

ВЕДОМОСТИ

**НАУЧНОГО ЦЕНТРА ЭКСПЕРТИЗЫ
СРЕДСТВ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ**

**РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ**

Том 7, № 3

Точка зрения авторов может не совпадать с мнением редакции журнала.

К публикации принимаются статьи, подготовленные в соответствии с правилами для авторов, размещенными на сайте журнала www.journals.regmed.ru

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

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

Труды заочных конференций не публикуются.

ВЕДОМОСТИ НАУЧНОГО ЦЕНТРА ЭКСПЕРТИЗЫ СРЕДСТВ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Рецензируемый научно-практический журнал

СОДЕРЖАНИЕ

Том 7, № 3 2017

ОБЗОРЫ

Е. С. Петрова, Д. В. Горячев, М. В. Петров

Современные подходы к оценке биоэквивалентности ингаляционных лекарственных препаратов 135

Д. П. Ромодановский, Д. В. Горячев

Планирование и оценка исследований биоэквивалентности препаратов розувастатина 142

Е. А. Сокова, И. А. Мазеркина, О. А. Демидова, Т. В. Александрова

Особенности клинической фармакологии лекарственных средств, применяемых для фармакотерапии ВИЧ-инфекции во время беременности 150

Д. В. Горячев, М. Ю. Тельных, Н. Д. Бунятян

Регуляторные подходы к оценке биоаналогов для лечения ревматических заболеваний 155

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

О. А. Батурина, Е. В. Чайковская, Е. П. Герникова, Т. Н. Боковикова, Л. А. Стронова,

Ю. Р. Биглова, С. А. Манаева, Е. С. Толмачева

Обоснование выбора условий определения родственных примесей методом ВЭЖХ в фармацевтической субстанции бисопролола фумарат 164

А. Н. Иоутси, М. А. Сумцов, А. Т. Сарницкая, А. Н. Блинов

Практические рекомендации по выбору неподвижной жидкой фазы и геометрических параметров колонки при определении триэтиламина методом газовой хроматографии. 170

Н. Е. Кузьмина, С. В. Моисеев, В. И. Крылов, А. А. Кутин, Е. А. Жуков,

В. А. Яшкир, В. А. Меркулов

Валидация методики определения аминокислотного состава фармацевтической субстанции «Глатирамера ацетат» методом ¹³C ЯМР-спектроскопии. 175

Н. П. Антонова, И. М. Моргун, С. С. Прохвятилова, Е. П. Шефер, А. М. Калинин

Применение альтернативного метода определения влажности в лекарственных растительных препаратах 182

Е. А. Бесхмельницкая, Д. В. Кравченко, М. В. Покровский, М. В. Корокин,

А. А. Пересыпкина, Е. И. Варавин, Д. А. Костина

Молекулярный поиск перспективных молекул-кандидатов в селективные антагонисты ионного канала TRPA₁ 186

Н. Г. Голоенко, Р. И. Ягудина, Б. К. Романов, Д. Г. Карапетян, А. Ю. Куликов,

М. В. Проценко, Г. Т. Абдрашитова

Анализ результатов социологического опроса по унификации типовых инструкций по медицинскому применению взаимозаменяемых лекарственных средств 190

Учредитель

Федеральное государственное
бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы
средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения
Российской Федерации

Издатель

Издательский дом «Фолиум»

Главный редактор

Ю. В. Олефир

Зам. главного редактора

В. А. Меркулов

А. Н. Яворский

Ответственный секретарь

Л. В. Корсун

Редактор

С. А. Калинин

Редакционная коллегия

Р. Н. Аляутдин

В. П. Бондарев

И. В. Борисевич

Н. Д. Бунятян

Е. Л. Ковалева

В. Г. Кукес

В. К. Лепяхин

Н. В. Медунин

А. А. Мовсисянц

Б. К. Романов

А. Б. Прокофьев

Е. И. Саканян

Р. И. Ягудина

Редакционный совет

В. А. Алешкин (Москва)

Ш. А. Байдуллаева (Алматы)

Г. М. Бобизода (Душанбе)

А. Л. Гинцбург (Москва)

А. Д. Дурнев (Москва)

Э. Э. Звартау (Санкт-Петербург)

А. З. Зурдинов (Бишкек)

И. Г. Козлов (Москва)

В. И. Кочеровец (Москва)

А. Г. Муляр (Москва)

А. В. Наджарян (Минск)

В. И. Петров (Волгоград)

А. А. Свистунов (Москва)

Д. А. Сычев (Москва)

В. В. Удуд (Томск)

А. Л. Хохлов (Ярославль)

В. П. Чехонин (Москва)

Н. Л. Шимановский (Москва)

Свидетельство о регистрации средства массовой информации: ПИ № ФС77-53169 от 14 марта 2013 г.

Адрес: 127051, Москва, Петровский 6-р, д. 8, стр. 2

Телефоны: +7 (495) 234-61-04, доб. 63-33; 63-34

E-mail: vedomosti@expmed.ru

www.journals.regmed.ru

Журнал включен в наукометрическую

базу данных Science Index

Подписной индекс 25122 в каталоге

«Газеты. Журналы» агентства «Роспечать»

© ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, 2017

Подписано в печать 21.08.2017.

Формат 60×90/8. Печ. л. 8,0

Бумага мелованная. Печать офсетная

Заказ № VED-3(17).

