁰ Там же.

¹¹ Там же.

¹² <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-13-451-fig6>

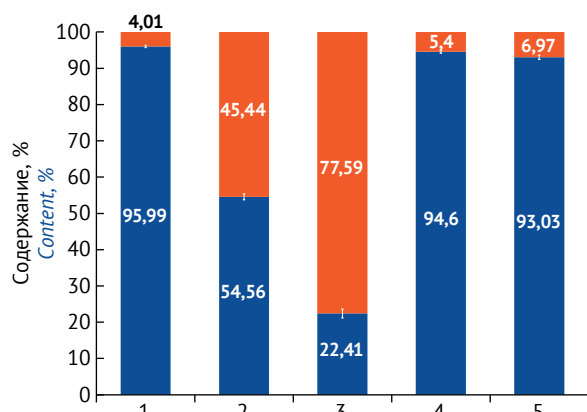


Рис. 8. Относительное суммарное содержание компонентов капреомицина (синий цвет) и примесей (оранжевый цвет), образовавшихся в ходе гидролиза субстанции (1 – исходный раствор, 2 – щелочной гидролиз при 60 °С, 3 – щелочной гидролиз при 80 °С, 4 – кислотный гидролиз при 60 °С, 5 – кислотный гидролиз при 80 °С)

Fig. 8. Relative total content of capreomycin components (red) and impurities (orange) formed during artificial degradation of the active pharmaceutical ingredient (1, stock solution; 2, solution after alkaline hydrolysis at 60 °C; 3, solution after alkaline hydrolysis at 80 °C; 4, solution after acid hydrolysis at 60 °C; 5, solution after acid hydrolysis at 80 °C)

примесей А (11) и примесей В (24) обнаружено на хроматограмме раствора 3 (щелочной гидролиз, 80 °С, рис. 6с, опубликован на сайте журнала¹³), что характерно для пептидных соединений, которые легко разрушаются в щелочной среде. При кислотном гидролизе количество

образующихся примесей значительно меньше, при этом пики продуктов разложения, характерные только для кислотного гидролиза, не обнаружены. Относительное содержание основных компонентов и примесей представлено на рисунке 7.

Примеси А1 и А2 являются основными продуктами щелочного гидролиза капреомицина (рис. 6с, опубликован на сайте журнала¹⁴). В водном растворе аммиака капреомицин при 60 °С разлагается с образованием примесей А1 и А2 в количестве, сравнимом с содержанием основных компонентов капреомицина IА и IВ, при 80 °С содержание примесей А1 и А2 превосходит суммарное содержание основных компонентов капреомицина. Содержание каждой из примесей А1 и А2 в исходном растворе больше, чем содержание минорных компонентов капреомицина IIA и IIB. На хроматограмме раствора 1 наблюдались несколько пиков (А12, А13 и А14), площади которых уменьшаются при разложении независимо от способа деструкции. Возможно, эти пики обусловлены неидентифицированными компонентами капреомицина. Учитывая, что капреомицин образуется путем биосинтеза, такое предположение может быть правомерным. Сравнение суммарного содержания компонентов капреомицина относительно содержания примесей в растворах 1–5 дает возможность оценить степень разложения капреомицина (рис. 8).

Таблица 7. Характеристики пиков компонентов капреомицина и разрешение с ближайшими пиками по экспериментальной методике

Table 7. Characteristics of major capreomycin peaks and their resolution with the nearest peaks obtained according to the experimental analytical procedure

Время удерживания, мин <i>Retention time, min</i>	Относительное время удерживания <i>Relative retention time, min</i>	Название пика <i>Peak name</i>	Число теоретических тарелок <i>Number of theoretical plates</i>	Фактор асимметрии <i>Tailing factor</i>	Разрешение с ближайшими пиками (до/после) <i>Resolution between the closest peaks (preceding/ following)</i>
Исходный раствор <i>Stock solution</i>					
31,5	0,60	IIA	62682	1	7,9/7,8
35,7	0,68	IIB	61041	1,2	7,8/20,4
52,1	1,00	IA	67421	1,4	1,9/4,6
55,7	1,07	IB	88986	1,4	4,6/2,2
Раствор после щелочного гидролиза (раствор 3) <i>Solution after alkaline hydrolysis (solution 3)</i>					
31,3	0,60	IIA	60957	1,7	0,8/2,7
35,8	0,69	IIB	26288	0,8	2,5/1,1
52,2	1,00	IA	105558	1,1	1,7/2,6
55,6	1,06	IB	94651	1,1	0,7/1,9

¹³ <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-13-451-fig6>

¹⁴ Там же.

На основе полученных в ходе градиентного элюирования хроматограмм рассчитаны характеристики пиков компонентов капреомицина и продуктов деградации: количество теоретических тарелок, фактор асимметрии, разрешение между близлежащими пиками. В *таблице 7* приведены результаты, рассчитанные по хроматограмме раствора 1 и раствора 3. Показатель эффективности свидетельствует о достаточно высокой емкости выбранной для анализа колонки. Факторы асимметрии 0,8–1,4 основных пиков и разрешение между соседними пиками позволяют адекватно рассчитывать их площади на хроматограммах, получаемых в предлагаемых условиях хроматографирования, как для растворов препарата, так и для растворов после искусственного разложения.

Заключение

Разработанная методика на основе ион-парной ультраэффективной хроматографии по эффек-

тивности не уступает методике Международной фармакопеи и позволяет обнаружить больше примесей капреомицина, чем фармакопейная методика. Пики основных компонентов капреомицина четко разделены, что позволяет адекватно рассчитывать сумму компонентов. При этом на хроматограммах было зафиксировано большее количество пиков неизвестных соединений, чем на хроматограммах, полученных по фармакопейной методике, что позволяет более качественно оценивать препараты капреомицина по содержанию примесей.

Разработанная методика позволяет одновременно оценивать субстанции капреомицина по содержанию как основных компонентов, так и примесных соединений. Методика может быть использована для стандартизации конечного продукта, изучения фармацевтических свойств и стабильности лекарственных средств капреомицина.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Shiba T, Nomoto S, Wakamiya T. The chemical structure of capreomycin. *Experientia*. 1976;32(9):1109–11. <https://doi.org/10.1007/BF01927571>
2. Gobbi A, Frenking G. Y-conjugated compounds: the equilibrium geometries and electronic structures of guanidine, guanidinium cation, urea, and 1,1-diaminoethylene. *J Am Chem Soc*. 1993;115(6):2362–72. <https://doi.org/10.1021/ja00059a035>
3. Browning RH, Donnerberg RL. Capreomycin – experiences in patient acceptance and toxicity. *Ann NY Acad Sci*. 1966;135(2):1057–64. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1966.tb45546.x>
4. Lee SH, Shin J, Choi JM, Lee EY, Kim DH, Suh JW, Chang JH. The impurities of capreomycin make a difference in the safety and pharmacokinetic profiles. *Int J Antimicrob Agents*. 2003;22(1):81–3. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(03\)00124-9](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(03)00124-9)
5. Liu G, Luan B, Liang G, Xing L, Huang L, Wang C, Xu Y. Isolation and identification of four major impurities in capreomycin sulfate. *J Chromatogr A*. 2018;1571:155–64. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.08.015>
6. Chopra S, Pendela M, Hoogmartens J, Van Schepdael A, Adams E. Impurity profiling of capreomycin using dual liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Talanta*. 2012;100:113–22. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.07.090>
7. Mallampati S, Huang S, Ashenafi D, Van Hemelrijck E, Hoogmartens J, Adams E. Development and validation of a liquid chromatographic method for the analysis of capreomycin sulfate and its related substances. *J Chromatogr A*. 2009;1216(12):2449–55. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.01.031>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: И.Ю. Якупов — идея, разработка условий проведения испытаний, проведение испытаний по экспериментальной методике и интерпретация полученных результатов, анализ и подбор литературы, написание текста рукописи, графическое оформление; С.И. Кулешова — идея, общая концепция исследования, написание текста рукописи, анализ результатов; Е.П. Симонова — консультации при подборе хроматографических колонок, анализ и интерпретация полученных результатов; А.С. Демидов — проведение испытаний по фармакопейной методике и интерпретация полученных результатов.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. Ilya Yu. Yakupov elaborated the study idea and testing conditions, conducted tests according to the experimental analytical procedure and interpreted the results, analysed and selected literature, and prepared the graphical material. Svetlana I. Kuleshova elaborated the study idea and general concept, drafted the manuscript, and analysed the results. Elena P. Simonova advised the team on column selection, analysed and interpreted the results obtained. Alexander S. Demidov conducted tests according to the pharmacopoeial analytical procedure and interpreted the results obtained.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00052-23-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121021800098-4).

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

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of publicly funded research project No. 056-00052-23-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121021800098-4).

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

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Якупов Илья Юрьевич

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3068-0396>
yakupoviy@expmed.ru

Кулешова Светлана Ивановна, канд. биол. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9103-9239>
Kuleshova@expmed.ru

Симонова Елена Павловна

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2221-5534>
simonovae@expmed.ru

Демидов Александр Сергеевич

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7061-2123>
demidovas@expmed.ru

Ilya Yu. Yakupov

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3068-0396>
yakupoviy@expmed.ru

Svetlana I. Kuleshova, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9103-9239>
Kuleshova@expmed.ru

Elena P. Simonova

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2221-5534>
simonovae@expmed.ru

Alexander S. Demidov

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7061-2123>
demidovas@expmed.ru

Поступила 28.04.2022

После доработки 27.01.2023

Принята к публикации 07.03.2023

Online first 16.05.2023

Received 28 April 2022

Revised 27 January 2023

Accepted 7 March 2023

Online first 16 May 2023



С.В. Моисеев 
Н.Е. Кузьмина 
Е.Ю. Северинова 
Е.П. Симонова 
В.В. Косенко 

Идентификация и количественное определение компонентного состава фармацевтической субстанции «Гентамицина сульфат» методами ^1H и ^{13}C ЯМР-спектроскопии

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

✉ Моисеев Сергей Владимирович; MoiseevSV@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

Гентамицина сульфат — бактерицидный антибиотик широкого спектра действия из группы аминогликозидов, продуцируемый *Micromonospora purpurea*. В медицинской практике используется фармацевтическая субстанция «Гентамицина сульфат», представляющая собой смесь гентамицинов групп C_1 и C_2 , содержание которых нормировано и контролируется при проведении фармацевтической экспертизы. В настоящее время при контроле качества субстанции гентамицина сульфата для идентификации и количественного определения компонентного состава применяется метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), в котором идентификацию осуществляют косвенно, путем сравнения со стандартным образцом; количественное определение проводят путем калибровки с использованием стандартного образца.

Цель работы: разработать методику идентификации и количественного определения компонентов фармацевтической субстанции «Гентамицина сульфат» методами ЯМР-спектроскопии без использования стандартных образцов.

Материалы и методы: в качестве объекта исследования использовали образец фармацевтической субстанции «Гентамицина сульфат». Регистрацию спектров проводили на ЯМР-спектрометре Agilent DD2 NMR System 600. Хроматограммы получены на жидкостном хроматографе Agilent 1200 MWD.

Результаты: определены спектральные характеристики сульфатов гентамицинов C_1 , C_{1A} , C_2 , C_{2A} , C_{2B} , входящих в состав фармацевтической субстанции «Гентамицина сульфат». Для каждого из сульфатов гентамицинов выделены однотипные характеристические сигналы, не перекрывающиеся с другими сигналами в спектре ^1H или ^{13}C . Данные сигналы являются спектральными маркерами наличия анализируемых гентамицинов в образце, а их нормализованные интегральные интенсивности равны мольной доле каждого из гентамицинов. Проведено сравнение результатов количественного определения компонентного состава субстанции «Гентамицина сульфат», полученных методами ЯМР-спектроскопии и высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Выводы: разработана методика идентификации и количественного определения компонентов фармацевтической субстанции «Гентамицина сульфат» методами ^1H и ^{13}C ЯМР-спектроскопии. Показано, что разработанная методика менее трудозатратна, чем методика с применением ВЭЖХ, и не требует использования стандартных образцов как для подтверждения подлинности, так и при количественных измерениях.

Ключевые слова: гентамицина сульфат; ЯМР-спектроскопия; нормализованная интегральная интенсивность; мольная доля; фармакопея; подлинность; контроль качества

Для цитирования: Моисеев С.В., Кузьмина Н.Е., Северинова Е.Ю., Симонова Е.П., Косенко В.В. Идентификация и количественное определение компонентного состава фармацевтической субстанции «Гентамицина сульфат» методами ^1H и ^{13}C ЯМР-спектроскопии. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2023;13(2-1):283–291. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-13-2-1-283-291>

S.V. Moiseev 
N.E. Kuz'mina 
E.Yu. Severinova 
E.P. Simonova 
V.V. Kosenko 

Identification and Quantification of the Component Composition of the Active Substance Gentamicin Sulfate by ^1H and ^{13}C NMR Spectroscopy

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

✉ **Sergey V. Moiseev;** MoiseevSV@expmed.ru

ABSTRACT

Gentamicin sulfate is a broad-spectrum bactericidal aminoglycoside antibiotic produced by *Micromonospora purpurea* and used in clinical practice as an active substance containing a mixture of gentamicins C_1 and C_2 . Gentamicin content is a standardised parameter controlled as part of a pharmaceutical product review. Currently, the quality control of the active substance gentamicin sulfate involves the use of high-performance liquid chromatography (HPLC) for the indirect identification of the component composition by comparison with a reference standard and for its quantification by calibration against the reference standard.

The aim of the study was to develop a procedure for identifying and quantifying the components of the active substance gentamicin sulfate using nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy that would not require reference standards.

Materials and methods. The authors studied a sample of the active substance gentamicin sulfate using an Agilent DD2 NMR spectrometer operating at 600 MHz to record NMR spectra and an Agilent 1200 HPLC system equipped with a multiple wavelength detector (MWD) to obtain chromatograms.

Results. Having determined the spectral properties of the C_1 , C_{1A} , C_2 , C_{2A} and C_{2B} gentamicins comprising the active substance, the authors observed characteristic signals of the same type that corresponded to each of the gentamicins and did not overlap with other signals in the ^1H and ^{13}C spectra. These characteristic signals provided spectral markers indicative of the gentamicins of interest in the sample, with normalised integrated intensities equal to the mole fractions of the analytes. The authors compared NMR and HPLC measurements of the active substance composition.

Conclusions. The authors developed a procedure for identifying and quantifying the constituents of the active substance gentamicin sulfate by ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy, which requires less effort than HPLC procedures and no reference standards for the intended applications.

Key words: gentamicin sulfate; NMR spectroscopy; normalised integrated intensity; mole fraction; pharmacopoeia; identification; quality control

For citation: Moiseev S.V., Kuz'mina N.E., Severinova E.Yu., Simonova E.P., Kosenko V.V. Identification and quantification of the component composition of the active substance gentamicin sulfate by ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2023;13(2-1):283–291. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-13-2-1-283-291>

Введение

Гентамицина сульфат — бактерицидный антибиотик широкого спектра действия из группы аминогликозидов, продуцируемый *Micromonospora*

purpurea. Он подавляет бактериальный синтез белка, высокоактивен по отношению к аэробным грамотрицательным бактериям и применяется для лечения различных инфекционно-

воспалительных заболеваний, таких как холецистит, пневмония, фурункулез, конъюнктивит и др. [1–3].

В медицинской практике используется фармацевтическая субстанция «Гентамицина сульфат», представляющая собой смесь гентамицинов групп C_1 и C_2 (рис. 1), содержание которых строго нормировано и контролируется при проведении фармацевтической экспертизы. В отечественной и Европейской фармакопеях установлены следующие нормы содержания гентамицинов¹: для гентамицина C_1 от 25,0 до 45,0%, для гентамицина C_{1A} от 10,0 до 30,0% и для суммы гентамицинов C_2 , C_{2A} и C_{2B} от 35,0 до 55,0%. Фармакопея США² устанавливает несколько иные нормы: для гентамицина C_{1A} — от 10,0 до 35,0%, для суммы гентамицинов C_2 и C_{2A} — от 25,0 до 55,0%, а для суммы гентамицинов C_1 и C_{2B} — от 25,0 до 50,0%.

В настоящее время при контроле качества субстанции гентамицина сульфата для идентификации и количественного определения компонентного состава применяется метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ)³, с помощью которого идентификацию осуществляют косвенно, путем сравнения времен выхода компонентов субстанции на хроматограмме со временами выхода соответствующих стандартных образцов (СО); количественное определение проводят путем калибровки с использованием СО компонентов субстанции.

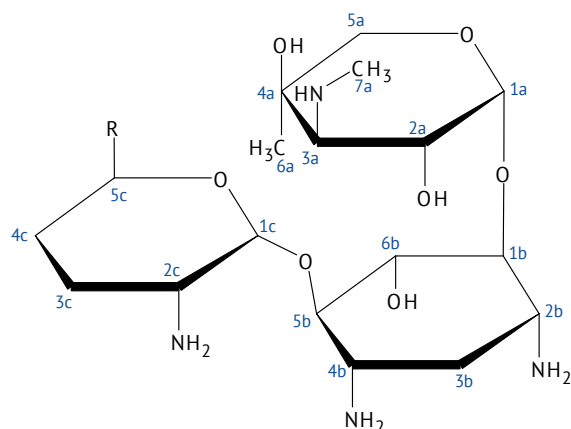
Использование метода ЯМР-спектроскопии позволяет подтверждать наличие и количественное

содержание каждого вида гентамицина, входящего в состав субстанции, напрямую, без установления градуировочной функции с использованием СО. При этом заметно снижается неопределенность результата измерения, так как из суммарной неопределенности исключаются неопределенность измерения навесок образца и объемов растворителя при приготовлении испытуемых и стандартных растворов.

Цель работы — разработка методики идентификации и количественного определения компонентов фармацевтической субстанции «Гентамицина сульфат» методами ЯМР-спектроскопии без использования стандартных образцов.

Материалы и методы

В качестве объекта исследования использовали образец фармацевтической субстанции «Гентамицина сульфат» («Янтай Джуставаре Фармасьютикал Ко., Лтд», Китай). Регистрацию спектров раствора 12,5 мг гентамицина сульфата в 0,5 мл оксида дейтерия (D_2O , Cambridge Isotope Laboratories, США) проводили на ЯМР-спектрометре Agilent DD2 NMR System 600 с 5-мм мультядерным датчиком, оснащенным градиентной катушкой, используя программное обеспечение VNMRJ, версия 4.2. Параметры 1D-экспериментов: температура — 27 °С, ширина спектра — 5733,9 Гц (1H) и 37878,8 Гц (^{13}C), угол поворота намагниченности — 45°, время релаксации — 5 с (1H) и 1 с (^{13}C), количество накоплений спада свободной индукции — 8 (1H)



$R=CH(CH_3)NHCH_3$ — гентамицин C_1 / *gentamicin* C_1

$R=CH_2NH_2$ — гентамицин C_{1A} / *gentamicin* C_{1A}

$R=(R)-CH(CH_3)NH_2$ — гентамицин C_2 / *gentamicin* C_2

$R=(S)-CH(CH_3)NH_2$ — гентамицин C_{2A} / *gentamicin* C_{2A}

$R=CH_2NHCH_3$ — гентамицин C_{2B} / *gentamicin* C_{2B}

Рис. 1. Структурная формула компонентов фармацевтической субстанции «Гентамицина сульфат»

Fig. 1. Structural formula of gentamicin sulfate active substance components

- 1 Monograph 07/2012:0331 Gentamicin sulfate. European Pharmacopoeia. 11th ed. Strasbourg: EDQM; 2022. ФС.2.1.0082.18 Гентамицина сульфат. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. III. М.; 2018.
- 2 Monograph Gentamicin sulfate. United States Pharmacopoeia. USP43–NF38 Rockville, MD: USP; 2020.
- 3 ФС.2.1.0082.18 Гентамицина сульфат. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. III. М.; 2018. Monograph 07/2012:0331 Gentamicin sulfate. European Pharmacopoeia. 11th ed. Strasbourg: EDQM; 2022. Monograph Gentamicin sulfate. United States Pharmacopoeia. USP43–NF38 Rockville, MD: USP; 2020.

и 16000 (^{13}C), число точек аналого-цифрового преобразования — 64к, экспоненциальное умножение — 0,3 Гц (^1H) и 2 Гц (^{13}C), дополнение нулями 64К, автоматическая коррекция базовой линии спектра, ручная настройка фазы, калибровка шкалы химических сдвигов (δ) под сигнал триметилсилильной группы внутреннего стандарта — тетрадеутерированного 3-(триметилсилил)-пропионата натрия (Cambridge Isotope Laboratories, США), $\delta=0,00$ м.д. (^1H , ^{13}C). Цифровое разрешение на ядре ^1H 0,09 Гц, соотношение S/N 300 (^1H) и 20 (^{13}C) для минорного компонента $\text{C}_{2\text{B}}$. При определении молярных долей интегральные интенсивности измеряли в пяти повторностях. Результаты измерений усредняли. Расчет массовых долей проводили по формуле⁴:

$$X_{i, \text{масс}} = \frac{M_i \times S'_i}{\sum_{j=1}^{j=n} M_j \times S'_j}, \quad (1)$$

где M_i — молекулярная масса гентамицина сульфата, S'_i — нормированное значение интегральной интенсивности сигнала.

Регистрацию двумерных спектров ^1H - ^1H gCOSY, ^1H - ^1H TOCSY, ^1H - ^{13}C gHSQC, ^1H - ^{13}C gHMBC проводили с применением стандартных параметров⁵.

Определение компонентного состава гентамицина сульфата методом ВЭЖХ проводили на хроматографе Agilent 1200 MWD (программное обеспечение ChemStation). Условия хроматографирования: колонка Nucleosil 120-3 C18, 3 мкм, 125×4,6 мм; скорость потока — 1 мл/мин; детектор — УФ, 330 нм; объем вводимой пробы — 5 мкл; температура колонки — 25 °С. Подвижная фаза: 5,5 г натрия гептансульфоната (Sigma-Aldrich, кат. № H2766), растворенного в смеси 50 мл уксусной кислоты ледяной (PanReas AppliChem, кат. № 131008), 250 мл воды деионизованной, очищенной на установке Milli-Q Integral 3 (Millipore), и 700 мл метанола, (ООО «ТД Химмед», кат. № КА-ВО499080).

Дериватизацию гентамицинов проводили путем нагревания в течение 15 мин при температуре 60 °С 25 мл раствора, содержащего 10 мл 50% водного раствора испытуемого образца гентамицинов, 5 мл метанола, 4 мл реактива фталевых альдегида, с последующим охлаждением до комнатной температуры. Реактив фталевых

альдегида представляет собой 100 мл раствора (pH = 10,4), содержащего 1 г фталевых альдегида (Sigma-Aldrich, кат. № P1378), 5 мл метанола, 95 мл раствора 2,5% раствора борной кислоты (99,7%, Merck, кат. № 100165), 2 мл кислоты меркаптоуксусной (99,9%, Sigma-Aldrich, кат. № 528056). При определении массовых долей гентамицинов готовили 2 испытуемых раствора, измерение площадей пиков для каждого испытуемого раствора проводили в двух повторностях.

Статистическую обработку результатов, полученных методами ЯМР и ВЭЖХ, осуществляли с помощью программы Microsoft Office Excel 2007.

Результаты и обсуждение

Возможность идентификации и количественного определения компонентов фармацевтической субстанции «Гентамицина сульфат» методами ЯМР-спектроскопии ранее рассматривалась в литературе [1, 4]. В работе [1] было показано, что в ^1H ЯМР-спектрах сигналы различных гентамицинов перекрываются между собой, поэтому авторы поставили под сомнение возможность получения корректного результата для количественного определения компонентного состава методом ЯМР-спектроскопии на ядрах ^1H и предложили использовать ядра ^{13}C . Следует отметить, что выбранные авторами [1] для количественных измерений изолированные сигналы в спектре ^{13}C ЯМР принадлежат к различным (неоднотипным) углеводородным фрагментам. Известно, что интенсивность сигналов ^{13}C , полученных с развязкой от протонов, зависит не только от концентрации вещества, но и от числа водородных заместителей при углеродном атоме. Это связано с тем, что атомы углерода, связанные с различным числом протонов, имеют разный коэффициент усиления сигнала вследствие ядерного эффекта Оверхаузера⁶. Кроме того, авторы [1] проигнорировали правило прецизионного интегрирования [5], согласно которому при проведении количественных измерений методом ЯМР время задержки между импульсными последовательностями должно составлять не менее пятикратного значения времен продольной спин-решеточной релаксации (T_1). Экспериментально измеренные значения T_1 ядер ^{13}C в молекулах гентамицинов находятся в интервале 0,18–0,92 с [1]. Используемое в [1] время задержки

⁴ ОФС.1.2.1.1.0007.15 Спектроскопия ядерного магнитного резонанса. Государственная фармакопея Российской Федерации, XIV изд. Т. I. М.; 2018.

⁵ COSY — корреляционная спектроскопия (correlation spectroscopy); TOCSY — полная корреляционная спектроскопия (total correlation spectroscopy); HSQC — гетероядерная одноквантовая корреляционная спектроскопия (heteronuclear single-quantum correlation spectroscopy); HMBC — гетероядерная многосвязная корреляционная спектроскопия (heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy).

⁶ Дероум Э. Современные методы ЯМР для химических исследований. М.: Мир; 1992.

между импульсными последовательностями (0,6 с) существенно меньше требуемого при прецизионных измерениях. Как следствие, предложенная авторами [1] методика количественного определения компонентов фармацевтической субстанции «Гентамицина сульфат» приводит к некорректным результатам.

В работе [4] основной акцент сделан на идентификацию и хроматографическое разделение гентамицинов комбинацией методов ЯМР-спектроскопии и жидкостной хроматографии (ЖХ). Авторами проведено соотнесение сигналов в спектрах ^1H и ^{13}C ЯМР с конкретными структурными фрагментами молекул гентамицинов и показана возможность их хроматографического разделения с использованием комбинации ЖХ-ЯМР. В данной работе отсутствует конкретная методика, позволяющая количественно оценить компонентный состав фармацевтической субстанции «Гентамицина сульфат».

В ходе разработки собственной методики количественного определения компонентного состава фармацевтической субстанции «Гентамицина

сульфат» мы уточнили структурное соответствие сигналов спектров ^1H и ^{13}C анализируемых гентамицинов на основе комплексного анализа результатов двумерных ЯМР-экспериментов (^1H - ^1H gCOSY, ^1H - ^1H TOCSY, ^1H - ^{13}C gHSQC, ^1H - ^{13}C gHMBC) (табл. 1).

Применение ЯМР-спектрометра с большей рабочей частотой по сравнению с рабочей частотой ЯМР-спектрометра, используемого авторами [1], позволило получить отдельные сигналы, не перекрывающиеся между собой в спектре ^1H ЯМР субстанции «Гентамицина сульфат» (рис. 2а), и выделить для каждого из гентамицинов характеристические сигналы, которые можно использовать как спектральные маркеры их присутствия в анализируемом образце. Нормализованные интегральные интенсивности характеристических сигналов компонентов субстанции «Гентамицина сульфат» равны мольной доле каждого.

Характеристическими сигналами гентамицинов C_1 и C_2 являются сигналы протона аномерной СН-группы пиранозного цикла (1с в соответствии

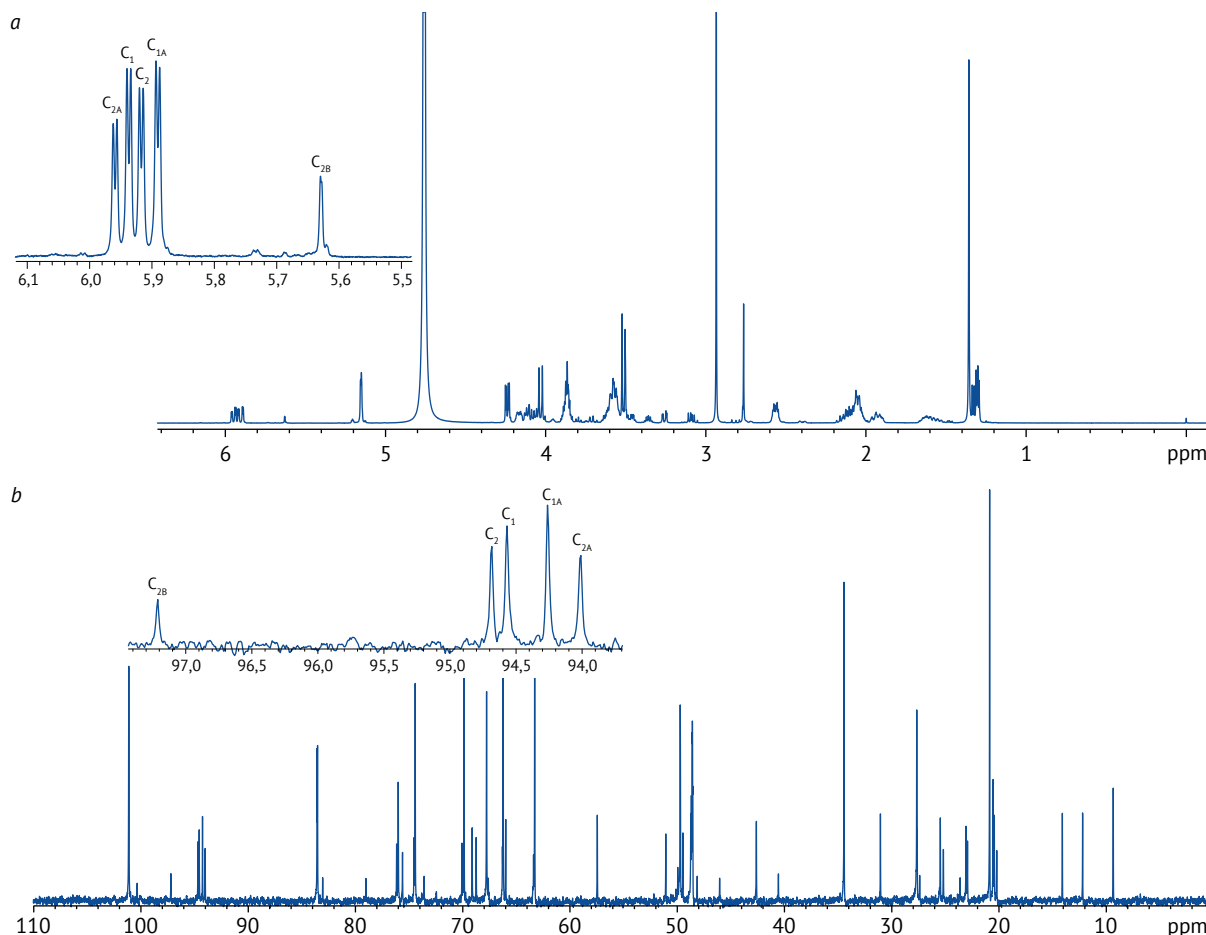


Рис. 2. ЯМР-спектры раствора субстанции «Гентамицина сульфат» с характеристическими сигналами: а – ^1H ЯМР; б – ^{13}C ЯМР

Fig. 2. NMR spectra of a solution of the active substance gentamicin sulfate with characteristic signals: а, ^1H NMR; б, ^{13}C NMR

Таблица 1. Спектральные характеристики гентамицинов C_1 , C_{1A} , C_2 , C_{2A} , C_{2B} Table 1. Spectral characteristics of gentamicins C_1 , C_{1A} , C_2 , C_{2A} , C_{2B}

Позиция атома <i>Atom position</i>	Химический сдвиг, м.д. (J, Гц) <i>Chemical shift, ppm (J, Hz)</i>		Позиция атома <i>Atom position</i>	Химический сдвиг, м.д. (J, Гц) <i>Chemical shift, ppm (J, Hz)</i>	
	¹ H	¹³ C		¹ H	¹³ C
1a	5,15 д/ <i>d</i> (J=3,7) 5,15 д/ <i>d</i> (J=3,7)	101,14	1b	3,88 м/ <i>m</i>	83,54; 83,58
2a	4,24 дд/ <i>dd</i> (J=11,0; 3,7)	66,23	2b	3,58 м/ <i>m</i>	49,72
3a	3,51 м/ <i>m</i>	63,29	3b	2,12 м/ <i>m</i> ; 2,57 м/ <i>m</i>	27,67
4a		69,87	4b	3,57 м/ <i>m</i>	48,59
5a	3,51 д/ <i>d</i> (J=12,8) 4,03 д/ <i>d</i> (J=12,8)	67,77	5b	4,10 м/ <i>m</i>	76,02
6a	1,36 с/ <i>s</i>	20,87	6b	3,86 м/ <i>m</i>	74,43
7a	2,93 с/ <i>s</i>	34,44			
Гентамицин C _{1A} / <i>gentamicin C_{1A}</i> (R=CH ₂ NH ₂)					
1c	5,89 д/ <i>d</i> (J=3,5)	94,26	4c	1,59 м/ <i>m</i> ; 1,96 м/ <i>m</i>	25,47
2c	3,58 м/ <i>m</i>	48,69	5c	4,17 м/ <i>m</i>	65,99
3c	2,06 м/ <i>m</i>	20,55	CH ₂ NH ₂	3,09 м/ <i>m</i> ; 3,26 м/ <i>m</i>	42,62
Гентамицин C ₁ / <i>gentamicin C₁</i> (R=CH(CH ₃)NHCH ₃)					
1c	5,94 д/ <i>d</i> (J=3,7)	94,57	5c	4,17 м/ <i>m</i>	69,11
2c	3,58 м/ <i>m</i>	48,74	CH(CH ₃)NHCH ₃	3,46 дд/ <i>dd</i> (J=6,8; 3,0)	57,45
3c	2,06 м/ <i>m</i>	20,44	CH(CH ₃)NHCH ₃	2,76 с/ <i>s</i>	31,06
4c	1,62 м/ <i>m</i> ; 1,93 м/ <i>m</i>	23,68	CH(CH ₃)NHCH ₃	1,31 д/ <i>d</i> (J=6,8)	9,35
Гентамицин C ₂ / <i>gentamicin C₂</i> (R=(R)-CH(CH ₃)NH ₂ , диастереомеры / <i>diastereomers</i>)					
1c	5,92 д/ <i>d</i> (J=3,6)	94,69	5c	3,88 м/ <i>m</i>	70,08
2c	3,56 м/ <i>m</i>	48,63	CH(CH ₃)NH ₂	3,63 м/ <i>m</i>	49,47
3c	2,06 м/ <i>m</i>	20,55	CH(CH ₃)NH ₂	1,30 д/ <i>d</i> (J=6,8)	12,21
4c	1,62 м/ <i>m</i> ; 1,92 м/ <i>m</i>	22,93			
Гентамицин C _{2A} / <i>gentamicin C_{2A}</i> (R=(S)-CH(CH ₃)NH ₂ , диастереомеры / <i>diastereomers</i>)					
1c	5,96 д/ <i>d</i> (J=3,6)	94,01	5c	4,11 м/ <i>m</i>	68,74
2c	3,56 м/ <i>m</i>	48,55	CH(CH ₃)NH ₂	3,36 м/ <i>m</i>	51,07
3c	2,02 м/ <i>m</i>	20,21	CH(CH ₃)NH ₂	1,33 д/ <i>d</i> (J=6,8)	14,09
4c	2,06 м/ <i>m</i>	25,18			
Гентамицин C _{2B} / <i>gentamicin C_{2B}</i> (R=CH ₂ NHCH ₃)					
1c	5,63 д/ <i>d</i> (J=1,4)	97,21	5c	4,24 м/ <i>m</i>	66,30
2c	3,95 м/ <i>m</i>	46,04	CH ₂ NHCH ₃	3,71 уш.д/ <i>bd</i> (J=12,2)	40,56
3c	2,06 м/ <i>m</i>	20,44	CH ₂ NHCH ₃	2,77 с/ <i>s</i>	31,06
4c	1,62 м/ <i>m</i> ; 1,93 м/ <i>m</i>	23,63			

с нумерацией рис. 1): 5,94 д (гентамицин C_1); 5,89 д (гентамицин C_{1A}); 5,92 д (гентамицин C_2); 5,96 д (гентамицин C_{2A}); 5,63 д (гентамицин C_{2B}).

Сигналы этих же структурных фрагментов являются характеристическими и в спектре ^{13}C (рис. 2b): 94,57 (гентамицин C_1); 94,26 (гентамицин C_{1A}); 94,69 (гентамицин C_2); 94,01 (гентамицин C_{2A});

97,21 (гентамицина C_{2B}). В связи с тем что характеристические сигналы различных гентамицинов в углеродном спектре принадлежат однотипным углеводородным фрагментам, они имеют одинаковый коэффициент усиления вследствие ядерного эффекта Оверхаузера и их корректно интегрировать при определении мольного соотношения компонентов субстанции.

Значения соответствующих нормированных интегральных интенсивностей характеристических сигналов сульфатов гентамицинов в спектрах 1H и ^{13}C близки между собой (рис. 3). Точность измерения содержания гентамицинов методом 1H выше, чем методом ^{13}C : диапазон значений относительного стандартного отклонения (RSD) составляет 0,3–0,5 (1H) и 0,9–2,3% (^{13}C) (табл. 2). Этот результат хорошо согласуется с известным фактом: неопределенность измерений методом ЯМР существенно зависит от соотношения сигнал:шум (S/N) и не превышает 1% при S/N 150:1 [5]. В нашем случае S/N 300 для 1H и 20 для ^{13}C (данные для минор-

ного компонента C_{2B}). Независимо от используемого метода (1H или ^{13}C) точность проведенных измерений соответствует фармакопейным требованиям к точности измерений методом ЯМР: RSD не более 1% для действующего вещества субстанции, не более 3% для составного компонента и не более 25% для примеси анализируемого образца⁷.

Сравнительный анализ статистических характеристик точности измерений методами ЯМР и ВЭЖХ подтверждает более высокую точность прямого метода ЯМР по сравнению с косвенным методом ВЭЖХ (табл. 2). В прямом измерении искомую величину (в случае ЯМР – мольное соотношение компонентов) получают непосредственно от средства измерения. При косвенных измерениях значение содержания вещества в испытуемом образце находят на основании результатов других измерений (в случае ВЭЖХ – содержания вещества в СО, связанных с искомой величиной градуировочной функцией).

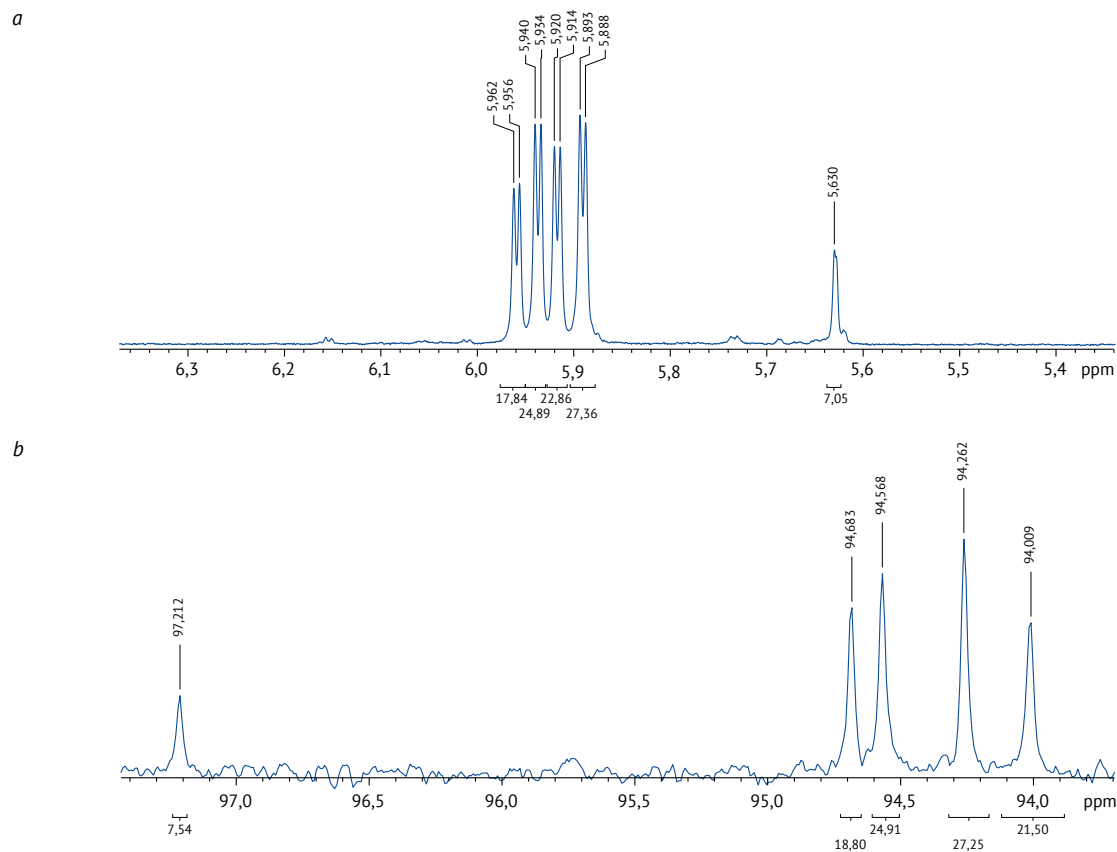


Рис. 3. Фрагмент ЯМР-спектров раствора субстанции «Гентамицина сульфат» с интегральными интенсивностями характеристических сигналов: а – 1H ЯМР; б – ^{13}C ЯМР

Fig. 3. Fragments of the 1H NMR spectra of a solution of the active substance gentamicin sulfate with integrated intensities of characteristic signals: а, 1H NMR; б, ^{13}C NMR

⁷ General monograph <761> Nuclear magnetic resonance spectroscopy. United States Pharmacopeia. USP43–NF38 Rockville, MD: USP; 2020.

Таблица 2. Результаты количественных измерений содержания сульфатов гентамицинов в фармацевтической субстанции «Гентамицина сульфат» методами ЯМР и ВЭЖХ**Table 2.** Results of NMR and HPLC gentamicin content measurements for the active substance gentamicin sulfate

Компоненты фармацевтической субстанции «Гентамицина сульфат» <i>Gentamicin sulfate active substance components</i>	Метод ^1H ЯМР ^1H NMR			Метод ^{13}C ЯМР ^{13}C NMR			Метод ВЭЖХ HPLC	
	мольн.% <i>molar%</i>	мас.% <i>mass%</i>	среднее мас. <i>mean mass</i> (RSD, %)	мольн.% <i>molar%</i>	мас.% <i>mass%</i>	среднее мас. <i>mean mass</i> (RSD, %)	мас.% <i>mass%</i>	среднее мас. <i>mean mass</i> (RSD, %)
Гентамицина сульфат C_1 <i>Gentamicin sulfate C_1</i>	24,89	25,53	25,7±0,1 (0,5)	24,91	25,54	26,0±0,5 (1,7)	24,27	25,0±0,9 (2,3)
	25,19	25,83		25,65	26,30		24,92	
	24,95	25,59		24,82	25,46		25,45	
	25,01	25,65		25,39	26,04		25,49	
	25,09	25,73		25,78	26,43		–	
Гентамицина сульфат C_{1A} <i>Gentamicin sulfate C_{1A}</i>	27,36	26,69	26,6±0,1 (0,3)	27,25	25,59	26,0±0,4 (1,2)	26,37	27,1±1,3 (3,0)
	27,13	26,45		26,87	26,21		26,53	
	27,30	26,63		26,96	26,30		27,88	
	27,30	26,63		26,85	26,19		27,78	
	27,29	26,62		26,48	25,83		–	
Гентамицина сульфат C_2 <i>Gentamicin sulfate C_2</i>	22,86	22,87	22,8±0,1 (0,4)	21,50	21,51	21,1±0,5 (1,8)	22,96	22,0±1,3 (3,6)
	22,70	22,71		20,80	20,81		22,34	
	22,95	22,96		21,37	21,38		21,35	
	22,84	22,85		21,07	21,07		21,33	
	22,80	22,81		20,63	20,63		–	
Гентамицина сульфат C_{2A} <i>Gentamicin sulfate C_{2A}</i>	17,84	17,85	17,8±0,1 (0,5)	18,80	18,81	18,9±0,2 (0,9)	–	–
	17,94	17,94		18,68	18,69			
	17,72	17,72		19,02	19,03			
	17,84	17,85		18,83	18,84			
	17,77	17,78		19,12	19,12			
Гентамицина сульфат C_{2B} <i>Gentamicin sulfate C_{2B}</i>	7,05	7,05	7,0±0,1 (0,4)	7,54	7,54	7,8±0,2 (2,3)	–	–
	7,04	7,04		7,99	7,99			
	7,08	7,08		7,83	7,83			
	7,01	7,01		7,85	7,85			
	7,05	7,05		7,98	7,98			
Гентамицина сульфат $\text{C}_{2A} + \text{C}_{2B}$ <i>Gentamicin sulfates $\text{C}_{2A} + \text{C}_{2B}$</i>	–	–	24,8	–	–	26,7	24,99	24,4±0,96 (2,5)
							24,78	
							23,81	
							23,89	

Примечание. «–» – данные отсутствуют; RSD – относительное стандартное отклонение; ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография.

Note. –, no data; RSD, relative standard deviation; HPLC, high-performance liquid chromatography.

Заключение

Разработана методика идентификации и количественного определения компонентов фармацевтической субстанции «Гентамицина сульфат» методами ^1H и ^{13}C ЯМР-спектроскопии. По сравнению с фармакопейной методикой, основанной на методе ВЭЖХ, она не предусматривает использования

СО и характеризуется более высокой точностью, так как в ней отсутствуют стадии приготовления растворов СО всех компонентов субстанции с точным взятием навесок образцов, объемов растворителя и построения калибровочной функции, которые вносят свой вклад в суммарную неопределенность результатов измерений.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Busson R, Claes PJ, Vanderhaeghe H. Determination of the composition of gentamicin sulfates by ^1H and ^{13}C nuclear magnetic spectroscopy. *J Assoc Off Anal Chem.* 1986;69(4):601–8. PMID: 3745084
2. Yoshizawa S, Fourmy D, Puglisi JD. Structural origins of gentamicin antibiotic action. *EMBO J.* 1998;17(22):6437–48. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.22.6437>
3. Beale JM, Block JH, eds. *Wilson and Gisvold's textbook of organic medicinal and pharmaceutical chemistry.* 12th ed. Baltimore, MD: Lippincott Williams and Wilkins; 2011.
4. Deubner R, Schollmayer C, Wienen F, Holzgrabe U. Assignment of the major and minor components of gentamicin for evaluation of batches. *Magn Reson Chem.* 2003;41(8):589–98. <https://doi.org/10.1002/mrc.1222>
5. Malz F, Jancke H. Validation of quantitative NMR. *J Pharm Biomed Anal.* 2005;38(5):813–23. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2005.01.043>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: С.В. Моисеев — идея, подбор и анализ литературы, проведение экспериментальных исследований методом ЯМР, анализ, систематизация и обобщение экспериментальных данных, интерпретация результатов исследования, написание и оформление рукописи; Н.Е. Кузьмина — идея, планирование исследования, анализ, систематизация и обобщение экспериментальных данных, интерпретация результатов исследования, редактирование текста рукописи; Е.Ю. Северинова — пробоподготовка образцов, подбор и анализ литературы; Е.П. Симонова — проведение экспериментальных исследований методом жидкостной хроматографии; В.В. Косенко — ответственность за все аспекты работы, включая надлежащее изучение и решение вопросов, связанных с достоверностью данных и целостностью всех частей статьи, утверждение окончательного варианта статьи для публикации.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00052-23-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121022400083-1).

Конфликт интересов. В.В. Косенко — главный редактор, Н.Е. Кузьмина — член редакционной коллегии журнала «Ведомости НЦЭСМП. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств». Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. Sergey V. Moiseev elaborated the study idea; selected and analysed literature; conducted NMR experiments; analysed, systematised, and summarised experimental data; interpreted the study results; drafted and formatted the manuscript. Natalia E. Kuz'mina elaborated the study idea; planned the study; analysed, systematised, and summarised experimental data; interpreted the study results; and edited the manuscript. Elena Yu. Severinova prepared the samples, selected and analysed literature. Elena P. Simonova conducted liquid chromatography experiments. Valentina V. Kosenko agreed to be accountable for all aspects of the work, including ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any of its parts are appropriately investigated and resolved; and approved the final version of the article.

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of publicly funded research project No. 056-00052-23-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121022400083-1).

Conflict of interest. Valentina V. Kosenko is the Editor-in-Chief and Natalia E. Kuz'mina is a member of the Editorial Board of *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. The other authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Моисеев Сергей Владимирович, канд. хим. наук, доцент
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1310-4477>
MoiseevSV@expmed.ru

Кузьмина Наталия Евгеньевна, д-р хим. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9133-0835>
KuzminaN@expmed.ru

Северинова Елена Юрьевна
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5695-8048>
Severinova@expmed.ru

Симонова Елена Павловна
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2221-5534>
Simonovae@expmed.ru

Косенко Валентина Владимировна, канд. фарм. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8353-7863>
kosenko@expmed.ru

Sergey V. Moiseev, Cand. Sci. (Chem.), Associate Professor
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1310-4477>
MoiseevSV@expmed.ru

Natalia E. Kuz'mina, Dr. Sci. (Chem.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9133-0835>
KuzminaN@expmed.ru

Elena Yu. Severinova
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5695-8048>
Severinova@expmed.ru

Elena P. Simonova
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2221-5534>
Simonovae@expmed.ru

Valentina V. Kosenko, Cand. Sci. (Pharm.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8353-7863>
kosenko@expmed.ru

Поступила 16.01.2023

После доработки 13.02.2023

Принята к публикации 07.03.2023

Received 16 January 2023

Revised 13 February 2023

Accepted 7 March 2023



П.В. Шадрин 
Л.В. Симутенко 
Т.А. Батуашвили 
Н.П. Неугодова 
Е.О. Чечетова 

Определение биологической активности инсулина и его аналогов на животных

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

✉ Шадрин Павел Валерьевич; shadrin@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

В последние годы появилась тенденция приравнивать результаты испытаний инсулина физико-химическими методами к его биологической активности. Однако следует подчеркнуть, что об эффективности препаратов инсулина можно судить только по реакции целостного организма, т.е. по гипогликемическому действию, которое является интегральным показателем. Определение биологической активности инсулина особенно актуально в связи с появлением на фармацевтическом рынке биосимиляров, которые практически не являются аналогами оригинальных препаратов. Испытаний только физико-химическими методами для оценки эффективности препаратов инсулина недостаточно. В настоящее время биологическую активность определяют путем испытаний на кроликах. При этом согласно требованиям Государственной фармакопеи Российской Федерации (ГФ РФ) для определения данного показателя также предложена альтернативная методика испытаний на мышах. В связи с физиологическими особенностями мышей для проведения адекватного испытания особое внимание следует уделять подбору исследуемых концентраций инсулина. **Цель работы:** предложить рекомендации по выбору диапазона концентраций инсулина для определения его биологической активности на мышах с учетом изменения чувствительности животных в зависимости от сезона. **Материалы и методы:** проведен анализ результатов испытаний биологической активности инсулина на мышах-самках с учетом аналитической области методики, указанной в ГФ РФ. При подборе концентраций вводимых проб учитывали чувствительность животных в конкретный временной период. **Результаты:** продемонстрировано, что реакция мышей-самок на инсулин в диапазоне концентраций 0,03–0,3 МЕ/мл характеризуется статистически значимой дозозависимостью и линейностью, что позволяет рекомендовать данный диапазон в качестве ориентировочного для определения биологической активности инсулина на мышах-самках. Приведены конкретные примеры, иллюстрирующие подбор концентраций испытуемых растворов. **Выводы:** предложен методический подход к выбору концентраций инсулина и оценке правильности результатов испытания при определении биологической активности двойным перекрестом на мышах-самках.

Ключевые слова: инсулин; биологическая активность; мыши; дисперсионный анализ; диапазон концентраций

Для цитирования: Шадрин П.В., Симутенко Л.В., Батуашвили Т.А., Неугодова Н.П., Чечетова Е.О. Определение биологической активности инсулина и его аналогов на животных. *Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств.* 2023;13(2-1):292–301. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2022-403>

P.V. Shadrin 
L.V. Simutenko 
T.A. Batuashvili 
N.P. Neugodova 
E.O. Chechetova 

Determination of the Biological Activity of Insulin and Its Analogues in Animals

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

✉ Pavel V. Shadrin; shadrin@expmed.ru

ABSTRACT

In recent years, there has been a tendency to equate the results of insulin testing by physicochemical methods with its biological activity. However, it should be emphasized that the effectiveness of insulin preparations can be judged only by the reaction of the whole organism, i.e. by the hypoglycaemic action, which is a composite indicator. The determination of the biological activity of insulin has become especially relevant with the pharmaceutical market entry of insulin biosimilars, which are practically not analogous to the original medicinal products. The effectiveness of insulin products cannot be adequately evaluated using only physicochemical testing. At present, the biological activity of insulin is tested in rabbits. Additionally, the State Pharmacopoeia of the Russian Federation includes an alternative method to determine this parameter using mice. Owing to the physiological characteristics of mice, an adequate test would require special attention to the selection of test concentrations of insulin. **The aim of the study** was to offer recommendations for choosing the range of insulin concentrations for determining its biological activity in mice with due consideration of changes in their sensitivity depending on the season. **Materials and methods:** the authors analysed the results of testing the biological activity of insulin in female mice, bearing in mind the analytical range of the method specified in the State Pharmacopoeia of the Russian Federation. Test concentrations of insulin were selected taking into account seasonal shifts in insulin sensitivity of the animals. **Results:** the study demonstrated significant dose dependence and linearity of the responses of female mice to insulin in the concentration range of 0.03–0.3 IU/mL. Therefore, this range can be recommended as a guideline for determining the biological activity of insulin in female mice. The selection of test concentrations is illustrated with specific examples. **Conclusions:** the authors offer a methodological approach to the selection of insulin concentrations and the assessment of the validity of test results during biological activity determination using twin-crossover tests in female mice.

Key words: insulin; biological activity; mice; analysis of variance; concentration range

For citation: Shadrin P.V., Simutenko L.V., Batuashvili T.A., Neugodova N.P., Chechetova E.O. Determination of the biological activity of insulin and its analogues in animals. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2023;13(2-1):292–301. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2022-403>

Введение

Инсулин — гормон, обладающий гипогликемическим действием, впервые был выделен из поджелудочной железы крупного рогатого скота в 20-х годах прошлого века. Получаемый препарат, на тот момент обладавший низкой активностью, был нестабилен и загрязнен различными примесями; несмотря на это, его сразу стали использовать в медицинской практике для лечения сахарного диабета [1]. Однако для правильного назначения лечебных доз необходимо знать биологическую активность инсулина, которую не удавалось количественно оценить из-за отсутствия подходящей модели

животных, стандартного образца (СО) и условий определения.

В результате многолетней работы исследователей разных стран, приведшей к созданию стабильного СО инсулина, были разработаны сначала простой, а затем двойной перекрестный метод определения биологической активности инсулина, включенные в ведущие фармакопеи мира¹. Метод основан на модели параллельных линий, в которой сравнивают реакцию тест-объектов (кролики или мыши) на введение двух или более доз стандартного и испытываемого образцов.

¹ British Pharmacopoeia. London: H.M. Stationery Office; 1980.

В настоящее время препараты инсулина получают с помощью биотехнологического синтеза. В полном объеме предсказать биологическую активность и клинические эффекты этих препаратов возможно только в исследованиях на животных или, частично, в исследованиях *in vitro* [2].

В последние годы появилась устойчивая тенденция к сокращению использования животных для контроля качества и экспертизы лекарственных средств в соответствии с концепцией 3 R. В настоящее время в Фармакопее США в монографиях на лекарственные средства инсулина для оценки биологической активности используют, как правило, упрощенный метод: биоидентичность², а для рутинного контроля лекарственных средств инсулина используют хроматографические методы и по результатам исследования судят об «активности» препарата, причем выражают эти результаты в международных единицах действия, что допустимо только при определении биологической активности.

«Биологическая активность — особая способность или свойство препарата оказывать определенный биологический эффект»³, т.е. характеризует фармакологическое действие лекарственного средства.

Задача физико-химических методов оценки качества — подтверждать первичную и вторичную структуру действующего вещества, а также количество белка, выраженное в единицах массы. Однако данные методы не дают полной информации о конформации белка, от которой зависит биологическая активность, что особенно важно при контроле биосимиляров [3].

Определение величины биологической активности инсулина *in vivo* проводят в сравнении с аттестованным СО (в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации (ГФ РФ) — с международным СО, фармакопейным СО или СО производителя). В этом случае полученная величина биологической активности отражает основное фармакологическое действие инсулина на организм. Определение качества биотехнологических лекарственных средств, в частности инсулина, требует совместного применения биологических и физико-химических методов, что позволяет получать наиболее полную

информацию [4]. Поэтому определение показателя «Биологическая активность» на кроликах или мышах остается важным элементом фармакопейного анализа.

В ГФ СССР X издания впервые был введен метод простого перекреста на кроликах⁴, а в дальнейшем для повышения точности — метод двойного перекреста (общая фармакопейная статья (ОФС) 42-0009-02). В этой же ОФС впервые в России были регламентированы испытания на мышах, по аналогии с требованиями Британской фармакопеи.

Методика определения активности инсулина на мышах введена в ГФ РФ значительно позже, чем на кроликах, и поэтому не так широко используется контрольными службами, хотя по точности и эффективности не уступает ей. Как показала практика, определение биологической активности инсулина на мышах вызывает некоторые затруднения у исследователей, поэтому для его успешного освоения и проведения испытаний полезны дополнительные методические рекомендации. В частности, это касается выбора концентрации инсулина для проведения испытания, зависящего от чувствительности животных. На чувствительность могут влиять различные факторы, включая линию, пол и условия содержания на момент проведения испытания. Изложенный в статье материал получен на мышах-самках, так как их чувствительность к инсулину значительно выше, чем у самцов.

Кормление и условия содержания животных в виварии, а также время проведения испытаний достаточно стабильны. Однако нельзя не учитывать внешние факторы, например сезонные, которые могут активно влиять на обменные процессы, протекающие в организме животных [5]. При подборе концентраций инсулина для проведения испытания в конкретное время года следует руководствоваться аналитической областью методики, указанной в ОФС.1.2.4.0001.15 (Метод В «Определение биологической активности инсулина по снижению концентрации глюкозы в крови мышей»).

Цель работы — предложить рекомендации по выбору диапазона концентраций инсулина для определения его биологической активности на мышах с учетом изменения чувствительности животных в зависимости от сезона.

² United States Pharmacopeia. USP 43–NF 38. 2021.

³ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза».

⁴ Государственная фармакопея СССР. X изд. М.: Медицина; 1968.

Материалы и методы

Испытания проводили в соответствии с требованиями ОФС «Биологические испытания инсулина»⁵. В испытаниях использовали самок белых мышей массой тела 22–25 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария⁶. Методический подход к выбору концентраций инсулина показан на материале 80 испытаний, проведенных в рамках рутинного контроля препаратов инсулина и его аналогов (в дальнейшем «инсулина»), выполняемых методом двойного перекреста в течение нескольких лет. Проанализированы данные, характеризующие реакцию мышей на введение в холку стандартных образцов инсулина разных концентраций (объем инъекции 0,3 мл, время взятия крови 40 мин после инъекции, четыре группы по 12 животных в каждой). Содержание глюкозы в крови отражало реакцию мышей на введение стандартных образцов инсулина в малых и больших концентрациях в первый и второй день испытания. Оценку реакции животных на введение инсулина различных концентраций проводили в сравнении с контрольной группой, которая получала аналогичный объем растворителя: подкисленного раствора натрия хлорида 0,9% для инъекций.

Результаты и обсуждение

Полученная зависимость средней концентрации глюкозы в крови мышей-самок от концентрации введенного инсулина представлена в *таблице 1* и на *рисунке 1*. Для линеаризации данных графическая зависимость построена в логарифмических координатах.

Согласно полученным данным (*табл. 1, рис. 1*) внутри каждого из трех диапазонов: 0,03–0,05, 0,06–0,12 и 0,25–0,30 МЕ/мл средние значения ответов животных на инсулин практически одинаковы. Так как модель параллельных линий подразумевает использование дозозависимых и линейных данных, для правильного анализа зависимости, представленные данные целесообразно объединить в три группы (*табл. 2, рис. 2*).

Для демонстрации линейности и дозозависимости реакции животных провели дисперсионный анализ [6] (*табл. 3*). При этом вычисляли значения нескольких источников дисперсии (показателей), два из которых («Регрессия» и «Нелинейность») являются основными и характеризуют дозозависимость и линейность соответственно.

Дисперсионный анализ показал дозозависимость и линейность реакции мышей на инсулин

Таблица 1. Концентрация глюкозы в крови мышей-самок в ответ на введение инсулина различных концентраций

Table 1. Blood glucose concentrations in female mice after administration of different concentrations of insulin

Концентрация инсулина, МЕ/мл <i>Insulin concentration, IU/mL</i>	Число животных в группе (n) <i>Number of animals in the group (n)</i>	Средняя концентрация глюкозы в крови животных и полуширина доверительного интервала ($\bar{c} \pm \Delta \bar{c}$), мг% (P = 99%) <i>Average blood glucose concentration in the animals and confidence interval half-width ($\bar{c} \pm \Delta \bar{c}$), mg% (P = 99%)</i>
0*	24	133,76 ± 5,26
0,03	158	101,22 ± 3,74
0,04	95	98,10 ± 5,22
0,05	150	104,72 ± 3,74
0,06	48	89,53 ± 5,17
0,07	148	88,71 ± 3,94
0,09	144	86,55 ± 3,95
0,12	68	83,25 ± 5,92
0,25	150	71,38 ± 3,31
0,27	47	72,18 ± 4,86
0,30	71	66,19 ± 4,14

* Животным контрольной группы вводили соответствующее количество подкисленного физиологического раствора.

* Control animals were injected with the appropriate amount of acidified saline.

⁵ ОФС.1.2.4.0001.15. Биологические испытания инсулина. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

⁶ СП 2.2.1.3218-14. Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев).

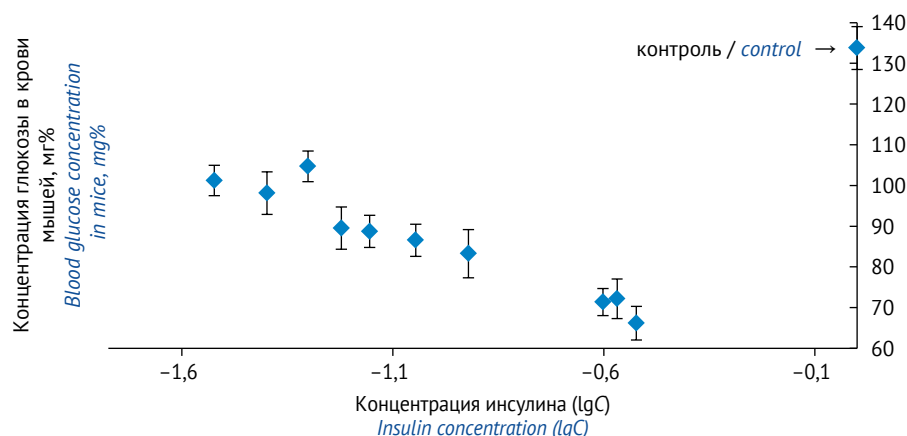


Рис. 1. Реакция мышей-самок на введение инсулина различных концентраций

Fig. 1. Responses of female mice to various concentrations of insulin

Таблица 2. Объединенная реакция мышей-самок на введение инсулина различных концентраций

Table 2. Pooled responses of female mice to administration of different concentrations of insulin

Концентрация инсулина, МЕ/мл Insulin concentration, IU/mL	Число животных в группе (n) Number of animals in the group (n)	Средняя концентрация глюкозы в крови животных и полуширина доверительного интервала ($\bar{c} \pm \Delta\bar{c}$), мг% (P = 99%) Average blood glucose concentration in the animals and confidence interval half-width ($\bar{c} \pm \Delta\bar{c}$), mg% (P = 99%)
0,040	403	101,78 $\pm$ 2,38
0,085	408	87,13 $\pm$ 2,31
0,273	268	70,14 $\pm$ 2,33

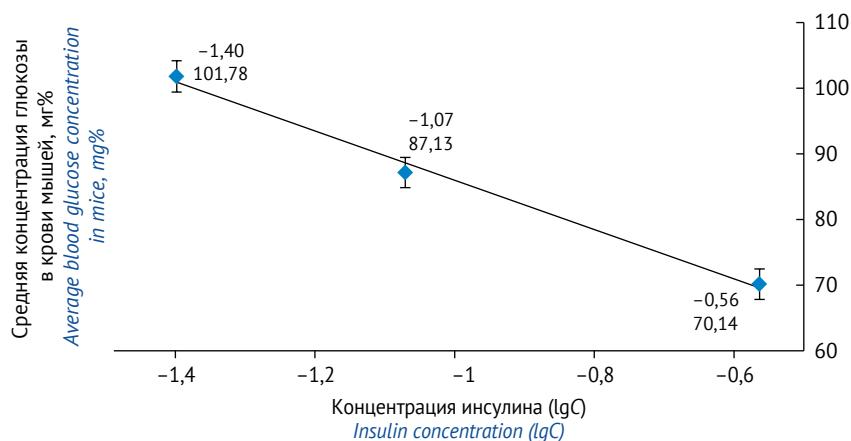


Рис. 2. Объединенная реакция мышей-самок на введение инсулина различных концентраций с линейной аппроксимацией

Fig. 2. Pooled responses of female mice to administration of different concentrations of insulin, with linear approximation

во всем исследованном диапазоне вводимых концентраций, о чем свидетельствует значимая регрессия ($304,06 > 6,66$) и незначимая нелинейность ($2,41 < 3,85$). Приведенные доказательства позволяют рекомендовать любой достаточно широкий участок вышеуказанного диапазона аналитической области для подбора конкретных концентраций инсулина при проведении биологических испытаний. При этом следует

учитывать, что в осенне-зимний период наблюдается тенденция к снижению чувствительности мышей к инсулину, а в весенне-летний — к ее повышению. Приведем несколько примеров выбора концентраций инсулина при проведении испытания двойным перекрестом.

Пример № 1 иллюстрирует применение инсулина в концентрациях, оптимальных для осенне-зимнего периода. В этом испытании малые

Таблица 3. Дисперсионный анализ объединенной реакции мышей-самок на введение инсулина

Table 3. Analysis of variance (ANOVA) of the pooled responses of female mice to insulin

Определяемый показатель <i>Test parameter</i>	Число степеней свободы (f) <i>Number of degrees of freedom (f)</i>	Сумма квадратов <i>Sum of squares</i>	Средний квадрат <i>Mean square</i>	Значение критерия Фишера <i>Fisher test value</i>		Доверительная вероятность (P) <i>Confidence probability (P)</i>
				$F_{\text{набл.}}$ F_{obs}	$F_{\text{критич.}}$ F_{crit}	
Регрессия <i>Regression</i>	1	160892,75	160892,75	304,06 > 6,66		0,99
Отклонение от регрессии (нелинейность) <i>Departure from regression (nonlinearity)</i>	1	1274,36	1274,36	2,41 < 3,85		0,95
Постановки (межгрупповая дисперсия) <i>Treatments (intergroup variance)</i>	2	162167,11	81083,55	153,24 > 3,00		0,95
Отклонение (внутригрупповая дисперсия) <i>Error (intragroup variance)</i>	1076	569357,32	529,14			
Итого (Σ_{yy}) <i>Total (Σ_{yy})</i>	1078	731524,43	678,59			

ДИСПЕРСИОННЫЙ АНАЛИЗ						
	f	СУММА КВАДРАТОВ	СРЕДНИЙ КВАДРАТ	$F_{\text{набл.}}$	$F_{\text{критич.}}$	
ПАРАЛЛЕЛЬНОСТЬ	1	529,3058	529,3058	0,9227312	<	4,0637022 (P=95%)
ДНИ*ПРЕПАРАТЫ	1	2083,5251	2083,5251	3,6321795	<	4,0637022 (P=95%)
ДНИ*РЕГРЕССИЮ	1	636,39487	636,39487	1,109418	<	4,0637022 (P=95%)
ОТКЛОНЕНИЕ (1)	43	24666,067	573,62946			
БЛОКИ	47	27915,292	593,94239			
ПРЕПАРАТЫ	1	61,510711	61,510711	0,1459036	<	4,0637022 (P=95%)
РЕГРЕССИЯ	1	10801,621	10801,621	25,621486	>	7,2473073 (P=99%)
ДНИ	1	88,324252	88,324252	0,2095055	<	4,0637022 (P=95%)
ДНИ*ПАРАЛЛЕЛЬНОСТЬ	1	426,87925	426,87925	1,0125592	<	4,0637022 (P=95%)
ОТКЛОНЕНИЕ (2)	43	18128,133	421,58449			
ИТОГ	94	57421,761				
БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ И ЕЁ ДОВЕРИТЕЛЬНЫЕ ГРАНИЦЫ						
I = 0,552842						
t = 2,0165411 (P=95%)						
b = -38,37407						
$y^{\wedge}z = 72,052875$						
$y^{\wedge}u = 73,653795$						
M'u = -0,041719						
ОЖИДАЕМАЯ АКТИВНОСТЬ = 100 МЕ/мл						
Ru						
Mu = 1,9582812 90,84085 МЕ/мл 90,84085 %						
C = 1,1886536 Доверительные границы Ru						
ниж. = 1,7094766 51,224363 МЕ/мл 51,224363 %						
верх. = 2,191345 155,36207 МЕ/мл 155,36207 %						
W = 70,05146 Ширина дов.инт. = 1,0413771						
s/b = 0,5350624						

Рис. 3. Проверка правильности результатов биологического испытания и вычисление биологической активности инсулина (пример № 1)

Fig. 3. Validation of biological test results and calculation of the biological activity of insulin (example 1)

и большие концентрации СО инсулина равны 0,07 и 0,25 МЕ/мл. Для проверки правильности полученных результатов испытания провели дисперсионный анализ данных (рис. 3).

Так как методика анализа двойного перекреста значительно сложнее, чем анализ одной линии (табл. 3), то для вычисления основных показателей, характеризующих правильность постановки испытания, необходим ряд дополнительных показателей. О наличии или отсутствии статистически значимой дозозависимости линии ответа и непараллельности линий первого и второго дня соответственно судят по показателям «Регрессия» и «Дни × параллельность»⁷. Если хотя бы один из этих двух показателей не соответствует нижеописанным требованиям ОФС, результаты испытания следует признать недостоверными.

На рисунке 3 показатели, характеризующие правильность постановки, выделены рамкой. Для «Регрессии», отражающей дозозависимость, наблюдаемое значение критерия Фишера ($F_{\text{набл.}}$) должно быть больше его критического значения ($F_{\text{критич.}}$) при данном

числе степеней свободы (f_1 для «Регрессии» и f_2 для «Отклонения (2)»). Критические значения критерия Фишера определяют по справочной таблице. В примере № 1 для показателя «Регрессия» $F_{\text{набл.}}$ составляет 25,62. По справочной таблице необходимо найти $F_{\text{критич.}}$ для значений $f_1 = 1$ и $f_2 = 43$ при доверительной вероятности $P = 99\%$, которое составляет 7,25 (рис. 3). Таким образом, полученное неравенство свидетельствует о наличии статистически значимой дозозависимости результатов биологического испытания.

$F_{\text{набл.}}$ для показателя «Дни × параллельность», характеризующего непараллельность линий графика в разные дни, должно быть меньше критического значения ($F_{\text{критич.}}$) для данного числа степеней свободы (f_1 для «Дни × параллельность» и f_2 для «Отклонения (2)»). Для показателя «Дни × параллельность» $F_{\text{набл.}}$ составляет 1,01, что меньше значения $F_{\text{критич.}}$ для $f_1 = 1$ и $f_2 = 43$

ДИСПЕРСИОННЫЙ АНАЛИЗ						
	f	СУММА КВАДРАТОВ	СРЕДНИЙ КВАДРАТ	$F_{\text{набл.}}$		$F_{\text{критич.}}$
ПАРАЛЛЕЛЬНОСТЬ	1	1765,4296	1765,4296	2,5575283	<	4,0583956 (P=95%)
ДНИ*ПРЕПАРАТЫ	1	67,269691	67,269691	0,0974517	<	4,0583956 (P=95%)
ДНИ*РЕГРЕССИЮ	1	29,480558	29,480558	0,0427077	<	4,0583956 (P=95%)
ОТКЛОНЕНИЕ (1)	44	30372,647	690,28743			
БЛОКИ	47	32234,827	685,84738			
ПРЕПАРАТЫ	1	2912,6855	2912,6855	9,6384218	>	4,0583956 (P=95%)
РЕГРЕССИЯ	1	30425,22	30425,22	100,68066	>	7,2336229 (P=99%)
ДНИ	1	439,04688	439,04688	1,4528582	<	4,0583956 (P=95%)
ДНИ*ПАРАЛЛЕЛЬНОСТЬ	1	3403,2469	3403,2469	11,261748	>	4,0583956 (P=95%)
ОТКЛОНЕНИЕ (2)	44	13296,592	302,19527			
ИТОГ	95	82711,618				
БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ И ЕЁ ДОВЕРИТЕЛЬНЫЕ ГРАНИЦЫ						
$I = 0,69897$						
$t = 2,0151997$ (P=95%)						
$b = -50,93927$						
$y^{\wedge}s = 82,590667$						
$y^{\wedge}u = 93,607104$						
$M'u = -0,216266$						
ОЖИДАЕМАЯ АКТИВНОСТЬ = 100 МЕ/мл						
Ru						
$Mu = 1,7837339$ 60,776249 МЕ/мл 60,776249 %						
$C = 1,0420311$ Доверительные границы Ru						
ниж. = 1,6243671 42,108241 МЕ/мл 42,108241 %						
верх. = 1,9249209 84,124185 МЕ/мл 84,124185 %						
$W = 179,82573$ Ширина дов.инт. = 0,4201594						
$s/b = 0,3412645$						

Рис. 4. Проверка правильности результатов биологического испытания и вычисление биологической активности инсулина (пример № 2)

Fig. 4. Validation of biological test results and calculation of the biological activity of insulin (example 2)

⁷ ОФС.1.1.0014.15. Статистическая обработка результатов определения специфической фармакологической активности лекарственных средств биологическими методами. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

ДЕНЬ I	S1 = 953,593	U1 = 1117,967		
	S2 = 647,896	U2 = 798,65022	СУММА	
	S = 1601,489	U = 1916,6172	3518,1062	
ДЕНЬ II	S1 = 1009,15	U1 = 914,198		
	S2 = 1070,957	U2 = 828,7056	СУММА	
	S = 2080,107	U = 1742,9036	3823,0106	
СУММА	3681,596	3659,5208	7341,1168	
	ЛИНЕЙНЫЕ КОНТРАСТЫ		СУММА	
	LS1 = -305,697	LU1 = -319,3168	-625,0138	
	LS2 = 61,807	LU2 = -85,4924	-23,6854	
	LS = -243,89	LU = -404,8092	-648,6992	
N = 96			Концентрации	
n = 24	m = 3		0,1 МЕ/мл	
K = 561374,96			0,29 МЕ/мл	
Итого = 62675,755				
ДИСПЕРСИОННЫЙ АНАЛИЗ				
	f	СУММА	СРЕДНИЙ	
		КВАДРАТОВ	КВАДРАТ	F _{набл.}
ПАРАЛЛЕЛЬНОСТЬ	1	269,73939	269,73939	0,3561458
ДНИ*ПРЕПАРАТЫ	1	4432,6723	4432,6723	5,8526026
ДНИ*РЕГРЕССИЮ	1	3766,6231	3766,6231	4,973196
ОТКЛОНЕНИЕ (1)	41	31052,777	757,38481	
БЛОКИ	47	39521,812	840,88962	
ПРЕПАРАТЫ	1	5,076182	5,076182	0,0118179
РЕГРЕССИЯ	1	4383,444	4383,444	10,205128
ДНИ	1	968,40291	968,40291	2,254546
ДНИ*ПАРАЛЛЕЛЬНОСТЬ	1	186,14835	186,14835	0,4333733
ОТКЛОНЕНИЕ (2)	41	17610,872	429,53345	
ИТОГ	92	62675,755		
БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ И ЕЁ ДОВЕРИТЕЛЬНЫЕ ГРАНИЦЫ				
I = 0,462398				
t = 2,0194251 (P=95%)				
b = -29,22713				
y^s = 76,699917				
y^u = 76,240017				
M'u = 0,0157354				
ОЖИДАЕМАЯ АКТИВНОСТЬ =	100 МЕ/мл			
	Ru			
Mu = 2,0157354	103,68964 МЕ/мл	103,68964 %		
C = 1,6655857	Доверительные границы Ru			
ниж. = 1,6486048	44,525087 МЕ/мл	44,525087 %		
верх. = 2,4038124	253,40339 МЕ/мл	253,40339 %		
W = 28,601099	Ширина дов.инт. =	2,088783		
s/b = 0,7091079				

Рис. 5. Проверка правильности результатов биологического испытания и вычисление биологической активности инсулина (пример № 3)

Fig. 5. Validation of biological test results and calculation of the biological activity of insulin (example 3)

при $P = 95\%$, равного 4,06. Это свидетельствует об отсутствии статистически значимой непараллельности результатов в разные дни. Следовательно, они параллельны.

Таким образом, результаты биологического испытания следует признать достоверными. Найденная биологическая активность испытуемого образца составила 91 (51–155) МЕ/мл ($P = 95\%$).

В качестве примера № 2 (рис. 4) можно рассмотреть пробное испытание, которое проводили в межсезонье, ближе к весне, поэтому изменили меньшую концентрацию инсулина, снизив ее до 0,05 МЕ/мл, а большую оставили равной 0,25 МЕ/мл.

Согласно данным, представленным на рисунке 4, для показателя «Регрессия», $F_{\text{набл.}}$ составляет 100,68, что больше $F_{\text{критич.}} = 7,23$ для $f_1 = 1$ (для «Регрессии») и $f_2 = 44$ (для «Отклонения (2)») при $P = 99\%$, что свидетельствует о статистически значимой дозозависимости результатов биологического испытания.

Для показателя «Дни × параллельность» $F_{\text{набл.}} = 11,26$, что больше $F_{\text{критич.}} = 4,06$ для $f_1 = 1$ и $f_2 = 44$ при $P = 95\%$. Это свидетельствует о наличии статистически значимой непараллельности результатов в разные дни. Таким образом, результаты биологического испытания (пример № 2) следует признать недостоверными из-за статистически значимой непараллельности результатов в разные дни. Это может быть связано со слабой и непостоянной реакцией животных на введение малой концентрации инсулина в разные дни. При перестановке испытания следует рассмотреть вопрос об увеличении малой концентрации раствора инсулина.