Отпечатано в Издательском доме «Фолиум»
127238, а/я 42, Москва, Дмитровское ш., 157

Тел.: +7 499 258-08-28

E-mail: press@folium.ru

www.folium.ru

**THE BULLETIN OF THE SCIENTIFIC CENTRE
FOR EXPERT EVALUATION OF MEDICINAL PRODUCTS**
Research and practice peer-reviewed journal

CONTENTS

Vol. 7, № **3** 2017

Founder

Federal State

Budgetary Institution

«Scientific Centre for Expert
Evaluation of Medicinal
Products» of the Ministry of Health
of the Russian Federation

Publisher

Folium Publishing Company

Editor in chief

Yu. V. Olefir

Deputy chief editors

V. A. Merkulov

A. N. Yavorsky

Executive editor

L. V. Korsun

Editor

S. A. Kalinichev

Editorial staff

R. N. Alyautdin

V. P. Bondarev

I. V. Borisevich

N. D. Bunyatyan

E. L. Kovaleva

V. G. Kukes

V. K. Lepakhin

N. V. Medunitsyn

A. A. Movesyants

B. K. Romanov

A. B. Prokofiev

E. I. Sakanyan

R. I. Yagudina

Editorial board

V. A. Aleshkin (*Moscow*)

Sh. A. Baidullaeva (*Almaty*)

G. M. Bobizoda (*Dushanbe*)

A. L. Gintsburg (*Moscow*)

A. D. Durnev (*Moscow*)

E. E. Zvartau (*Saint-Petersburg*)

A. Z. Zurdinov (*Bishkek*)

I. G. Kozlov (*Moscow*)

V. I. Kocherovets (*Moscow*)

A. G. Mulyar (*Moscow*)

A. V. Nadzharyan (*Minsk*)

V. I. Petrov (*Volgograd*)

A. A. Svistunov (*Moscow*)

D. A. Sychev (*Moscow*)

V. V. Udut (*Tomsk*)

A. L. Khokhlov (*Yaroslavl*)

V. P. Chekhonin (*Moscow*)

N. L. Shimanovsky (*Moscow*)

REVIEWS

E. S. Petrova, D. V. Goryachev, M. V. Petrov

Modern approaches to the assessment of orally inhaled products bioequivalence 135

D. P. Romodanovsky, D. V. Goryachev

Planning and evaluation of bioequivalence studies of rosuvastatin drug products 142

E. A. Sokova, I. A. Mazerkina, O. A. Demidova, T. V. Aleksandrova

Clinical pharmacology aspects of drugs for HIV-infected pregnant women 150

D. V. Goryachev, M. Yu. Telnykh, N. D. Bunyatyan

Regulatory approaches to evaluation of biosimilars for treatment of rheumatic diseases 155

ORIGINAL ARTICLES

**O. A. Baturina, E. V. Chaykovskaya, E. P. Gernikova, T. N. Bokovikova, L. A. Stronova,
Yu. R. Biglova, S. A. Manaeva, E. S. Tolmacheva**

Substantiation of conditions for determination of related substances in bisoprolol
fumarate by HPLC 164

A. N. Ioutsy, M. A. Sumtsov, A. T. Sarnitskaya, A. N. Blinov

Recommendations for selection of a liquid stationary phase and geometric parameters
of the column when determining triethylamine by gas chromatography 170

**N. E. Kuz'mina, S. V. Moiseev, V. I. Krylov, A. A. Kutin, E. A. Zhukov, V. A. Yashkir,
V. A. Merkulov**

Validation of the procedure for determination of amino acids composition
of glatiramer acetate by C-13 NMR spectroscopy 175

N. P. Antonova, I. M. Morgunov, S. S. Prohvatilova, E. P. Shefer, A. M. Kalinin

An alternative method of loss on drying determination in herbal medicinal products 182

E. A. Beskhmel'nitsyna, D. V. Kravchenko, M. V. Pokrovsky, M. V. Korokin,

A. A. Peresyapkina, E. I. Varavin, D. A. Kostina
Molecular screening for potential selective antagonists of TRPA₁ ion channel 186

N. G. Golovenko, R. I. Yagudina, B. K. Romanov, D. G. Karapetyan, A. Yu. Kulikov,

M. V. Protsenko, G. T. Abdrashitova
Results of an opinion poll devoted to unification of instructions for interchangeable
medicines 190

Mass media registration certificate:
ПИ № ФС77-53169 of March 14, 2013
Address: Petrovsky boulevard 8, bld. 2,
Moscow 127051
Tel: +7 (495) 234-61-04, ext. 63-33; 63-34
E-mail: vedomosti@expmed.ru
www.journals.regmed.ru

Format 60×90/8.
Printed sheets: 8,0
Enamel-paper. Offset printing.
Order № VED-3(17).
Printed in Folium Publishing Company
157, Dmitrovskoe sh., Moscow,
P.O. Box 42, 127238

Современные подходы к оценке биоэквивалентности ингаляционных лекарственных препаратов

Е. С. Петрова, Д. В. Горячев, М. В. Петров

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

Статья поступила 27.04.2017 г. Принята к печати 21.08.2017 г.

Резюме: Проведен анализ нормативных документов по требованиям к клинической документации (исследованиям) для ингаляционных лекарственных препаратов, включая требования к подтверждению терапевтической эквивалентности лекарственных препаратов, применяемых для лечения бронхиальной астмы и хронической обструктивной болезни легких у взрослых и детей. Сформулированы основные подходы к оценке эквивалентности ингаляционных лекарственных средств. Систематизированы и описаны лекарственные формы и ингаляционные устройства, необходимые этапы последовательного изучения ингаляционных лекарственных препаратов, представлена методология проведения исследований терапевтической эквивалентности в зависимости от фармакотерапевтической группы препарата, длительности его действия и предполагаемой нозологии, включающая описание требований к выбору исследуемой популяции, дизайну и условиям проведения исследования, рекомендации по выбору доз препаратов, длительности исследования, выбору основных и дополнительных конечных точек эффективности и безопасности ингаляционных лекарственных препаратов.

Ключевые слова: ингаляционные лекарственные препараты; ингаляционные устройства; фармакокинетика; фармакодинамика; биоэквивалентность; терапевтическая эквивалентность; конечные точки клинических исследований; критерии оценки эффективности и безопасности.

Библиографическое описание: Петрова ЕС, Горячев ДВ, Петров МВ. Современные подходы к оценке биоэквивалентности ингаляционных лекарственных препаратов. Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения 2017; 7(3): 135–141.

Доставка лекарственных препаратов непосредственно в легкие позволяет при относительно небольших дозах препарата обеспечить высокие локальные концентрации при сведении к минимуму системных побочных эффектов. Ингаляторы наиболее часто назначают при лечении бронхиальной астмы (БА) и хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ).