Пример № 3 (рис. 5) иллюстрирует ситуацию, когда чувствительность животных оказалась выше ожидаемой. Испытание проведено в начале зимнего периода, поэтому, предполагая, что чувствительность мышей к инсулину ниже в этот период, использовали более высокие концентрации инсулина (0,1 и 0,29 МЕ/мл). На рисунке 5 представлены суммарные ответы мышей на введение стандартного и испытуемого образца в малых и больших концентрациях, а также результаты дисперсионного анализа.

В первый день испытания наблюдалась выраженная дозозависимая реакция животных на введение инсулина в малых и больших концентрациях (стандартный и испытуемый образец) (рис. 5). Однако во второй день испытания дозозависимость практически отсутствовала в группе мышей, получивших инсулин в виде СО

в малых и больших концентрациях, и наблюдалась слабая дозозависимость в группах мышей, получивших испытуемый препарат.

Несмотря на отсутствие непараллельности ($F_{\text{набл.}} = 0,43 < F_{\text{критич.}} = 4,08$), использование вышеуказанных концентраций привело к довольно слабой дозозависимости (близкие значения $F_{\text{набл.}} = 10,21 > F_{\text{критич.}} = 7,28$), что отразилось на низкой точности результатов (ширина доверительного интервала $2,0887 \times 100 = 209\%$). Очевидно, что в данном случае необходима перестановка испытания. При этом следует уменьшить обе концентрации инсулина, что позволит нормализовать дозозависимость и доверительный интервал.

Заключение

На основании данных, полученных при определении биологической активности инсулина, показана линейность и дозозависимость реакции мышей-самок на введение инсулина в концентрациях 0,03–0,3 МЕ/мл, что позволяет рекомендовать использование данного диапазона в качестве ориентировочного для определения биологической активности инсулина на мышах-самках.

Продемонстрированы подходы к выбору концентраций инсулина на конкретных примерах определения биологической активности с учетом сезонного изменения чувствительности мышей-самок. Проведенный статистический анализ данных показал снижение чувствительности животных в осенне-зимний период и повышение в весенне-летний, что требует соответствующей корректировки концентраций инсулина.

Методика на мышах имеет ряд преимуществ: на кроликах испытание продолжается не менее двух недель, а на мышах два дня. Это делает ее экономически более выгодной, так как требует меньше трудовых и временных затрат, а также ресурсов для содержания животных.

Результаты данной работы могут представлять интерес для сотрудников контрольных служб, фирм-производителей, а также при проведении доклинических исследований новых препаратов инсулина.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Аметов АС, Пуговкина ЯВ, Вовк ПС. Инсулинотерапия — история успеха длиной в век. Фокус на базальный инсулин. *Эндокринология: новости, мнения, обучение*. 2021;10(1):27–33. [Ametov AS, Pugovkina YaV, Vovk PS. Insulin therapy is a century-long success story. Focus on basal insulin. *Endokrinologiya: novosti, mneniya, obucheniye* = *Endocrinology: News,*
2. Алпатова НА, Гайдерова ЛА, Яковлев АК, Мотузова ЕВ, Лысикова СЛ, Солдатов АА, Авдеева ЖИ. Особенности определения специфической активности биотехнологических лекарственных средств. *Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лече-*

Opinions, Training. 2021;10(1):26–33 (In Russ.))
<https://doi.org/10.33029/2304-9529-2021-10-1-26-33>

- ние. 2017;17(1):13–26. [Alpatova NA, Gayderova LA, Yakovlev AK, Motuzova EV, Lysikova SL, Soldatov AA, Avdeeva ZhI. Assessment of biotechnological products specific activity. *Biopreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie* = *Biopreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2017;17(1):13–26 (In Russ.)]
3. Бездетко НВ. Биосимиляры аналогов инсулина: что необходимо знать клиницисту. *Український медичний часопис*. 2016(1):35–41. [Bezdetko NV. Insulin analog biosimilars: what a clinician needs to know. *Ukrains'kiy medichny chasopis* = *Ukrainian Medical Journal*. 2016(1):35–41 (In Russ.)]
4. Батуашвили ТА, Симутенко ЛВ, Шадрин ПВ, Неугодова НП. Современные подходы к определению биологической активности инсулина и его аналогов. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2019;9(2):85–92. [Batuashvili TA, Simutenko LV, Shadrin PV, Neugodova NP. Modern approaches to determination of the biological activity of insulin and its analogues. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya* = *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2019;9(2):85–92 (In Russ.)] <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2019-9-2-85-92>
5. Яковлева ТВ, Казанцева АЮ, Макарова ЕН, Бажан НМ. Половые различия молекулярных механизмов чувствительности к инсулину у молодых и взрослых мышей C57BL/6J. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2017;21(7):833–40. [Yakovleva TV, Kazantseva AYU, Makarova EN, Bazhan NM. Sex differences of molecular mechanisms of insulin sensitivity in young and adult C57BL/6J mice. *Vavilovskiy zhurnal genetiki i selektsii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2017;21(7):833–40 (In Russ.)] <https://doi.org/10.18699/VJ17.303>
6. Burn JH, Finney DJ, Goodwin LG. *Biological Standardization*. 2nd ed. London: Oxford University Press; 1952.

Вклад авторов. П.В. Шадрин – обоснование концепции исследования, проведение вычислений, выполнение сравнительного анализа полученных результатов, анализ и обобщение данных литературы, работа с графическим материалом, написание и оформление текста рукописи; Л.В. Симутенко – планирование исследования, обсуждение полученных результатов и формулировок; Т.А. Батуашвили – обобщение результатов исследования, редактирование и критический пересмотр текста рукописи; Н.П. Неугодова – идея, консультация, утверждение окончательного варианта статьи для публикации; Е.О. Четцова – проведение биологических испытаний.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00001-22-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121021800098-4).

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

Authors' contributions. Pavel V. Shadrin – substantiation of the research concept, carrying out calculations and comparative analysis, analysis and consolidation of literature data, work with graphic material, writing and formatting of the manuscript; Lyudmila V. Simutenko – planning of the study, discussion of the obtained results; Tamara A. Batuashvili – consolidation of the study results, editing and critical revision of the text of the manuscript; Natalia P. Neugodova – elaboration of the study idea, advisory assistance, approval of the final version of the manuscript for publication; Ekaterina O. Chechetova – execution of biological testing.

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of publicly funded research project No. 056-00001-22-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121021800098-4).

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

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Шадрин Павел Валерьевич

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7143-8227>
shadrin@expmed.ru

Симутенко Людмила Васильевна, канд. биол. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2373-8756>
simutenko@expmed.ru

Батуашвили Тамара Ариеловна, канд. биол. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2656-8131>
batuashvili@expmed.ru

Неугодова Наталия Петровна, канд. биол. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8615-952X>
neugodova@expmed.ru

Четцова Екатерина Олеговна

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6728-594X>
stepanuk@expmed.ru

Поступила 23.11.2021

После доработки 23.06.2022

Принята к публикации 31.08.2022

Online first 28.10.2022

Pavel V. Shadrin

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7143-8227>
shadrin@expmed.ru

Lyudmila V. Simutenko, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2373-8756>
simutenko@expmed.ru

Tamara A. Batuashvili, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2656-8131>
batuashvili@expmed.ru

Natalia P. Neugodova, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8615-952X>
neugodova@expmed.ru

Ekaterina O. Chechetova

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6728-594X>
stepanuk@expmed.ru

Received 23 November 2021

Revised 23 June 2022

Accepted 31 August 2022

Online first 28 October 2022



Н.Н. Еременко¹
Е.В. Ших²
Н.Е. Уварова¹

Фармакокинетические исследования (исследования биодоступности) препаратов магния

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 «Первый Московский государственный медицинский
университет им. И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения
Российской Федерации (Сеченовский Университет),
Трубецкая ул., д. 8, стр. 2, Москва, 119991, Российская Федерация

✉ Еременко Наталья Николаевна; Eremenkonn2014@gmail.com

РЕЗЮМЕ

При исследованиях биодоступности препаратов, содержащих соли магния, для получения корректных результатов необходимо учитывать эндогенный уровень этого макроэлемента в организме. Цель работы – провести систематический обзор результатов клинических исследований по изучению биодоступности лекарственных препаратов, содержащих магний, оценить используемые методы определения эндогенного уровня магния и необходимость корректировки фармакокинетических параметров с учетом выявленных эндогенных значений магния. В обзор включены данные клинических исследований по изучению биодоступности магния, выполненные с участием здоровых добровольцев и опубликованные за последние 5 лет. Источниками данных для обзора послужили поисковая система Google, базы данных PubMed, UpToDate®, ClinicalTrials.gov, официальные сайты регуляторных органов (EFSA, EMA и FDA). Анализ литературы показал, что в качестве первичной конечной точки чаще всего выбирают анализ экскреции магния с мочой, а в качестве вторичной точки – определение магния в плазме или сыворотке крови. В большинстве исследований эндогенный уровень магния учитывали во всех точках забора крови, и данный факт позволил избежать ошибок и неправильной трактовки результатов. Корректировку фармакокинетических параметров с учетом эндогенных значений магния проводили по-разному. В одних исследованиях эндогенные значения магния рассматривались как независимые переменные и с ними сравнивали значения, полученные после применения препаратов; в других исследованиях эндогенные значения магния рассматривались как ковариата, влияющая на полученные значения и требующая обязательного учета; в двух исследованиях была проведена классическая корректировка фармакокинетических параметров – вычитание эндогенных значений из значений, полученных после применения препаратов. Оценка эндогенного уровня магния в рамках изучения его биодоступности необходима для корректировки фармакокинетических показателей, получения достоверных результатов исследования и должна быть запланирована заранее при подготовке протокола клинического исследования.

Ключевые слова: эндогенный уровень магния; клинические исследования; сыворотка крови; плазма; биодоступность

Для цитирования: Еременко Н.Н., Ших Е.В., Уварова Н.Е. Фармакокинетические исследования (исследования биодоступности) препаратов магния. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств.* 2023;13(2-1):302–315. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2022-419>

© Н.Н. Еременко, Е.В. Ших, Н.Е. Уварова, 2022

N.N. Eremenko¹ 
E.V. Shikh² 
N.E. Uvarova¹ 

Pharmacokinetic (Bioavailability) Studies of Magnesium Preparations

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

² I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University)
8/2 Trubetskaya St, Moscow 119991, Russian Federation

✉ Natalia N. Eremenko; Eremenkonn2014@gmail.com

ABSTRACT

In order to obtain valid results when studying the bioavailability of medicinal products containing magnesium salts, it is necessary to take into account endogenous levels of the macroelement in the body. The aim of the study was to conduct a systematic review of the results of clinical studies on the bioavailability of medicinal products containing magnesium, to evaluate the methods used for determining the endogenous level of magnesium, and to establish the necessity for adjusting pharmacokinetic parameters according to the identified endogenous magnesium levels. The review includes data from clinical studies of magnesium bioavailability performed with healthy volunteers and published over the past 5 years. According to the literature review results, the most commonly chosen primary endpoint is urinary magnesium excretion analysis, and the most secondary endpoint is plasma or serum magnesium determination. Data sources for the review included Google's search engine; PubMed, UpToDate®, ClinicalTrials.gov databases; and official websites of regulatory authorities (EFSA, EMA, and FDA). In most studies, endogenous magnesium levels were taken into account at all blood sampling points, and this provided an opportunity to avoid errors and misinterpretations of the results. Adjustments of pharmacokinetic parameters with regard to endogenous magnesium values were performed differently. Some studies treated endogenous magnesium values as independent variables and compared the values obtained after drug administration with them; other studies treated endogenous magnesium values as a covariate influencing the values obtained and requiring mandatory consideration; two studies involved a classical adjustment of pharmacokinetic parameters, the subtraction of endogenous values from the values obtained after drug administration. The evaluation of endogenous magnesium levels as part of bioavailability studies is necessary to adjust pharmacokinetic parameters and to obtain valid study results. It should be planned beforehand at the time of preparation of the study protocol.

Key words: endogenous level of magnesium; clinical studies; serum; plasma; bioavailability

For citation: Eremenko N.N., Shikh E.V., Uvarova N.E. Pharmacokinetic (bioavailability) studies of magnesium preparations. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2023;13(2-1):302–315. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2022-419>

Введение

Магний как внутриклеточный катион участвует во многих биохимических процессах в организме человека [1, 2] и является одним из макроэлементов, который наиболее часто принимают дополнительно в виде добавок к пище. Недостаточное потребление магния распространено среди населения ряда стран [2], однако до настоящего времени нет единого мнения о том, какая доза магния может считаться

физиологической и каков верхний уровень потребления магния. Европейское управление по безопасности пищевых продуктов (European Food Safety Authority, EFSA) и Институт медицины (Institute of Medicine, IoM¹) установили верхний уровень потребления магния при приеме пищевых добавок до 250 и 350 мг соответственно². Согласно данным UpToDate®, среднее ежедневное потребление магния составляет 360 мг (15 ммоль)³. В Российской

¹ С 2015 года Институт медицины — Национальная академия медицины США (National Academy of Medicine, NAM).

² <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.2903/j.efsa.2015.4186>

³ Alan SLYu. Regulation of magnesium balance. https://www.uptodate.com/contents/regulation-of-magnesium-balance?search=magnesium&topicRef=834&source=see_link

Федерации, согласно методическим рекомендациям МР 2.3.1.0253-21. 2.3.1⁴, уточненная физиологическая потребность магния для взрослых составляет 420 мг/сут. О необходимости корректировки референсных значений при потреблении магния было указано на рабочей конференции (май 2021 г.) по магнию, неврологии и питанию в условиях пандемии COVID⁵.

Недостаток магния в организме может быть скомпенсирован приемом препаратов, содержащих соли магния. Современный фармацевтический рынок предлагает потребителю большое количество препаратов магния (органических и неорганических солей) в различных лекарственных формах (таблетки, капсулы, порошки и суспензии для приема внутрь, таблетки жевательные и др.)⁶. В Европе и США данные препараты относятся к биологическим добавкам, и их обращение регулируется соответственно Европейским управлением по безопасности пищевых продуктов (European Food Safety Authority, EFSA)⁷ и Управлением по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств (Food and Drug Administration, FDA)⁸. В Российской Федерации и на территории государств — членов Евразийского экономического союза (ЕАЭС) препараты, содержащие соли магния, регистрируются для обращения на фармацевтическом рынке как лекарственные препараты (ЛП)⁹, при этом может потребоваться проведение клинических исследований сравнительной биодоступности препарата.

Первые статьи, посвященные медицинскому применению магния, можно проследить от 1697 г. [3], однако знания о фармакокинетике ЛП, содержащих соли магния, остаются ограниченными.

Цель работы — провести систематический обзор результатов клинических исследований по изучению биодоступности ЛП, содержащих магний, оценить используемые методы определения эндогенного уровня магния и необходимость корректировки фармакокинетических параметров с учетом выявленных эндогенных значений магния.

Следует уточнить, что большая часть опубликованных систематических обзоров и метаанализов касается терапевтического применения магния, нашей задачей было изучение биодоступности и оценка эндогенного уровня магния в клинических исследованиях.

Материалы и методы

В работе над данным систематическим обзором был использован информационно-аналитический метод для оценки имеющихся данных по проведению фармакокинетических исследований биодоступности *in vivo* препаратов магния.

Текст структурирован в соответствии с пошаговой инструкцией для написания систематического обзора — PRISMA 2020 [4].

Источники информации. Поиск выполнялся по запросам:

- 1) на официальных сайтах регуляторных органов США и Европы¹⁰;
- 2) в поисковой системе Google, базах данных PubMed, UpToDate®, ClinicalTrials.gov по ключевым словам, а затем по спискам литературы в найденных статьях, опубликованных за последние 5 лет (с 2016 по 2021 г.) в информационно-телекоммуникационной сети Интернет.

Критерии первичного поиска. Использовались ключевые слова «magnesium comparative bioavailability» и фильтры: «Review», «Systematic review», «Meta-analysis», а также «Clinical trial», «Randomised controlled trial», также фильтр «За последние 5 лет». Результаты, полученные по разным фильтрам, представлены на *рисунке 1*.

Критерии включения. Подходящие публикации выбирали по принципу PICOS (population, intervention, comparison, outcomes, and study) [5]. Пациенты (P): от 18 лет здоровые добровольцы обоего пола. Тип вмешательства (I): взятие крови и(или) мочи для исследования концентрации магния. Группа сравнения (C): нет. Исходы (O): подтверждение или опровержение сопоставимой биодоступности магния. Типы исследований (S): работы, в которых проводилась

⁴ МР 2.3.1.0253-21. Нормы физиологических потребностей в энергии и пищевых веществах для различных групп населения Российской Федерации. Методические рекомендации. Москва; 2021.

⁵ 2° Workshop on magnesium, neuroscience and nutrition — in current Covid pandemia. <https://www.mdpi.com/journal/nutrients/events/13123>

⁶ <https://grls.rosminzdrav.ru>

⁷ <https://www.efsa.europa.eu/en>

⁸ <https://www.fda.gov>

⁹ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза». Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 78 «О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения».

¹⁰ <https://www.efsa.europa.eu/en>
<https://www.fda.gov>

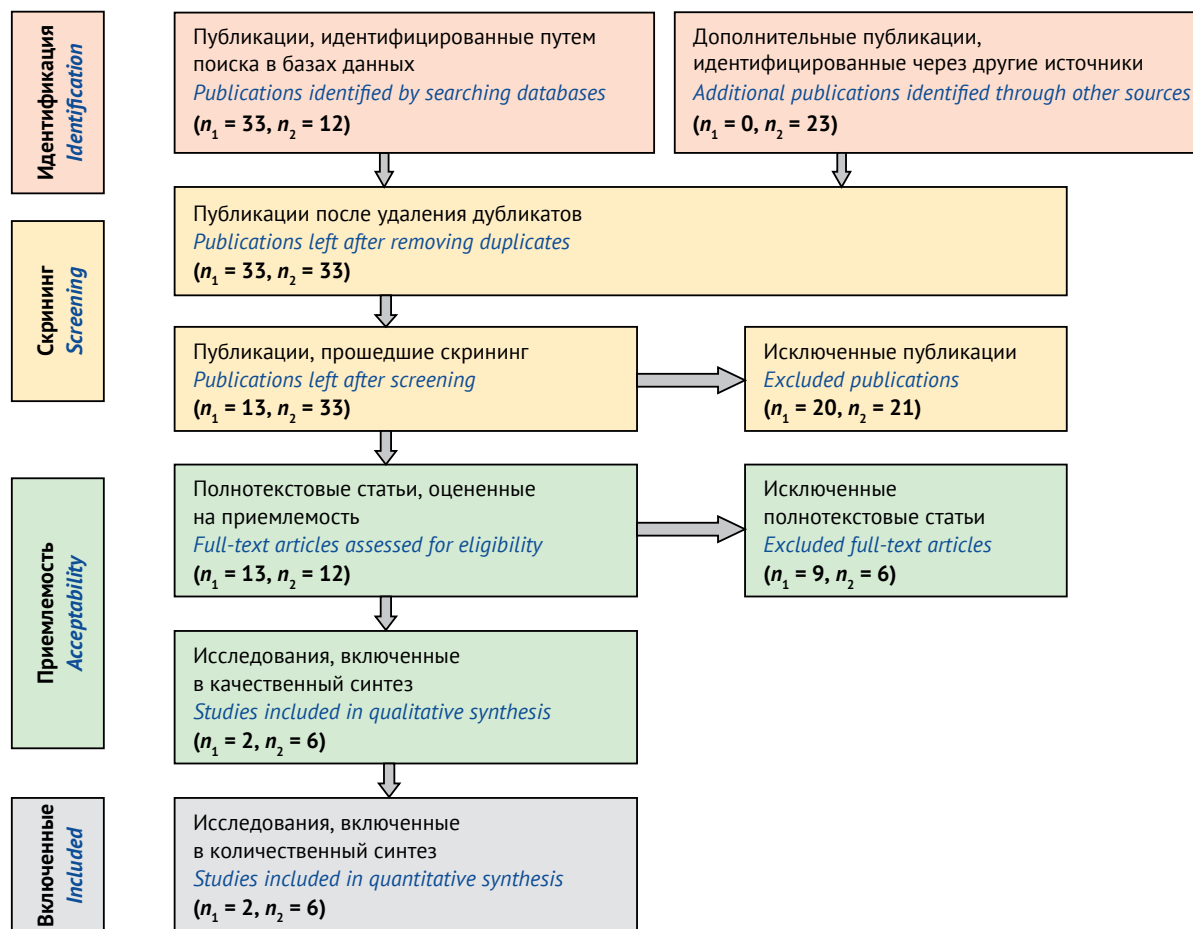


Рис. 1. Алгоритм отбора статей для систематического обзора (n_1 – число публикаций с фильтрами «Review» и «Systematic review», n_2 – число публикаций с фильтрами «Clinical trial» и «Randomised controlled trial»)

Fig. 1. Algorithm for selecting articles for the systematic review (n_1 – number of publications identified with the filters “Review” and “Systematic review”; n_2 – number of publications identified with the filters “Clinical trial” and “Randomised controlled trial”)

сравнительная оценка биодоступности магния из ЛП (пищевых добавок).

Критерии не включения. Работы, в которых изучалась биодоступность магния *in vitro*, на животных, из продуктов питания или растительного сырья.

Результаты и обсуждение

При поиске в изучаемых базах данных по ключевым словам «magnesium comparative bioavailability» с фильтрами «Review» и «Systematic review» за последние 5 лет было найдено 33 результата. 20 статей не содержали данных по биодоступности магния, 9 статей были посвящены биодоступности магния, но не из ЛП. И только 2 статьи отвечали поисковому запросу (рис. 1).

Последний из рассмотренных нами систематических обзоров, посвященных исследованиям биодоступности магния, был опубликован

в 2021 г. М.Р. Pardo и соавт. [6]. В нем проанализированы исследования биодоступности магния, опубликованные в базах данных PubMed, Cochrane, Web of Science, Scopus. Было найдено 443 исследования, из них только 14 соответствовали поисковому запросу. Выводы, которые сделали авторы:

- неорганические препараты магния менее биодоступны, чем органические, однако степень всасывания зависит от дозы и уменьшается с увеличением дозы магния;
- все пищевые добавки, содержащие магний, могут поддерживать содержание данного элемента у здоровых людей на физиологическом уровне без предшествующего дефицита, однако подобный результат не может быть гарантирован у пожилых пациентов, пациентов с заболеваниями или с предыдущим субфизиологическим уровнем магния;
- исследования биодоступности магния проводятся исходя из значений эндогенного уровня

магния в плазме. В клинических исследованиях биодоступности магния в качестве параметра мониторинга использовали почечную экскрецию (при соблюдении условия, что поглощение магния и его высвобождение тканями находятся в равновесии).

Важной составляющей всех исследований, описанных в обзоре [6], было изучение эндогенного уровня магния у субъектов до исследования, а также контроль потребления продуктов, богатых магнием, на протяжении всего исследования.

В систематическом обзоре, опубликованном в 2017 г. J.P. Schuchardt и соавт. [7], также обозначалась необходимость оценки эндогенного статуса магния. Авторы отмечают, что обычные исследования биодоступности, которые контролируют уровни магния в плазме крови после перорального приема, недостаточны для изучения скорости и количества всасывания магния, поскольку магний в плазме подвержен быстрому гомеостазу, который в основном обусловлен почечной экскрецией (за более высокой абсорбцией обычно следует более высокая экскреция данного элемента) и последующим накоплением в костной ткани [8]. Активная реабсорбция магния из первичной мочи в почках обеспечивает поступление в плазму примерно в 20 раз больше магния по сравнению с тем количеством, которое всасывается в кишечном тракте. Оставшийся магний выводится с мочой. Таким образом, базовые уровни магния в плазме быстро регулируются организмом, что затрудняет оценку точных кривых «концентрация – время».

По запросу в базе данных PubMed и в ClinicalTrials.gov по поисковым словам «magnesium comparative bioavailability» и фильтрам «Clinical trial», «Randomised controlled trial» и «За последние 5 лет», было обнаружено 35 результатов, 29 из них не соответствовали критериям поиска – не было информации по магнию. Каждое исследование рассматривалось отдельно, в виде полнотекстовой статьи, чтобы выявить, изучался ли эндогенный уровень магния до исследования (рис. 1). Полученные результаты представлены в таблице 1.

Исследование M.K. Dolberg и соавт. [9] посвящено изучению сравнительной фармакокинетики различных лекарственных форм магния гидроксида: пероральной и для внутривенных инъекций. Дизайн исследования предусматривал три периода: 1 сут – оценивали эндогенный уровень, взятие крови для оценки эндогенного уровня проводили во всех точках забора крови, которые были запланированы для исследуемых

препаратов, 2 сут – добровольцы принимали внутрь магния гидроксид 360 мг, 3 сут – проводили внутривенное болюсное введение магния сульфата 2 г. Концентрацию магния определяли в плазме крови и в моче, собранной за четыре 6-часовых интервала отбора проб. Корректировка значения площади под кривой «концентрация–время» AUC_{0-24} была сделана путем вычитания значения эндогенного уровня магния в плазме до применения препаратов (1 сут исследования) из значений, полученных после применения препарата. Биодоступность гидроксида магния составляла 15%, и данный результат, по мнению авторов, представляет собой клинически значимый вариант для пероральных добавок магния. В исследовании была выбрана относительно высокая доза магния для того, чтобы вызвать заметный прирост определяемого элемента в плазме по отношению к его эндогенному уровню. Однако данный выбор может привести к меньшей биодоступности магния, так как известен факт, что чем меньше нагрузочная доза магния, тем больше его степень всасывания [6, 7, 10, 11].

Обращает на себя внимание, что значения эндогенной концентрации магния в некоторых точках отбора проб крови были выше значений его концентраций после приема перорального препарата. Авторы отмечают, что у одного добровольца был высокий эндогенный уровень магния в плазме крови, что привело к тому, что после вычитания из значений AUC после применения препарата магния корректируемое значение AUC_{0-24} стало ниже нуля. Таким образом, для данного субъекта исследования биодоступность была обозначена как ноль. Фактически этот результат можно рассматривать как выброс, который смог бы исказить результаты, если бы не проводилась оценка эндогенного фона и необходимая корректировка значения AUC .

Авторы работы [9] считают, что традиционная стратегия с определением доли активного вещества, поступающего в кровь при заданной пероральной нагрузке, может быть сомнительной для макронутриентов, таких как магний. Следует учитывать компоненты, влияющие на абсорбцию магния, а также эндогенный уровень магния в плазме, который проблематично отличить от увеличения его концентрации после применения препаратов, содержащих магний. Авторы делают вывод, что изучение уровня магния в сыворотке по-прежнему преобладает в клинических исследованиях и представляет собой довольно быстрый метод. Также допустимость и пригодность определения магния

Таблица 1. Клинические исследования биодоступности препаратов магния, описанные в открытых источниках литературы за 2016–2021 гг.**Table 1.** Clinical studies of the bioavailability of magnesium preparations reported in the open-source literature for 2016–2021.

Год исследования, ссылка <i>Year of research, reference</i>	Изучаемые препараты <i>Studied medicinal products</i>	Количество добровольцев <i>Number of volunteers</i>	Биоматериал и точки забора <i>Biomaterial and sampling points</i>	Метод определения концентрации магния <i>Method for determination of magnesium concentration</i>	Результат <i>Result</i>	Примечание <i>Note</i>
2017 [10]	360 мг магния гидроксида (перорально); 2 г магния сульфата (внутривенное болюсное введение) <i>360 mg magnesium hydroxide (oral); 2 g magnesium sulfate (intravenous bolus injection)</i>	10 здоровых мужчин <i>10 healthy men</i>	Образцы крови (плазма) собирали перед введением дозы препарата (эндогенный уровень), через 15, 30, 60, 90 и 120 мин, через 3, 4, 6, 8, 12 и 24 ч после введения препарата. Образцы мочи собирали за четыре 6-часовых периода в день исследования <i>Blood (plasma) samples were collected before dosing (endogenous level), at 15, 30, 60, 90, and 120 min, and at 3, 4, 6, 8, 12, and 24 h after dosing. Urine samples were collected over four 6-h periods on the day of the study</i>	Фотометрия поглощения с помощью хромогенной реакции (для анализа образцов плазмы и мочи) <i>Absorption photometry by chromogenic reaction was used to analyse plasma and urine samples</i>	Биодоступность гидроксида магния составила 14,9% (ДИ: 8,3; 26,8). Экскреция магния с мочой увеличилась на 17,7% (ДИ: 8,9; 35,0) от исходного уровня <i>The bioavailability of magnesium hydroxide was 14.9% (CI: 8.3; 26.8). Urinary magnesium excretion increased by 17.7% (CI: 8.9; 35.0) from the baseline</i>	Перекрестный дизайн исследования с пероральным и внутривенным введением препаратов магния. Диета до и во время исследования* <i>The study used cross-over design with oral and intravenous magnesium preparations. Participants followed diet recommendations before and during the studies*</i>
2018 [12]	350 мг магния оксида в матрице из фосфолипидов и сложных эфиров сахарозы, 350 мг магния оксида, 350 мг магния цитрата, 350 мг магния бисглицината <i>350 mg magnesium oxide (phospholipid-sucrose matrix), 350 mg magnesium oxide, 350 mg magnesium citrate, 350 mg magnesium bisglycinate</i>	10 здоровых добровольцев (4 мужчин и 6 женщин) <i>10 healthy volunteers (4 men and 6 women)</i>	Образцы крови (сыворотка и эритроциты) и мочи собирали в моменты времени 0 (эндогенный уровень), 2, 4, 8 и 24 ч <i>Blood (serum and erythrocytes) and urine samples were collected at time points 0 (endogenous level), 2, 4, 8 and 24 h</i>	Содержание магния в эритроцитах определяли методом атомно-абсорбционной спектрофотометрии. Образцы мочи были проанализированы на центробежном анализаторе Monarch <i>Magnesium content in erythrocytes was measured by atomic absorption spectrophotometry. Urine samples were analysed using a Monarch centrifugal analyser</i>	Отмечена статистически значимая большая биодоступность магния из изучаемого состава по сравнению с другими препаратами, однако очевидная клиническая значимость не ясна <i>The studied composition demonstrated significantly higher bioavailability of magnesium in comparison with the other medicines; however, the clinical significance of this fact is not obvious</i>	Отмечена высокая вариабельность эндогенных значений экскреции магния с мочой в разных группах, при этом у данных пациентов эндогенные значения магния в сыворотке крови и эритроцитах значимо не отличались <i>The endogenous values of urinary magnesium excretion varied largely in different groups, while the endogenous values of magnesium in serum and erythrocytes in the same patients did not differ significantly</i>

Продолжение таблицы 1

Table 1 (continued)

Год исследования, ссылка <i>Year of research, reference</i>	Изучаемые препараты <i>Studied medicinal products</i>	Количество добровольцев <i>Number of volunteers</i>	Биоматериал и точки забора <i>Biomaterial and sampling points</i>	Метод определения концентрации магния <i>Method for determination of magnesium concentration</i>	Результат <i>Result</i>	Примечание <i>Note</i>
2019 [13]	Магния цитрат (400 мг) и магния оксид (400 мг) <i>400 mg magnesium citrate and 400 mg magnesium oxide</i>	14 здоровых мужчин <i>14 healthy men</i>	Образцы крови собирали в моменты времени: 0 (эндогенный уровень), 2, 4, 8 и 24 ч. Образцы мочи — в течение 24 ч после приема препарата <i>Blood samples were collected at time points 0 (endogenous level), 2, 4, 8 and 24 h. Urine samples were collected over 24 h after dosing</i>	Методы не описаны <i>The methods are not described</i>	Отмечено статистически значимое увеличение экскреции магния с мочой в течение 24 ч после применения цитрата магния. В плазме крови отмечалось статистически значимое повышение концентрации магния после применения магния цитрата, чем после применения магния оксида в течение 4 ч и 8 ч <i>The study showed a significant increase in the urinary magnesium excretion within 24 hours after the administration of magnesium citrate. The increase in plasma magnesium concentration at 4-h and 8-h points after the administration of magnesium citrate was significantly higher than with magnesium oxide</i>	Предварительно проводился дополнительный прием препаратов магния (400 мг) в течение 5 сут <i>Preliminary 5-day intake of magnesium preparations (400 mg)</i>
2020 [14]	Два препарата магния (500 мг): с немедленным высвобождением и с двухфазным отсроченным высвобождением <i>Two 500-mg formulations of magnesium: an immediate-release one and a biphasic, delayed-release one</i>	20 здоровых добровольцев (10 мужчин и 10 женщин) <i>20 healthy volunteers (10 men and 10 women)</i>	Образцы крови (сыворотка) — в исходном состоянии (эндогенный уровень) и после приема препаратов через 1, 2, 3, 4, 6 и 8 ч. Образцы мочи собирали в течение 24 ч <i>Blood (serum) samples were collected at the baseline (endogenous level) and 1, 2, 3, 4, 6, and 8 h after dosing. Urine samples were collected over 24 h</i>	Методы не описаны <i>The methods are not described</i>	Не было выявлено существенных различий между тестируемыми препаратами в отношении 24-часовой почечной экскреции магния и площади под кривой концентрации магния в сыворотке крови в течение 8 ч <i>There was no significant difference between the tested products regarding 24-hour renal magnesium excretion and the area under the curve of serum magnesium levels over 8 h</i>	Исследование было проведено натощак, после диеты. Стандартизированное питание во время исследования** <i>Participants followed diet recommendations and fasted overnight before the study; they consumed standardised meals during the study**</i>

Продолжение таблицы 1

Table 1 (continued)

Год исследования, ссылка <i>Year of research, reference</i>	Изучаемые препараты <i>Studied medicinal products</i>	Количество добровольцев <i>Number of volunteers</i>	Биоматериал и точки забора <i>Biomaterial and sampling points</i>	Метод определения концентрации магния <i>Method for determination of magnesium concentration</i>	Результат <i>Result</i>	Примечание <i>Note</i>
2020 ¹¹ [15]	300 мг магния хлорида по сравнению с плацебо <i>300 mg magnesium chloride versus placebo</i>	17 здоровых добровольцев (7 мужчин и 10 женщин) <i>17 healthy volunteers (7 men and 10 women)</i>	Образцы крови собирали натощак (за 15 мин до введения дозы) и затем в 0; 0,5; 1; 2; 4; 6; 8 ч и через 24 ч после дозирования. Образцы мочи собирали за 15 мин до приема препарата и затем в 2, 4, 6, 8, 12 и 24 ч после приема <i>Blood samples were obtained starting with a fasting sample (15 min before dosing) and then at 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, and 24 h after dosing. Urine samples were collected 15 min before dosing, and total urine was collected at 2, 4, 6, 8, 12, and 24 h after dosing</i>	Концентрацию iMg в цельной крови определяли с использованием электролитного анализатора Nova 8 (Nova Biomedical, Waltham, MA, США). Концентрацию totalMg в сыворотке крови и общее содержание магния в моче определяли методом атомно-абсорбционной спектроскопии [21] <i>The whole blood iMg concentration was determined using a Nova 8 electrolyte analyser (Nova Biomedical, Waltham, MA, USA). The concentrations of serum totalMg and urine totalMg were determined by atomic absorption spectrometry [21]</i>	Было отмечено большее увеличение концентрации iMg, но не totalMg в сыворотке крови или магния в моче (данной дозы недостаточно для статистически достоверного повышения totalMg) <i>A higher increase was noted in the concentration of iMg, but not in the serum or urine totalMg (the tested dose is not sufficient for a significant increase in totalMg)</i>	Пилотное плацебо-контролируемое исследование. После завтрака с низким содержанием магния. iMg цельной крови может быть более чувствительным показателем при пероральном приеме магния по сравнению с totalMg сыворотки и мочи и может быть предпочтительным для оценки биодоступности добавок. Вывод о том, что однократная доза 300 мг магния может изменить iMg, но не общий totalMg в сыворотке крови, предполагает, что метод оценки iMg более чувствителен*** <i>A pilot placebo-controlled study conducted after a low-magnesium breakfast. The whole blood iMg, compared to the serum and urine totalMg, may be a more sensitive indicator for oral magnesium intake and may be preferable for assessing the bioavailability of supplements. The superior sensitivity of iMg is suggested by the finding that a single 300-mg dose of Mg may alter the whole blood iMg, but not the serum totalMg***</i>

¹¹ Bioavailability of Single-dose Magnesium Salts. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04139928>

Продолжение таблицы 1

Table 1 (continued)

Год исследования, ссылка <i>Year of research, reference</i>	Изучаемые препараты <i>Studied medicinal products</i>	Количество добровольцев <i>Number of volunteers</i>	Биоматериал и точки забора <i>Biomaterial and sampling points</i>	Метод определения концентрации магния <i>Method for determination of magnesium concentration</i>	Результат <i>Result</i>	Примечание <i>Note</i>
2020 [16] ¹²	Магния оксид 400 мг/сут 10 недель в сравнении с плацебо <i>400 mg/day magnesium oxide for 10 weeks versus placebo</i>	59 здоровых добровольцев старше 55 лет (39 включены в конечный отчет) <i>59 healthy volunteers over 55 years old (39 included in the final report)</i>	Образцы крови (iMg в цельной крови, totalMg в сыворотке крови) собирали начиная с образца натощак (до введения дозы) и через 10 недель применения препарата <i>Blood samples (whole blood iMg, serum tMg) were obtained starting with a fasting sample (before dosing) and then after 10 weeks of dosing</i>	iMg в цельной крови измеряли через 10 мин после сбора с помощью газоанализатора крови pHox® Ultra. Измерения iMg в сыворотке крови проводили колориметрическим методом на анализаторе Roche cobas c501 (Roche Diagnostics, США) <i>The whole blood iMg was measured 10 min after sample collection, using a pHox® Ultra blood gas analyser. Serum totalMg measurements were performed using colourimetric analysis on a Roche cobas c501 analyser (Roche Diagnostics, Indianapolis, USA)</i>	Прием магния в течение 10 недель приводил к увеличению концентрации iMg. При использовании охлажденной и замороженной сыворотки результаты измерений iMg были завышенными по сравнению с измерениями, проведенными в свежей цельной крови <i>The 10-week magnesium supplementation resulted in an iMg concentration increase. Compared to the measurements in fresh whole blood, refrigerated and frozen samples consistently led to overestimation of the iMg concentration</i>	Отмечена умеренная и положительная связь между базовыми (эндогенными) концентрациями iMg и totalMg <i>The study demonstrated a moderate and positive relationship between baseline (endogenous) concentrations of iMg and totalMg</i>

Примечание. ДИ – доверительный интервал; iMg – ионизированный магний; totalMg – общий магний.

* Было исключение значения концентрации одного добровольца из-за высокого значения эндогенного уровня магния.

** Были обнаружены статистически значимые различия в значении эндогенного уровня концентрации магния в сыворотке крови натощак между разными днями обследования.

*** Были обнаружены циркадные ритмы колебания iMg, а также общего магния в сыворотке или моче.

Note. CI, confidence interval; iMg, ionised magnesium; totalMg, total magnesium.

* There was an exclusion of the concentration value for one volunteer due to the high endogenous magnesium level.

** Endogenous fasting serum magnesium concentrations differed significantly on different examination days.

*** The study found circadian rhythms of iMg and serum or urine totalMg fluctuations.

в сыворотке подтверждается относительно низкими уровнями как CV_{intra} , так и CV_{inter} концентрации сывороточного магния, в отличие от уровней CV_{intra} и CV_{inter} 24-часовой экскреции магния с мочой, обнаруженных в исследовании [9].