ХОБЛ имеет распространенность в пределах от 7,8 до 19,7 % во всем мире, и приводит к существенной и возрастающей экономической и социальной нагрузке. ХОБЛ характеризуется стойким ограничением воздушного потока, которое, как правило, прогрессирует и связано с хронической воспалительной реакцией на вредные частицы или газы в дыхательных путях (ДП) и легких [1]. Распространенность БА составляет от 1 до 18 %, по последним оценкам число больных бронхиальной астмой в мире составляет более 334 млн человек.

В настоящее время самыми эффективными препаратами для длительного контроля симптомов БА являются ингаляционные глюкокортикостероиды (ИГКС). Они играют важную роль в долгосрочной терапии БА благодаря их противовоспалительному эффекту. ИГКС облегчают симптомы БА и улучшают качество жизни, улучшают функцию легких, уменьшают гиперчувствительность ДП, позволяют контролировать воспаление ДП, уменьшить частоту и тяжесть обострений, а также связанную с заболеванием смертность [2].

Второй широко применяемой при указанных заболеваниях группой лекарственных средств (ЛС) являются бронходилататоры. Ингаляционные бронходилататоры также используются при лечении БА и

играют центральную роль в лечении больных с ХОБЛ. Основным механизмом фармакологического действия бронходилататоров — расслабление гладких мышц ДП, что приводит к бронходилатации и улучшению состояния больного. Эта группа ЛС представлена в основном бета2-агонистами адreno-рецепторов и антихолинергическими средствами. Лечение длительно действующими бронхолитиками является более удобным и более эффективным для устойчивого облегчения симптомов, чем лечение коротко действующими бронходилататорами.

Неудивительно, что существует значительный интерес к созданию воспроизведенных лекарственных препаратов (ЛП) или разработке новых комбинаций уже существующих ИГКС и ингаляционных бронходилататоров. Применение воспроизведенных препаратов увеличилось в последние годы, в первую очередь из-за экономических факторов. Принципы оценки терапевтической эквивалентности ингаляционных ЛП в настоящее время в России значительно отличаются от зарубежных.

В то же время современные подходы к стандартизации ингаляционных ЛП, включающие научно и экспериментально обоснованную нормативную базу для выпуска и контроля качества лекарственных препаратов для ингаляций (в частности, исследование их аэродинамических показателей), нашли отражение в XIII издании Государственной фармакопеи Российской Федерации [3–5].

Установление эквивалентности воспроизведенных ингаляционных препаратов (ИП) зачастую является сложной задачей. Методология определения биоэквивалентности наиболее детально регламенти-

рована для системно действующих твердых пероральных лекарственных форм. Целью установления биоэквивалентности является демонстрация эквивалентности между воспроизведенным и референтным препаратами для того, чтобы установить связь с доклиническими и клиническими исследованиями, выполненными для «оригинального» препарата. Однако подход к установлению эквивалентности ЛС, применяемый в случае твердых пероральных лекарственных форм, невозможен в случае ингаляторов, поскольку до конца не известна взаимосвязь между ингалируемой дозой, местной эффективностью и системной концентрацией ЛС. Таким образом, в настоящее время не существует универсальной принятой методологии, и нормативные требования в этой области являются предметом обсуждения.

В этой связи, с целью гармонизации российского и зарубежного опыта, помимо отечественной нормативной базы, следует учитывать требования ЕМА (European Medicines Agency, Европейское агентство по лекарственным средствам) как наиболее развитый в научном плане подход к оценке эквивалентности ингаляционных лекарственных средств. Только комплексное поэтапное изучение свойств сравниваемых препаратов (фармацевтическая эквивалентность, сходные параметры средств доставки, сопоставимые системная фармакокинетика и легочное распределение, эквивалентные фармакодинамические свойства и клинический эффект) может позволить составить представление о свойствах предлагаемого нового препарата.

Установление эквивалентности ИП, согласно современным требованиям, предполагает ступенчатый подход к определению биоэквивалентности «оригинального» и воспроизведенного ингаляторов [6], а именно:

- оценка эквивалентности качественного и количественного состава действующего и вспомогательных веществ сравниваемых препаратов и сходства свойств используемого средства доставки;
- изучение сравнительных данных ингалятора *in vitro* с получением данных распределения размеров частиц вдыхаемой дозы;
- изучение системной фармакокинетики и легочного распределения;
- оценка фармакодинамических свойств и клинической эффективности.

Современные ингаляционные устройства имеют различные легочные модели распределения / депозиции (англ. deposition), зависящие от потока. Предпочтения пациентов в применении этих устройств различаются.

Важным аспектом, влияющим на клиническую разработку препарата, является знание характеристик, оцененных *in vitro*, в том числе особенности распределения частиц препарата в зависимости от потока и ингаляционного устройства.

Различают следующие типы ингаляционных устройств:

- дозированные ингаляторы под давлением (то есть неуправляемые дыханием дозированные ингаляторы под давлением);
- управляемые дыханием дозированные ингаляторы;
- дозированные ингаляторы под давлением со спейсерами или удерживающими камерами;
- дозированные ингаляторы не под давлением;

– небулайзеры для ингаляций растворов и суспензий;

– сухие порошковые ингаляторы с использованием резервуара и дозирующего механизма или с предварительно распределенной дозой.

Неуправляемые дыханием дозированные ингаляторы под давлением (Pressurized Metered Dose Inhalers, pMDIs) содержат различные пропелленты и другие вспомогательные вещества, а также могут использоваться различные системы доставки, что может привести к различным клиническим исходам. Стандартный pMDI требует координации вдоха с приведением в действие ингалятора.

Для работы **управляемого дыханием ингалятора** (Breath-Operated Inhaler, BOI) требуется определенный минимальный пиковый инспираторный поток на вдохе (Peak Inspiratory Flow, PIF), и, если PIF не может быть достигнут пациентом, применение ингалятора будет неэффективным. В качестве препарата сравнения для BOI может быть использован соответствующий pMDI.

Некоторые ингаляторы имеют два способа приведения в действие: ручное и активирование дыханием.