В другом двойном слепом перекрестном исследовании E. Brilli и соавт. [12] сравнивали биодоступность магния при приеме Sucrosomial® magnesium (препарат оксида магния в матрице из фосфолипидов и сложных эфиров сахарозы, которые увеличивают проницаемость кишечного барьера и позволяют активному веществу

достигать кровотока, не взаимодействуя со слизистой оболочкой желудка) в сравнении с другими препаратами магния, такими как оксид, цитрат и бисглицинат. Концентрация магния определялась в сыворотке крови, эритроцитах и моче на исходном уровне и через 2, 4, 8 и 24 ч после применения 350 мг магния в разных формах. Корректировку результатов определения концентрации магния с учетом эндогенных значений не проводили, так как сравнение между эндогенным уровнем магния в сыворотке, эритроцитах и моче (табл. 2) и концентрацией магния, полученной через 24 ч после применения

¹² Magnesium supplementation for the prevention of supraventricular arrhythmias. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02837328>

Таблица 2. Значения эндогенной концентрации магния в исследуемых биологических жидкостях согласно источникам литературы за 2016–2021 гг.

Table 2. Endogenous magnesium concentrations in biological fluids according to the analysed open-source literature for 2016–2021

Исследуемый препарат <i>Test product</i>	Эндогенная концентрация магния <i>Baseline magnesium concentrations</i>				Уровень значимости <i>P-value</i>
	Сыворотка крови <i>Blood</i>	Эритроциты <i>Erythrocytes</i>	Ионизированный магний (iMg) <i>Ionised magnesium</i>	Моча <i>Urine</i>	
По данным E. Brilli и соавт., 2018 [12]; (концентрация магния, мг/дл) <i>According to E. Brilli et al., 2018 [12]; (magnesium concentration, mg/dL)</i>					
Sucrosomial® magnesium	1,93 ± 0,20	4,84 ± 0,49	–	5,69 ± 2,39	–
Магния цитрат <i>Magnesium citrate</i>	1,99 ± 0,11	4,68 ± 0,57	–	4,74 ± 3,07	
Магния оксид <i>Magnesium oxide</i>	2,05 ± 0,11	4,91 ± 0,59	–	7,88 ± 3,07	
Магния биглицинат <i>Magnesium bisglycinate</i>	2,02 ± 0,13	5,09 ± 0,59	–	8,04 ± 5,49	
По данным T. Greupner и соавт., 2020 [14]; (концентрация магния, ммоль/л) <i>According to T. Greupner et al., 2019 [14]; (magnesium concentration, mmol/L)</i>					
2 P (1) — препарат с двух- фазным отсроченным высвобождением, первый период <i>2 P (1): two-phase delayed- release product, period 1</i>	0,81 ± 0,05	–	–	3,66 ± 1,64	0,002 (для значений в сыворотке крови / <i>for serum Mg values</i>)
2 P (2) — препарат с двух- фазным отсроченным высвобождением, второй период <i>2 P (2): two-phase delayed- release product, period 2</i>	0,82 ± 0,04**	–	–	3,58 ± 2,08	0,733 (для значений в моче / <i>for urine Mg values</i>)
1 P (1) — препарат с немедленным высвобож- дением, первый период <i>1 P (1): immediate release product, period 1</i>	0,85 ± 0,05*	–	–	4,05 ± 2,27	
1 P (2) — препарат с немедленным высвобож- дением, второй период <i>1 P (2): immediate release product, period 2</i>	0,85 ± 0,05*	–	–	3,77 ± 2,07	
По данным J. Zhan и соавт., 2020 [15]; (концентрация магния, мг/дл)*** <i>According to J. Zhan, et al., 2020 [15]; (magnesium concentration, dL)***</i>					
Плацебо <i>Placebo</i>	1,95 (1,78–3,30)	–	1,25 ± 0,008	2,90 (0,81– 47,15)	0,491 (для значений в сы- воротке крови / <i>for serum Mg values</i>),
Магния хлорид <i>Magnesium chloride</i>	2,08 (1,76–3,19)	–	1,26 ± 0,01	2,95 (0,35– 88,63)	0,242 (для значений iMg / <i>for iMg values</i>), 0,267 (для значений в моче / <i>for urine Mg values</i>)

Примечание. «–» — нет данных.

* Значения статистически не отличаются ($p > 0,05$, парный t-критерий с уровнем значимости, скорректированным по Бонферрони).

** Значение статистически достоверно отличается от других результатов, полученных в данном исследовании ($p < 0,05$).

*** Значения представлены как среднее (Mean) ± стандартное отклонение (SD) или медиана (Median) — диапазон в зависимости от нормальности распределения данных.

Note. —, no data available.

* The values do not differ significantly ($p > 0.05$, paired t-test with Bonferroni's adjustment).

** The values indicate a significant difference from the other results obtained in this study ($p < 0.05$).

*** The values are given as the mean ± SD or the median (range) depending on the normality of the data distribution.

препаратов (в сыворотке, эритроцитах и моче), выполняли с применением соответствующих статистических методов оценки. В исследовании было показано, что изучаемый препарат магния в лекарственной форме с замедленным высвобождением имеет максимальную биодоступность, так как концентрация магния статистически значимо увеличилась во всех анализируемых биологических жидкостях через 24 ч. Следует отметить, что определение количества абсорбированного магния на основании результатов определения магния, выведенного с мочой, в образце, взятом через 24 ч после приема дозы препарата, может являться неточным [12].

Обращают на себя внимание эндогенные значения экскреции магния с мочой, у некоторых пациентов отмечена большая вариабельность данных значений в разных группах, при этом у них же эндогенные значения магния в сыворотке крови и эритроцитах значимо не отличались (табл. 2). Схожие результаты, демонстрирующие высокую вариабельность значений магния в моче, были отмечены в исследовании M.K. Dolberg и соавт. [9].

В исследовании T. Werner и соавт. [13] при оценке сравнительной биодоступности оксида и цитрата магния было подтверждено, что органические соли магния более биодоступны, чем его оксид или неорганические соли. В качестве первичной конечной точки авторы использовали величину экскреции магния с мочой. Значение эндогенного уровня магния оценивали только в одной нулевой точке забора крови.

T. Greupner и соавт. [14] было проведено сравнение биодоступности двух препаратов, содержащих по 500 мг магния оксида, с различным типом высвобождения: препарат с немедленным высвобождением (одна фаза) сравнивали с препаратом с отсроченным двухфазным высвобождением (одна фаза немедленного высвобождения 250 мг, вторая фаза отсроченного высвобождения 250 мг). В данном исследовании первичной конечной точкой для определения биодоступности была 24-часовая экскреция магния с мочой, а вторичная конечная точка — площадь под кривой «концентрация–время» сывороточного магния в течение 8 ч (AUC_{0-8}). Кроме того, оценивали эндогенный уровень магния в сыворотке крови и моче. Все полученные значения концентрации магния в сыворотке были скорректированы с учетом их соответствующих эндогенных уровней. Значение AUC_{0-8} магния сыворотки рассчитывалось по правилу трапеций без учета площади ниже

базовой линии. Каждый препарат принимался дважды с периодом «отмывки»; таким образом, было четырехкратное применение препаратов. Биодоступность магния не различалась между исследуемыми препаратами как по первичной, так и по вторичной конечным точкам. Самая высокая экскреция магния наблюдалась в течение 0–6 ч после приема исследуемых препаратов, что соответствует данным других исследований [10, 12]. Однако были обнаружены статистически значимые различия в значении эндогенного уровня магния в сыворотке крови натощак ($p = 0,002$, по результатам дисперсионного анализа ANOVA) между разными днями обследования (табл. 2), отмеченные колебания находились в пределах 5%. Полученные данные согласуются с результатами исследования вариабельности эндогенного уровня магния [2].

Следующие два исследования [15, 16] схожи тем, что для оценки биодоступности магния в качестве первичной конечной точки проводилась оценка концентрации ионизированного магния (iMg). В последнее время считается, что iMg может быть более физиологически релевантным маркером, чем общий магний (totalMg). Для оценки концентрации магния в сыворотке крови традиционно используют величину totalMg как в клинических, так и в исследовательских целях. Необходимо учитывать, что 20–30% от общего содержания магния в сыворотке связано с белками и считается физиологически неактивным, тогда как iMg составляет 60–70% от totalMg [17, 18] и считается биологически активной формой магния в сыворотке крови [19]. Однако величина iMg нечасто используется в клинических исследованиях, вероятно, потому, что для этого требуется немедленный анализ iMg цельной крови и для измерения требуется специальное оборудование [15].

J. Zhan и соавт. [15] провели пилотное рандомизированное плацебо-контролируемое исследование для оценки биодоступности магния из пероральных добавок, содержащих хлорид магния. Оценивались следующие значения: концентрация iMg в цельной крови, концентрация totalMg в сыворотке крови и общее содержание магния в моче в течение 24 ч после приема добавки или плацебо. Также определяли эндогенный уровень iMg и totalMg. В данном исследовании важно наличие плацебо, которое позволило наблюдать циркадные ритмы колебания iMg, а также магния в сыворотке или моче.

Необходимо отметить, что получены разные значения эндогенной концентрации iMg, totalMg

и магния в моче в разные дни исследования с большим интерквартильным размахом в значениях (табл. 2). В данном исследовании не проводили корректировку полученных значений параметров фармакокинетики, так как значения сравнивали с таковыми, полученными в группе плацебо.

После введения хлорида магния регистрировалось статистически значимое (по сравнению с плацебо) увеличение концентраций iMg (параметры AUC и C_{max}), но не totalMg в сыворотке или магния в моче. Авторы делают вывод, что оценка iMg в цельной крови является более чувствительным методом для изучения биодоступности магния из препаратов. В данном исследовании показано, что прием 300 мг хлорида магния был недостаточным для повышения значения магния в крови, а значение iMg отражает количество магния, полученное добровольцами с пищей (диетическое значение).

M.R. Rooney и соавт. [16] провели пилотное двойное слепое рандомизированное плацебо-контролируемое исследование. Задачами исследования было выяснить, насколько пероральные добавки магния увеличат концентрацию iMg по сравнению с плацебо, и оценить взаимосвязь между iMg и totalMg на исходном уровне, а также оценить влияние приема магния на возникновение наджелудочковых аритмий. В исследовании принимали участие пациенты, не имеющие сердечно-сосудистых заболеваний, стратифицированные по возрасту: <65 лет и >65 лет. Участники принимали препарат, содержащий цитрат магния (400 мг/день), в течение 10 недель или плацебо. Забор крови проводился в начале исследования для определения эндогенного уровня iMg в цельной крови и totalMg в сыворотке крови и по истечении 10 недель. Для оценки зависимости увеличения концентрации iMg после применения препарата магния был использован метод линейной регрессии. Базовый уровень iMg был включен в качестве ковариаты для повышения точности расчетов [20]. Результаты показали, что эндогенные уровни iMg и totalMg имели умеренную и положительную связь (по классификации тесноты взаимосвязи по Чеддоку, коэффициент Пирсона $r = 0,50$, $p < 0,001$), при этом отношение эндогенного уровня iMg к totalMg составляло 64%.

Были получены следующие результаты: применение 400 мг магния в течение 10 недель повысило значение концентрации iMg, однако полученное значение статистически значимо не отличалось от эндогенного уровня iMg.

Результаты различных исследований, проведенных для анализа биодоступности магния, могут оказаться противоречивыми из-за использования разных методологий анализа. Согласно M.R. Pardo и соавт. [6], не существует стандартизированного протокола для изучения биодоступности различных форм магния в качестве пищевых добавок. Это делает дизайн каждого исследования уникальным, и результаты могут быть несопоставимы, даже если используется один и тот же препарат [6].

Так, сравнение результатов проанализированных клинических исследований затруднено из-за различия в установлении и контроле зависимых и независимых переменных. В одних исследованиях эндогенные значения магния рассматривались как независимые переменные и с ними сравнивали значения, полученные после применения препаратов [12, 15, 16]. В других исследованиях эндогенные значения магния рассматривались как ковариата, влияющая на полученные значения и требующая обязательного учета [20]. И только в двух исследованиях [13, 14] была проведена корректировка фармакокинетических параметров согласно требованиям Европейского агентства по лекарственным средствам (European Medicines Agency, EMA)¹³, а также FDA¹⁴ и ЕАЭС¹⁵, с вычитанием эндогенных значений из значений, полученных после применения препаратов.

На сегодня авторы не перестают дискутировать о том, что является первичной, а что вторичной конечной точкой для оценки биодоступности магния. В одних исследованиях на первое место ставится величина экскреции магния с мочой [13, 14], в других — концентрация магния в плазме или сыворотке крови [9, 12, 15, 16].

Во всех без исключения работах определяли эндогенные значения магния. В большинстве исследований определяли эндогенный уровень магния во всех точках забора крови, и данный факт позволил избежать ошибок и неправильной трактовки результатов. Были обнаружены

¹³ CPMP/EWP/QWP/1401/98 Rev. 1. Guideline on the investigation of bioequivalence. EMA; 2010.

¹⁴ FDA-2013-D-1464. Bioequivalence studies with pharmacokinetic endpoints for drugs submitted under an abbreviated new drug application. FDA; 2021.

¹⁵ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза».

статистически значимые различия в значении эндогенного уровня концентрации магния в сыворотке крови натошак между разными днями обследования [14]; определены циркадные ритмы колебания iMg, а также общего магния в сыворотке или моче [16]; отмечена большая вариабельность эндогенных значений экскреции магния с мочой в разных группах [12]; из-за высокого значения эндогенного уровня магния было исключено значение концентрации одного добровольца из анализа [9].

Заклучение

Проанализированы результаты клинических исследований по изучению биодоступности лекарственных препаратов, содержащих магний, описанные в открытых источниках литературы за 2016–2021 гг. и отобранные по принципу

PICOS (population, intervention, comparison, outcomes, and study). Было показано, что определение эндогенного уровня магния в рамках изучения его биодоступности – это важный этап, который нельзя игнорировать.

Без проведения коррекции значений фармакокинетических параметров магния (вычитание фоновых значений из полученных значений после применения препарата) для расчета истинных показателей C_{max} и AUC, обусловленных именно применением препарата, можно сделать неправильные выводы.

Остается вопросом, является ли достаточным отбор образцов крови в трех временных точках до приема препаратов для определения эндогенного уровня магния, как это регулируется нормативными актами EMA, FDA и ЕАЭС.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Crisponi G, Nurchi VM, Cappai R, Zoroddu MA, Gerosa C, Piras M, et al. The potential clinical properties of magnesium. *Curr Med Chem*. 2021;28(35):7295–311. <https://doi.org/10.2174/0929867327999201116195343>
2. Workinger JL, Doyle RP, Bortz J. Challenges in the diagnosis of magnesium status. *Nutrients*. 2018;10(9):1202. <https://doi.org/10.3390/nu10091202>
3. Grew N. A treatise of the nature and use of the bitter purging salt contain'd in Epsom and such other waters. Reproduction of the original in the Cambridge University Library Edition, London, UK: Early English Books Online (EEBO) Editions ProQuest, 1697.
4. Page MJ, Moher D, Bossuyt PM, Boutron I, Hoffmann TC, Mulrow CD, et al. PRISMA 2020 explanation and elaboration: updated guidance and exemplars for reporting systematic reviews. *BMJ*. 2021;372:n160. <https://doi.org/10.1136/bmj.n160>
5. Amir-Behghadami M, Janati A. Population, intervention, comparison, outcomes and study (PICOS) design as a framework to formulate eligibility criteria in systematic reviews. *Emerg Med J*. 2020;37(6):387. <https://doi.org/10.1136/emered-2020-209567>
6. Pardo MR, Vilar EG, Martín ISM, Martín MAC. Bioavailability of magnesium food supplements: a systematic review. *Nutrition*. 2021;89:111294. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2021.111294>
7. Schuchardt JP, Hahn A. Intestinal absorption and factors influencing bioavailability of magnesium – an update. *Curr Nutr Food Sci*. 2017;13(4):260–78. <https://doi.org/10.2174/1573401313666170427162740>
8. Benech H, Pruvost A, Batel A, Bourguignon M, Thomas JL, Grognet JM. Use of the stable isotopes technique to evaluate the bioavailability of a pharmaceutical form of magnesium in man. *Pharm Res*. 1998;15(2):347–51. <https://doi.org/10.1023/a:1011947525377>
9. Dolberg MK, Nielsen LP, Dahl R. Pharmacokinetic profile of oral magnesium hydroxide. *Ba-sic Clin Pharmacol Toxicol*. 2017;120(3):264–69. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12642>
10. Gibson RS. The role of diet- and host-related factors in nutrient bioavailability and thus in nutrient-based dietary requirement estimates. *Food Nutr Bull*. 2007;28(1):S77–100. <https://doi.org/10.1177/15648265070281S108>
11. Schneider I, Greupner T, Hahn A. Magnesium bioavailability from mineral waters with different mineralization levels in comparison to bread and a supplement. *Food Nutr Res*. 2017;61(1):1384686. <https://doi.org/10.1080/16546628.2017.1384686>
12. Brilli E, Khadge S, Fabiano A, Zambito Y, Williams T, Tarantino G. Magnesium bioavailability after administration of Sucrosomial® magnesium: results of an ex-vivo study and a comparative, double-blinded, cross-over study in healthy subjects. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2018;22(6):1843–51. https://doi.org/10.26355/eurrev_201803_14605
13. Werner T, Kolisek M, Vormann J, Pilchova I, Grendar M, Struharnanska E, Cibulka M. Assessment of bioavailability of Mg from Mg citrate and Mg oxide by measuring urinary excretion in Mg-saturated subjects. *Magnesium Res*. 2019;32(3):63–71. PMID: 32162607
14. Greupner T, Schneider I, Gellert S, Hahn A. Magnesium bioavailability and tolerability do not differ between two supplements with different release properties. *J Diet Suppl*. 2020;17(4):454–66. <https://doi.org/10.1080/19390211.2019.1629146>
15. Zhan J, Wallace TC, Butts SJ, Cao S, Ansu V, Spence LA, et al. Circulating ionized magnesium as a measure of supplement bioavailability: results from a pilot study for randomized clinical. *Nutrients*. 2020;12(5):1245. <https://doi.org/10.3390/nu12051245>
16. Rooney MR, Rudser KD, Alonso A, Harnack L, Saenger AK, Lutsey PL. Circulating ionized magnesium: comparisons with circulating total magnesium and the response to magnesium supplement-

- tation in a randomized controlled trial. *Nutrients*. 2020;12(1):263. <https://doi.org/10.3390/nu12010263>
17. Glasdam SM, Glasdam S, Peter GH. The importance of magnesium in the human body: a systematic literature review. *Adv Clin Chem*. 2016;73:169–93. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2015.10.002>
 18. Grober U, Schmidt J, Kisters K. Magnesium in prevention and therapy. *Nutrients*. 2015;7(9):8199–226. <https://doi.org/10.3390/nu7095388>
 19. Altura BM, Altura BT. Role of magnesium in patho-physiological processes and the clinical utility of magnesium ion selective electrodes. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*. 1996;224:211–34. <https://doi.org/10.3109/00365519609088642>
 20. Senn S. Change from baseline and analysis of covariance revisited. *Stat Med*. 2006;25(24):4334–44. <https://doi.org/10.1002/sim.2682>
 21. Palacios C, Wigertz K, Braun M, Martin BR, McCabe GP, McCabe L, et al. Magnesium retention from metabolic balance studies in female adolescents: impact of race, dietary salt, and calcium. *Am J Clin Nutr*. 2013;97(5):1014–9. <https://doi.org/10.3945/ajcn.112.039867>

Вклад авторов. Н.Н. Еременко — разработка дизайна обзорно-аналитического исследования, сбор и систематизация данных литературы, проведение сравнительного анализа, обобщение результатов исследования, формулировка выводов; Е.В. Ших — идея, планирование исследования, ответственность за все аспекты работы, утверждение окончательного варианта статьи для публикации; Н.Е. Уварова — обсуждение результатов исследования, оформление и редактирование рукописи.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00001-22-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121021800098-4).

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

Authors' contributions. Natalia N. Eremenko — development of the design of the review and analytical study; collection and systematisation of literature data; performance of the comparative analysis; consolidation of the study results; formulation of the conclusions; Evgenia V. Shikh — elaboration of the study idea, planning of the study, responsibility for all aspects of the study, approval of the final version of the manuscript for publication; Natalia E. Uvarova — discussion of the study results, formatting and editing of the manuscript.

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of publicly funded research project No. 056-00001-22-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121021800098-4).

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

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Еременко Наталья Николаевна, канд. мед. наук, доцент
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2385-7114>
Eremenkonn2014@gmail.com
Ших Евгения Валерьевна, д-р мед. наук, профессор
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6589-7654>
chih@mail.ru
Уварова Наталия Евгеньевна
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6718-695X>
Uvarova@expmed.ru

Natalia N. Eremenko, Cand. Sci. (Med.), Associate Professor
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2385-7114>
Eremenkonn2014@gmail.com
Evgenia V. Shikh, Dr. Sci. (Med.), Professor
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6589-7654>
chih@mail.ru
Natalia E. Uvarova
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6718-695X>
Uvarova@expmed.ru

Поступила 23.12.2021
После доработки 18.07.2022
Принята к публикации 31.08.2022
Online first 28.10.2022

Received 23 December 2021
Revised 18 July 2022
Accepted 31 August 2022
Online first 28 October 2022



Н.И. Бурдаев¹
Л.Л. Николаева^{2,3}
В.В. Косенко¹
З.С. Шпрах^{2,3}
Н.Д. Бунятян^{1,3}

Липосомы как носители лекарственных средств: классификация, методы получения и применение

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 бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Каширское ш., д. 24, Москва, 115522, Российская Федерация

³ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), Трубецкая ул., д. 8, стр. 2, Москва, 119991, Российская Федерация

✉ Бурдаев Николай Игоревич; burd.mobile@gmail.com

РЕЗЮМЕ

Липосомы — одна из наиболее известных и перспективных наноразмерных систем доставки лекарственных средств. Липосомальные лекарственные средства успешно применяются в клинической практике для лечения сердечно-сосудистых, онкологических, дерматологических и ряда других заболеваний. Разработка и широкое внедрение липосом в клиническую практику являются актуальными задачами.

Цель работы: обобщение и анализ научных данных о структуре липосом, их составе, классификации, особенностях методов получения.

Приведена актуальная информация о коммерческих липосомальных лекарственных препаратах (ЛЛП). Показана взаимосвязь состава, структуры и способов получения липосом, важными характеристиками которых являются размер и ламеллярность, определяющие эффективность инкапсуляции лекарственного средства и его биораспределение. Выбор вспомогательных веществ проводится в зависимости от области применения липосомального препарата. Обобщены основные методы получения липосом, особенности их использования, преимущества и недостатки. Показано, что традиционные методы получения липосом просты в исполнении и не требуют использования сложного оборудования, основными недостатками традиционных методов являются низкая эффективность инкапсуляции лекарственных средств и сложность масштабирования технологических процессов. Особое внимание уделено микрофлюидным технологиям получения липосом, которые характеризуются высокой степенью контроля технологического процесса (распределения липосом по размерам и ламеллярности), высокой воспроизводимостью, возможностью масштабирования на уровень промышленного производства и могут использоваться для инкапсуляции лекарственных средств различной природы.

Ключевые слова: липосомы; липосомальные лекарственные препараты; классификация липосом; структура и состав липосом; методы получения липосом; микрофлюидика

Для цитирования: Бурдаев Н.И., Николаева Л.Л., Косенко В.В., Шпрах З.С., Бунятян Н.Д. Липосомы как носители лекарственных средств: классификация, методы получения и применение. *Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2023;13(2-1):316–332. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-508>

N.I. Burdaev¹ 
L.L. Nikolaeva^{2,3} 
V.V. Kosenko¹ 
Z.S. Shprakh^{2,3} 
N.D. Bunyatyan^{1,3} 

Liposomes as Drug Carriers: Classification, Preparation Methods, and Medicinal Use

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

² N.N. Blokhin National Medical Research Centre of Oncology,
24 Kashirskoe Hwy, Moscow 115522, Russian Federation

³ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University),
8/2 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russian Federation

✉ Nikolay I. Burdaev; burd.mobile@gmail.com

ABSTRACT

Liposomes are one of the most well-known and promising nanoscale drug delivery systems. Liposomal medicinal products are successfully used in clinical practice for cardiovascular, oncological, dermatological, and other indications. The development of liposomes and their widespread implementation in clinical practice are relevant tasks.

The aim of the study was to summarise and analyse scientific data regarding the structure, composition, and classification of liposomes, as well as specific aspects of liposome production methods.

This review covers up-to-date information on marketed liposomal medicinal products. The authors illustrate how production methods affect the composition and structure of liposomes. The size and lamellarity are important characteristics of liposomes that determine the encapsulation efficiency and biodistribution of active pharmaceutical ingredients (APIs). The choice of excipients depends on the intended use of liposomal medicinal products. The article summarises the main liposome production methods, highlighting specific usage aspects, advantages and disadvantages. Conventional liposome production methods are easy to apply and do not require complex equipment, and their principal disadvantages include the low efficiency of API encapsulation within liposomes and the high complexity of scaling up technological processes. The authors pay special attention to microfluidic techniques for liposome preparation, which are characterised by a highly controlled technological process (in terms of size distribution and lamellarity), high reproducibility, and scalability to the level of industrial production and are applicable to encapsulating different APIs.

Key words: liposomes; liposomal medicinal products; classification of liposomes; structure and composition of liposomes; liposome preparation methods; microfluidics

For citation: Burdaev N.I., Nikolaeva L.L., Kosenko V.V., Shprakh Z.S., Bunyatyan N.D. Liposomes as drug carriers: classification, preparation methods, and medicinal use. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2023;13(2-1):316–332. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-508>

Введение

Липосомы, известные как липидные везикулы и иногда называемые просто везикулами, представляют собой микроскопические сферические структуры, состоящие из одного или нескольких липидных бислоев, обычно включающих природные и синтетические фосфолипиды и напминающих плазматическую мембрану клетки [1]. Свойства липосом позволяют широко использовать их в качестве модельных биомембран, а также как средства доставки различных биологически активных веществ, прежде всего лекарственных средств (ЛС) [2–4].

Чаще всего липосомы используют для защиты ЛС от деградации *in vivo*, для контролируемого высвобождения активного вещества и модификации биораспределения, для направленного транспорта активных ингредиентов, повышения биодоступности и снижения нежелательных побочных эффектов. Значительным преимуществом липосом является их высокая биосовместимость, низкая иммуногенность, способность компонентов липосомальных мембран к биodeградации [5]. Парентеральное введение липосом позволяет исключить проблемы, обычные для перорального введения

ЛС: пресистемный метаболизм ЛС, плохую проницаемость желудочно-кишечного тракта и побочные эффекты со стороны желудочно-кишечного тракта [6]. Интерес к липосомам как системам доставки ЛС связан и с простотой методов их получения, и со способностью инкапсулировать широкий спектр ЛС независимо от их гидрофобности, заряда, размера и других физико-химических свойств. Липосомы способны включать как гидрофильные агенты во внутреннее водное пространство, так и липофильные субстанции – в мембраны [5, 6]. В настоящее время липосомы являются наиболее известной системой доставки ЛС на основе наночастиц, одобренной для использования в клинической практике [6, 7].

Анализ публикаций в базе данных Scopus за последние 25 лет показывает экспоненциальный рост количества исследований, посвященных липосомам как носителям ЛС, с ~1500 в 1995 г. до ~3000 в 2020 г. [8]. При подготовке настоящего обзора проведен анализ публикаций за период с 1965 по 2022 г., при этом основное внимание уделено публикациям последних лет (2019–2022 гг.).

Цель работы – обобщение и анализ научных данных о структуре липосом, их составе, классификации и особенностях методов получения.

Липосомальные лекарственные препараты

Липосомы как системы доставки ЛС впервые были описаны A.D. Bangham и соавт. в 1964 г. [9], и прошло почти 30 лет до появления на фармацевтическом рынке первых липосомальных препаратов Амбизом® и Doxil® [10, 11].

Липосомальные ЛС используют в лечении диабета, сердечно-сосудистых, воспалительных, нейродегенеративных, онкологических и ряда других заболеваний [2]. В настоящее время в клиническую практику введены 14 липосомальных лекарственных препаратов (ЛЛП) как системы доставки противоопухолевых и противомикробных агентов, вакцины против опоясывающего лишая, анальгетика [12–20].

В *таблице 1* приведена информация о ЛЛП, одобренных к медицинскому применению Управлением по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств (Food and Drug Administration, FDA) и Европейским агентством по лекарственным средствам (European Medicines Agency, EMA) (данный перечень

не включает липидные комплексы, например Abelcet®, Amphotec®, Амфолип и Onpattro®; вирусомальные вакцины, например Eraphal® и Inflexal®). В Российской Федерации в настоящее время зарегистрированы ЛЛП, включающие действующие вещества амфотерицин (Амбизом®, Амфотерицин В липосомальный) и доксорубицин (Келикс®)¹.

Лекарственные формы липосомальных препаратов представляют собой стерильные дисперсии или лиофилизаты для приготовления дисперсий для инъекций, а пути их введения включают внутривенные инфузии, внутримышечные и интратекальные инъекции, эпидуральное введение, локальную инфильтрацию и пероральные ингаляции (*табл. 1*).

Классификация липосом

Классификацию липосом в основном проводят по размеру; при этом выделяют маленькие однослойные везикулы (МОВ – small unilamellar vesicles, SUVs) размером 20–100 нм, большие однослойные везикулы (БОВ – large unilamellar vesicles, LUVs) >100 нм и гигантские однослойные везикулы (ГОВ – giant unilamellar vesicles, GUVs) >1 мкм [19].

Важной характеристикой липосомальной мембраны является ее ламеллярность, или количество бислоев. Если водное пространство захватывается многими слоями бислоев, такие везикулы называют мультиламеллярными (МЛВ – multilamellar vesicles, MLVs, >0,5 мкм, >5 бислоев) или олиголамеллярными (ОЛВ – oligolamellar vesicles, OLVs, 0,1–1 мкм, 2–5 бислоев), а если одна бислоевая везикула инкапсулирует множество неконцентрических бислоев, то она известна как мультивезикулярная везикула (МВВ – multivesicular vesicles, MVVs, >1 мкм).

Поскольку БОВ имеют сравнительно больший захватываемый объем водного раствора, чем МОВ и МЛВ, они чаще всего используются для включения гидрофильных молекул. МЛВ, наоборот, могут быть хорошим выбором для включения гидрофобных молекул, поскольку они имеют несколько гидрофобных бислоев. ГОВ часто используются в качестве мембранных модельных систем из-за большого размера, что позволяет их визуализировать методом оптической микроскопии и проводить микроманипуляции с отдельными везикулами [21].

Размер липосомальных везикул, их распределение по размерам и количество бислоев

¹ www.grls.rosminzdrav.ru

Таблица 1. Липосомальные лекарственные препараты, зарегистрированные за рубежом²

Table 1. Liposomal medicinal products authorised abroad²

Препарат <i>Medicinal product</i>	Активное вещество, МНН <i>Active substance, INN</i>	Лекарственная форма и путь введения <i>Dosage form and route of administration</i>	Применение <i>Indication</i>
AmBisome®	Амфотерицин <i>Amphotericin</i>	Лио, в/в <i>Lyo, IV</i>	Системные грибковые инфекции <i>Systemic fungal infections</i>
DaunoXome®	Даунорубицин <i>Daunorubicin</i>	Дисперсия, в/в <i>Dispersion, IV</i>	Лейкемия <i>Leukaemia</i>
DepoCyt®	Цитарабин <i>Cytarabine</i>	Дисперсия, и/т <i>Dispersion, IT</i>	Неопластический и лимфоматозный менингит <i>Neoplastic and lymphomatous meningitis</i>
DepoDur®	Морфин <i>Morphine</i>	Дисперсия, эпидурально <i>Dispersion, epidural</i>	Анальгезия <i>Analgesia</i>
Doxil®	Доксорубицин <i>Doxorubicin</i>	Дисперсия, в/в <i>Dispersion, IV</i>	Рак яичников, саркома Капоши, рак молочной железы <i>Ovarian cancer, Kaposi's sarcoma, breast cancer</i>
Exparel®	Бупивакаин <i>Bupivacaine</i>	Дисперсия, локальная инфильтрация <i>Dispersion, local infiltration</i>	Послеоперационная анальгезия <i>Postoperative analgesia</i>
Marqibo®	Винкристин <i>Vincristine</i>	Лио, в/в <i>Lyo, IV</i>	Неходжкинская лимфома и лейкоз <i>Non-Hodgkin lymphoma and leukaemia</i>
Mepact®	Мифамуртид <i>Mifamurtide</i>	Лио, в/в <i>Lyo, IV</i>	Остеосаркома <i>Osteosarcoma</i>
Myocet®	Доксорубицин <i>Doxorubicin</i>	Лио в/в <i>Lyo, IV</i>	Метастатический рак молочной железы <i>Metastatic breast cancer</i>
Visudyne®	Вертепорфин <i>Verteporfin</i>	Лио, в/в <i>Lyo, IV</i>	Возрастная макулярная дегенерация <i>Age-related macular degeneration</i>
Onivyde®	Иринотекан <i>Irinotecan</i>	Дисперсия, в/в <i>Dispersion, IV</i>	Панкреатическая аденокарцинома <i>Pancreatic adenocarcinoma</i>
Vyxeos®	Даунорубицин/ Цитарабин <i>Daunorubicin/Cytarabine</i>	Лио, в/в <i>Lyo, IV</i>	Острая миелоидная лейкоз <i>Acute myeloid leukaemia</i>
Arikayce®	Амикацин <i>Amikacin</i>	Дисперсия, пероральная ингаляция <i>Dispersion, oral inhalation</i>	Инфекции легких <i>Lung infections</i>
Shingrix	Вакцина на основе гликопротеина E <i>Glycoprotein E vaccine</i>	Дисперсия, в/м <i>Dispersion, IM</i>	Вакцинация против опоясывающего лишая и постгерпетической невралгии <i>Vaccination against herpes zoster and postherpetic neuralgia</i>

Примечание. МНН – международное непатентованное наименование; в/в – внутривенно; и/т – интратекально; в/м – внутримышечно; лио – лиофилизат.

Note. INN, international non-proprietary name; IV, intravenous; IT, intrathecal; IM, intramuscular; lyo, lyophilisate.

определяют эффективность инкапсуляции ЛС, его биотрансформацию, биораспределение и выведение из организма, нацеленность на определенный орган [22, 23]. Любая изменчивость размеров приводит к изменчивости указанных параметров [7].

На размеры и распределение везикул по размерам влияет также технология производства. Составы липосомальных везикул коммерческих ЛЛП, их структура, размеры и способы получения приведены в таблице 2.

Гидрофильные группы липидов липосомальной мембраны могут быть отрицательно или положительно заряженными, что позволяет классифицировать липосомы как катионные или анионные [41].

Структура и состав липосом

Основным структурным компонентом липосом являются фосфолипиды, имеющие амфифильную природу, то есть включающие липофильную длинную углеводородную цепь(и)

² <https://www.fda.gov/drugs>
<https://www.ema.europa.eu>

Таблица 2. Структура и способ получения коммерческих липосомальных продуктов

Table 2. Structures and preparation methods of marketed liposomal medicinal products

Лекарственный препарат <i>Medicinal product</i>	Состав <i>Composition</i>	Структура и размер частиц, мкм <i>Structure and particle size, μm</i>	Способ получения/загрузки <i>Production/loading method</i>
AmBisome® (Амбизом® / <i>AmBisome</i>)	HSPC:DSPG:chol	МОВ, 50–100 [7] <i>SUVs</i>	Гидратация тонкой пленки [24] <i>Thin-film hydration</i>
DaunoXome®	DSPC:chol	МОВ, 45–80 [18] <i>SUVs</i>	Гидратация тонкой пленки / pH-градиент [7, 8] <i>Thin-film hydration, pH gradient hydration</i>
DepoCyt®	DOPC:DPPG	МЛВ, 20000 [25, 26] <i>MLVs</i>	Метод двойных эмульсий [27] <i>Double emulsion method</i>
DepoDur®	DOPC: DPPG	МЛВ, 17000–23000 [28] <i>MLVs</i>	Метод двойных эмульсий [27] <i>Double emulsion method</i>
Doxil® (Келикс® / <i>Caelyx</i>)	HSPC:chol:DSPE-PEG2000	МЛВ, около 100 [18] <i>SUVs, about 100</i>	Гидратация тонкой пленки / pH-градиент [7, 29] <i>Thin-film hydration, pH gradient hydration</i>
Exparel®	DEPC:DPPG:chol:TC	МЛВ, 24000–31000 [30] <i>MLVs</i>	Метод двойных эмульсий [27] <i>Double emulsion method</i>
Marqibo®	SPH:chol	МОВ, 100 <i>SUVs</i>	Гидратация тонкой пленки / pH-градиент [7, 31] <i>Thin-film hydration, pH gradient hydration</i>
Мепакт®	DOPC:DOPS	МЛВ, 1000–5000 [32] <i>MLVs</i>	–
Myocet®	EPC:chol	МЛВ, 80–90 [18, 33] <i>MLVs</i>	Гидратация тонкой пленки / pH-градиент [7, 33] <i>Thin-film hydration, pH gradient hydration</i>
Visudyne®	EPG:DMPC	МОВ, 18–104 [34] <i>SUVs</i>	Гидратация тонкой пленки [24] <i>Thin-film hydration</i>
Onivyde®	DSPC:chol:DSPE-PEG2000	МОВ, 110 <i>SUVs</i>	Гидратация тонкой пленки / pH-градиент [35] <i>Thin-film hydration, pH gradient hydration</i>
Vyxeos®	DSPC:DSPG:chol	Биламеллярные везикулы, 107 [36] <i>Bilamellar vesicles</i>	Гидратация тонкой пленки / pH-градиент [7, 8] <i>Thin-film hydration, pH gradient hydration</i>
Arikayce®	DPPC:chol	БОВ, 200–300 [37, 38] <i>LUVs</i>	Метод впрыска растворителя [39] <i>Solvent injection method</i>
Shingrix	DOPC:chol	МОВ, 50–100 [40] <i>SUVs</i>	Гидратация тонкой пленки [24] <i>Thin-film hydration</i>

Примечание. МОВ – маленькие однослойные везикулы; БОВ – большие однослойные везикулы; МЛВ – мультиламеллярные везикулы; HSPC – полностью гидрогенизированный соевый фосфатидилхолин; EPC – яичный фосфатидилхолин; EPG – яичный фосфатидилглицерин; SPH – сфингомиелин; DSPC – дистеароилфосфатидилхолин; DOPC – диолеоилфосфатидилхолин; DEPC – диерукоилфосфатидилхолин; DPPC – дипальмитоилфосфатидилхолин; DMPC – димиристоилфосфатидилхолин; DPPG – дипальмитоилфосфатидилглицерин; DSPG – дистеароилфосфатидилглицерин; DOPS – диолеоилфосфатидилсерин; chol – холестерин; TC – трикаприлин; DSPE-PEG2000 – N-(карбонил-метоксиполиэтиленгликоль-2000)дистеароилфосфатидилэтаноламин, «–» – данные отсутствуют.