Эффективные **спейсеры и удерживающие камеры** облегчают ингаляцию через неуправляемый вдохом pMDI и уменьшают количество действующего вещества, осаждающегося в полости рта и глотке, а затем проглатываемого. Спейсеры обычно увеличивают легочное распределение препарата. Использование спейсера рекомендуется для всех пациентов, но особенно для тех, которые испытывают затруднения в координации вдоха и приведения в действие pMDI (например, дети и пожилые люди), а также для пациентов, получающих ИГКС. Однако конкретный спейсер может использоваться по-разному с различными действующими веществами, и аналогичным образом, конкретное действующее вещество в конкретном pMDI может иметь разные варианты распределения при вдыхании через отличающиеся по техническим характеристикам спейсеры. Распределение действующего вещества и клинический ответ не могут считаться эквивалентными, если используется другой спейсер или если другой pMDI используется с тем же самым спейсером.

Дозированные ингаляторы, не находящиеся под давлением, являются портативными дозирующими устройствами, активируемыми нажатием, и представляют собой резервуар, содержащий водный раствор, суспензию или эмульсию и обеспечивающий введение одной дозы в одно или несколько приведений в действие (нажатий). В дозированных ингаляторах, не находящихся под давлением, скорость струи низкая, и поэтому ингаляционный маневр занимает больше времени, чем для pMDIs (без использования спейсера) и для порошковых ингаляторов. Чтобы обеспечить введение достаточного количества действующего вещества, пациент должен вдыхать определенный объем аэрозоля. У всех пациентов, особенно у лиц с ограниченными ингаляционными возможностями (например, дети), должно быть продемонстрировано, что объем аэрозоля, необходимый для получения желаемого клинического эффекта, не превышает ингаляционных способностей пациента.

При определенных обстоятельствах (например, у младенцев и детей младшего возраста, тяжелобольных, пожилых людей, инвалидов) вариантом лечения является ингаляция лекарственных средств через систему **небулайзера (растворы и суспензии для ингаляций)**. В настоящее время доступны струйные (англ.

Jet), ультразвуковые, вибрационно-сетчатые небулайзерные системы, различающиеся доставляемым объемом аэрозоля. Как правило, небулайзерные системы находятся в обращении отдельно от растворов и суспензий, содержащих действующие вещества для ингаляции (англ. Nebulisation). Поэтому лекарственное средство, разработанное для ингалирования через небулайзер, должно иметь определенные характеристики применения для указанной и стандартизированной системы (систем) распылителя.

При сравнении с MDIs под давлением и без давления, **ингаляторы сухого порошка** (Dry Powder Inhalers, DPIs) часто имеют высокий уровень зависимости параметров распределения от воздушного потока. Поэтому должна быть представлена характеристика скорости потока в популяциях пациентов, для которых будет предназначаться DPI. Представленное доось должно включать достаточное количество данных *in vitro*, таких как описание характеристики легочного распределения препарата в пределах клинически значимых перепадов давления и ограничений воздушного потока.

Линейность дозы должна быть исследована *in vitro*, как для исследуемого, так и для референтного препаратов во всех предложенных дозировках, таким образом, речь идет об исследовании нескольких доз лекарственного средства.

Если линейность дозы подтверждена *in vitro* при исследовании различных доз одного вещества, то может быть достаточно установить клиническую терапевтическую эквивалентность только с одной дозировкой действующего вещества, как правило, самой низкой из имеющихся доз, чтобы повысить чувствительность исследования. Если линейность всех предложенных доз не демонстрируется с референтным препаратом, то должна быть установлена терапевтическая эквивалентность с более чем одной дозой ЛС и, возможно, со всеми дозами препарата.

Выбор референтного препарата должен быть обоснован. В качестве референтного следует выбирать препарат, зарегистрированный инноватором, если этот препарат присутствует на рынке.

Если вводят новый пропеллент, вспомогательное вещество или комбинацию вспомогательных веществ, то в дополнение к стандартной токсикологической и доклинической программой должно быть изучено их возможное влияние на клиническую эффективность и безопасность. Могут быть необходимы расширенные данные о безопасности [7, 8].

В рамках экспертизы должна быть подтверждена терапевтическая эквивалентность для воспроизведенных препаратов. В некоторых случаях использование только сравнительных данных *in vitro*, полученных с помощью стандартных методов (таких как многоступенчатый каскадный импактор/импинжер), может считаться приемлемым, если препарат удовлетворяет всем представленным критериям (в сравнении с референтным препаратом):

- 1) препарат содержит то же активное вещество (ту же соль, эфир, гидрат или раствор и т.д.);
- 2) лекарственная форма идентична (например, pMDI; MDI, DPI и т.д.);
- 3) действующее вещество в твердом состоянии (порошок, суспензия): любые различия в кристаллической структуре и/или полиморфной форме не должны влиять на характеристики растворения и функциональные характеристики препарата или распределение аэрозольных частиц;
- 4) любые качественные и/или количественные различия во вспомогательных веществах не должны

влиять на характеристики, определяющие эффективность препарата (такие как однородность доставленной дозы и т.д.), свойства аэрозольных частиц (такие как гигроскопичность, динамика и геометрия струи) и/или должны быть сходными по воздействию ингаляции на пациента (распределение размера частиц в ротовой полости и горле или «охлаждающий фреоновый» эффект);

5) любые качественные и/или количественные различия во вспомогательных веществах не должны менять профиль безопасности препарата;

6) объем ингаляции через дозирующее устройство, позволяющий доставить необходимое количество действующего вещества в легкие, должен быть сходным (отличия в пределах $\pm 15\%$);

7) метод применения ингаляционного дозирующего устройства для исследуемого и референтного препаратов с целью высвобождения необходимого количества действующего вещества должен быть сходным;

8) ингаляционное устройство должно обеспечивать одинаковое сопротивление воздушному потоку (отличия в пределах $\pm 15\%$);

9) количество доставленной дозы должно быть одинаково (отличия в пределах $\pm 15\%$).

Следует обеспечить получение полного объема данных распределения частиц по размерам для отдельных ступеней/каскадов (англ. stages) валидированным методом с применением многоступенчатого импактора/импинжера. Должны быть получены сравнительные данные *in vitro* зависимости скорости потока с диапазоном потоковых скоростей. Этот диапазон необходимо обосновать по отношению к целевой популяции пациентов. Должна быть оценена характеристика распределения этого показателя в данной популяции пациентов (минимальное значение (например, 10-й процентиль), медиана и максимальное значение (например, 90-й процентиль)).

Эффективность и безопасность лекарственного средства будут зависеть от количества действующего вещества, достигшего легких, и от характера распределения. Кроме того, на безопасность также будут оказывать влияние скорость и степень системной абсорбции из желудочно-кишечного тракта (то есть проглоченная фракция). Поэтому *in vitro* сравнение должно быть выполнено для ступеней, которые отражают массу тонкодисперсных частиц, а также верхних ступеней импактора/импинжера, которые связаны с эффективностью и безопасностью лекарственного средства *in vivo*.

Сравнение должно проводиться по ступеням импактора или обоснованной группе ступеней. По крайней мере, оцениваются 4 ступени. Обоснование должно строиться на предполагаемых уровнях распределения в легких. Должны быть протестированы не менее трех последовательных проб исследуемого препарата и трех последовательных проб референтного препарата. Максимально допускаемые различия *in vitro* должны быть указаны и обоснованы, например, могут быть приемлемы $\pm 15\%$ различия. Для ступени импактора или обоснованной группы ступеней должны быть рассчитаны 90 % доверительные интервалы для наблюдаемых *in vitro* различий. На основании заранее утвержденного протокола, с указанием и обоснованием максимально допустимых различий, можно вынести решение об эквивалентности.

Если препарат не удовлетворяет всем этим критериям эквивалентности, должны быть выполнены клинические исследования, чтобы обосновать эквивалентность.

Вспомогательные вещества, устройства или различные характеристики аэрозоля ингаляционных препаратов могут оказывать значительное влияние на легочное распределение и обладать значимым влиянием на эффективность и безопасность. Если изучаемый препарат не демонстрирует эквивалентность референтному препарату на основании данных *in vitro*, одним из способов продемонстрировать эквивалентную эффективность может быть сравнение легочного распределения. Исследования легочного распределения изучают степень и характер распределения ингаляционного действующего вещества.

Исследования легочного распределения выполняются в виде двойных слепых перекрестных исследований и должны быть осуществлены с использованием клинически значимой дозы препарата, которая может быть определена по данным *in vitro*. Эти исследования должны быть выполнены в целевой популяции пациентов. У детей исследования легочного распределения не проводятся.

Легочное распределение может быть исследовано путем проведения фармакокинетических или визуализационных исследований.

Фармакокинетическое исследование, предназначенное для оценки легочного распределения, позволяет исключить поглощение действующего вещества из желудочно-кишечного тракта (например, посредством использования блокады активированным углем). Фармакокинетическое исследование может быть использовано для определения легочного распределения, кроме того позволяет исследовать системную безопасность. При исследовании безопасности должно быть измерено общее системное воздействие в предполагаемой популяции пациентов, таким образом исследование должно включать в себя оценку количества действующего вещества, абсорбированного через легкие и желудочно-кишечный тракт.

Однако для веществ с незначительной желудочно-кишечной абсорбцией является допустимым, что фармакокинетическое исследование, предназначенное для изучения легочного распределения, может быть достаточным для оценки терапевтической эквивалентности.

В соответствии с общепринятыми стандартными методами оценки биоэквивалентности следует сравнить максимальную концентрацию ($C_{\max}$), площадь под фармакокинетической кривой (AUC) и время до достижения $C_{\max}$ ($T_{\max}$). Эквивалентное легочное распределение и эквивалентная системная безопасность двух ингаляционных препаратов могут быть подтверждены, если 90 % доверительный интервал для каждого параметра находится в пределах диапазона от 0,8 до 1,25. Однако в некоторых случаях, например, для активных веществ с узким «терапевтическим окном», 90 % доверительный интервал может потребовать более жестких ограничений при оценке системной безопасности. С другой стороны, для препаратов с высокой вариабельностью допустимо расширение приемлемого диапазона для $C_{\max}$ от 0,75 до 1,33.

Региональное количественное определение легочного распределения двух препаратов может быть осуществлено путем измерения радиоактивности в различных сегментах легких (визуализационные исследования). Могут быть использованы двумерные скинтиграфические методы. Должно быть измерено как общее легочное распределение препарата, так и удельное распределение в центральной, средней и периферической зоне легких, ротоглотке, мундштуке, актуаторе (пусковом механизме) и фильтре выдоха. Эквивалентное легочное распределение двух пре-

паратов может быть подтверждено, если 90 % доверительный интервал радиоактивности в каждой области находится в пределах диапазона от 0,8 до 1,25. Должно быть гарантировано, что радиоизотопная метка ингаляционных препаратов оказывает лишь незначительное влияние на характеристики распределения.

ФАРМАКОДИНАМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Терапевтическая эквивалентность определяется как эквивалентная эффективность и безопасность, когда новый ингаляционный препарат, для которого планируется получение регистрационного удостоверения, сравнивают с соответствующим референтным препаратом. В случаях, когда эквивалентность не удалось продемонстрировать *in vitro*, и когда эквивалентность убедительно не подтверждена исследованием легочного распределения и системной безопасности, терапевтическая эквивалентность должна быть подтверждена при проведении соответствующего клинического исследования, имеющего хорошо валидированный исследовательский дизайн, сравнивающий исследуемый препарат с референтным препаратом.

Учитывая различные способы ингаляции, зависящие от различных ингаляционных устройств, при оценке терапевтической эквивалентности рекомендовано по возможности, чтобы исследуемый и референтный препарат ингаляровались с применением одинаковых ингаляционных устройств (например, как исследуемый, так и референтный препарат должны быть введены с помощью рMDI или оба должны быть применены посредством DPI).