Note. SUVs, small unilamellar vesicles; LUVs, large unilamellar vesicles; MLVs, multilamellar vesicles; HSPC, fully hydrogenated soy phosphatidylcholine; EPC, egg phosphatidylcholine; EPG, egg phosphatidylglycerol; SPH, sphingomyelin; DSPC, distearoylphosphatidylcholine; DOPC, dioleoylphosphatidylcholine; DEPC, dierucoylphosphatidylcholine; DPPC, dipalmitoylphosphatidylcholine; DMPC, dimyristoylphosphatidylcholine; DPPG, dipalmitoylphosphatidylglycerol; DSPG, distearoylphosphatidylglycerol; DOPS, dioleoylphosphatidylserine; chol, cholesterol; TC, tricaprilyn; DSPE-PEG2000, N-(carbonyl-methoxypolyethyleneglycol-2000)-distearoylphosphatidylethanolamine; –, not available.

и водорастворимую гидрофильную головку. В присутствии воды такие липиды агрегируют (самособираются) в различные структуры: плоские липидные бислои, мицеллы и (или) везикулы, геометрия которых зависит от структуры липидов [41]. Именно липиды, используемые при получении липосом, определяют их

свойства: природа липидов влияет на заряд поверхности бислоя, биораспределение, проницаемость, высвобождение и клиренс активного вещества [42], а также определяет эффективность включения, стабильность и токсичность липосомальных лекарственных форм [43]. Так, в недавнем исследовании К.А. Carter и соавт.

использовали порфирин-фосфолипиды для получения липосомального препарата с контролируемым высвобождением доксорубина (DOX) при облучении в ближней инфракрасной области [44]. S.M. Park и соавт. вводили в состав липосом с DOX эластиноподобный полипептид, конъюгированный с жирными кислотами: при этом высвобождение DOX «запускалось» при повышении температуры в качестве внешнего стимула [45].

Обычно липосомальные мембраны включают не только фосфолипиды. Для снижения проницаемости липосомальной мембраны и, соответственно, уменьшения вытекания активного соединения в мембрану добавляют вспомогательные вещества. Чаще всего используют холестерин, который оказывает модулирующее действие на физико-химические свойства мембран. Холестерин повышает стабильность липосомальной мембраны за счет снижения ее проницаемости в присутствии биологических жидкостей, таких как кровь и плазма. Количество холестерина, включаемого в липосомальный бислой, зависит от предполагаемой области применения липосомального препарата [18, 46, 47].

R.J. Quinn и соавт. показали, что введение в липосомальную мембрану α -токоферола обеспечивает более высокий терапевтический потенциал ЛПП. Это происходит за счет индукции активных форм кислорода в поврежденной ткани, что облегчает внутриклеточную доставку ЛС и продлевает время удерживания инкапсулированного ЛС [48].

Чтобы повысить стабильность и нагружаемость липосом и придать им способность реагировать на воздействие температуры, света, pH и других внешних факторов и (или) активно распознавать конкретную мишень, в состав оболочки везикул включают полимеры [49]. Обычно для этих целей используют полиэтиленгликоль (ПЭГ), получая стерически стабилизированные (stealth, стелс) липосомы [50]. ПЭГ-липосомы с трудом распознаются клетками ретикулоэндотелиальной системы (РЭС), что позволяет увеличить время циркуляции липосом в кровяном русле, защитить их от инактивации или метаболической деградации. Кроме того, ПЭГ-липосомы демонстрируют повышенную стабильность при хранении [51, 52]. Так, в исследовании C. Caddeo и соавт. показано, что липосомы, модифицированные ПЭГ, практически не изменялись после 2 мес. хранения, тогда как обычные липосомы демонстрировали прогрессирующую агрегацию и преципитацию [53]. Однако пегилирование липосом не только

повышает стабильность везикул, но также может ограничивать клеточный захват и эндосомальное высвобождение, снижая конечный терапевтический эффект [54], и вызывать нежелательные реакции различной степени тяжести, вплоть до анафилактического шока [55, 56].

Включение ПЭГ в состав липосомальной мембраны обеспечивает длительную циркуляцию ЛС, заключенного в наночастицу, в крови, его пассивное нацеливание (passive targeting), опосредованное эффектом повышенной проницаемости и удерживания (enhanced permeability and retention), и накопление в тканях-мишенях. Активное нацеливание (active targeting) ЛС требует включения в состав липосомальной мембраны специфических лигандов [57], таких как антитела, белки, пептиды и нуклеиновые кислоты, аптамеры, витамины и углеводы, что обеспечивает направленный транспорт липосом к клеткам, экспрессирующим на поверхности соответствующие рецепторы (рис. 1).

Традиционные методы получения липосом

Липосомы могут быть получены традиционными методами, такими как метод Бэнгхэма (конвекционный метод или метод гидратации тонкой пленки), метод удаления детергента, метод впрыска (инъекции) растворителя, метод обратного-фазового выпаривания (выпаривания с обращением фаз) и др. [59, 60].

Данные методы просты в исполнении, однако технологический процесс получения липосом достаточно сложно масштабировать и контролировать, а недостаточная воспроизводимость результатов приводит к неоднородности между сериями, что затрудняет эффективное использование разработанных липосомальных ЛС при переходе к их клиническому применению [2, 8, 18].

Основной целью получения липосомального нанопрепарата являются формирование монодисперсных частиц с узким распределением по размерам и требуемой степени ламеллярности, эффективное включение ЛС и длительная стабильность получаемого продукта. При использовании традиционных методов получения липиды, первоначально растворенные в органическом растворителе, смешивают с водной фазой. Наличие органического растворителя может нарушать химические свойства включенных активных соединений или влиять на стабильность/токсичность полученного нанопрепарата [61].

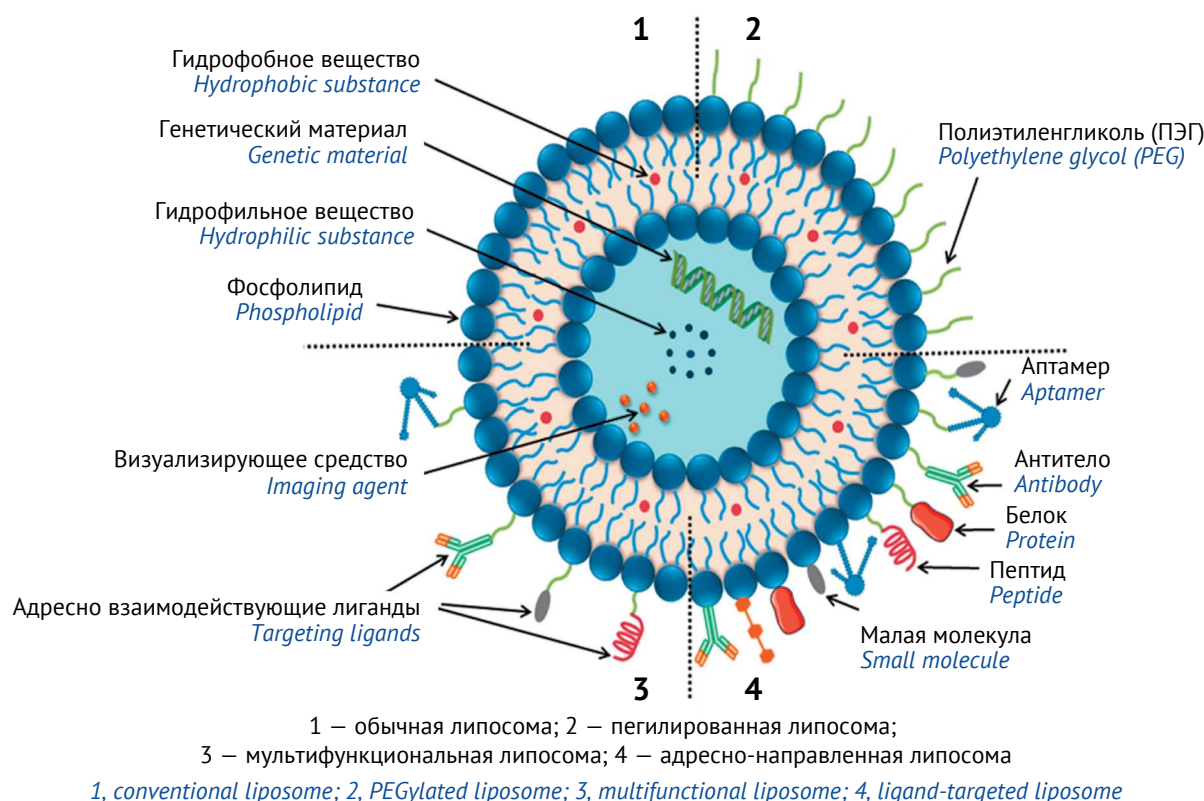


Рис. 1. Схематичная структура липосомы, содержащей гидрофобные и гидрофильные ЛС (по М.К. Ряз и соавт. [58] с изменениями)

Fig. 1. Schematic structure of a liposome containing hydrophobic and hydrophilic active substances (adapted from Riaz et al. [58])

Традиционные методы получения липосом включают следующие основные этапы:

- растворение липидов в органическом растворителе, приготовление раствора активного вещества;
- выпаривание органического растворителя (высушивание полученного липидного раствора);
- гидратация липида водной средой (с последующим взбалтыванием/перемешиванием);
- измельчение и (или) изменение ламеллярности (при необходимости);
- дополнительная обработка (очистка, стерилизация) (при необходимости);
- лиофилизация (при необходимости) и упаковка;
- характеристика конечного продукта [62, 63].

В зависимости от конкретного процесса стадия 2 (выпаривание органического растворителя) и стадия 3 (гидратация липида) могут меняться местами.

Метод гидратации тонкой пленки, также называемый методом Бэнгхэма, — первый широко используемый метод получения липосом, который эффективен для загрузки липофильных субстанций [9, 24]. Следует отметить, что эффективность

включения (encapsulation efficiency, EE) липофильных средств в липосомы всегда выше, так как они могут быть плотно «упакованы» в липидные мембраны.

При получении липосом данным методом липиды растворяют в органическом растворителе (дихлорметане, хлороформе, этаноле или смеси хлороформ-метанол), который затем удаляют выпариванием в вакууме с образованием тонкой липидной пленки. При гидратации липидной пленки в водной среде (водой или буферным раствором) образуются МЛВ или ГОВ, которые можно измельчить до БОВ и МОВ, применив механическое воздействие, например экструзию или озвучивание [24]. Активное вещество может быть активно или пассивно загружено во время или после формирования липосом соответственно.

Преимуществами метода Бэнгхэма являются его простота и возможность использования для различных типов липидов. Однако гидрофильные ЛС демонстрируют низкую эффективность включения, метод является трудоемким, сложности вызывают масштабирование процесса и удаление органического растворителя. Кроме того, липосомы, получаемые данным методом,

неоднородны по размеру. Тем не менее метод гидратации тонкой пленки применяют при получении большинства коммерческих ЛЛП (табл. 2). При этом загрузку водорастворимых активных субстанций (доксорибуцина, даунорубицина, винкристина и иринотекана) в липосомы проводят с помощью создания градиента pH (табл. 2).

Метод удаления детергента позволяет формировать везикулы с сохранением соответствующей биологической активности действующего вещества и наиболее часто используется для инкапсуляции плохо растворимых мембранных белков.

В данном методе липиды растворяют в растворе детергента [64], при этом детергент связывается с фосфолипидами, экранируя гидрофобные головки от прямого взаимодействия с водной фазой, и при этом образуются смешанные (детергент/липид) мицеллы. При удалении детергента смешанные мицеллы обогащаются липидами, что приводит к образованию однослойных везикул [65]. Обычно используют детергенты с высокой критической концентрацией мицеллообразования (ККМ), такие как холат натрия, Triton X-100, дезоксихолат натрия и алкил гликозид. Удаление детергента проводят различными методами, простейшим из которых является метод разбавления буферным раствором — при этом увеличиваются размер и полидисперсность исходных мицелл и происходит переход к везикулам, а затем постепенно, при более высоком разбавлении, к монодисперсным однослойным везикулам. На финальной стадии технологического процесса, когда концентрация детергента становится меньше ККМ, формируются липосомы.

Также для удаления детергента используют диализ, при этом формируются популяции гомогенных по размеру липосом, или колоночную гель-хроматографию, или центрифугирование.

Основными преимуществами метода удаления детергента являются контролируемость размера частиц и однородности продукта, которые в значительной мере зависят от скорости удаления детергента и исходного соотношения детергент/фосфолипид.

Недостатки данного метода связаны с медленным уравниванием промежуточных мицеллярных структур, наличием остатков детергента и сложностью удаления органического растворителя. Кроме того, методом удаления детергента удается получить дисперсии с низкой концентрацией липосом и низкой эффективностью включения гидрофобных соединений [61].

В **методе впрыска (инъекции) растворителя**, впервые описанном S. Batzri и E.D. Korn в 1973 г., в качестве растворителя липидов и липофильных субстанций обычно используют этанол ввиду его безопасности или диэтиловый эфир или смесь диэтилового эфира и этанола [39]. Органическую фазу быстро вводят в большой объем хорошо перемешанной, предварительно нагретой водной фазы, что приводит к самоагрегации липидов и спонтанному образованию МЛВ. Быстрое разбавление также способствует осаждению липидов и последующему формированию двухслойных плоских фрагментов, инкапсулирующих водную фазу. Органический растворитель удаляют выпариванием, лиофилизацией, диализом или диафильтрацией, что позволяет концентрировать суспензию липосом до необходимого объема. Испарение растворителя способствует слиянию фрагментов липидов и последовательному образованию закрытых однослойных везикул.

На свойства везикул влияют такие параметры, как скорость впрыска, температура органической и водной фазы, концентрация липидов и другие [39].

Основными преимуществами метода впрыска являются его простота и быстрота выполнения, высокий уровень воспроизводимости, а также возможность масштабирования. Использование для впрыска эфира позволяет получить концентрированный продукт с высокой эффективностью включения активного вещества.

Недостатки метода связаны с трудностями удаления растворителей, в том числе этанола, за счет образования азеотропной смеси с водой, формированием гетерогенной (от 30 до 110 нм) популяции липосом и риском инактивации биологически активных макромолекул в присутствии даже небольших количеств этанола [65].

Метод впрыска этанола используют для получения Arikaucе® — при этом для формирования наноразмерных липосом амикацина минимальное количество спиртового раствора липидов и водного раствора амикацина сульфата смешивают в коннекторе и встроенном миксере [16, 37].

Метод обратно-фазового выпаривания. Обратно-фазовое выпаривание применяют для включения в водное внутреннее пространство липосомы гидрофильного лекарственного вещества [66]. Водную фазу, содержащую активное вещество, вводят в раствор липидов в органическом растворителе (например, в смеси эфира и хлороформа, диэтилового и изопропилового эфиров

или хлороформа и метанола), затем смесь обрабатывают ультразвуком, что приводит к образованию эмульсии «вода в масле» или инвертных мицелл. После медленного выпаривания растворителя под вакуумом получают вязкий или гелеобразный продукт, к которому прибавляют воду или буферный раствор и встряхивают до образования гомогенных липосом (МЛВ).

Основным преимуществом метода обратно-фазового выпаривания является высокая эффективность включения (до 80%) гидрофильных активных веществ [66]. Кроме того, технически простой метод обратно-фазового выпаривания позволяет включать в липосомы не только малые, но и большие молекулы, а также макромолекулы.

В настоящее время метод обратно-фазового выпаривания используется для комбинированного включения терапевтических и диагностических ЛС в одну и ту же липидную тераностическую наносистему.

Основным недостатком метода является использование большого количества органических растворителей и, соответственно, присутствие в готовой лекарственной форме остаточных растворителей, которые могут быть удалены диализом или при центрифугировании. Кроме того, метод невозможно использовать для включения в липосомы «хрупких» молекул, например пептидов, поскольку загружаемое ЛС контактирует с органическим растворителем. А молекулы ферментов, белков или олигонуклеотидов при механическом перемешивании и воздействии органического растворителя претерпевают конформационные изменения (происходит денатурация белка, разрушение цепи ДНК). К недостаткам метода также можно отнести сложность масштабирования процесса и затраты большого количества времени [16, 67].

Метод двойных эмульсий, также известный как DepoFoam platform™, используют для получения МЛВ трех коммерческих продуктов: DepoCyt®, DepoDur® и Exparel® (табл. 2).

Цикл получения липосом методом двойных эмульсий обычно включает четыре основных технологических операции: 1) получение эмульсии «вода в масле»; 2) формирование эмульсии «вода в масле в воде»; 3) экстракция растворителя с использованием вакуумного насоса или газообразного реактива (stripping gas); 4) микрофльтрация для удаления невключенного ЛС и смены внешнего раствора [27]. Получаемые МЛВ имеют преимущества по сравнению

с другими системами доставки ЛС, поскольку многочисленные внутренние липидные мембраны обеспечивают высокую стабильность при хранении, хороший контроль за скоростью высвобождения ЛС, высокоэффективное включение гидрофильных молекул и относительно простое масштабирование производства [28].

Технологический процесс получения липосом методом двойных эмульсий следует проводить в асептических условиях, поскольку МЛВ из-за размера частиц не могут подвергаться стерильной фильтрации через фильтры с диаметром пор 0,22 мкм.

В. Lu и соавт. показали, что размер частиц первой эмульсии «вода в масле» увеличивается с повышением концентрации липидов. Для второй эмульсии («вода в масле в воде») эффективность включения снижается при удалении растворителя, так как происходит деформация части МЛВ и вытекание ЛС из внутренней водной фазы. Кроме того, высокая температура технологического процесса способствует подвижности и перестройке липидных бислоев, что приводит к слиянию липидов и деформации водных камер липосом [67].

Объемным методом получения липосом, хорошо зарекомендовавшим себя в экспериментальных работах, является метод **электроформования**, который предполагает формирование липидного слоя на электроде. Под воздействием электрического поля заданного напряжения и частоты происходит отслаивание липидов с электрода и их самосборка в ГОВ. Однако именно использование электрического поля является потенциальным недостатком данного метода, поскольку при этом могут разрушаться белки, чувствительные к электрическим полям [68].

Методы измельчения липосом

Размер и распределение по размерам являются критическими показателями эффективности и безопасности липосом. Для уменьшения размера липосом используют несколько методов: обработку ультразвуком, френч-пресс, экструзию, гомогенизацию или комбинированные методы, например экструзию с замораживанием-оттаиванием или замораживание-оттаивание с обработкой ультразвуком и метод гомогенизации-экструзии под высоким давлением [69, 70].

Все методы измельчения липосом имеют свои преимущества и недостатки. Так, обработка ультразвуком является достаточно быстрым методом и позволяет измельчить большое количество частиц в малом объеме, однако во время

зоникации происходит выделение тепла, что может привести к деградации как фосфолипидов, так и активного вещества.

Метод замораживания-оттаивания позволяет измельчить МЛВ до БОВ или МОВ, однако с довольно широким распределением частиц по размерам (повышенным индексом полидисперсности).

Наиболее популярными и широко используемыми в фармацевтическом производстве являются экструзия и гомогенизация под высоким давлением (high-pressure homogenisation, HPH).

Для измельчения **методом экструзии** липосомы больших размеров пропускают через поликарбонатные мембраны с диаметром пор от 50 нм до 5 мкм или асимметричные керамические фильтры. Механизм уменьшения размеров данным методом заключается в том, что МЛВ разрываются на входе в пору мембраны и перестраиваются во время прохождения мембраны [71].

Экструзию используют при получении ЛЛП Onivyde®, Vuxeo® и Marqibo® (табл. 2). Метод экструзии относительно прост, хорошо воспроизводится и не требует особых условий, а критическими параметрами процесса являются размер пор поликарбонатной мембраны, количество циклов прохождения, давление, скорость потока и др., которые влияют на размер и ламеллярность липосом [72]. S.G.M. Ong и соавт. показали, что экструзия является наиболее эффективной по сравнению с другими методами измельчения, в том числе замораживанием-оттаиванием, ультразвуковым воздействием и гомогенизацией, однако при экструзии может измениться структура липосом и уменьшиться эффективность включения ЛС в липосомы [71].

Гомогенизацию высокого давления используют при производстве различных нанопрепаратов: липосом, нанокристаллов и наноземульсий. Достоинством метода является его масштабируемость и возможность использования в масштабах от лабораторных с производительностью 10 л/ч до крупных производственных с производительностью до 100 000 л/ч [73, 74]. Суспензию МЛВ под высоким давлением пропускают через узкое отверстие, при этом везикулы разрушаются за счет силы сдвига, турбулентности и кавитации жидкости, создаваемой градиентом скорости, а затем перестраиваются в более мелкие липосомы. Размер частиц и распределение по размерам определяются такими параметрами процесса гомогенизации, как давление, количество рабочих циклов, конструкция клапана

и скорость потока, а также свойствами образцов, в том числе составом и вязкостью объемной среды, начальным распределением частиц по размерам. Повышение давления и количества циклов гомогенизации уменьшают размер частиц и индекс полидисперсности, но приводят к снижению эффективности инкапсуляции. Данный метод используют при производстве Visudyne® и Амбизома (табл. 2).

Новые технологии получения липосомальных лекарственных средств

К основным недостаткам традиционных методов получения липосом относятся трудность масштабирования процесса и низкая эффективность инкапсуляции лекарственных веществ. Кроме того, традиционные методы обычно не подходят для получения липосом, включающих биомолекулы, которые могут подвергаться структурным или функциональным изменениям при воздействии детергентов, органических растворителей, процессов гомогенизации или обработки ультразвуком и др.

Преодолеть перечисленные недостатки позволяет использование современных методов получения липосом, например методов, основанных на микрофлюидных технологиях (микрофлюидика), подробно описанных в [2, 75–77].

Микрофлюидные технологии. Микрофлюидный метод получения липосом предполагает пропускание раствора фосфолипидов в органическом растворителе через микрофлюидные каналы, которые представляют собой стеклянные капилляры с диаметром отверстий от 5 до 500 мкм, в водную среду под высоким давлением. Липосомы образуются в результате локальной диффузии фосфолипидов в воду [78].

Ключевым преимуществом метода является возможность получения монодисперсных везикул. Поскольку микрофлюидика предполагает использование небольших объемов жидкостей и их точный контроль, это снижает стоимость реагентов, повышает производительность технологического процесса и улучшает аналитические характеристики получаемых везикул [78].

Методы микрофлюидики характеризуются ламинарным потоком и диффузионным массопереносом, что позволяет оценивать как размер, так и ламеллярность во время образования везикул. Использование микрофлюидных систем позволяет точно контролировать такие параметры, как температура, осмолярность, pH и др., что обеспечивает высокий уровень контроля технологического процесса в целом. Кроме того,

микрофлюидика позволяет осуществлять непрерывное производство липосом, масштабировать процесс за счет использования нескольких параллельных реакторов и отличается высокой воспроизводимостью и удобством использования, несмотря на громоздкость и сложность некоторых методов [2]. Очевидным преимуществом микрофлюидных систем является возможность удалять органическую фазу из конечных везикул. Микрофлюидные методы, которые можно использовать при получении липосом, включают гидродинамическое фокусирование, импульсный выброс, гидратацию капель льда, перенос капель эмульсии и др. [2, 76–78].

В методе **гидродинамического фокусирования** центральный поток липидов, растворенных в спирте, соединяется с двумя боковыми потоками водных растворов в одном микроканале. Когда спиртовой раствор разбавляется водными растворами до критической концентрации, липиды спонтанно самособираются в липосомы. Везикулы, сформировавшиеся с помощью данного метода, являются моодисперсными и, в зависимости от скорости потока водной фазы относительно липидной фазы, имеют диаметр 50–150 нм. Также на размер липосом и распределение по размерам влияют состав липидов и их концентрация [79].

S. Garg и соавт. отмечают, что использование метода гидродинамического фокусирования не требует этапов последующей обработки (например, измельчения) и позволяет получать однородные липосомы со строгим контролем их размера и ламеллярности [80].

Неоспоримым достоинством данного метода является возможность его применения для непрерывного производства везикул, а также простота масштабирования за счет использования параллельных микрореакторов [81]. Так, T.A. Balbino и соавт. разработали оборудование для двойного гидродинамического фокусирования, добавив дополнительную пару каналов: при этом скорость получения липосом увеличилась вдвое, их диаметр уменьшился, но не изменился индекс полидисперсности [82].

К недостаткам метода можно отнести большую вероятность того, что полученные липосомы могут содержать спирт, что отрицательно сказывается на устойчивости мембран [83].

Импульсный выброс представляет собой технику, напоминающую выдувание мыльных пузырей через петлю. С помощью микрофорсунки водный раствор распыляется небольшими струями

на плоскую липидную мембрану, при этом импульс водного раствора растягивает липидную мембрану, образуя везикулу [84]. Размер получаемых везикул можно настраивать, изменяя время распыления водного раствора. При повторении процесса можно получить большое количество моодисперсных ГОВ (300–600 мкм) с одновременным формированием небольшого количества более мелких «сателлитных везикул».

Основным преимуществом импульсного выброса является непосредственная инкапсуляция материалов, включенных в водный раствор, в формируемые везикулы, что позволяет с высокой эффективностью вводить в липосомы клетки, хромосомы, наночастицы и мембранные белки. Однако формирование липосом данным методом представляет собой сложную технологическую задачу, требующую специальных инженерных инструментов, навыков и выполнения трудоемких экспериментальных этапов, что ограничивает его широкое применение [81].

Метод **переноса капель эмульсии** впервые описан исследователями под руководством S. Pautot [85]: эмульсию «вода в масле», полученную перемешиванием водного раствора и суспензии липидов, повторно переносят в водную фазу. Для перекрытия липидного слоя капли эмульсии вытягивают второй монослой с поверхности раздела масло–вода, что приводит к образованию ГОВ. Такие ГОВ инкапсулируют различные макромолекулы как микробиореакторы с эффективностью включения до 98%, однако получаемые ГОВ являются полидисперсными, поскольку эмульсию получают встряхиванием. При последующей обработке ГОВ микрофлюидным методом, например методом гидродинамического фокусирования потока, можно получить моодисперсные ГОВ. Такая возможность сочетания метода переноса капель эмульсии и микрофлюидной обработки для получения моодисперсной эмульсии является основным преимуществом метода.

S. Sugiura и соавт. использовали метод **гидратации замороженных капель** для получения олиголамеллярных или мультиламеллярных гигантских везикул размером от 4 до 20 мкм [86]. На первой стадии получали моодисперсную эмульсию типа «вода в масле», используя сорбитан моноолеат и стериламин как эмульсификаторы и гексан в качестве жировой фазы. На следующей стадии капли воды замораживали, гексан удаляли и замещали раствором липида и холестерина в гексане. Процедуру проводили

при температуре -10°C , чтобы капли воды оставались замороженными. Затем гексан выпаривали и к смеси липидов и замороженных капель воды прибавляли водный раствор, что приводило к образованию ГОВ. Ламеллярность полученных везикул и эффективность включения зависят от соотношения липид / капли воды и от состава внешней водной фазы. Для измельчения гигантских липосом их экструдировали через поликарбонатные мембраны, получая БОВ диаметром около 100 нм. Экструзия приводила к значительному снижению включения действующего вещества в липосомы, что ограничивает применение метода [87].

Другие микрофлюидные методы получения липосом. Временный вывод мембраны, впервые описанный S. Ota и соавт., включает специальную обработку липидного бислоя с образованием везикул: водный раствор с одной стороны мембраны нагревают, используя лазер, что вызывает вздутие и формирование пузырька, который отрывается с образованием липосомы [88]. Основным преимуществом данного метода является его полная интеграция с микрофлюидным оборудованием, позволяющая получать монодисперсные однослойные липосомы, а также возможность регулирования размера частиц. Поскольку внутренняя и внешняя водные фазы разделены двухслойной липидной мембраной, достигается высокая эффективность включения активных веществ в липосому [89].

Липосомы также можно получать с помощью микрофлюидного микромиксера, в котором происходит смешивание потоков (водной фазы и раствора липидов в этаноле) в микроканалах. Зигзагообразные («елочкой») узоры на дне канала значительно повышают эффективность смешивания, которую можно варьировать асимметрией «елочек» и их количеством на единицу площади. I.V. Zhigaltsev и соавт. первыми использовали данный метод для получения наноразмерных липосом липидных наночастиц размером до 20 нм, которые эффективно включали и удерживали доксорубицин [89]. Согласно результатам нескольких исследований, формирование липосом при использовании данного метода главным образом

зависит от композиции липидов и параметров перемешивания потоков, прежде всего их скорости и количества циклов [90].

К сожалению, большинство микрофлюидных подходов требуют использования дорогостоящих фосфолипидов, а технологический процесс включает применение токсичных реактивов. Другим существенным недостатком микрофлюидных устройств является относительно небольшая производительность при получении наноматериалов [77, 91, 92].

Заключение

За последние 25 лет наблюдается экспоненциальный рост количества исследований, посвященных липосомам как носителям ЛС, что подтверждает перспективность использования данного метода доставки при разработке лекарственных препаратов для лечения заболеваний высокой социальной значимости.

Традиционные методы получения липосом (гидратации тонкой пленки, удаления детергента, впрыска (инъекции) растворителя, обратно-фазового выпаривания и др.) просты в исполнении и не требуют использования сложного оборудования. Препятствиями для промышленного производства липосом данными методами являются недостаточная эффективность включения действующих веществ, низкая воспроизводимость между сериями, неудовлетворительная стабильность при хранении и, что наиболее важно, сложность масштабирования для получения препаратов для клинического использования.

Исследования в смежных областях, прежде всего в электрогидродинамике и микрофлюидике, а также понимание механизмов самосборки липидов под действием коллоидных и межмолекулярных сил привели к разработке более совершенных методов получения липосом. Показано, что использование микрофлюидных технологий улучшает эффективность и воспроизводимость инкапсуляции, позволяет контролировать как размер везикул, так и их ламеллярность. Возможность одновременного использования нескольких параллельных реакторов упрощает масштабирование технологических процессов до уровня промышленного производства.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Gregoriadis G. Liposomes in drug delivery: how it all happened. *Pharmaceutics*. 2016;8(2):19. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics8020019>
2. Filipczak N, Pan J, Yalamarty SSK, Torchilin VP. Recent advancements in liposome technology. *Adv Drug Deliver Rev*. 2020;156:4–22. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.06.022>
3. Sanarova E, Lantsova A, Oborotova N, Orlova O, Polozkova A, Dmitrieva M, Nikolaeva N. Liposome drug delivery. *J Pharm Sci & Res*. 2019;11(3):1148–55.

4. Pattni BS, Chupin VV, Torchilin VP. New developments in liposomal drug delivery. *Chem Rev.* 2015;115(19):10938–66.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00046>
5. Almeida B, Nag OK, Rogers KE, Delehanty JB. Recent progress in bioconjugation strategies for liposome-mediated drug delivery. *Molecules.* 2020;25(23):5672.
<https://doi.org/10.3390/molecules25235672>
6. Crommelin DJA, van Hoogevest P, Storm G. The role of liposomes in clinical nanomedicine development. What now? Now what? *J Control Release.* 2020;318:256–63.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.12.023>
7. Shan X, Gong X, Li J, Wen J, Li Y, Zhang Z. Current approaches of nanomedicines in the market and various stage of clinical translation. *Acta Pharm Sin B.* 2022;12(7):3028–48.
<https://doi.org/10.1016/j.apsb.2022.02.025>
8. Liu P, Chen G, Zhang J. A review of liposomes as a drug delivery system: current status of approved products, regulatory environments, and future perspectives. *Molecules.* 2022;27(4):1372.
<https://doi.org/10.3390/molecules27041372>
9. Bangham AD, Standish MM, Watkins JC. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol.* 1965;13(1):238–52.
[https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(65\)80093-6](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(65)80093-6)
10. Gulati M, Bajad S, Singh S, Ferdous AJ, Singh M. Development of liposomal amphotericin B formulation. *J Microencapsul.* 1998;15(2):137–51.
<https://doi.org/10.3109/02652049809006844>
11. Barenholz Y. Doxil® – the first FDA-approved nano-drug: lessons learned. *J Control Release.* 2012;160(2):117–34.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.03.020>
12. Zhao M, Ding X, Shen J, Zhang X, Ding X, Xu B. Use of liposomal doxorubicin for adjuvant chemotherapy of breast cancer in clinical practice. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2017;18(1):15–26.
<https://doi.org/10.1631/jzus.B1600303>
13. Petre CE, Dittmer DP. Liposomal daunorubicin as treatment for Kaposi's sarcoma. *Int J Nanomedicine.* 2007;2(3):277–88.
PMID: 18019828
14. Taléns-Visconti R, Díez-Sales O, de Julián-Ortiz JV, Nácher A. Nanoliposomes in cancer therapy: marketed products and current clinical trials. *Int J Mol Sci.* 2022;23(8):4249.
<https://doi.org/10.3390/ijms23084249>
15. Stone NR, Bicanic T, Salim R, Hope W. Liposomal amphotericin B (AmBisome®): a review of the pharmacokinetics, pharmacodynamics, clinical experience and future directions. *Drugs.* 2016;76(4):485–500.
<https://doi.org/10.1007/s40265-016-0538-7>
16. Shirley M. Amikacin liposome inhalation suspension: a review in Mycobacterium avium complex lung disease. *Drugs.* 2019;79(5):555–62.
<https://doi.org/10.1007/s40265-019-01095-z>
17. Wang N, Chen M, Wang T. Liposomes used as a vaccine adjuvant-delivery system: from basics to clinical immunization. *J Control Release.* 2019;303:130–50.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.04.025>
18. Bulbake U, Doppalapudi S, Kommineni N, Khan W. Liposomal formulations in clinical use: an updated review. *Pharmaceutics.* 2017;9(2):12.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics9020012>
19. Andra VVSNL, Pammi SVN, Bhatraju LVKP, Rudaraju LK. A comprehensive review on novel liposomal methodologies, commercial formulations, clinical trials and patents. *Bionanoscience.* 2022;12(1):274–91.
<https://doi.org/10.1007/s12668-022-00941-x>
20. Ilfeld BM, Eisenach JC, Gabriel RA. Clinical effectiveness of liposomal bupivacaine administered by infiltration or peripheral nerve block to treat postoperative pain. *Anesthesiology.* 2021;134(2):283–344.
<https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000003630>
21. Ren H, He Y, Liang J, Cheng Z, Zhang M, Zhu Y, et al. Role of liposome size, surface charge, and PEGylation on rheumatoid arthritis targeting therapy. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2019;11(22):20304–15.
<https://doi.org/10.1021/acsami.8b22693>
22. Tretiakova DS, Vodovozova EL. Liposomes as adjuvants and vaccine delivery systems. *Biochem (Mosc) Suppl Ser A Membr Cell Biol.* 2022;16(1):1–20.
<https://doi.org/10.1134/S1990747822020076>
23. Mukhamadiyarov RA, Senokosova EA, Krutitsky SS, Voevoda DV, Pyshnaya IA, Ivanov VV, et al. Size-dependent ability of liposomes to accumulate in the ischemic myocardium and protect the heart. *J Cardiovasc Pharm.* 2018;72(3):143–52.
<https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000000606>
24. Zhang H. Thin-film hydration followed by extrusion method for liposome preparation. *Methods Mol Biol.* 2017;1522:17–22.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6591-5_2
25. Salehi B, Mishra AP, Nigam M, Kobarfard F, Javed Z, Rajabi S, et al. Multivesicular liposome (depofoam) in human diseases. *Iran J Pharm Res.* 2020;19(2):9–21.
<https://doi.org/10.22037/ijpr.2020.112291.13663>
26. Salehi B, Selamoglu ZS, Mileski K, Pezzani R, Redaelli M, Cho WC, et al. Liposomal cytarabine as cancer therapy: from chemistry to medicine. *Biomolecules.* 2019;9(12):773.
<https://doi.org/10.3390/biom9120773>
27. Chaurasiya A, Gorajiya A, Panchal K, Katke S, Singh AK. A review on multivesicular liposomes for pharmaceutical applications: preparation, characterization, and translational challenges. *Drug Deliv Transl Res.* 2022;12(7):1569–87.
<https://doi.org/10.1007/s13346-021-01060-y>
28. Angst MS, Drover DR. Pharmacology of drugs formulated with DepoFoam™. *Clin Pharmacokinet.* 2006;45(12):1153–76.
<https://doi.org/10.2165/00003088-200645120-00002>
29. Ibrahim M, Abuwatfa WH, Awad NS, Sabouni R, Hussein GA. Encapsulation, release, and cytotoxicity of doxorubicin loaded in liposomes, micelles, and metal-organic frameworks: a review. *Pharmaceutics.* 2022;14(2):254.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14020254>
30. Beiranvand S, Eatemadi A, Karimi A. New updates pertaining to drug delivery of local anesthetics in particular bupivacaine using lipid nanoparticles.