Если клинические исследования необходимы, и референтный препарат имеет зарегистрированное показание, которое включает как БА, так и ХОБЛ, исследования терапевтической эквивалентности могут потребоваться лишь для одной популяции пациентов. Как правило, такие исследования легче проводить у пациентов с БА. Если терапевтическая эквивалентность референтному препарату продемонстрирована по одному клиническому показанию, например, при БА, необходима также оценка данных *in vitro*, чтобы подтвердить, что исследуемый и референтный препарат обладают сопоставимым распределением частиц по размерам, по скорости потока и диапазону перепада давления, что применимо ко всем пациентам, которые будут использовать исследуемый препарат, и позволяет экстраполировать все показания референтного препарата.

Два типа фармакодинамических исследований обеспечивают получение приемлемых результатов для оценки эквивалентности — исследования бронходилатации (оценки улучшения функции дыхательных путей) и бронхопротективные исследования (исследования влияния на гиперреактивность бронхов). Одно или другое, или оба эти исследования, могут использоваться для изучения сравнительной эффективности. Независимо от типа исследования оно должно проводиться у пациентов с БА, у которых отмечается обратимость функции дыхательных путей. У взрослых обратимость функции дыхательных путей оценивается измерением объема форсированного выдоха за первую секунду (FEV_1) с демонстрацией прироста (улучшения) FEV_1 на $\geq 12\%$ и ≥ 200 мл через 15 минут после ингаляции соответствующего короткодействующего бета2-агониста (SABA); у детей в возрасте 6 лет и старше — с демонстрацией улучшения FEV_1 на $\geq 12\%$ через 15 минут после ингаляции SABA; у детей в возрасте 5 лет и младше — спиромет-

рия осуществима у детей старше 3 лет, однако, возможно, лучшими показателями, чем FEV_1 , могут быть $FEV_{0,5}$ или $FEV_{0,75}$. Диагноз БА является сложной задачей для постановки в этой младшей возрастной группе и должен основываться на клинической оценке, оценке симптомов и данных физикального осмотра. Проводимое исследование должно быть достаточно чувствительным, чтобы обнаружить различия между двумя сравниваемыми препаратами и иметь возможность уловить клинически значимые различия, которые могут существовать между этими двумя препаратами. Таким образом, все пациенты, включенные в исследование, должны быть в состоянии продемонстрировать клинически значимый ответ на лечение.

Продолжительность исследования и выбор первичных и вторичных конечных точек зависят от терапевтического класса исследуемого препарата.

Ингаляционные бронходилататоры делятся на три группы — короткодействующие бета2-агонисты адренорецепторов (Short-acting beta2-agonists, SABA), длительнодействующие бета2-агонисты адренорецепторов (Long-acting beta2-agonists, LABA) и антихолинергические средства. Клинические исследования бронходилататоров могут иметь перекрестный дизайн.

Для SABA бронходилатационные исследования однократной дозы или бронхопровокационные исследования однократной дозы являются приемлемым дизайном исследования для оценки эквивалентности в отношении эффективности.

У взрослых первичными переменными в бронходилатационной модели являются FEV_1AUC (измерение бронходилатации, по крайней мере, в течение 80 % продолжительности действия после однократной ингаляции) и изменение FEV_1 (в соответствующий момент(ы) времени); в бронхопровокационном исследовании основной переменной является провокационная концентрация или провокационная доза провоцирующего агента, которая вызывает 20 % падение FEV_1 ($PC_{20}FEV_1$ или $PD_{20}FEV_1$).

У детей в возрасте от 6 лет и старше первичными переменными в бронходилатационной модели являются спирометрические переменные (например, изменение FEV_1 или отношение FEV_1/FVC (форсированная жизненная емкость легких) в соответствующий момент(ы) времени и/или FEV_1AUC (измерение бронходилатации, по крайней мере, в течение 80 % продолжительности действия после однократной ингаляции). У детей от 3 лет первичной переменной является спирометрия (FEV_1 , либо $FEV_{0,5}$ или $FEV_{0,75}$), а у детей в возрасте от 2 до 6 лет удельное сопротивление дыхательных путей (sRaw) в сочетании с балльной оценкой клинических симптомов. Пиковая скорость выдоха должна быть измерена и записана только как вторичная переменная эффективности. В бронхопротективных исследованиях могут быть использованы провокационная проба с метахолином или физическими упражнениями, например, у детей 6 лет и старше, а также у дошкольников могут быть использованы провокация с холодным сухим воздухом или эукапническая гипервентиляция. Первичными переменными будут $PC_{20}FEV_1$ или $PD_{20}FEV_1$ метахолина, либо процентное изменение от базовой линии sRaw; могут быть использованы также другие валидированные конечные точки.

У взрослых безопасность SABA должна быть исследована с помощью эквивалентности, основанной на фармакокинетических данных после введения одной дозы. Если эквивалентный уровень без-

опасности не может быть подтвержден на основании фармакокинетического исследования, данные по безопасности должны быть предоставлены из фармакодинамического исследования. Профиль безопасности должен быть исследован после введения максимальной рекомендуемой дозы. Потребуются регистрация побочных эффектов и оценка парадоксального бронхоспазма, запись жизненно важных показателей и ЭКГ с измерением интервала QTc и определение лабораторных показателей (включая измерение сывороточного калия и глюкозы в плазме крови).

У детей безопасность SABA должна быть исследована с помощью фармакокинетических или фармакодинамических исследований, после назначения максимальной рекомендованной суточной дозы, как указано выше для взрослых.

Требования к оценке эквивалентности в отношении эффективности LABA являются такими же, как и для SABA: проводятся бронходилатационные или бронхопротективные исследования однократной дозы. Однако начало действия (достижение клинически значимого эффекта), максимальный ответ и большая продолжительность действия LABA должны быть приняты во внимание при планировании исследования.

У взрослых и детей первичные переменные как для бронходилатационных исследований, так и бронхопротективных исследований, такие же, как описанные для SABA, за исключением первичной переменной в бронходилатационных исследованиях у детей 6 лет и старше, где FEV_1AUC (измерение бронходилатации, по крайней мере, в течение 80 % продолжительности действия после однократной ингаляции) является более подходящей первичной переменной выбора.