- Nanoscale Res Lett.* 2016;11(1):307–17.
<https://doi.org/10.1186/s11671-016-1520-8>
31. Silverman JA, Deitcher SR. Marqibo® (vincristine sulfate liposome injection) improves the pharmacokinetics and pharmacodynamics of vincristine. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2013;71(3):555–64.
<https://doi.org/10.1007/s00280-012-2042-4>
 32. Venkatakrishnan K, Liu Y, Noe D, Mertz J, Bargfrede M, Marbury T, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of liposomal mifamurtide in adult volunteers with mild or moderate hepatic impairment. *Br J Clin Pharmacol.* 2014;77(6):998–1010.
<https://doi.org/10.1111/bcp.12261>
 33. Swenson CE, Perkins WR, Roberts P, Janoff AS. Liposome technology and the development of Myocet™ (liposomal doxorubicin citrate). *Breast.* 2001;10:1–7.
[https://doi.org/10.1016/S0960-9776\(01\)80001-1](https://doi.org/10.1016/S0960-9776(01)80001-1)
 34. Skupin-Mrugalska P, Piskorz J, Goslinski T, Mielcarek J, Konopka K, Düzgüneş N. Current status of liposomal porphyrinoid photosensitizers. *Drug Discov Today.* 2013;18(15–16):776–84.
<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2013.04.003>
 35. Milano G, Innocenti F, Minami H. Liposomal irinotecan (Onivyde): exemplifying the benefits of nanotherapeutic drugs. *Cancer Sci.* 2022;113(7):2224–31.
<https://doi.org/10.1111/cas.15377>
 36. Dicko A, Kwak S, Frazier AA, Mayer LD, Liboiron BD. Biophysical characterization of a liposomal formulation of cytarabine and daunorubicin. *Int J Pharm.* 2010;391(1–2):248–59.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.02.014>
 37. Li Z, Perkins W, Cipolla D. Robustness of aerosol delivery of amikacin liposome inhalation suspension using the eFlow® Technology. *Eur J Pharm Biopharm.* 2021;166:10–8.
<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2021.05.021>
 38. Perkins W, Malinin V, Li X, Miller B, Seidel D, Holzmann P, et al. System for treating pulmonary infections. US Patent No. 9566234 B2, 2017.
<https://patents.google.com/patent/US9566234B2/en>
 39. Gouda A, Sakr OS, Nasr M, Sammour OA. Ethanol injection technique for liposomes formulation: An insight into development, influencing factors, challenges and applications. *J Drug Deliv Sci Technol.* 2020;61:102174.
<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.102174>
 40. Alving CR, Beck Z, Matyas GR, Rao M. Liposomal adjuvants for human vaccines. *Expert Opin Drug Deliv.* 2016;13(6):807–16.
<https://doi.org/10.1517/17425247.2016.1151871>
 41. Li J, Wang X, Zhang T, Wang C, Huang Z, Luo X, et al. A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. *Asian J Pharm Sci.* 2015;10(2):81–98.
<https://doi.org/10.1016/j.ajps.2014.09.004>
 42. Ferrer JR, Sinegra AJ, Ivancic D, Yeap XY, Qiu L, Wang JJ, et al. Structure-dependent biodistribution of liposomal spherical nucleic acids. *ACS Nano.* 2020;14(2):1682–93.
<https://doi.org/10.1021/acsnano.9b07254>
 43. Nunes SS, Fernandes RS, Cavalcante CH, da Costa César I, Leite EA, Lopes SCA, et al. Influence of PEG coating on the biodistribution and tumor accumulation of pH-sensitive liposomes. *Drug Deliv and Transl Res.* 2019;9(1):123–30.
<https://doi.org/10.1007/s13346-018-0583-8>
 44. Carter KA, Shao S, Hoopes MI, Luo D, Ahsan B, Grigoriants VM, et al. Porphyrin-phospholipid liposomes permeabilized by near-infrared light. *Nat Commun.* 2014;5:3546.
<https://doi.org/10.1038/ncomms4546>
 45. Park SM, Kim MS, Park S-J, Park ES, Choi K-S, Kim Y-S, et al. Novel temperature-triggered liposome with high stability: formulation, in vitro evaluation, and in vivo study combined with high-intensity focused ultrasound (HIFU). *J Control Release.* 2014;170(3):373–9.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.06.003>
 46. Nasr G, Greige-Gerges H, Elaissari A, Khreich N. Liposomal membrane permeability assessment by fluorescence techniques: main permeabilizing agents, applications and challenges. *Int J Pharm.* 2020;580:119198.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119198>
 47. Nsairat H, Khater D, Sayed U, Odeh F, Bawab AA, Alshaer W. Liposomes: structure, composition, types, and clinical applications. *Heliyon.* 2022;8(5):e09394.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09394>
 48. Quinn PJ. The effect of tocopherol on the structure and permeability of phosphatidylcholine liposomes. *J Control Release.* 2012;160(2):158–63.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.12.029>
 49. De Leo V, Milano F, Agostiano A, Catucci L. Recent advancements in polymer/liposome assembly for drug delivery: from surface modifications to hybrid vesicles. *Polymers.* 2021;13(7):1027.
<https://doi.org/10.3390/polym13071027>
 50. Lamichhane N, Udayakumar TS, D'Souza WD, Simone CB., Raghavan SR, Polf J, et al. Liposomes: clinical applications and potential for image-guided drug delivery. *Molecules.* 2018;23(2):288.
<https://doi.org/10.3390/molecules23020288>
 51. Tsermentseli SK, Kontogiannopoulos KN, Papageorgiou VP, Assimopoulou AN. Comparative study of PEGylated and conventional liposomes as carriers for shikonin. *Fluids.* 2018;3(2):36.
<https://doi.org/10.3390/fluids3020036>
 52. Torchilin V. PEGylated pharmaceutical nanocarriers. In: Wright J, Burgess D, eds. *Long acting injections and implants. Advances in delivery science and technology.* Boston, MA: Springer; 2012. P. 263–93.
https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0554-2_14
 53. Caddeo C, Pucci L, Gabriele M, Carbone C, Fernàndez-Busquets X, Valenti D, et al. Stability, biocompatibility and antioxidant activity of PEG-modified liposomes containing resveratrol. *Int J Pharm.* 2018;538(1–2):40–7.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.12.047>
 54. Nosova AS, Koloskova OO, Nikonova AA, Simonova VA, Smirnov VV, Kudlay D, et al. Diversity of PEGylation methods of liposomes and their influence on RNA delivery. *Medchemcomm.* 2019;10(3):369–77.
<https://doi.org/10.1039/c8md00515j>
 55. Ilinskaya AN, Dobrovol'skaia MA. Understanding the immunogenicity and antigenicity of nanomaterials:

- past, present and future. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2016;299:70–7.
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2016.01.005>
56. Третьякова ДС, Хайдуков СВ, Бабаянц АА, Фролова ИС, Щегловитова ОН, Онищенко НР и др. Липофильное пролекарство метотрексата в мембране липосом усиливает их фагоцитоз в крови человека. *Acta Naturae*. 2020;12(1):99–109.
Tretiakova DS, Khaidukov SV, Babayants AA, Frolova IS, Scheglovitova ON, Onishchenko NR, et al. Lipophilic prodrug of methotrexate in the membrane of liposomes promotes their uptake by human blood phagocytes. *Acta Naturae*. 2020;12(1):99–109 (In Russ.).
<https://doi.org/10.32607/actanaturae.10946>
 57. Kularatne RN, Crist RM, Stern ST. the future of tissue-targeted lipid nanoparticle-mediated nucleic acid delivery. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2022;15(7):897.
<https://doi.org/10.3390/ph15070897>
 58. Riaz MK, Riaz MA, Zhang X, Lin C, Wong KH, Chen X, et al. Surface functionalization and targeting strategies of liposomes in solid tumor therapy: a review. *Int J Mol Sci*. 2018;19(1):195.
<https://doi.org/10.3390/ijms19010195>
 59. Горбик ВС, Шпрах ЗС, Козлова ЖМ, Салова ВГ. Липосомы как система таргетной доставки лекарственных средств (обзор). *Российский биотерапевтический журнал*. 2021;20(1):33–41.
Gorbik VS, Shprakh ZS, Kozlova ZM, Salova VG. Liposomes as a targeted delivery system of drug (Review). *Russian Journal of Biotherapy*. 2021;20(1):33–41 (In Russ.).
<https://doi.org/10.17650/1726-9784-2021-20-1-33-41>
 60. Новикова АА, Кезимана П, Станишевский ЯМ. Методы получения липосом, используемых в качестве носителей лекарственных средств (обзор). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017;19(2):134–8.
Novikova AA, Kezimana P, Stanishevskiy YM. Methods of obtaining liposomes, used as drug delivery systems (Review). *Drug Development and Registration*. 2017;19(2):134–8 (In Russ.).
 61. Lombardo D, Kiselev MA. Methods of liposomes preparation: formation and control factors of versatile nanocarriers for biomedical and nanomedicine application. *Pharmaceutics*. 2022;14(3):543.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14030543>
 62. Sanarova EV, Lantsova AV, Nikolaeva LL, Orlova OL. Technological aspects of obtaining liposomal drug delivery systems. *World J Pharm Pharm Sci*. 2022;11(8):1979–2009.
 63. Shvets VI, Kaplun AP, Krasnopol'skii YM, Stepanov AE, Chekhonin VP. From liposomes of the 1970s to 21st century nanobiotechnology. *Nanotechnol Russia*. 2008;3:643–55.
<https://doi.org/10.1134/S1995078008110013>
 64. Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Davaran S, Joo SW, Zarghami N, Hanifehpour Y, et al. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nano-scale Res Lett*. 2013;8(1):102.
<https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-102>
 65. Shaker S, Gardouh AR, Ghorab MM. Factors affecting liposomes particle size prepared by ethanol injection method. *Res Pharm Sci*. 2017;12(5):346–52.
<https://doi.org/10.4103/1735-5362.213979>
 66. Shi NQ, Qi XR. Preparation of drug liposomes by reverse-phase evaporation. In: Lu W, Qi XR, eds. *Liposome-based drug delivery systems. Biomaterial engineering*. Berlin: Springer; 2018. P. 1–10.
https://doi.org/10.1007/978-3-662-49231-4_3-1
 67. Lu B, Ma Q, Zhang J, Liu R, Yue Z, Xu C, et al. Preparation and characterization of bupivacaine multivesicular liposome: a QbD study about the effects of formulation and process on critical quality attributes. *Int J Pharm*. 2021;598:120335.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120335>
 68. Boban Z, Mardesic I, Subczynski WK, Raguz M. Giant unilamellar vesicle electroformation: what to use, what to avoid, and how to quantify the results. *Membranes*. 2021;11(11):860.
<https://doi.org/10.3390/membranes11110860>
 69. Maritim S, Boulas P, Lin Y. Comprehensive analysis of liposome formulation parameters and their influence on encapsulation, stability and drug release in glibenclamide liposomes. *Int J Pharm*. 2021;592:120051.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.120051>
 70. Дмитриева МВ, Лугэн Б, Оборотова НА, Краснюк ИИ, Краснюк ИИ (мл.), Беляцкая АВ и др. Метод экструзии в технологии получения липосом. *Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация*. 2020;(3):87–96.
Dmitrieva MV, Lugen B, Oborotova NA, Krasnyuk II, Krasnyuk II (Jr.), Belyatskaya AV, et al. Extrusion method in the technology preparation of liposomes. *Proceedings of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy*. 2020(3):87–96 (In Russ.).
 71. Ong SG, Chitneni M, Lee KS, Ming LC, Yuen KH. Evaluation of extrusion technique for nanosizing liposomes. *Pharmaceutics*. 2016;8(4):36.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics8040036>
 72. Doskocz J, Dalek P, Przybylo M, Trzebicka B, Forsy A, Kobylukh A, et al. The elucidation of the molecular mechanism of the extrusion process. *Materials*. 2021;14(15):4278.
<https://doi.org/10.3390/ma14154278>
 73. Xiang B, Cao DY. Preparation of drug liposomes by thin-film hydration and homogenization. In: Lu WL, Qi XR, eds. *Liposome-based drug delivery systems. Biomaterial engineering*. Berlin: Springer; 2018. P. 1–11.
https://doi.org/10.1007/978-3-662-49231-4_2-1
 74. Preksha V, Patel JK, Patel MM. High-pressure homogenization techniques for nanoparticles. In: Patel JK, Pathak YV, eds. *Emerging technologies for nanoparticle manufacturing*. Cham: Springer; 2021. P. 263–86.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-50703-9_11
 75. Roces CB, Lou G, Jain N, Abraham S, Thomas A, Halbert GW, et al. Manufacturing considerations for the development of lipid nanoparticles using microfluidics. *Pharmaceutics*. 2020;12(11):1095.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12111095>
 76. Has C, Sunthar P. A comprehensive review on recent preparation techniques of liposomes. *J Liposome Res*.

- 2020;30(4):336–65.
<https://doi.org/10.1080/08982104.2019.1668010>
77. Carugo D, Bottaro E, Owen J, Stride E, Nastruzzi C. Liposome production by microfluidics: potential and limiting factors. *Sci Rep*. 2016;6:25876.
<https://doi.org/10.1038/srep25876>
78. Zhang G, Sun J. Lipid in chips: a brief review of liposomes formation by microfluidics. *Int J Nanomedicine*. 2021;16:7391–16.
<https://doi.org/10.2147/IJN.S331639>
79. Lin WS, Malmstadt N. Liposome production and concurrent loading of drug simulants by microfluidic hydrodynamic focusing. *Eur Biophys J*. 2019;48(6):549–58.
<https://doi.org/10.1007/s00249-019-01383-2>
80. Garg S, Heuck G, Ip S, Ramsay E. Microfluidics: a transformational tool for nanomedicine development and production. *J Drug Target*. 2016;24(9):821–35.
<https://doi.org/10.1080/1061186X.2016.1198354>
81. Capretto L, Carugo D, Mazzitelli S, Nastruzzi C, Zhang X. Microfluidic and lab-on-a-chip preparation routes for organic nanoparticles and vesicular systems for nanomedicine applications. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013;65(11–12):1496–532.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.08.002>
82. Balbino TA, Aoki NT, Gasperini AAM, Oliveira CLP, Azzoni AR, Cavalcanti LP, et al. Continuous flow production of cationic liposomes at high lipid concentration in microfluidic devices for gene delivery applications. *Chem Eng J*. 2013;226:423–33.
<https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.04.053>
83. Maeki M, Kimura N, Sato Y, Harashima H, Tokeshi M. Advances in microfluidics for lipid nanoparticles and extracellular vesicles and applications in drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev*. 2018;128:84–100.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.03.008>
84. Koki K, Toshihisa O, Shoji T. Formation of nano-sized lipid vesicles with asymmetric lipid components using a pulsed-jet flow method. *Sens Actuators B Chem*. 2021;327:128917.
<https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.128917>
85. Chiba M, Miyazaki M, Ishiwata S. Quantitative analysis of the lamellarity of giant liposomes prepared by the inverted emulsion method. *Biophys J*. 2014;107(2):346–54.
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.05.039>
86. Sugiura S, Kuroiwa T, Kagota T, Nakajima M, Sato S, Mukataka S, et al. Novel method for obtaining homogeneous giant vesicles from a monodisperse water-in-oil emulsion prepared with a microfluidic device. *Langmuir*. 2008;24(9):4581–8.
<https://doi.org/10.1021/la703509r>
87. Kuroiwa T, Fujita R, Kobayashi I, Uemura K, Nakajima M, Sato S, et al. Efficient preparation of giant vesicles as biomimetic compartment systems with high entrapment yields for biomacromolecules. *Chem Biodivers*. 2012;9(11):2453–72.
<https://doi.org/10.1002/cbdv.201200274>
88. Ota S, Yoshizawa S, Takeuchi S. Microfluidic formation of monodisperse, cell-sized, and unilamellar vesicles. *Angew Chem Int Ed*. 2009;48(35):6533–7.
<https://doi.org/10.1002/anie.200902182>
89. Zhigaltsev IV, Belliveau N, Hafez I, Leung AK, Huft J, Hansen C, et al. Bottom-up design and synthesis of limit size lipid nanoparticle systems with aqueous and triglyceride cores using millisecond microfluidic mixing. *Langmuir*. 2012;28(7):3633–40.
<https://doi.org/10.1021/la204833h>
90. Lou G, Anderluzzi G, Woods S, Roberts CW, Perrie Y. A novel microfluidic-based approach to formulate size-tuneable large unilamellar cationic liposomes: formulation, cellular uptake and biodistribution investigations. *Eur J Pharm Biopharm*. 2019;143:51–60.
<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.08.013>
91. Mitchell MJ, Billingsley MM, Haley RM, Wechsler ME, Peppas NA, Langer R. Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nat Rev Drug Discov*. 2021;20(2):101–24.
<https://doi.org/10.1038/s41573-020-0090-8>
92. Ma Z, Li B, Peng J, Gao D. Recent development of drug delivery systems through microfluidics: from synthesis to evaluation. *Pharmaceutics*. 2022;14(2):434.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14020434>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: Н.И. Бурдаев – подбор и анализ литературы; Л.Л. Николаева, З.С. Шпрах – подбор и анализ литературы, написание и оформление текста рукописи; В.В. Косенко – идея исследования, планирование исследования, подбор и анализ литературы; Н.Д. Бунытян – ответственность за все аспекты работы и целостность всех частей статьи, утверждение окончательного варианта рукописи для публикации.

Благодарности. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. *Nikolay I. Burdaev* selected and reviewed literature. *Ludmila L. Nikolaeva* and *Zoya S. Shprakh* selected and reviewed literature, drafted and formatted the manuscript. *Valentina V. Kosenko* elaborated the study idea, planned the study, selected and reviewed literature. *Natalia D. Bunyatyan* agreed to be accountable for all aspects of the work, including the integrity of all its parts, and approved the final version of the manuscript for publication.

Acknowledgements. The study was performed without external funding.

Конфликт интересов. В.В. Косенко — главный редактор, Н.Д. Бунятян — член редколлегии журнала «Вестник НЦЭСМП. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств». Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest. Valentina V. Kosenko is the Editor-in-Chief of *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*, and Natalia D. Bunyatyan is a member of the journal's Editorial Board. The other authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Бурдаев Николай Игоревич

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0662-495X>
burd.mobile@gmail.com

Николаева Людмила Леонидовна, канд. фарм. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8003-8241>
alima91@yandex.ru

Косенко Валентина Владимировна, канд. фарм. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8353-7863>
General@expmed.ru

Шпрах Зоя Сергеевна, д-р фарм. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3034-750X>
z.shprakh@ronc.ru

Бунятян Наталья Дмитриевна, д-р фарм. наук, профессор

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0936-5551>
ndbun@mail.ru

Поступила 10.10.2022

После доработки 12.01.2023

Принята к публикации 07.03.2023

Online first 18.05.2023

Nilolay I. Burdaev

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0662-495X>
burd.mobile@gmail.com

Ludmila L. Nikolaeva, Cand. Sci. (Pharm.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8003-8241>
alima91@yandex.ru

Valentina V. Kosenko, Cand. Sci. (Pharm.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8353-7863>
General@expmed.ru

Zoya S. Shprakh, Dr. Sci. (Pharm.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3034-750X>
z.shprakh@ronc.ru

Natalia D. Bunyatyan, Dr. Sci. (Pharm.),

Professor

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0936-5551>
ndbun@mail.ru

Received 10 October 2022

Revised 12 January 2023

Accepted 7 March 2023

Online first 18 May 2023



Е.О. Бахрушина¹ 
В.С. Пыжов¹ 
П.С. Сахарова¹ 
Н.Б. Демина¹ 
Д.А. Чижова³ 
Т.В. Табанская^{1,2} 
М.Ф. Лутфуллин³ 

Блок-сополимеры этиленоксида и пропиленоксида: перспективы применения в отечественной медицине и фармации

¹ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» (Сеченовский Университет) Министерства здравоохранения Российской Федерации, Институт фармации имени А.П. Нелюбина, Трубецкая ул., д. 8, стр. 2, Москва, 119991, Российская Федерация

² 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

³ Министерство здравоохранения Российской Федерации, Рахмановский пер., д. 3, ГСП-4, Москва, 127994, Российская Федерация

✉ Бахрушина Елена Олеговна; bakhrushina_e_o@staff.sechenov.ru

РЕЗЮМЕ

Блок-сополимеры этиленоксида и пропиленоксида (блок-сополимеры ЭО и ПО), также называемые плурониками, полосамерами или проксанолами — это полимерные неионогенные поверхностно-активные вещества с высоким гидрофильно-липофильным балансом, являющиеся одними из самых востребованных современных вспомогательных веществ в производстве лекарственных средств. Они используются как при производстве традиционных лекарственных форм (жидких, мягких, твердых), так и в составе систем направленной доставки. Это связано с наличием у таких блок-сополимеров, помимо солюбилизующей, эмульгирующей, гелеобразующей и других способностей, термореверсивных свойств, которые необходимы при создании *in situ* систем и технологий 3D-печати.

Цель работы — оценка перспектив применения блок-сополимеров ЭО и ПО в медицинских целях, а также анализ номенклатуры лекарственных препаратов, содержащих блок-сополимеры ЭО и ПО, зарегистрированных в Российской Федерации.

В настоящем обзоре проанализирован реестр зарегистрированных в Российской Федерации лекарственных средств, содержащих полосамеры, приведен перечень крупнейших мировых производителей блок-сополимеров ЭО и ПО и изучена возможность применения полосамеров в медицинских целях. На сегодня в мире насчитывается более десяти химических концернов и компаний, производящих блок-сополимеры ЭО и ПО для фармацевтических, биотехнологических и других отраслей. Отмечено, что полосамеры входят в состав более шестидесяти препаратов на российском фармацевтическом рынке, что свидетельствует о необходимости импортозамещения данных компонентов.

Ключевые слова: блок-сополимеры этиленоксида и пропиленоксида; полосамеры; плуроники; проксаноламы; эмукол; *in situ* системы; Государственный реестр лекарственных средств

Для цитирования: Бахрушина Е.О., Пыжов В.С., Сахарова П.С., Демина Н.Б., Чижова Д.А., Табанская Т.В., Лутфуллин М.Ф. Блок-сополимеры этиленоксида и пропиленоксида: перспективы применения в отечественной медицине и фармации. *Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2023;13(2-1):333–344. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-530>

E.O. Bakhrushina¹ 
V.S. Pyzhov¹ 
P.S. Sakharova¹ 
N.B. Demina¹ 
D.A. Chizhova³ 
T.V. Tabanskaya^{1,2} 
M.F. Lutfullin³ 

Block Copolymers of Ethylene Oxide and Propylene Oxide: Prospects for Medical and Pharmaceutical Application in Russia

¹ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University),
A.P. Nelyubin Institute of Pharmacy
8/2 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russian Federation

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

³ Ministry of Health of the Russian Federation,
3 Rakhmanovsky Ln., GSP-4, Moscow 127994, Russian Federation

✉ Elena O. Bakhrushina; bakhrushina_e_o@staff.sechenov.ru

ABSTRACT

Block copolymers of ethylene oxide and propylene oxide (EO/PO block copolymers) are polymeric non-ionic surfactants with a high hydrophilic–lipophilic balance also referred to as pluronics, poloxamers, or proxanols. These compounds are among the most demanded modern excipients for the production of medicines. EO/PO block copolymers are used both in the production of traditional (liquid, semi-solid, and solid) dosage forms and as part of targeted delivery systems. The extensive application of EO/PO block copolymers is due to the diverse array of their properties, including not only solubilising, emulsifying, gelling, and other effects but also thermoreversibility, which is essential for developing *in situ* delivery systems and 3D printing technologies.

The aim of the study was to evaluate the potential of EO/PO block copolymers for medicinal use and to assess the range of medicinal products approved in the Russian Federation that contain EO/PO block copolymers.

This review presents an analysis of the register of poloxamer-containing medicines approved in the Russian Federation, a list of the largest manufacturers of EO/PO block copolymers in the world, and a study of the possibility to use copolymers for medical purposes. Currently, there are more than 10 chemical manufacturers producing EO/PO block copolymers for the pharmaceutical, biotechnology, and other industries around the world. EO/PO block copolymers are included in more than 60 medicinal products present in the Russian pharmaceutical market; this observation indicates the need to phase out the import of poloxamers.

Key words: block copolymers of ethylene oxide and propylene oxide; poloxamers; pluronics; proxanols; emuxol; *in situ* systems; State register of medicines

For citation: Bakhrushina E.O., Pyzhov V.S., Sakharova P.S., Demina N.B., Chizhova D.A., Tabanskaya T.V., Lutfullin M.F. Block copolymers of ethylene oxide and propylene oxide: prospects for medical and pharmaceutical application in Russia. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2023;13(2-1):333–344. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-530>

Введение

Вспомогательные вещества, входящие в состав лекарственного препарата, оказывают заметное влияние на его эффективность и безопасность. От свойств вспомогательных веществ зависят как биодоступность активного фармацевтического ингредиента, технологические показатели лекарственной формы, обеспечивающие ее стабильность и длительность хранения, так и удобство применения, свойства, определяющие потребительские предпочтения. Таким образом, варьируя состав вспомогательных веществ

лекарственного препарата, можно добиться создания препарата, удовлетворяющего заданному дизайну фармацевтической разработки.

В последнее десятилетие в рецептуре лекарственных препаратов все чаще используют сопроцессинговые смеси, или вспомогательные вещества, отличающиеся мультифункциональностью. Подобный подход уменьшает затраты на фармацевтическую разработку, ускоряет процесс создания и производства новых лекарственных препаратов, минимизирует риски ошибки на производстве, что позитивно отражается

на качестве и себестоимости готовых лекарственных препаратов.

Блок-сополимеры этиленоксида и пропиленоксида (блок-сополимеры ЭО и ПО, поллоксамеры, плюроники) — неоиногенные поверхностно-активные вещества с высоким гидрофильно-липофильным балансом — одно из вспомогательных средств, отвечающее современному тренду мультифункциональности. Термочувствительный компонент, солюбилизатор, эмульгатор, активатор всасывания, гелеобразователь, стабилизатор клеточных мембран, высокоактивное безопасное поверхностно-активное вещество — вот только некоторые возможности применения этих полимеров. Многофункциональность позволяет успешно применять их в рецептуре как жидких, мягких, так и твердых лекарственных форм.

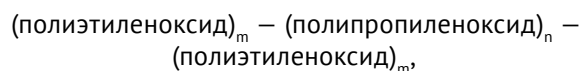
В середине XX века блок-сополимеры ЭО и ПО использовались в СССР исключительно для нужд текстильной, химической, нефтеперерабатывающей промышленности, в то время как во всем мире уже тогда они стали востребованы и для медицинских целей. Работы по изучению возможности использования блок-сополимеров ЭО и ПО в композициях для медицинского применения в нашей стране начали проводиться лишь в конце 60-х годов XX века, и можно с уверенностью сказать, что их потенциал в фармацевтике еще до конца не изучен [1, 2].

На сегодня блок-сополимеры ЭО и ПО являются одними из самых востребованных компонентов для получения систем таргетной доставки за счет термочувствительности, позволяющей проводить термозависимый фазовый переход и обеспечивать контроль высвобождения активного фармацевтического ингредиента [3–6].

Цель работы — оценка перспектив применения сополимеров ЭО и ПО в медицинских целях, а также анализ номенклатуры лекарственных препаратов, содержащих блок-сополимеры ЭО и ПО, зарегистрированных в Российской Федерации.

Общая характеристика и возможности применения блок-сополимеров этиленоксида и пропиленоксида в современных технологиях

Блок-сополимеры ЭО и ПО представляют собой симметричные неоиногенные полимеры, состоящие из повторяющихся фрагментов полиэтиленоксида и полипропиленоксида, общей формулой



где m и n — количество полимерных звеньев.

Функционал поллоксамеров обусловлен соотношением количества ЭО и ПО звеньев, молекулярной массой (M_m), а также массовой долей гидрофильных (ЭО) или гидрофобных (ПО) групп. Последняя характеристика определяет такие показатели полимеров, как гидрофильно-липофильный баланс, критическая концентрация мицеллообразования, температура помутнения полимера в растворе и т.д. [7]. Так, например, в работе А. Kabanov et al. [8] при анализе плюронигов L121 (M_m 4400) и P84 (M_m 4200), имеющих близкие значения молекулярных масс, но разное содержание гидрофильного ЭО фрагмента в сополимере (10 и 40% соответственно), было показано, что значения гидрофильно-липофильного баланса; критическая концентрация мицеллообразования; температуры помутнения полимера в 1% растворе также сильно различались: для L121 составляя 1; 1×10^{-6} моль/л; 14 °С соответственно, а для P84 — 14; $7,1 \times 10^{-5}$ моль/л; 74 °С.

Активно используется в современных разработках и способность некоторых блок-сополимеров ЭО и ПО к самосборке в определенном температурном диапазоне (термочувствительный или термореверсивный золь-гель переход), обусловленная внутренними изменениями свойств мицелл или энтропийным изменением упорядоченных молекул воды вблизи сегментов ПО, а также возможным образованием сшитой и трехмерной структуры, способной захватывать воду [5]. Подобное свойство было обнаружено еще в конце 70-х годов для поллоксамера 407 (M_m 12700) I.R. Schmolka [9–12]. В исследовании 2022 г. корейские ученые описали самосборку двух разных типов смесей блок-сополимеров P65 и PE6200, что может стать новым этапом развития синтеза и применения термочувствительных полимеров [13].

За последнее десятилетие трендами мировой фармацевтической и медицинской науки стали разработки систем направленной (таргетной) доставки и регенеративная медицина, в которой успешно применяются новые технологии 3D-биопечати. Особую актуальность изучения блок-сополимеров ЭО и ПО подчеркивает тот факт, что поллоксамеры находят широкое применение в реализации обоих этих направлений.

Направленная доставка. Блок-сополимеры ЭО и ПО используются в качестве систем направленной доставки уже более двадцати лет, и за это время исследователями выявлены не только преимущества и перспективы использования полимеров в технологии, но и некоторые

проблемы, на решение которых направлены современные исследования. Так, отмечается, что для поллоксамеров как вспомогательных веществ в системах направленной доставки характерно быстрое растворение, короткое время пребывания в биологических средах, слабая механическая прочность, что в комплексе может препятствовать эффективности систем на их основе. Таким образом, наиболее перспективным считается комбинирование плюроники с другими системами доставки и функциональными полимерами [14].

Блок-сополимеры ЭО и ПО все чаще находят применение как компоненты систем доставки химиотерапевтических агентов [15]. В 2022 г. был опубликован целый ряд исследований, описывающих создание и исследование различных систем доставки куркумина — натурального противоопухолевого средства — с поллоксамерами для корректировки низкой биодоступности и растворимости активного ингредиента [16–18]. Полученные системы доставки — полимерные наночастицы [16], наногель [17], твердые дисперсии [18], созданные на основе поллоксамера 188, поллоксамера 403 и поллоксамера 407, обеспечивали высокую стабильность противоопухолевой композиции, эффективную доставку активных агентов в опухолевые клетки и улучшенную выживаемость после химиотерапии, определенную в доклинических исследованиях *in vivo* [16].

В работе [19] описана разработка наночастиц фармацевтического ингредиента с противоопухолевой активностью R19, относящегося к четвертому классу биофармацевтической классификационной системы (низкая растворимость, низкая проницаемость) с использованием D- α -токоферилполиэтиленгликоля 1000 сукцината и поллоксамера P123 в разных соотношениях. Полученные наночастицы обеспечивали коллоидную стабильность системы, а в испытаниях *in vivo* продемонстрировали низкую цитотоксичность в отношении кожных фибробластов человека и более значительную индукцию апоптоза по сравнению со свободным введением R19.

Мицеллы и наномицеллы, образуемые блок-сополимерами ЭО и ПО, также используются для улучшения профилей эффективности и безопасности химиотерапевтических агентов [20–23]. В работе [20] изучалось влияние мицелл различных поверхностно-активных соединений (ионогенных и неионогенных) на противоопухолевую активность доцетаксела. Мицеллы на основе неионогенных поллоксамеров

продемонстрировали наилучшие профили высвобождения доцетаксела и значительное увеличение его эффективности.

В исследовании S. Mishra et al. [24] описывается разработка таргетной наносистемы на основе поллоксамера 407 для достижения нацеливания на конкретные типы клеток в поджелудочной железе. Для достижения активного таргетирования исследователями были конъюгированы несколько моноклональных антител (~150 кДа IgG), реагирующих на определенные типы клеток в поджелудочной железе путем соединения аминокрупп лизина антитела с группами пара-нитрофенилкарбоната, генерируемыми на гидрофильных сегментах ЭО поллоксамера 407. Полученные целевые наномицеллы продемонстрировали высокую специфичность связывания и эффективность таргетирования и в дальнейшем могут быть использованы для инкапсуляции и доставки гидрофобных агентов к конкретным типам клеток поджелудочной железы.

In situ системы представляют собой современные системы таргетной доставки, которые претерпевают фазовый переход в локальной точке применения. Такие системы основаны на чувствительных смарт-полимерах, которые изменяют свою конформацию под действием специфических стимулов: температуры, УФ-излучения, pH, присутствия селективных ионов, влаги, смены растворителя [25, 26]. Локальное изменение агрегатного состояния в точке предполагаемого действия дает возможность препаратам на основе таких систем лучше противостоять естественному клиренсу организма (например, при интраназальном или интравагинальном введении), дольше апплицироваться на месте применения, обеспечивая модифицированное высвобождение. Конечными формами *in situ* систем чаще являются гели и имплантаты, но известны также *in situ* пленки, эмульсии, суппозитории и др. [27].

Первой подобной системой был фазочувствительный имплантат на основе гидрофобного полимера, растворенного в диметилформамиде [28]. Однако еще в конце 90-х годов XX века активно начали разрабатываться термочувствительные системы на смарт-полимерах, которые, в отличие от известных фазочувствительных композиций, обладали возможностью управляемого фазового перехода — контролируемого температурным диапазоном [29].

В 1998 г. была опубликована работа, описывающая положительный опыт создания тканеинженерного хряща, носителя аутологических

хондроцитов, на основе термореверсивного 30,0% раствора полоксамера 407, и введение его в животную модель [30]. Эту публикацию можно считать отправной точкой исследовательского интереса к созданию термочувствительных систем, позже названных *in situ* имплантатами.

Одной из первых работ, посвященных разработке термочувствительных *in situ* систем, было исследование C.S. Yong et al. [31]. В статье описываются так называемые «жидкие суппозитории» – *in situ* системы для вагинального или ректального введения, способные к гелеобразованию под действием температуры на месте применения. Смеси полоксамеров 407 (15%) и 188 (15–20%) существовали в виде жидкости при комнатной температуре, но гелировались при температуре 37°C. В исследовании была рассмотрена проблема изменения настроенного термочувствительного диапазона композиции после введения активного фармацевтического ингредиента. Диклофенак натрия значительно повышал температуру гелеобразования и ослаблял прочность геля и силу биоадгезии, в то время как введение хлорида натрия понижало температуру гелеобразования, повышая при этом прочность геля. Полоксамерные гели с содержанием хлорида натрия менее 1,0% вводились в прямую кишку кроликов без затруднений и подтеканий и оставались на месте не менее 6 ч. Авторы отмечают, что термочувствительная система жидких суппозиториях с хлоридом натрия и полоксамерами является более физически стабильной и удобной ректальной лекарственной формой диклофенака натрия.

На сегодня, по данным базы медицинских научных публикаций PubMed, опубликовано более 400 исследований, посвященных применению полоксамера 407 в термочувствительных *in situ* композициях. Температура является универсальным стимулом к фазовому переходу (благодаря различию физиологической, патологической температуры тела человека и температуры хранения препарата) и в нужной мере селективным. Это объясняет широкий спектр применения полоксамеров в составе подобных систем для офтальмологического [32–35], стоматологического [36], интраназального [37], интравагинального, а также внутриопухолевого и прочего парентерального применения [38–41]. Для большинства областей применения доля блок-сополимеров ЭО и ПО среди других смарт-полимеров составляет примерно 25% – увеличивается для интравагинального и ректального применения и уменьшается для стоматологических *in situ* имплантатов, традиционно

разрабатываемых на основе фазочувствительных композиций.

3D-биопечать – одно из самых новых и развивающихся направлений использования полоксамеров. С 2011 по 2022 г. в базу PubMed были включены 40 работ, посвященных биопечати с использованием блок-сополимеров ЭО и ПО, причем более 90% из них – за последние 5 лет (см., например, [42–53]).

3D-биопечать – инструмент, применяемый в регенеративной медицине. С помощью этого метода возможно создание искусственной костной и хрящевой ткани, элементов васкулярной сети, а также *in vitro* моделей органов [42–53]. Оптимальными кандидатами при выборе материала для биопечати являются гидрогели. Метод экструзионной печати позволяет использовать в качестве основы полимеры с широким диапазоном вязкости [42]. Из всех полимеров с выраженной гелеобразующей способностью, разрешенных для фармацевтического применения в качестве «чернил» для 3D-печати, наряду с натуральными полимерами (альгинат, агароза, желатин) широкое применение находит полоксамер 407.

Возможности применения полоксамера 407 в качестве материала для биопечати были отмечены еще в одной из первых работ в этой области, опубликованной в 2013 г. [43]. Авторы отмечают, что неоспоримым преимуществом полоксамера 407 являются его термореверсивные свойства – при температуре 4 °C раствор блок-сополимера находится в жидком агрегатном состоянии и становится вязко-пластичным при температуре выше температуры гелеобразования ~20 °C в растворах с концентрацией 24,5% масс./об. Это свойство позволяет растворять 3D-модель, полученную на основе полоксамера, в требуемых условиях, что делает возможным применение полимера в том числе для печати особо тонких и узких геометрий.

Полоксамер 407 был использован для печати методом микроэкструзии на компактном настольном 3D-принтере в работе E. Sodupe-Ortega et al. [44]. В 2021 г. Z. Fu et al. [45] был предложен способ автоматизации процедуры биопринтинга на основе полоксамера 407 из-за частого использования полимера для нужд регенеративной медицины.

После публикации в 2018 г. работы L. Benning et al. [46], демонстрирующей отсутствие преимуществ блок-сополимера перед коллагеном для печати искусственных сосудов, полоксамер 407 все чаще применяют в качестве материала для биопечати

в смеси с альгинатами. Также в статье G.R. López-Marcial et al. [43] были продемонстрированы преимущества композиции полоксамер-агароза-альгинат перед чистым полоксамером 407 в качестве эффективных биочернил для аддитивного производства биологических материалов для инженерии хрящевой ткани.

В исследовании Y. Xu et al. [47] также отмечалось, что 3D-формы на основе полоксамера 407 имеют модуль упругости, соответствующий естественной аорте, а клетки гладкой мускулатуры аорты сохраняют на полученном каркасе свою жизнеспособность и целостность.

В работе S. Hu et al. [48] тестировалась композиция из плюроники, альгината и пектина в качестве биочернил для печати имплантата с иммуномодулирующей активностью для заместительной клеточной терапии. Результаты показали, что загруженная клетками конструкция, напечатанная биочернилами пектин-альгинат-полоксамер, снижает реакцию тканей за счет ингибирования TLR2/1 и поддерживает выживание β -клеток, продуцирующих инсулин, в условиях воспалительного стресса. Авторами отмечено, что проведенное исследование представляет потенциальную новую стратегию для улучшения долгосрочной выживаемости трансплантатов островков Лангерганса поджелудочной железы для лечения диабета 1-го типа.

В исследовании [44] термочувствительный полусинтетический гидрогель полоксамер/альгинат использовался для биопечати 3D-модели печени с целью исследования специфичной для печени метаболической активности 3D-модели по сравнению с традиционными 2D-адгезивными культурами. Полученные авторами результаты демонстрируют высокую жизнеспособность и специфичную для печени метаболическую активность, оцениваемую по синтезу мочевины, альбумина и уровням экспрессии детоксицирующего фермента CYP1A2 клеток, встроенных в систему 3D-гидрогеля. Заметно повышенная чувствительность к ацетаминофену, известному своей гепатотоксичностью, наблюдается у клеток в 3D-модели по сравнению с 2D-культурами. Таким образом, 3D-модель, разработанная на основе композиции полоксамер-альгинат, может представлять собой альтернативу животным моделям *in vitro* для исследования гепатотоксичности, вызванной лекарственными препаратами.

В совместном исследовании специалистов Национального университета Канвондо (Рес-

публика Корея) и Яньбяньского университета (Китайская Народная Республика) [49] в 2021 г. было продемонстрировано, что трехмерные биопечатные гели полоксамера 407 способны стимулировать остеогенную дифференцировку стволовых клеток апикального сосочка (СКАС) под влиянием низкочастотного напряжения. Полученные результаты показывают, что 3D-биопечатные гидрогели P407 являются биосовместимыми для инкапсуляции СКАС, а применяемые низкочастотные электромагнитные поля могут эффективно улучшать регенерацию тканей зубов.

Производство блок-сополимеров этиленоксида и пропиленоксида на мировом рынке

Основным производителем блок-сополимеров ЭО и ПО для фармацевтических целей является химический концерн BASF (Германия), владелец патента на способ синтеза оригинального вспомогательного вещества, полученного в 1966 г. (патент опубликован в США в 1973 г.) [13]. Более 80% фармацевтических и биотехнологических разработок, а также производств препаратов проводятся с использованием коммерчески-доступных полимеров Kolliphor® (Lutrol®), Kollisolv®, выпущенных этой компанией. Для нужд фармацевтики и биотехнологической промышленности плюроники выпускают также компании Croda, PCC Rokita SA и др. (табл. 1). На российском рынке блок-сополимеры ЭО и ПО под торговой маркой «Эмуксол», зарегистрированной в 2009 г., производит АО «НИОПИК» (Эмуксол 168 (Мм 8000) и Эмуксол 268 (Мм 13000)). Также в России проксанол выпускается в качестве активного фармацевтического ингредиента в форме субстанции-раствора 13,3% (ЛСР-007448/10, ОАО «НПФ «ПЕРФТОРАН»).

В 2022 г. концерн BASF объявил о прекращении деятельности на российском рынке¹. Таким образом, для предотвращения развития дефектуры отечественным фармацевтическим компаниям следует рассмотреть возможность расширения круга альтернативных поставщиков данного вспомогательного вещества.