Диапазон доз следует изучать в исследованиях однократного применения. Требуется включить оценку низких и высоких доз, чтобы продемонстрировать зависимость ответа от дозы.

Требования к оценке эквивалентности в отношении безопасности LABA у взрослых и детей аналогичны требованиям оценки безопасности для SABA.

Исследования терапевтической эквивалентности в отношении короткодействующих и длительнодействующих антихолинергических препаратов такие же, как и для SABA и LABA.

Демонстрация эквивалентной эффективности ингаляционных глюкокортикостероидов (ИГКС) является сложной задачей. Успешное исследование эквивалентной эффективности требует демонстрации существенной взаимосвязи доза-ответ с изучением, по крайней мере, двух доз исследуемого препарата по сравнению с двумя дозами референтного препарата; дозы должны быть изучены на крутом участке кривой доза-ответ. Должна быть продемонстрирована сопоставимость *in vitro* для разных доз препаратов.

В настоящее время наиболее широко используется двойной слепой, рандомизированный в параллельных группах дизайн исследования для сравнения исследуемого и референтного препаратов [5]; если выбранный дизайн исследования отличается от указанного, причины этого должны быть обоснованы заявителем.

При исследовании терапевтической эквивалентности ИГКС также используются две фармакодинамические модели, однако бронхопротективная — существенно реже ввиду меньшего опыта. В исследованиях бронходилатации популяция пациентов должна иметь клиническую симптоматику и демонстриро-

вать разный клинический ответ на две дозы ИГКС и быть максимально гомогенной, чтобы уменьшить вариабельность и увеличить мощность. Цель исследований — обнаружить значимую связь доза-ответ и обнаружить различие между препаратами в отношении легочной функции с достаточно узким доверительным интервалом.

У взрослых и детей старше 6 лет первичной переменной эффективности должно быть регулярное измерение легочной функции, предпочтительно FEV_1 , и, если возможно, ежедневно в домашних условиях. Пиковая скорость выдоха (Peak Expiratory Flow Rate, PEF) должна измеряться и регистрироваться ежедневно в домашних условиях в качестве вторичной переменной эффективности. Если регулярное измерение FEV_1 в домашних условиях не представляется возможным, в качестве первичной переменной эффективности должна использоваться утренняя PEF, измеряемая ежедневно. Измерения FEV_1 не реже двух раз в неделю в клинике всегда должны быть включены в качестве вторичной переменной эффективности. У детей дошкольного возраста критериями эффективности являются: спирометрия у детей в возрасте от 3 до 6 лет (либо FEV_1 , либо $FEV_{0,5}$, либо $FEV_{0,75}$) и sRaw в сочетании с балльной оценкой клинических симптомов у детей в возрасте от 2 до 6 лет. Желательно применение электронных дневников (как у взрослых, так и у детей). Длительность периода лечения должна быть не менее 8–12 недель, любой более короткий период лечения должен быть обоснован.

В обеих моделях, как для взрослых, так и для детей, в качестве вторичных конечных точек должны регистрироваться балльная оценка симптомов, процент бессимптомных дней, частота использования короткодействующих бета2-агонистов и обострений. Другие переменные эффективности включают исследование выдыхаемого оксида азота (Exhaled Nitric Oxide, eNO) и эозинофилов в мокроте, валидированные вопросники качества жизни (Quality of Life, QoL) и подтвержденные сообщения пациентов об исходах (Patient-Reported Outcome Measures, PROMs).

Соответствующий мониторинг безопасности в рамках исследований терапевтической эффективности должен включать запись местных побочных эффектов, любых доказательств парадоксального бронхоспазма и оценку системных эффектов. Системная безопасность должна быть продемонстрирована с помощью фармакодинамической эквивалентности с использованием двух различных, но релевантных исследований или с помощью фармакокинетической эквивалентности. Если это невозможно, требуется оценка системной безопасности после ингаляции максимально рекомендуемой общей суточной дозы ИГКС, вместе с оценкой приема более низкой дозы ЛС, регулярно в течение длительного времени, с помощью измерения фармакодинамических параметров, связанных с фармакокинетическими параметрами. В этой связи важной является оценка влияния на гипоталамо-гипофизарную надпочечниковую систему (ГГНС). Предпочтительным фармакодинамическим методом оценки ГГНС является повторяющаяся оценка изменения концентрации кортизола в плазме крови в течение 24-часового периода по отношению к начальному уровню, как для измерений AUC (в качестве первичной переменной) и C_{max} .

Данные по безопасности, полученные у взрослых пациентов с БА, не могут быть экстраполированы на

детей. Системная безопасность у детей должна быть продемонстрирована путем выполнения как минимум одного из условий: 1) двух фармакодинамических оценок безопасности — оценки системных эффектов ИГКС на ГГНС и оценки роста (с использованием суррогатного маркера) или 2) фармакокинетической оценки, если это возможно и оправданно.

Какими бы ни были у взрослых, либо у детей методы оценки системных эффектов ИГКС, они должны быть в полной мере обсуждены и обоснованы в досье.

Для фиксированной комбинации известных лекарственных средств, где комбинация активных веществ не является новой, и для которой существуют референтные комбинированные лекарственные препараты, терапевтическая эквивалентность должна быть доказана для каждого из активных веществ комбинированного препарата и, соответственно, дизайн исследования будет зависеть от конкретных активных веществ комбинации. Кроме установления терапевтической эквивалентности для комбинаций ИГКС и LABA могут быть проведены отдельные исследования, оценивающие каждый отдельный действующий компонент.

Таким образом, анализ нормативных документов по требованиям к клиническим исследованиям для ингаляционных лекарственных препаратов, в т.ч. требованиям к подтверждению терапевтической эквивалентности лекарственных препаратов для лечения бронхиальной астмы и хронической обструктивной болезни легких у взрослых и детей, выявил необходимость совершенствования регламента экспертизы ингаляционных лекарственных средств с целью гармонизации российского и международного опыта в данной области.