Блок-сополимеры этиленоксида и пропиленоксида в составе лекарственных средств

Функционал блок-сополимеров ЭО и ПО в качестве вспомогательных веществ для классических лекарственных форм довольно широк. В технологии стерильных растворов полоксамеры

¹ <https://www.interfax.ru/business/854080>

Таблица 1. Некоторые зарубежные производители блок-сополимеров этиленоксида и пропиленоксида

Table 1. Several foreign manufacturers of block copolymers of ethylene oxide and propylene oxide

Компания <i>Company</i>	Страна-производитель <i>Country of production</i>	Наименование марок <i>Trade name</i>
BASF SE	Германия / <i>Germany</i>	Kolliphor® (Lutrol®), Kollisolv®
Croda International Plc.	Великобритания / <i>UK</i>	Synperonic®
PCC Rokita SA	Польша / <i>Poland</i>	Rocopol®, Chema®
Stepan Company	США / <i>USA</i>	Makon®
Sasol Limited	Южно-Африканская Республика / <i>South Africa</i>	Plurodac®, Slovamic®, Novanic®
Green Cross Corp.	США / <i>USA</i>	Exocorpol®
LardRx (previously CytRx) Corp.	США / <i>USA</i>	Flocor®
Polysciences Inc.	США / <i>USA</i>	–
Xuchuan Chemical (Kunshan) Co. Ltd	Китай / <i>China</i>	–
Shanghai Longyu Biotechnology Co. Ltd	Китай / <i>China</i>	–
Hebei Likes Technology Co. Ltd	Китай / <i>China</i>	–
Anhui PUYA Biological Technology Co. Ltd	Китай / <i>China</i>	–

Примечание. «–» – торговые наименования отсутствуют.

Note. –, no trade name.

выполняют роль солюбилизаторов, веществ, стабилизирующих гетерогенные системы [54]. В жидких концентратах спреев введение блок-сополимеров ЭО и ПО обосновывается не только увеличением стабильности композиций, но и улучшением характеристик мукоадгезии, важных при разработке средств, предназначенных для нанесения на слизистые оболочки [55]. В мягких лекарственных формах полоксамеры в высоких концентрациях выполняют роль компонентов основы (гидрофильные гелеобразователи), стабилизаторов вязкости, солюбилизаторов, активаторов всасывания [55].

Согласно проведенному анализу фармацевтического рынка среди препаратов, изготавливаемых с применением блок-сополимеров ЭО и ПО, велика доля твердых лекарственных форм – около 40% (табл. 2, размещена на сайте журнала²). В технологии таблетированных форм полоксамеры эффективно выполняют функцию лубрикантов – скользящих веществ, обеспечивающих хорошее выталкивание таблеток из матрицы и отсутствие налипания таблеточной массы на пресс-инструмент [56, 57].

Полоксамер 188 широко используется в масштабном производстве клеточных культур млекопитающих и в культивировании клеточных культур в биореакторах [58–62] как защитный наполнитель для повы-

шения продуктивности клеточной биомассы на встряхиваемых культурах и уменьшения клеточной адгезии на стационарных культурах. Были предложены два механизма, объясняющие защитное действие полоксамера 188 на клетки. Первый предполагает, что полоксамер 188 защищает клетки от пузырьков атмосферного воздуха, образующихся в воде. Второй – что клетки становятся более устойчивыми к механическим воздействиям в присутствии полимера. Полоксамер 188 также способствует рефолдингу и подавляет агрегацию термически денатурированных протеинов. Удаление полоксамера 188 из технологического процесса культивирования может привести к уменьшению выхода готового продукта, а также ингибировать рост некоторых клеточных линий [63]. На сегодня полоксамер 188 используется при биотехнологическом производстве препаратов на основе моноклональных антител в качестве одного из компонентов питательной среды для культивирования бактерий на заводах полного цикла, таких как ЗАО «БИОКАД», ООО «Мабскейл» и др. В настоящее время рядом авторов полоксамер 188 рассматривается в качестве замены полисорбатов 20 и 80, наиболее широко используемых вспомогательных веществ для стабилизации белковых частиц в биотехнологических препаратах [64].

² <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-530-tabl2>

На сегодня в Российской Федерации зарегистрировано более 60 наименований лекарственных препаратов, в состав которых входят блок-сополимеры ЭО и ПО иностранного или отечественного производства (табл. 2, опубликована на сайте журнала³).

Блок-сополимеры ЭО и ПО отечественного производства (проксанолы и эмуксолы) входят в состав чуть более 6% препаратов, зарегистрированных на территории РФ. Компания АО «Нижфарм» уже на протяжении нескольких лет успешно использует отечественный эмуксол-268 в своих препаратах в форме крема – Артраксикам® и Фунготербин®.

Многогранность областей применения, мультифункциональность, наличие уникальных свойств блок-сополимеров ЭО и ПО. обосновывают высокую потребность российской фармацевтической промышленности в сополимерах такого типа и остро ставят вопрос об импортозамещении данного продукта на территории РФ.

С момента введения в отношении Российской Федерации ограничительных мер экономического характера Правительством Российской Федерации был предпринят ряд мер, направленных на формирование устойчивой системы лекарственного обеспечения по предотвращению рисков возникновения дефектуры лекарственных препаратов в условиях санкций⁴.

Одной из таких мер является расширение круга производителей компонентов фармацевтической продукции и/или замена вспомогательных веществ. В этом случае применимо ускоренное внесение изменений в документы,

содержащиеся в регистрационных досье, в отношении которых межведомственной комиссией установлена дефектура или риск возникновения дефектуры⁵. Проведение экспертизы качества лекарственного препарата осуществляется экспертным учреждением в срок, не превышающий 15 рабочих дней со дня поступления задания Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Заключение

Блок-сополимеры этиленоксида и пропиленоксида – перспективные мультифункциональные фармацевтические компоненты, применяемые как в составе традиционных лекарственных форм, так и для разработки систем таргетной доставки. Эти соединения могут использоваться в качестве материала для 3D-печати в регенеративной медицине, при клеточном культивировании в биотехнологическом производстве, а также в других областях фармацевтической промышленности. Анализ номенклатуры зарегистрированных в Российской Федерации лекарственных препаратов, содержащих блок-сополимеры ЭО и ПО, показал, что лишь 62 (6%) препарата в 16 лекарственных формах содержат отечественные полимеры – проксанолы и эмуксолы. Безусловно, потребность российской фармацевтической отрасли в подобных полимерах высока, и в рамках импортозамещения возникает необходимость обеспечения промышленности отечественными ингредиентами. Таким образом, расширение отечественных мощностей, направленных на разработку технологий и производство блок-сополимеров ЭО и ПО, должно стать одной из задач фармацевтической промышленности.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Воробьев АМ. Выбор рецептур моющих средств для очистки кожи от радиоактивных загрязнений. *Гигиена и санитария*. 1967;(7):45–9. Vorob'ev AM. Selection of mixtures of wetting agents for cleansing the skin of radioactive contamination. *Gig Sanit*. 1967 1967;(7):45–9 (In Russ.). PMID: 5603613
2. Дмитриев МТ, Китросский НА, Ерофеева ЗА. Ионизационно-хроматографическое раздельное определение детергентов в воде с предварительным пиролизом. *Гигиена и санитария*. 1971;(8):77–82. Dmitriev MT, Kitrosskiĭ NA, Erofeeva ZA. Ionization-chromatographic separate determination of detergents in water with preliminary pyrolysis. *Gig Sanit*. 1971;(8):77–82 (In Russ.). PMID: 5145470
3. Linse P, Malmsten M. Temperature-dependent micellization in aqueous block copolymer solutions. *Macromolecules*. 1992;25(20):5434–9. <https://doi.org/10.1021/ma00046a048>
4. Постановление Правительства Российской Федерации от 05.04.2022 № 593 «Об особенностях обращения лекарственных средств для медицинского применения в случае дефектуры или риска возникновения дефектуры лекарственных препаратов в связи с введением в отношении Российской Федерации ограничительных мер экономического характера».
5. Постановление Правительства Российской Федерации от 23.03.2022 № 440 «Об утверждении особенностей внесения изменений в документы, содержащиеся в регистрационном досье на зарегистрированный лекарственный препарат для медицинского применения, в случае дефектуры или риска возникновения дефектуры лекарственных препаратов в связи с введением в отношении Российской Федерации ограничительных мер экономического характера».

4. Schillén K, Glatter O, Brown W. Characterization of a PEO-PPO-PEO block copolymer system. In: Laggner P, Glatter O, eds. *Trends in Colloid and Interface Science VII. Progress in Colloid and Polymer Science*. 2008;93:66–71.
<https://doi.org/10.1007/BFb0118476>
5. Alexandridis P, Holzwarth JF, Hatton TA. Micellization of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) triblock copolymers in aqueous solutions: thermodynamics of copolymer association. *Macromolecules*. 1994;27(9):2414–25.
<https://doi.org/10.1021/ma00087a009>
6. Cendejas G, Arreguín F, Castro LV, Flores EA, Vazquez F. Demulsifying super-heavy crude oil with bifunctionalized block copolymers. *Fuel*. 2013;103:356–63.
<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2012.08.029>
7. Liu D, Yang M, Wang D, Jing X, Lin Y, Feng L, Duan X. DPD study on the interfacial properties of PEO/PEO-PPO-PEO/PPO ternary blends: effects of pluronic structure and concentration. *Polymers (Basel)*. 2021;13(17):2866.
<https://doi.org/10.3390/polym13172866>
8. Kabanov AV, Batrakova EV, Alakhov VYu. Pluronic® block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. *J Control Release*. 2002;82(2–3):189–212.
[https://doi.org/10.1016/s0168-3659\(02\)00009-3](https://doi.org/10.1016/s0168-3659(02)00009-3)
9. Schmolka IR. A review of block polymer surfactants. *J Am Oil Chem Soc*. 1977;54(3):110–116.
<https://doi.org/10.1007/BF02894385>
10. Schmolka IR. The molecular basis for toxicity of surfactants in surgical wounds. 1. EO:PO block polymers. *J Surg Res*. 1973;14(4):277–284.
[https://doi.org/10.1016/0022-4804\(73\)90029-2](https://doi.org/10.1016/0022-4804(73)90029-2)
11. Schmolka IR, Raymond AJ. Micelle formation of polyoxyethylene-polyoxypropylene surfactants. *J Am Oil Chem Soc*. 1965;42:1088–91.
<https://doi.org/10.1007/BF02636916>
12. Schmolka IR. Polyoxyethylene-polyoxypropylene aqueous gels. US Patent No. US3740421A; 1966.
13. Jeon SW, Yoon YJ, Park SM, Jang JD, Kim TH. Unusual self-assembly of amphiphilic block copolymer blends induced by control of hydrophobic interaction. *J Phys Chem B*. 2022;126(34):6511–9.
<https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.2c03043>
14. Cappuccio de Castro K, Cedran Coco J, Mendes Dos Santos E, Narciso Ataíde J, Miliani Martinez R, Monteiro do Nascimento MH, et al. Pluronic® triblock copolymer-based nanoformulations for cancer therapy: a 10-year overview. *J Control Release*. 2023;353:802–22.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.12.017>
15. Singla P, Garg S, McClements J, Jamieson O, Peeters M, Mahajan RK. Advances in the therapeutic delivery and applications of functionalized Pluronics: a critical review. *Adv Colloid Interface Sci*. 2022;299:102563.
<https://doi.org/10.1016/j.cis.2021.102563>
16. Hou X, Liang J, Yang X, Bai J, Yang M, Qiao N, et al. Poloxamer₁₈₈-based nanoparticles improve the anti-oxidation and anti-degradation of curcumin. *Food Chem*. 2022;375:131674.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131674>
17. Nguyen NT, Bui QA, Nguyen HH, Nguyen TT, Ly KL, Tran HL, et al. Curcuminoid co-loading platinum heparin-poloxamer P403 nanogel increasing effectiveness in antitumor activity. *Gels*. 2022;8(1):59.
<https://doi.org/10.3390/gels8010059>
18. Gao J, Shi Y, Han Y, Tang X, Bi R, Pan L, Lai X. One-way intestinal perfusion of PVP/VA–poloxamer₁₈₈–Curcuma longa L. extract solid dispersion in rats *in vivo* and its effect on HSC-T6 cell proliferation. *AAPS PharmSciTech*. 2022;23(3):83.
<https://doi.org/10.1208/s12249-022-02228-6>
19. Sunoqrot S, Aliyeh S, Abusulieh S, Sabbah D. Vitamin E TPGS-poloxamer nanoparticles entrapping a novel PI3Ka inhibitor potentiate its activity against breast cancer cell lines. *Pharmaceutics*. 2022;14(9):1977.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14091977>
20. Kim J, Francis DM, Sestito LF, Archer PA, Manspeaker MP, O'Melia MJ, Thomas SN. Thermosensitive hydrogel releasing nitric oxide donor and anti-CTLA-4 micelles for anti-tumor immunotherapy. *Nat Commun*. 2022;13(1):1479.
<https://doi.org/10.1038/s41467-022-29121-x>
21. Yang Y, Alencar LMR, Pijera MSO, Batista BDS, França ARS, Rates ERD, et al. [²²³Ra] RaCl₂ nanomicelles showed potent effect against osteosarcoma: targeted alpha therapy in the nanotechnology era. *Drug Deliv*. 2022;29(1):186–91.
<https://doi.org/10.1080/10717544.2021.2005719>
22. De Souza MVF, Shinobu-Mesquita CS, Meirelles LEF, Mari NL, Cesar GB, Gonçalves RS, et al. Effects of hypericin encapsulated on Pluronic F127 photodynamic therapy against triple negative breast cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2022;23(5):1741–51.
<https://doi.org/10.31557/apjcp.2022.23.5.1741>
23. Nugraha DH, Anggadiredja K, Rachmawati H. Effect of the surfactant charge on the characteristics and anticancer effects of docetaxel-loaded poloxamer polymeric micelles. *Pharm Nanotechnol*. 2023.
<https://doi.org/10.2174/2211738511666221103152156>
24. Mishra S, Streeter PR. Micelle-based nanocarriers for targeted delivery of cargo to pancreas. *Methods Mol Biol*. 2023;2592:175–84.
https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2807-2_12
25. Kempe S, Mäder K. *In situ* forming implants – an attractive formulation principle for parenteral depot formulations. *J Control Release*. 2012;161(2):668–79.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.04.016>
26. Thakur RR, McMillan HL, Jones DS. Solvent induced phase inversion-based *in situ* forming controlled release drug delivery implants. *J Control Release*. 2014;176:8–23.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.12.020>
27. Viganì B, Rossi S, Sandri G, Bonferoni MC, Caramella CM, Ferrari F. Recent advances in the development of *in situ* gelling drug delivery systems for non-parenteral administration routes. *Pharmaceutics*. 2020;12(9):859.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12090859>
28. Dunn RL, Tipton AJ, Southard GL, Rogers JA. Biodegradable polymer composition. US Patent No. 5599552; 1997.
29. Бахрушина ЕО, Никифорова ДА, Демина НБ. Основные аспекты разработки термореверсив-

- ных поликомплексов полуксамеров. *Здоровье и образование в XXI веке*. 2018;20(5):103–6.
- Bakhrushina EO, Nikiforova DA, Demina NB. The main aspects of the thermoreversible polycomplexes of poloxamers developing. *Health and Education Millennium*. 2018;20(5):103–6 (In Russ.) EDN: [ХОСТJB](https://doi.org/10.1038/s41598-019-48254-6)
30. Cao YL, Lach E, Kim TH, Rodriguez A, Arévalo CA, Vacanti CA. Tissue-engineered nipple reconstruction. *Plast Reconstr Surg*. 1998;102(7):2293–8. <https://doi.org/10.1097/00006534-199812000-00002>
 31. Yong CS, Choi JS, Quan QZ, Rhee JD, Kim CK, Lim SJ, et al. Effect of sodium chloride on the gelation temperature, gel strength and bioadhesive force of poloxamer gels containing diclofenac sodium. *Int J Pharm*. 2001;226(1–2):195–205. [https://doi.org/10.1016/s0378-5173\(01\)00809-2](https://doi.org/10.1016/s0378-5173(01)00809-2)
 32. Chen LC, Lin SY, Cheng WJ, Sheu MT, Chung CY, Hsu CH, Lin HL. Poloxamer sols endowed with in-situ gelability and mucoadhesion by adding hypromellose and hyaluronan for prolonging corneal retention and drug delivery. *Drug Deliv*. 2023;30(1):2158964. <https://doi.org/10.1080/10717544.2022.2158964>
 33. Kushwaha SK, Saxena P, Rai A. Stimuli sensitive hydrogels for ophthalmic drug delivery: a review. *Int J Pharm Investig*. 2012;2(2):54–60. PMID: 23119233
 34. Kim HM, Woo SJ. Ocular drug delivery to the retina: current innovations and future perspectives. *Pharmaceutics*. 2021;13(1):108. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13010108>
 35. Al Khateb K, Ozhmukhametova EK, Mussin MN, Selikhanov SK, Rakhypbekov TK, Lau WM, Khutoryanskiy VV. *In situ* gelling systems based on Pluronic F127/Pluronic F68 formulations for ocular drug delivery. *Int J Pharm*. 2016;502(1–2):70–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.02.027>
 36. Kida D, Zakrzewska A, Zborowski J, Szulc M, Karolewicz B. Polymer-based carriers in dental local healing-review and future challenges. *Materials (Basel)*. 2021;14(14):3948. <https://doi.org/10.3390/ma14143948>
 37. Бахрушина ЕО, Демина НБ, Шумкова ММ, Родюк ПС, Шуликина ДС, Краснюк ИИ. Интраназальные системы доставки in situ: перспективы применения и основные фармацевтические аспекты разработки (обзор). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4):54–63. Bakhrushina EO, Demina NB, Shumkova MM, Rodyuk PS, Shulikina DS, Krasnyuk II. In situ intranasal delivery systems: application prospects and main pharmaceutical aspects of development (review). *Drug Development and Registration*. 2021;10(4):54–63 (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-54-63>
 38. Yap LS, Yang MC. Thermo-reversible injectable hydrogel composing of pluronic F127 and carboxymethyl hexanoyl chitosan for cell-encapsulation. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2020;185:110606. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110606>
 39. Chatterjee S, Hui PC, Kan CW, Wang W. Dual-responsive (pH/temperature) Pluronic F-127 hydrogel drug delivery system for textile-based transdermal therapy. *Sci Rep*. 2019;9(1):11658. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48254-6>
 40. Shriky B, Kelly A, Isreb M, Babenko M, Mahmoudi N, Rogers S, et al. Pluronic F127 thermosensitive injectable smart hydrogels for controlled drug delivery system development. *J Colloid Interface Sci*. 2020;565:119–30. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2019.12.096>
 41. Giuliano E, Paolino D, Fresta M, Cosco D. Mucosal applications of poloxamer 407-based hydrogels: an overview. *Pharmaceutics*. 2018;10(3):159. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10030159>
 42. Dutta SD, Bin J, Ganguly K, Patel DK, Lim KT. Electromagnetic field-assisted cell-laden 3D printed poloxamer-407 hydrogel for enhanced osteogenesis. *RSC Adv*. 2021;11(33):20342–54. <https://doi.org/10.1039%2Fd1ra01143j>
 43. López-Marcial GR, Zeng AY, Osuna C, Dennis J, Garcia JM, O'Connell GD. Agarose-based hydrogels as suitable bioprinting materials for tissue engineering. *ACS Biomater Sci Eng*. 2018;4(10):3610–6. <https://doi.org/10.1021/acsbomaterials.8b00903>
 44. Sodupe-Ortega E, Sanz-Garcia A, Pernia-Espinoza A, Escobedo-Lucea C. Accurate calibration in multi-material 3D bioprinting for tissue engineering. *Materials (Basel)*. 2018;11(8):1402. <https://doi.org/10.3390/ma11081402>
 45. Fu Z, Angeline V, Sun W. Evaluation of printing parameters on 3D extrusion printing of pluronic hydrogels and machine learning guided parameter recommendation. *Int J Bioprint*. 2021;7(4):434. <https://doi.org/10.18063/ijb.v7i4.434>
 46. Benning L, Gutzweiler L, Trondle K, Riba J, Zengerle R, Koltay P, et al. Assessment of hydrogels for bioprinting of endothelial cells. *J Biomed Mater Res A*. 2018;106(4):935–47. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36291>
 47. Xu Y, Hu Y, Liu C, Yao H, Liu B, Mi S. A novel strategy for creating tissue-engineered biomimetic blood vessels using 3D bioprinting technology. *Materials (Basel)*. 2018;11(9):1581. <https://doi.org/10.3390/ma11091581>
 48. Hu S, Martinez-Garcia FD, Moeun BN, Burgess JK, Harmsen MC, Hoesli C, de Vos P. An immune regulatory 3D-printed alginate-pectin construct for immunoisolation of insulin producing β -cells. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2021;123:112009. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112009>
 49. Tracy EP, Gettler BC, Zakhari JS, Schwartz RJ, Williams SK, Birla RK. 3D bioprinting the cardiac Purkinje system using human adipogenic mesenchymal stem cell derived Purkinje cells. *Cardiovasc Eng Technol*. 2020;11(5):587–604. <https://doi.org/10.1007/s13239-020-00478-8>
 50. Gori M, Giannitelli SM, Torre M, Mozetic P, Abbruzzese F, Trombetta M, et al. Biofabrication of hepatic constructs by 3D bioprinting of a cell-laden thermogel: an effective tool to assess drug-induced hepatotoxic response. *Adv Healthc Mater*. 2020;9(21):e2001163. <https://doi.org/10.1002/adhm.202001163>
 51. Mozetic P, Giannitelli SM, Gori M, Trombetta M, Rainer A. Engineering muscle cell alignment through 3D bio-

- printing. *J Biomed Mater Res A*. 2017;105(9):2582–8.
<https://doi.org/10.1002/jbm.a.36117>
52. Shamma RN, Sayed RH, Madry H, El Sayed NS, Cucchiari M. Triblock copolymer bioinks in hydrogel three-dimensional printing for regenerative medicine: a focus on Pluronic F127. *Tissue Eng Part B Rev*. 2022;28(2):451–63.
<https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2021.0026>
53. Müller M, Becher J, Schnabelrauch M, Zenobi-Wong M. Printing thermoresponsive reverse molds for the creation of patterned two-component hydrogels for 3D cell culture. *J Vis Exp*. 2013;(77):e50632.
<https://doi.org/10.3791/50632>
54. Strickley RG. Solubilizing excipients in oral and injectable formulations. *Pharm Res*. 2004;21(2):201–30.
<https://doi.org/10.1023/b:pham.0000016235.32639.23>
55. Bariev EA, Krasnyuk II, Anurova MN, Bakhrushina EO, Smirnov VV, Bardakov AI, et al. Study of the acute toxicity of a new dosage form of naloxone hydrochloride for intranasal administration. *Drug Res (Stuttg)*. 2019;70(1):23–5.
<https://doi.org/10.1055/a-0899-4948>
56. Бариев ЭА, Бубело ВД, Ляпунов НА. Фармацевтическая разработка отечественного препарата «Налоксон спрей назальный» для оказания экстренной медицинской помощи в качестве антидота при остром отравлении (передозировке) опиоидами. *Успехи в химии и химической технологии*. 2015;29(10):113–4.
Bariev EA, Bubelo VD, Lyapunov NA. Pharmaceutical development of a drug «Naloxone nasal spray» to emergency medical care as an antidote to overdose from opioids. *Advances in Chemistry and Chemical Technology*. 2015;29(10):113–4 (In Russ.).
EDN: [VDEGUP](https://doi.org/10.1055/a-0899-4948)
57. Anurova MN, Bakhrushina EO, Demina NB. Review of contemporary gel-forming agents in the technology of dosage forms. *Pharm Chem J*. 2015;49(9):627–34.
<https://doi.org/10.1007/s11094-015-1342-5>
58. Dun J, Osei-Yeboah F, Boulas P, Lin Y, Sun CC. A systematic evaluation of poloxamers as tablet lubricants. *Int J Pharm*. 2020;576:118994.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118994>
59. Medarević D, Djuriš J, Krkobabić M, Ibrić S. Improving tableting performance of lactose monohydrate by fluid-bed melt granulation co-processing. *Pharmaceutics*. 2021;13(12):2165.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13122165>
60. Narayanappa AT, Mwilu S, Holdread S, Hammett K, Bu G, Dodson EC, Brooks JW. A rapid cell-based assay for determining poloxamer quality in CHO suspension cell culture. *Biotechniques*. 2019;67(3):98–109.
<https://doi.org/10.2144/btn-2019-0070>
61. Peng H, Hall KM, Clayton B, Wiltberger K, Hu W, Hughes E, et al. Development of small scale cell culture models for screening poloxamer 188 lot-to-lot variation. *Biotechnol Prog*. 2014;30(6):1411–8.
<https://doi.org/10.1002/btpr.1967>
62. Bandyopadhyay A, Kosanam H, Yang RS, Gupta B, Naralakattu N, Pakhale S, et al. Low-molecular-weight impurity in Poloxamer 188 responsible for atypical cell culture performance for mAb production. *J Biotechnol*. 2022;351:13–22.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2022.04.008>
63. Zakrzewski R, Lee K, Lye GJ. Development of a miniature bioreactor model to study the impact of pH and DOT fluctuations on CHO cell culture performance as a tool to understanding heterogeneity effects at large-scale. *Biotechnol Prog*. 2022;38(4):e3264.
<https://doi.org/10.1002/btpr.3264>
64. Bollenbach L, Buske J, Mäder K, Garidel P. Poloxamer 188 as surfactant in biological formulations – an alternative for polysorbate 20/80? *Int J Pharm*. 2022;620:121706.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.121706>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: Е.О. Бахрушина, Н.Б. Демина – разработка концепции статьи; В.С. Пыжов, П.С. Сахарова – информационный поиск, подбор литературы; Е.О. Бахрушина, Т.В. Табанская – написание и редактирование текста рукописи, анализ данных государственного реестра лекарственных средств и подготовка табличного материала; Е.О. Бахрушина, Т.В. Табанская, Д.А. Чижова, М.Ф. Лутфуллин – анализ и обобщение данных, утверждение окончательного варианта статьи для публикации.

Благодарности. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

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

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. Elena O. Bakhrushina and Natalia B. Demina conceptualised the study. Victor S. Pyzhov and Polina S. Sakharova searched information and selected literature. Elena O. Bakhrushina and Tatiana V. Tabanskaya drafted and edited the manuscript, analysed data from the Russian State Register of Medicines, and prepared the tables. Elena O. Bakhrushina, Tatiana V. Tabanskaya, Diana A. Chizhova, and Marsel F. Lutfullin analysed and summarised data; approved the final version of the manuscript for publication.

Acknowledgements. The study was performed without external funding.

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

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Бахрушина Елена Олеговна, канд. фарм. наук,
доцент

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8695-0346>
bakhrushina_e_o@staff.sechenov.ru

Пыжов Виктор Сергеевич

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2174-7157>
vitya.pyzhov@gmail.com

Сахарова Полина Сергеевна

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4870-6232>
sakharova_p_s@student.sechenov.ru

Демина Наталья Борисовна, д-р фарм. наук,
профессор

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4307-8791>
demina_n_b@staff.sechenov.ru

Чижова Диана Александровна, канд. биол. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6082-4461>
ChijovaDA@minzdrav.gov.ru

Табанская Татьяна Валерьевна

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7965-6050>
TabanskayaTV@minzdrav.gov.ru

Лутфуллин Марсель Фанисович

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1484-6587>
LutfullinMF@minzdrav.gov.ru

Поступила 09.01.2023

После доработки 30.03.2023

Принята к публикации 22.05.2023

Online first 29.06.2023

Elena O. Bakhrushina, Cand. Sci. (Pharm.), Associate
Professor

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8695-0346>
bakhrushina_e_o@staff.sechenov.ru

Victor S. Pyzhov

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2174-7157>
vitya.pyzhov@gmail.com

Polina S. Sakharova

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4870-6232>
sakharova_p_s@student.sechenov.ru

Natalia B. Demina, Dr. Sci. (Pharm.),
Professor

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4307-8791>
demina_n_b@staff.sechenov.ru

Diana A. Chizhova, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6082-4461>
ChijovaDA@minzdrav.gov.ru

Tatiana V. Tabanskaya

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7965-6050>
TabanskayaTV@minzdrav.gov.ru

Marsel F. Lutfullin

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1484-6587>
LutfullinMF@minzdrav.gov.ru

Received 9 January 2023

Revised 30 March 2023

Accepted 22 May 2023

Online first 29 June 2023



Е.М. Рычихина ✉ 
О.Г. Ткаченко 
В.В. Косенко 

Рекомендации для специалистов по регистрации лекарственных препаратов в целях оптимизации работ по процедурам ЕАЭС

*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*

✉ **Рычихина Екатерина Михайловна**; richikhina@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

С 2021 г. регистрация новых лекарственных препаратов на территории Российской Федерации осуществляется в соответствии с Правилами регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения, утвержденными Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 78. Полный переход к правилам регулирования обращения лекарственных средств в рамках Евразийского экономического союза (ЕАЭС) должен быть завершен до 31 декабря 2025 г. Поэтому держателям регистрационных удостоверений требуется как приводить досье на препараты в соответствие с требованиями ЕАЭС, так и вносить изменения в досье и регистрировать новые препараты. Это значительно увеличило нагрузку на регуляторные органы и значительно усложнило регуляторные механизмы в сфере обращения лекарственных средств, а также поставило заявителей перед необходимостью быстро адаптироваться к новым правилам. В статье рассмотрены последовательность регуляторных процедур, содержание работ, даны рекомендации о том, как выделить и оптимизировать каждый этап, определить цели, приоритетность, оценить продолжительность и возможные риски для получения положительных результатов. Описаны примеры применения различных процедур для типичного жизненного цикла досье, что позволит сделать регуляторный процесс более эффективным.

Ключевые слова: управление жизненным циклом досье; тип заявления; регуляторные процедуры; регистрационное досье

Для цитирования: Рычихина Е.М., Ткаченко О.Г., Косенко В.В. Рекомендации для специалистов по регистрации лекарственных препаратов в целях оптимизации работ по процедурам ЕАЭС. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2023;13(2-1):345–360. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-544>

Е.М. Rychikhina ✉ 
О.Г. Tkachenko 
V.V. Kosenko 

Recommendations on the EAEU Marketing Authorisation Procedures to Optimise the Performance of Regulatory Affairs Specialists

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

✉ **Ekaterina M. Rychikhina**; richikhina@expmed.ru

ABSTRACT

Since 2021, the marketing authorisation (MA) of new medicinal products in the Russian Federation has been carried out according to the Rules of Marketing Authorisation and Assessment of Medicinal Products for Human Use that are implemented by Decision No. 78 of the Council of the Eurasian Economic Commission dated 3 November 2016. The Member States of the Eurasian Economic Union (EAEU) must fully transition to the new regulatory framework by 31 December 2025. Therefore, MA holders are required to bring their existing product dossiers into compliance with EAEU requirements and continue submitting new product applications and dossier variations. Under the circumstances, the burden on regulatory authorities has increased significantly, regulatory mechanisms have become more complicated, and applicants have faced the challenge of swift adaptation to the latest requirements. To contribute towards the success of regulatory submissions, this article covers the sequence of regulatory procedures, the scope of work, and recommendations on dividing the procedures into stages, optimising each stage, determining goals and priorities, and assessing timelines and possible risks. To make the approval process more efficient, the authors illustrate the application of different procedures throughout a typical lifecycle of a dossier.

Key words: dossier lifecycle management; application type; regulatory procedures; registration dossier

For citation: Rychikhina E.M., Tkachenko O.G., Kosenko V.V. Recommendations on the EAEU marketing authorisation procedures to optimise the performance of regulatory affairs specialists. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2023;13(2-1):345–360. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-544>

Введение

Ввиду перехода от национального регулирования процедур регистрации и экспертизы лекарственных средств к наднациональному все очевиднее становится повышение разноплановой, зачастую невзаимосвязанной и крайне объемной нагрузки на всех участников процесса регистрации и поддержания актуальности регистрационных досье в рамках жизненного цикла лекарственного препарата. Повышение нагрузки характерно как для представителей регуляторных органов и экспертных организаций государств – членов Евразийского экономического союза (ЕАЭС), так и для участников рынка – заявителей и держателей регистрационных удостоверений (РУ).

Нормативно-правовое регулирование обращения лекарственных средств ЕАЭС предлагает различные инструменты для решения задач по выбору регистрационной стратегии препарата и возможности соответствовать все возрастающим требованиям.

Работа сотрудника фармацевтической компании – специалиста по регистрации или

руководителя подразделения – требует постоянного взаимодействия с другими подразделениями компании по подготовке материалов для создания документов регистрационного досье. Именно поэтому согласно принятой в ноябре 2005 г. системе кодирования ICH¹ общий технический документ (common technical document, CTD²) отнесен к категории M4 (multidisciplinary – междисциплинарная).

Основной целью специалиста по регистрации является достижение конечного результата – государственной регистрации лекарственного препарата и вывода его на рынок. Поэтому для правильного оформления регистрационного досье лекарственного препарата и успешного прохождения регуляторных процедур регистратор обязан знать и неукоснительно исполнять все требования законодательства в области регистрации лекарственных средств.

Необходимо помнить, что все досье на препараты портфелей компаний должны соответствовать требованиям ЕАЭС до 31.12.2025, т.е. в период перехода к единому рынку лекарственных

¹ Международный совет по гармонизации технических требований к лекарственным средствам для медицинского применения (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, ICH). В Совет входят представители регуляторных органов и ассоциации производителей лекарственных средств, совместно вырабатывающие требования надлежащей клинической практики, интегрированные в законодательство многих стран.

² CTD – это согласованный на международном уровне формат подготовки заявок на новые лекарственные средства, предназначенные для подачи в региональные регуляторные органы стран-участниц. Разработан Европейским агентством по лекарственным средствам (European Medicines Agency, EMA), Управлением по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств (Food and Drug Administration, FDA) и Министерством здравоохранения, труда и социального обеспечения (Япония) и начиная с Международной конференции органов по регулированию лекарственных средств Всемирной организации здравоохранения (ICDRA) в Париже в 1989 г. CTD поддерживается Международным советом по гармонизации технических требований к лекарственным средствам для медицинского применения (ICH).

средств ЕАЭС актуальным является девиз: «Думай глобально, действуй локально» (Think globally, act locally)³.

Решение регуляторной задачи по оформлению всех досье в соответствии с требованиями ЕАЭС включает в себя:

- инвентаризацию существующих досье компании;
- сравнительный анализ требований (как национальных, так и ЕАЭС) как к регистрационным досье в целом, так и к документам в составе этих досье в частности;
- определение приоритетов;
- постановку задач и срока их исполнения для досье на каждый препарат;
- разработку плана по выполнению всех вышеперечисленных задач.

На первый взгляд, за оставшиеся 2,5 года (до 31.12.2025) держателям РУ трудно выполнить такой объем работ. Но цель будет достигнута, если двигаться к ней планомерно, локально решая небольшие задачи относительно каждого досье и учитывая ресурсы своих компаний.

В Российской Федерации к настоящему времени накоплен достаточный правоприменительный опыт по регистрации препаратов по процедуре ЕАЭС. Из всех стран содружества наибольшее количество заявлений на регистрацию препаратов в рамках процедур ЕАЭС подано именно в России. Ниже рассмотрим некоторые связанные с этим наиболее актуальные вопросы.

Жизненный цикл регистрационного досье

Любую регуляторную процедуру по Правилам⁴ регистрации и экспертизы лекарственных средств ЕАЭС (далее – Правила ЕАЭС) можно рассматривать как составную часть проекта по управлению жизненным циклом досье. Жизненный цикл досье на лекарственное средство формируется не только производителем/держателем РУ, но и регуляторными органами и включает актуальные, первоначальные и промежуточные редакции документов, входящих в версии досье, а также документы, формируемые в процессе прохождения административных процедур в уполномоченном органе и в процессе экспертизы лекарственного препарата в экспертной организации. Проект по управлению жизненным циклом досье связан с жизненным циклом препарата. На рисунке 1 представлена модульная шкала жизненного цикла досье, взаимосвязь циклов и показано, как на каждом из этапов жизненного цикла препарата закладываются основы для формирования документов будущего досье.

Процессы фармацевтической разработки, доклинических (ДКИ) и клинических (КИ) исследований лекарственных препаратов могут идти параллельно, отдельные этапы могут повторяться, например масштабирование производства. При внесении изменений в процесс производства может потребоваться вернуть препарат на этап разработки или проведения ДКИ и (или) КИ.



Рис. 1. Шкала (этапность) жизненного цикла препарата от идеи, разработки, масштабирования производства, доклинических (ДКИ) и клинических (КИ) исследований до регистрации и внесения изменений. М1 – модуль 1 (Административная информация), М2 – модуль 2 (Резюме общего технического документа), М3 – модуль 3 (Качество), М4 – модуль 4 (Доклинические исследования), М5 – модуль 5 (Клинические исследования)

³ Оригинальная фраза «Думай глобально, действуй локально» была приписана шотландскому общественному деятелю Патрику Геддесу, биологу, социологу, филантропу и новатору в области градостроительства. Использовалась в различных контекстах.

⁴ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 78 «О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения».

Формирование досье на лекарственный препарат происходит не одномоментно, а по мере прохождения препаратом этапов жизненного цикла. Если к началу процедуры регистрации препарата определяющие этапы его жизненного цикла завершены, то для жизненного цикла досье все только начинается. Поэтому важно уже на этапе идеи понимать предполагаемый тип заявления и разрабатывать регистрационную стратегию с выполнением всех нормативных требований, рекомендаций, с учетом современного уровня научных знаний. Этот принцип заложен в формат общего технического документа (ОТД ЕАЭС).

Процесс поддержания досье в актуальном состоянии на протяжении всего жизненного цикла препарата регламентирован, ситуация обновления документов в досье «от процедуры до процедуры»⁵ уходит в прошлое. Регистрационное досье должно быть валидно и доступно в любое время. Валидность в данном контексте означает, что досье должно включать действующие версии документов, содержащих актуальные сведения по каждому параметру досье — от сертификата анализа на используемое в составе препарата вспомогательное вещество до обновления периодической информации по фармаконадзору.

Каждый производитель/держатель РУ выбирает свой подход к обеспечению валидности досье — от офлайн-систем, поддерживающих досье, до современных облачных технологий электронных досье. В связи с непрерывным управлением жизненным циклом досье на препарат необходимо на подготовительных этапах, до создания электронного досье, определить подход к структурированию сведений. При выборе степени детализации следует учесть, что при изменении релевантных сведений в любой момент жизненного цикла препарата требуется замена документов (файлов) в электронном ОТД (эОТД) целиком.

Современные подходы к оценке сведений, которые включаются в документы регистрационного досье на препарат любого вида, основаны на «принципе скепсиса», подразумевающим требование постоянного подтверждения представляемых сведений и их критический анализ как со стороны разработчика, так и со стороны экспертов. Поэтому необходимо заранее определить ключевые или реперные точки, влияющие на процесс формирования и поддержания

досье в актуальном состоянии. Определяющая ключевая точка — это тип заявления.

Вид заявления и тип заявления на регистрацию лекарственного препарата

Важно не путать понятия «вид заявления» и «тип заявления».

*Вид заявления*⁶ — определяет процедуру, в соответствии с которой будет проводиться регистрация (регистрация по процедуре взаимного признания, децентрализованная процедура регистрации, приведение регистрационного досье в соответствие и т.д.).

Тип заявления (фактически тип досье) должен быть определен на этапе идеи о разработке препарата, так как с учетом выбранного типа заявления планируются программы фармацевтической, доклинической и клинической разработки препарата.

С 06.10.2021 в модуль 1 ОТД добавлен документ — резюме обоснования выбранного типа заявления⁷, схема составления которого представлена на рисунке 2.

Тип заявления указывают в следующих документах: отчеты по доклинической и клинической оценке, предварительный сводный отчет, экспертный отчет об оценке безопасности, эффективности и качества (оценка пользовательского тестирования).

Таким образом, для успешного прохождения любой регуляторной процедуры и подготовки досье, отвечающего современным требованиям, выбор типа заявления должен происходить не на уровне комплектования досье перед подачей, а на первом этапе жизненного цикла препарата при формировании идеи о его разработке. И неважно, регистрируется ли воспроизведенный препарат, или приводится досье в соответствие; заявитель должен четко обосновать тип заявления, помня о «принципе скепсиса», требующем подтверждения представляемых сведений и их критического анализа.

Эксперты должны принимать во внимание тип заявления на всем протяжении экспертизы документов досье и результатов исследований, чтобы иметь возможность применения особых оснований для регистрационной процедуры, например концепции биоаналога или гибридного

⁵ Для каждой из процедур, установленных положениями Федерального закона от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств», характерен принцип исчерпывающих перечней документов в отличие от процедур по Правилам регистрации ЕАЭС.

⁶ Формы заявлений установлены согласно Приложению № 3 к Правилам (Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 78 «О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения»).

⁷ Раздел 1.8.2 регистрационного досье в формате ОТД.



Рис. 2. Общая схема составления Резюме обоснования выбранного типа заявления. M1 – модуль 1 досье (Административная информация), M2 – модуль 2 досье (Резюме общего технического документа)

препарата, значимость педиатрических исследований, достаточность проведенных исследований и др. и оценивать представленные в досье сведения во взаимосвязи с типом заявления.

Выбранный тип заявления оценивают на основании совокупности сведений, указанных в резюме обоснования выбранного типа заявления и соответствующих разделах модуля 2 (в отдельных случаях и в документах модулей 3, 4, 5), а также в разделах, которые посвящены описанию разработки препарата определенного вида с указанием, почему была выбрана та или иная стратегия разработки. Это относится ко всем видам препаратов, особенно к тем, в отношении которых отсутствуют результаты собственных исследований.

Цель определения типа заявления заключается в том, что заявитель должен доказать выбранную стратегию разработки и при необходимости привести приемлемые обоснования для отказа от определенных исследований или замены оригинальных исследований данными из источников литературы. Если результаты каких-либо исследований представлены только в форме публикаций, следует уточнить, обладают ли они достаточным качеством для возможности

проведения всестороннего анализа наиболее критических данных.

Критерии, которые необходимо учитывать при определении типа заявления

На определение типа заявления оказывают влияние тип и вид препарата. Согласно Правилам ЕАЭС указанный в заявлении тип препарата может совпадать с видом препарата. Поэтому для определения типа заявления рекомендуется обосновывать вид препарата с учетом его уточненного вида и классификации препарата по природе происхождения действующих веществ, входящих в его состав (рис. 3).

Важно также учитывать *статус препарата*, в отношении которого может быть запрошена регистрация на условиях, условная или ускоренная регистрация. В Правилах ЕАЭС четко определены требования при запросе особых условий регистрации или регистрации с учетом применения критерия исключительного случая при рассмотрении заявления для орфанного препарата, установлены критерии применения условной регистрации и установлены категории препаратов для ускоренной⁸ экспертизы.

⁸ В соответствии с положениями пункта 120.11 Правил ЕАЭС ускоренная экспертиза лекарственных препаратов применяется в отношении орфанных лекарственных препаратов, лекарственных препаратов, предназначенных исключительно для применения несовершеннолетними, лекарственных препаратов, представляющих особую значимость для здоровья населения, в частности, при отсутствии эффективных методов оказания медицинской помощи в государствах-членах, определяемых Экспертным комитетом по лекарственным средствам на основании обращения уполномоченного органа государства-члена, в котором подано обращение заявителя об особой значимости лекарственного препарата до подачи заявления на регистрацию.

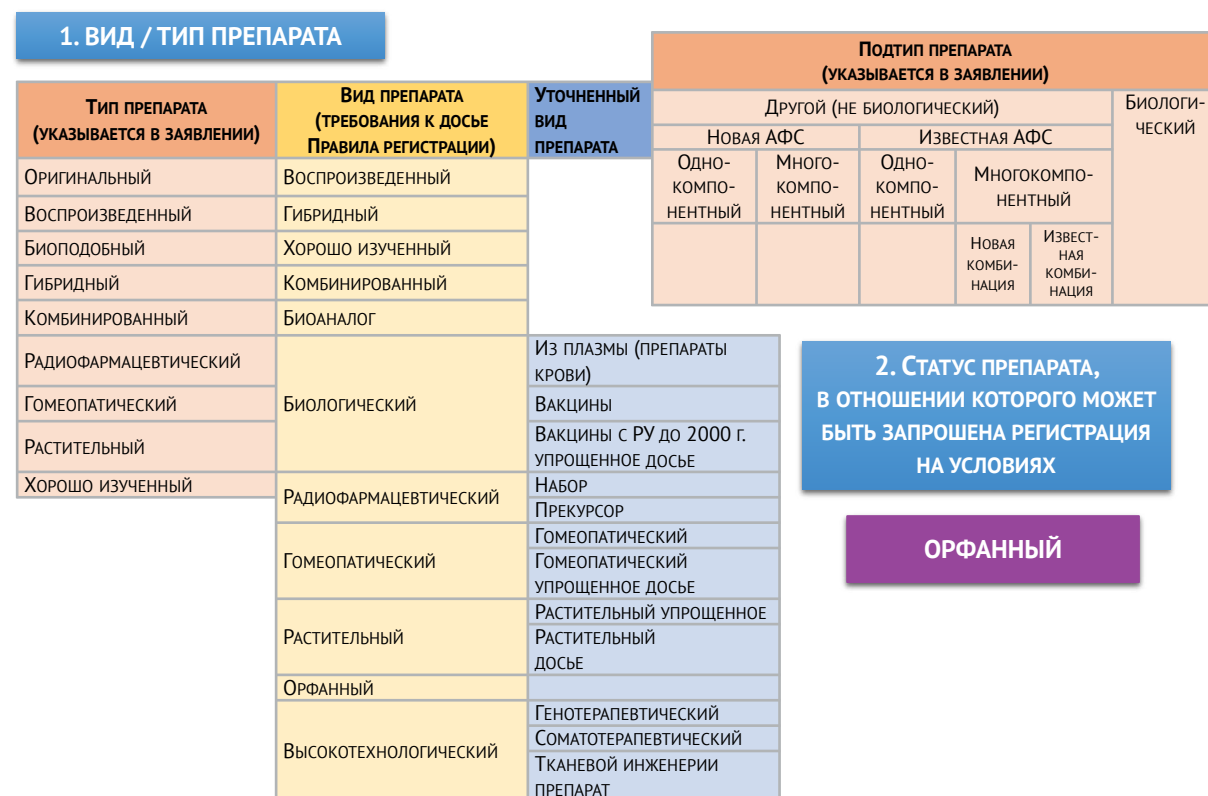


Рис. 3. Критерии определения типа заявления (на основании вида препарата)

Планируемая категория отпуска лекарственного препарата также влияет на выбор типа заявления. К примеру, лекарственный препарат в форме лиофилизата для приготовления раствора для внутривенного введения, согласно положениям Решения Коллегии Евразийской экономической комиссии от 29.12.2015 № 178 «О Правилах определения категорий лекарственных препаратов, отпускаемых без рецепта и по рецепту», отпускается по рецепту.

В случае если уполномоченные органы предусматривают установление подкатегории рецептурных препаратов, подлежащих ограниченному порядку отпуска по специальному требованию, они должны принять во внимание соответствие лекарственного препарата следующим критериям:

- лекарственный препарат в силу своих фармацевтических свойств или новизны либо исходя из интересов общественного здоровья должен применяться исключительно в условиях стационара;
- лекарственный препарат применяется для лечения состояний, которые могут быть диагностированы в условиях стационара или учреждений с соответствующими диагностическими возможностями, несмотря на возможность применения и наблюдения за состоянием пациента в любых условиях.

Таким образом, ожидаемые заявителем требования, которые будут применимы к условиям отпуска лекарственного препарата в форме лиофилизата для приготовления раствора для внутривенного введения, должны быть сформулированы как «препарат рецептурного отпуска, исключительно в условиях стационара».

На обоснование выбора типа заявления также оказывают влияние фармацевтические и фармакологические аспекты, которые должны быть приняты во внимание несмотря на то, что на этапе идеи разработки препарата и на ранних этапах его разработки не все они могут быть учтены.

Фармакологические аспекты: планируемое терапевтическое действие, планируемый путь введения, планируемая возрастная категория пациентов.

Фармацевтические аспекты: активная фармацевтическая субстанция (АФС) новая или известная, природа АФС, планируемая лекарственная форма.

На рисунке 4 перечислены процедуры, которые способны оказать влияние на обоснование выбора типа заявления.

Например, процедура приведения регистрационного досье в соответствие с требованиями

ВИД ПРОЦЕДУРЫ / ЗАЯВЛЕНИЯ

РЕГИСТРАЦИЯ	ПРИВЕДЕНИЕ В СООТВЕТСТВИЕ	ВНЕСЕНИЕ ЗНАЧИМЫХ ИЗМЕНЕНИЙ
РЕГИСТРАЦИЯ ХОРОШО ИЗУЧЕННОГО ПРЕПАРАТА	ПРИВЕДЕНИЕ В СООТВЕТСТВИЕ С ПОСЛЕДУЮЩЕЙ РЕГИСТРАЦИЕЙ	ВНЕСЕНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ ПО ТИПУ РАСШИРЕНИЯ РЕГИСТРАЦИИ

ТИП ПРОЦЕДУРЫ

ПРОЦЕДУРА ВЗАИМНОГО ПРИЗНАНИЯ

ДЕЦЕНТРАЛИЗОВАННАЯ ПРОЦЕДУРА

Рис. 4. Критерии определения типа заявления (на основании выбора процедуры)

ЕАЭС в зависимости от типа заявления может идти, как минимум, тремя путями в зависимости от типа заявления:

- 1) приведение в соответствие только в референтном государстве с целью продолжения обращения только в нем;
- 2) приведение в соответствии в нескольких странах, где лекарственный препарат зарегистрирован по национальным требованиям;
- 3) приведение в соответствие в нескольких странах, где лекарственный препарат зарегистрирован и не зарегистрирован;
- 4) другие случаи.

Таким образом, рассмотрев перечисленные критерии применительно к конкретному препарату, специалист по регистрации сможет выбрать тип заявления, что не только определит тип будущего досье и стратегию фармацевтической, доклинической и клинической разработки препарата, но и даст дополнительные аргументы при обсуждении с отделом маркетинга плана вывода препарата на рынок (человеческие, временные и финансовые ресурсы).

Рассмотрим на примерах некоторые случаи выбора типа заявления при различных процедурах.

Пример № 1. Выбор типа заявления для комбинированного препарата

Идея по разработке препарата. Компания планирует вывести на рынок Российской Федерации лекарственный препарат, на который бы распространялся режим эксклюзивности данных (data exclusivity) в течение 6 лет.

Учитывая временные рамки от идеи до регистрации оригинального препарата, для конкретной компании наиболее привлекательный путь — комбинация двух или более ранее известных активных веществ в одной лекарственной форме.

Информация о препарате на этапе идеи. В составе лекарственного препарата планируются два действующих вещества, которые в соответствии с законодательством зарегистрированы как однокомпонентные препараты, лекарственная форма, скорее всего, — для приема внутрь, но в комплекте с растворителем (что создает дополнительное ограничение для возможных конкурентов, поскольку требует соответствующих технологических возможностей предприятия), область применения — отхаркивающее и муколитическое действие.

Задача для специалиста по регистрации. Определить тип заявления → тип будущего досье → подходы к стратегии разработки препарата: фармацевтической, доклинической и клинической.

Для лучшего понимания задачи дадим дополнительные пояснения. При вступлении Российской Федерации во Всемирную торговую организацию (ВТО) было принято условие о введении в законодательство режима эксклюзивности данных в отношении доклинических и клинических исследований, а для реализации этого условия введена поправка в ст. 18 Федерального закона Российской Федерации от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств»⁹.

⁹ Не допускается использование в коммерческих целях информации о результатах доклинических исследований лекарственных средств и клинических исследований лекарственных препаратов для медицинского применения, представленной заявителем для государственной регистрации лекарственного препарата, без его согласия в течение шести лет с даты государственной регистрации референтного лекарственного препарата в Российской Федерации (ч. 18 введена Федеральным законом Российской Федерации от 22.12.2014 № 429-ФЗ).

До сих пор существуют разные мнения относительно того, будет ли действовать эта норма, если препарат планируется к регистрации и будет зарегистрирован по Правилам ЕАЭС. Прямой нормы в законодательстве об обращении лекарственных средств в ЕАЭС, запрещающей использование в коммерческих целях информации о результатах ДКИ и КИ, и, соответственно, регистрации препарата на основании этих данных до истечения 6 лет, нет.

Однако ряд нормативных правовых актов, регламентирующих функционирование единого фармрынка, косвенно позволяет применять положения о защите эксклюзивности данных КИ, установленных законодательством Российской Федерации. В частности, согласно ст. 3 Соглашения о единых принципах и правилах обращения лекарственных средств в рамках ЕАЭС, регулирование обращения лекарственных средств осуществляется в том числе в соответствии с законодательством государств-членов. Ст. 42 Правил ЕАЭС устанавливает одним из основных принципов проведения экспертизы регистрационного досье обязанность выполнения требований законодательства государств-членов, международных договоров и актов, составляющих право ЕАЭС. Это положение косвенно свидетельствует о возможности отклонения уполномоченным органом заявления на регистрацию в случае несоблюдения требований в отношении защиты эксклюзивности данных. Кроме того, соглашения Всемирной торговой организации (ВТО) устанавливают базовый набор требований с достаточно широкими формулировками, позволяющими конкретизировать требования и вводить более сложную регуляторную систему в рамках региональных торговых соглашений. В случае возникновения правовой коллизии региональными соглашениями обычно определяется преимущественная сила положений соглашения ВТО. Так, согласно Договору о функционировании Таможенного союза в рамках многосторонней торговой системы от 19 мая 2011 г., с даты присоединения любого из государств-членов ЕАЭС к ВТО положения соглашения ВТО становятся частью правовой системы Таможенного союза.

В помощь специалисту по регистрации предлагаем следующий алгоритм определения типа заявления на этапе идеи о разработке препарата.

1. Определить вид/тип препарата.

Согласно Информационному справочнику¹⁰ ЕАЭС комбинированный препарат — лекарственный препарат, содержащий более одной фармацевтической субстанции. В Правилах ЕАЭС определение комбинированного препарата отсутствует, но есть понятие нового лекарственного препарата (ч. 9 раздела II приложения 1 к Правилам ЕАЭС), представляющего собой комбинацию двух или более ранее известных активных веществ в одной лекарственной форме (то есть активных веществ, входящих в состав комбинированного лекарственного препарата, но ранее зарегистрированных в составе однокомпонентных препаратов). Следует отметить, что однокомпонентные лекарственные препараты, представленные в комбинированной упаковке, не могут рассматриваться в качестве комбинированных лекарственных препаратов (так называемые наборы).

2. Определить статус препарата и возможность запроса в отношении него (регистрация на условиях или ускоренная регистрация).

С учетом исходных данных, регистрация на условиях или ускоренная регистрация не могут быть использованы, поскольку планируемая область применения препарата (муколитик) не затрагивает орфанные заболевания. К препаратам, которые представляют особую значимость для здоровья граждан, предназначены для лечения серьезных или опасных для жизни заболеваний, планируемый препарат также не относится.

3. Определить категорию отпуска.

Новый препарат подлежит обычному рецептурному отпуску без дополнительных ограничений. Возможно одобрение безрецептурного отпуска для краткосрочного применения, в течение которого эффект маскирования основного заболевания не будет иметь клинически значимых последствий.

4. Рассмотреть фармацевтические и фармакологические аспекты.

АФС не новые, сведения о них включены в реестр лекарственных средств ЕАЭС, заявлять для АФС статус новых АФС не надо.

Вспомогательные вещества для разработки лекарственной формы планируется использовать известные, фармакопейного качества.

¹⁰ Рекомендация Коллегии Евразийской экономической комиссии от 12.01.2021 № 2 «Об актуализированном Информационном справочнике понятий, применяемых в рамках Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств».

Лекарственная форма для приема внутрь в комплекте с растворителем: порошок для приготовления раствора или суспензии для приема внутрь, растворитель — вода.

Область применения — отхаркивающее и муколитическое действие. Популяция пациентов — взрослые.

Дозировки не определены, планируются пропорционально зарегистрированным однокомпонентным препаратам. Режим дозирования не установлен.

5. Выбрать вид процедуры/заявления: регистрация по Правилам ЕАЭС.

6. Выбрать тип процедуры: процедура взаимного признания в двух и более странах.

Решение задачи (пример № 1) с учетом проведенной оценки: заявление на регистрацию по процедуре взаимного признания, комбинированного препарата (многокомпонентный, новая комбинация двух ранее известных активных веществ в одной лекарственной форме для приема внутрь), рецептурного отпуска для симптоматической терапии продуктивного кашля у взрослых пациентов (рис. 5).

Для определенного типа заявления специалист по регистрации готовит обоснование по приведенному алгоритму со ссылками на нормы и положения Правил ЕАЭС, планирует стратегию разработки и начинает шаг за шагом формировать регистрационное досье.

Пример № 2. Обоснование подходов к стратегии разработки препарата и подготовка отсутствующих документов для приведения досье в соответствие с требованиями ЕАЭС

Идея о разработке препарата. Препарат зарегистрирован по национальному законодательству Российской Федерации (РУ бессрочное). В досье нет данных для обоснования типа заявления и обоснований по разработке препарата.

Характеристики препарата. В составе три активных вещества, которые зарегистрированы в Российской Федерации как однокомпонентные¹¹, имеются аналогичные препараты, зарегистрированные в Российской Федерации¹². Лекарственная форма для приема внутрь.

Задача для специалиста по регистрации. Определить тип заявления → обосновать



Рис. 5. Алгоритм действий специалиста по регистрации для примера № 1

¹¹ В соответствии с требованиями Федерального закона Российской Федерации от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств».

¹² То же.

подходы к стратегии разработки препарата и подготовке отсутствующих документов для приведения досье в соответствие с требованиями ЕАЭС.

Предполагается следующий алгоритм действий.

1. Определить вид и тип (подтип) препарата (согласно Информационному справочнику ЕАЭС).

Комбинированный препарат — препарат, содержащий более одной фармацевтической субстанции.

Воспроизведенный препарат — препарат, который имеет такой же количественный и качественный состав действующих веществ и ту же лекарственную форму, что и оригинальный препарат, и биоэквивалентность которого оригинальному лекарственному препарату подтверждается соответствующими исследованиями биодоступности. Различные лекарственные формы для приема внутрь с немедленным высвобождением признаются в рамках исследований биодоступности одной и той же лекарственной формой.

Гибридный препарат — препарат, не подпадающий под определение воспроизведенного лекарственного препарата при невозможности подтверждения его биоэквивалентности с помощью исследований биодоступности, а также в случае, если в данном препарате произошли изменения действующего вещества (веществ), показаний к применению, дозировки, лекарственной формы или пути введения по сравнению с оригинальным препаратом.

Новые лекарственные препараты — препараты, представляющие собой комбинацию двух или более ранее известных активных веществ в одной лекарственной форме.

Следует обратить внимание на распространенный вопрос отечественных производителей воспроизведенных препаратов при действии по процедуре приведения досье в соответствие с Правилами ЕАЭС. Если препарат был зарегистрирован по национальной процедуре в Российской Федерации¹³ как воспроизведенный препарат, в отношении него были проведены сравнительные исследования биоэквивалентности или терапевтической эквивалентности или не были проведены (препарат регистрировался до вступления в действие Федерального закона Российской Федерации

от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» или подпадал под критерии исключения¹⁴ и регистрировался на основании данных из литературных источников), то зачем на этапе приведения досье в соответствие с Правилами ЕАЭС указывать для такого препарата тип/вид — гибридный? Чтобы вернуться на этап разработки и провести соответствующие исследования, которые требуется включить в досье гибридных препаратов по Правилам ЕАЭС для обоснования выбранного типа заявления? В Российской Федерации отсутствовало понятие «гибридный препарат», следовательно, производители не могли его применять на этапе обоснования подходов к разработке своих препаратов.

Регуляторные системы стран ЕАЭС все еще находятся в состоянии переходного периода, реестр зарегистрированных препаратов ЕАЭС не сопоставим с реестрами отдельных государств, в него попросту еще не включены все оригинальные препараты. Поэтому общим для процедуры приведения регистрационного досье в соответствие является правило: какой вид был присвоен препарату в рамках регистрации по национальной процедуре, такой и следует указывать в заявлении.

2. Определить статус препарата и выяснить, может ли в отношении него быть запрошена регистрация на условиях или ускоренная регистрация.

Неприменимо, препарату не присвоен статус орфанного.

3. Определить категорию отпуска.

Отнесение лекарственного препарата к рецептурным или безрецептурным лекарственным препаратам осуществляется при регистрации лекарственного препарата. Изменение категории отпуска лекарственного препарата возможно при подтверждении регистрации (перерегистрации) и внесении изменений в регистрационное досье, требующих экспертизы ожидаемой пользы к возможному риску применения лекарственного препарата.

Так как в данном случае применяется процедура приведения в соответствие, то одновременное внесение таких изменений невозможно. Поэтому следует указать текущую категорию отпуска, присвоенную в рамках регистрации по национальной процедуре.

¹³ В соответствии с требованиями Федерального закона Российской Федерации от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств».

¹⁴ То же.

4. Фармацевтические и фармакологические аспекты.

Лекарственный препарат зарегистрирован по национальной процедуре.

5. Вид процедуры/заявления: приведение досье в соответствие Правилам ЕАЭС.

6. Тип процедуры: процедура взаимного признания в 1-й стране.

Решение задачи (пример № 2) с учетом проведенной оценки: заявление на приведение досье в соответствие Правилам ЕАЭС воспроизведенного препарата (многокомпонентный, известная комбинация), рецептурного отпуска для (указать область терапевтического применения) у взрослых пациентов (рис. 6).

Каждый проект по управлению жизненным циклом досье отдельного препарата уникален и имеет свои сроки, свои требования, свои цели.

До конца 2025 г. для держателей РУ на первый план выходят процедуры:

- приведение досье на препараты в соответствие с требованиями ЕАЭС;
- внесение изменений в досье;
- регистрация новых препаратов.

У этих разных процедур есть много общего. Каждую процедуру можно разделить на этапы, которые включают в себя повторяющиеся процессы.

Регуляторная процедура с позиции специалиста по регистрации компании-заявителя включает не только этапы прохождения непосредственно самой процедуры в уполномоченном регуляторном органе и (или) в экспертной организации, но и подготовительные этапы. Очевидно, что самыми критичными для успешного прохождения регуляторной процедуры являются подготовительные этапы, которые совпадают с подготовительными этапами проекта по управлению жизненным циклом досье.

Подготовительные этапы:

- подготовка отдельных документов досье;
- внутреннее согласование (валидация);
- формирование заявления и электронного досье (R.022);
- подача заявления.

Стандартная схема жизненного цикла проекта состоит из пяти фаз:

- инициация;
- планирование;
- исполнение;
- контроль;
- завершение.

Обычно в начале нового проекта эти фазы следуют друг за другом по порядку (линейный проект), но так бывает не всегда. Например, управление жизненным циклом досье представляет собой циклический проект и имеет свои особенности.



Рис. 6. Алгоритм решения задачи специалиста по регистрации для примера № 2

1. В случае внесения изменений, инициированных внешней стороной (регуляторные органы), например изменение требований к общей характеристике лекарственного препарата (ОХЛП), введение новых фармакопейных требований, запрос в рамках прохождения процедур, необходимо вернуться к фазе «Планирование», чтобы учесть изменения.
2. В случае внесения изменений, инициированных в соответствии с внутренними потребностями (маркетинг, служба закупок и обеспечения предприятия и т.д.), необходимо вернуться к фазе «Инициация», чтобы учесть изменения.
3. Фаза «Завершение» применима к отдельным процедурам в рамках управления проектом, но не ко всему проекту по управлению жизненным циклом досье.

Такой гибкий подход упрощает процессы управления изменениями в ходе жизненного цикла досье. Особенно это актуально для процедуры уведомления регуляторных органов о внесении незначимых изменений IA типа в течение 365 календарных дней со дня введения таких изменений. Такие возможности при ведении досье в «ручном» режиме будут требовать от сотрудников предельной внимательности и ответственности. А от руководителей отделов

регистрации — уверенности, что при смене специалиста по регистрации все документы досье будут тщательно систематизированы и доступны для дальнейшей работы других сотрудников.

Эта последовательность фаз может показаться формальностью, но на самом деле такой организованный подход очень помогает управлять жизненным циклом досье, более четко распределять роли и обязанности участников процесса, улучшать взаимодействие между подразделениями и добиваться стабильных результатов.

Процедура регистрации лекарственного препарата по Правилам ЕАЭС

Фазы по управлению проектом жизненного цикла досье на примере процедуры регистрации лекарственного препарата по Правилам ЕАЭС представлены на рисунке 7.

Фаза 1. Инициация. Это подготовительный этап, когда нужно убедиться, что проект по регистрации препарата действительно осуществим, прежде чем вкладывать силы в планирование и решение последующих задач. Эта фаза включает в себя разработку регистрационной стратегии, в том числе определение типа заявления, типа досье, оценку рисков, сроков и ограничений. Фаза инициации — фундамент



Рис. 7. Фазы жизненного цикла проекта по управлению досье в процессе регистрации препарата по правилам Евразийского экономического союза. ЛП — лекарственный препарат, ДКИ — доклинические исследования, КИ — клинические исследования, M1 — модуль 1 (Административная информация), M2 — модуль 2 (Резюме общего технического документа), M3 — модуль 3 (Качество), M4 — модуль 4 (Доклинические исследования), M5 — модуль 5 (Клинические исследования), коды документов указаны четырехзначным числом

для успешного выполнения проекта подготовки регистрационного досье.

Фаза 2. Планирование. Совпадает с этапом разработки жизненного цикла препарата. Включает в себя стратегии разработки препарата (фармацевтическая, доклиническая, клиническая), определение внутренних и внешних ключевых участников процесса разработки препарата, сбор сведений и материалов для подготовки документов досье. В результате должны сформироваться общие представления о том, как будет реализовываться проект по управлению регистрационным досье.

Фаза 3. Исполнение. Включает в себя координацию деятельности подразделений компании и внешних исполнителей по подготовке информации и материалов для создания документов регистрационного досье, создание документов досье, формирование досье в бумажном и электронном форматах версии 0000.

Именно на этом этапе участники процесса совершают большинство ошибок. Необходимо тщательно планировать действия и строго их выполнять; убедиться, что каждый участник процесса придерживается стратегии разработки и выполняет свою часть работы.

Фаза 4. Контроль. Обычно совпадает по времени с началом регуляторной процедуры. Включает в себя взаимодействие с уполномоченным регуляторным органом и экспертной организацией, подачу досье на регистрацию (электронные сервисы, образцы), ответы на запросы. Жизненный цикл управления досье требует определенной гибкости. Во время фазы контроля могут возникать ситуации, требующие корректировки. В случае получения запроса в рамках прохождения процедур необходимо вернуться к фазе «Планирование», чтобы учесть изменения в досье и предоставить требуемый ответ. Использование программы по управлению проектами досье поможет обеспечить прозрачность данных, иметь общее представление о ходе выполнения проекта, отслеживать отдельные задачи и рабочую загрузку исполнителей.

Фаза 5. Завершение. Это финал проекта по регистрации, но еще не всего проекта по управлению жизненным циклом досье. Включает в себя получение РУ, утвержденных документов досье, размещение всех документов и материалов в централизованном хранилище, архивирование утвержденной версии досье во избежание внесения неучтенных изменений, сдачу проекта

клиенту или внутренним заказчикам и подразделениям, отвечающим за выпуск препарата в гражданский оборот (производство, контроль качества, поставки, обеспечение качества, сбыт).

При инициации внесения изменений или при продолжении процесса регистрации препарата в странах признания все фазы проекта повторяются, начиная с планирования, с небольшими отличиями в фазе планирования.

Процедура приведения досье в соответствие с требованиями ЕАЭС

Фазы по управлению проектом жизненного цикла досье на препарат на примере процедуры приведения досье в соответствие с требованиями ЕАЭС представлены на *рисунке 8*.

Основное отличие управления проектом жизненного цикла досье во время процедуры приведения в соответствие с требованиями ЕАЭС от процедуры регистрации по правилам ЕАЭС связано с начальными фазами процедуры, т.е. с определением вида процедуры, как это указано на *рисунке 9*.

Фаза 1. Инициация. При приведении досье в соответствие с требованиями ЕАЭС фаза инициации включает в себя определение типа заявления и определение вида процедуры приведения.

Фаза 2. Планирование. Включает в себя анализ документов национального РУ со всеми внесенными изменениями, при необходимости определение внутренних и внешних ключевых участников. В случае выбора процедуры приведения в соответствие с последующей регистрацией или приведения в соответствие с одновременным внесением изменений необходим также анализ рисков и ограничений.

Остальные фазы жизненного цикла досье при процедуре приведения в соответствие не отличаются от проекта по управлению досье по процедуре регистрации.

При планировании регуляторных процедур специалистам по регистрации, как правило, приходится ориентироваться на сроки и задачи, которые ставят коммерческие подразделения компаний. Но решения, которые сегодня необходимы для реализации маркетингового плана, с учетом длительности регистрационных процедур через год могут оказаться невостребованными. И наоборот, необходимые с точки зрения специалиста по регистрации задачи и решения кажутся незначительными коммерческим подразделениям. Специалисты по регистрации проявляют осторожность, выбирают решения со



Рис. 8. Фазы жизненного цикла проекта по управлению досье на препарат согласно процедуре приведения в соответствие с требованиями Евразийского экономического союза. ЛП – лекарственный препарат, ДКИ – доклинические исследования, КИ – клинические исследования, М1 – модуль 1 (Административная информация), М2 – модуль 2 (Резюме общего технического документа), М3 – модуль 3 (Качество), М4 – модуль 4 (Доклинические исследования), М5 – модуль 5 (Клинические исследования), коды документов указаны четырёхзначным числом

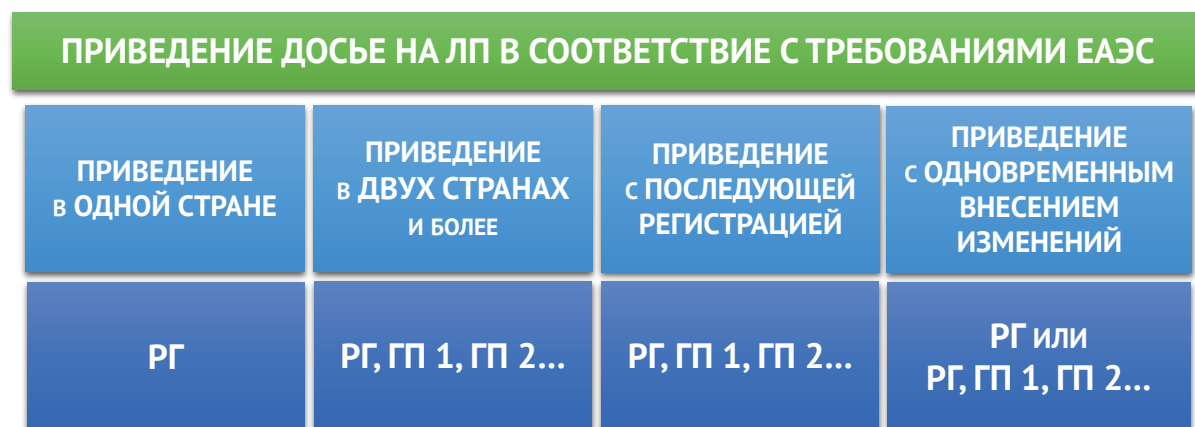


Рис. 9. Примеры видов процедуры приведения регистрационного досье в соответствии с требованиями Евразийского экономического союза (ЕАЭС). РГ – референтное государство, ГП – государство признания

множеством запасных (часто ненужных) вариантов, тем самым увеличивая свою загруженность и загруженность экспертной организации.

На наш взгляд, целесообразно все препараты продуктового портфеля компании, как уже выведенные на фармацевтический рынок, так и находящиеся на разных этапах разработки, для определения приоритетности и планирования регуляторных процедур ЕАЭС разделить на три категории, определив для каждой категории срок подачи документов.

1. Зарегистрированные по национальной процедуре препараты с ранжированием по сроку действия РУ (срочные/бессрочные).
2. Зарегистрированные по процедуре ЕАЭС препараты с ранжированием по сроку действия РУ (срочные/бессрочные). Следует контролировать срок действия РУ.
3. Препараты в разработке. По сроку готовности досье.

Становится неактуальным подтверждение срочного РУ по национальным требованиям (срок

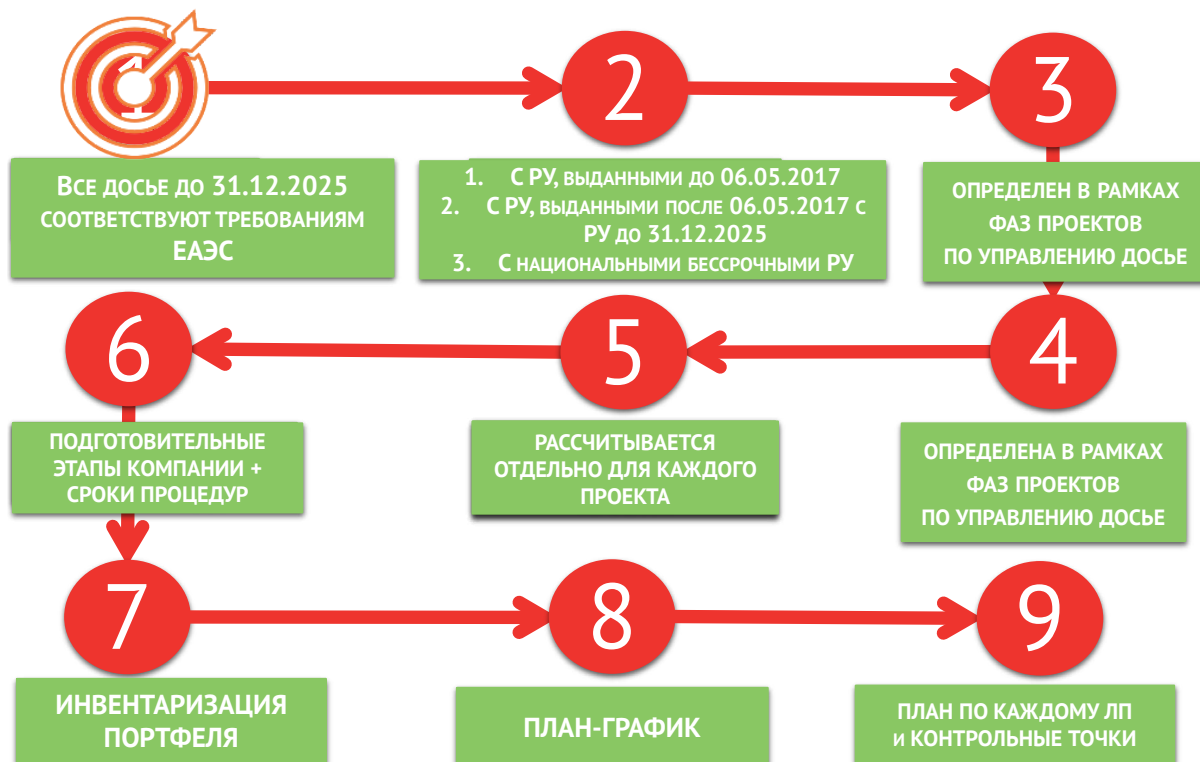


Рис. 10. Планирование регуляторных процедур Евразийского экономического союза. Последовательность этапов

действия до 31.12.2025). Вместо этого следует приводить досье в соответствие Правилам ЕАЭС и уже в него вносить необходимые изменения. Тем более что ряд изменений, требующих срочного внесения, допускается вносить одновременно с процедурой приведения в соответствие.

Общая схема планирования регуляторных процедур по Правилам ЕАЭС представлена на рисунке 10 и состоит из следующих этапов.

1. Определение целей: до 31.12.2025 все досье на препараты портфеля компании необходимо привести в соответствие с требованиями ЕАЭС.
2. Определение приоритетности: в первую очередь следует приводить в соответствие досье на препараты, зарегистрированные по национальной процедуре со срочными РУ, выданными до 06.05.2017, затем — выданные после 06.05.2017 и только после этого — на препараты, зарегистрированные по национальной процедуре с бессрочными РУ.
3. Состав работ определен в рамках фаз проектов по управлению досье.
4. Последовательность работ определена в рамках фаз проектов по управлению досье.

5. Определение потребностей в ресурсах рассчитываются для каждого проекта отдельно.

6. Оценка продолжительности работ: подготовительные этапы в компании + сроки процедур.

7. Оптимизация задач: если продолжительность работ и запланированные ресурсы не позволяют достичь цели, возможно проведение инвентаризации портфеля и отзыв РУ.

8. Общий план-график необходимых работ по всем процедурам.

9. План-график по каждому препарату и установление контрольных точек.

Многие компании уже успешно освоили процедуру приведения досье в соответствие и приступили к процессу регистрации по Правилам ЕАЭС, некоторые компании уже вносят изменения в РУ, выданные по Правилам ЕАЭС.

Благодаря предложенной поэтапной организации и структурированию задач можно сосредоточить усилия на более важных участках работы, эффективнее отслеживать рентабельность и не упустить значимых деталей, необходимых для успешного вывода препарата на рынок.

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: *Е.М. Рычихина* — концепция работы; *О.Г. Ткаченко* — написание и оформление текста рукописи; *В.В. Косенко* — утверждение окончательного варианта рукописи для публикации.

Благодарности. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. В.В. Косенко — главный редактор журнала «Вестник НЦЭСМП. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств». Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. *Ekaterina M. Rychikhina* elaborated the concept. *Oksana G. Tkachenko* drafted and formatted the manuscript. *Valentina V. Kosenko* approved the final version of the article for publication.

Acknowledgements. The study was performed without external funding.

Conflict of interest. Valentina V. Kosenko is the Editor-in-Chief of *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. The other authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Рычихина Екатерина Михайловна, канд. биол. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8728-2538>
richikhina@expmed.ru

Ткаченко Оксана Геннадьевна
ORCID: <https://orcid.org/0009-0002-8368-9001>
tkachenkoog@expmed.ru

Косенко Валентина Владимировна, канд. фарм. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8353-7863>
General@expmed.ru

Ekaterina M. Rychikhina, Cand. Sci. (Biol.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8728-2538>
richikhina@expmed.ru

Oksana G. Tkachenko
ORCID: <https://orcid.org/0009-0002-8368-9001>
tkachenkoog@expmed.ru

Valentina V. Kosenko, Cand. Sci. (Pharm.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8353-7863>
General@expmed.ru

Поступила 21.03.2023

После доработки 03.05.2023

Принята к публикации 03.05.2023

Online first 16.06.2023

Received 21 March 2023

Revised 3 May 2023

Accepted 3 May 2023

Online first 16 June 2023

Ведомости Научного центра экспертизы
средств медицинского применения

**Регуляторные исследования
и экспертиза лекарственных средств**