ЛИТЕРАТУРА

1. Global initiative for chronic obstructive lung disease (GOLD) [Internet]. 2017 [cited 2017 Jul 3]. Available from: <http://www.goldcopd.org>.
2. Global Initiative for Asthma (GINA). 2015 [cited 2017 Jul 3]. Available from: <http://www.ginasthma.org>.
3. Митькина ЛИ, Ковалева ЕЛ, Прокопов ИА. Стандартизация дозированных лекарственных форм для ингаляций в Российской Федерации: современное состояние и перспективы. Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения 2012; (1): 53–7.
4. ОФС. 1.1.0012.15. Лекарственные формы для ингаляций. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. М.; 2015. Available from: <http://femb.ru/feml>.
5. ОФС. 1.4.2.001.15. Аэродинамическое распределение мелкодисперсных частиц. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. М.; 2015. Available from: <http://femb.ru/feml>.
6. European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products for Human Use. Guideline on the requirements for clinical documentation for orally inhaled products (OIP) including the requirements for demonstration of therapeutic equivalence between two inhaled products for use in the treatment of asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in adults and for use in the treatment of asthma in children and adolescents Doc. Ref. CPMP/EWP/4151/00 Rev. 1. London; 2009. Available from: <https://goo.gl/ZzEkwi>.
7. Олефир ЮВ. Результаты проведенного анализа и обобщения материалов по безопасности клинических исследований. Безопасность и риск фармакотерапии 2017; 5(1): 5–10.
8. Нонинов ВЕ, Архипов ВВ, Маринин ВФ, Чельцов ВВ, Бердникова НГ, Петрова ЕС. Методические рекомендации по проведению клинических исследований ингаляционных глюкокортикостероидов. В кн.: Руководство по проведению клинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К; 2012. С. 177–86.

ОБ АВТОРАХ

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Российская Федерация, 127051, Москва, Петровский бульвар, д. 8, стр. 2.
Петрова Елена Сергеевна. Главный эксперт управления экспертизы лекарственных средств № 3 Центра экспертизы и контроля готовых лекарственных средств, канд. мед. наук.
Горячев Дмитрий Владимирович. Директор Центра экспертизы и контроля готовых лекарственных средств, д-р мед. наук.
Петров Максим Владимирович. Ведущий научный сотрудник Центра планирования и координации научно-исследовательских работ, канд. мед. наук.

АДРЕС ДЛЯ ПЕРЕПИСКИ

Петрова Елена Сергеевна; EPetrova@expmed.ru

MODERN APPROACHES TO THE ASSESSMENT OF ORALLY INHALED PRODUCTS BIOEQUIVALENCE

E. S. Petrova, D. V. Goryachev, M. V. Petrov

Federal State Budgetary Institution
«Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products»
of the Ministry of Health of the Russian Federation,
Petrovsky boulevard 8, bld. 2, Moscow 127051, Russian Federation

Abstract: The article analyses regulatory documents containing requirements for clinical (trials) documentation for orally inhaled products, including requirements for the demonstration of therapeutic equivalence of medicinal products for the treatment of bronchial asthma and chronic obstructive pulmonary disease in adults and children. The article summarises the main approaches to the assessment of inhalers equivalence. It also systematizes and describes dosage forms and inhalation devices, as well as the necessary stages of inhaler evaluation, looks into the methodology of conducting therapeutic equivalence studies with due regard to the therapeutic class of the drug, duration of its action and proposed nosology. The methodology includes requirements for the selection of the study population, study design and conditions, and recommendations for the selection of drug dose, study duration, primary and secondary efficacy and safety endpoints in the context of orally inhaled products.

Key words: orally inhaled products; inhalation devices; pharmacokinetics; pharmacodynamics; bioequivalence; therapeutic equivalence; primary endpoints of clinical trials; efficacy and safety criteria.

For citation: Petrova ES, Goryachev DV, Petrov MV. Modern approaches to the assessment of orally inhaled products bioequivalence. The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products 2017; 7(3): 135–141.

REFERENCES

1. Global initiative for chronic obstructive lung disease (GOLD) [Internet]. 2017 [cited 2017 Jul 3]. Available from: <http://www.goldcopd.org>.
2. Global Initiative for Asthma (GINA). 2015 [cited 2017 Jul 3]. Available from: <http://www.ginasthma.org>.
3. Mitkina LI, Kovaleva EL, Prokopov IA. Standardization of inhalation dosage forms in the Russian Federation: current status and perspectives. The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products 2012; (1): 53–7 (in Russian).
4. General monograph 1.1.0012.15. Inhalation drug products. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIII ed. M.; 2015. Available from: <http://femb.ru/feml>.
5. General monograph 1.4.2.001.15. Aerodynamic particle size distribution. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIII ed. M.; 2015. Available from: <http://femb.ru/feml>.
6. European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products for Human Use. Guideline on the requirements for clinical documentation for orally inhaled products (OIP) including the requirements for demonstration of therapeutic equivalence between two inhaled products for use in the treatment of asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in adults and for use in the treatment of asthma in children and adolescents Doc. Ref. CPMP/EWP/4151/00 Rev. 1. London; 2009. Available from: <https://goo.gl/ZzEkwi>.
7. Olefir YuV. The results of the analysis on materials of safety of clinical trials. Safety and Risk of Pharmacotherapy 2017; 5(1): 5–10 (in Russian).
8. Nonikov VE, Arkhipov VV, Marinin VF, Cheltsov VV, Berdnikova NG, Petrova ES. Guideline on conducting clinical trials of inhaled glucocorticosteroids. In: Guidance on clinical evaluation of medicines. Part I. Moscow: Grif i K; 2012. P. 177–86 (in Russian).

AUTHORS

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Petrovsky boulevard 8, bld. 2, Moscow 127051, Russian Federation.

Petrova ES. Chief expert of Division No. 3 for Medicinal Products' Evaluation of the Centre for Evaluation and Control of Medicinal Products. Candidate of Medical Sciences.

Goryachev DV. Director of the Centre for Evaluation and Control of Medicinal Products. Doctor of Medical Sciences.

Petrov MV. Leading research associate of the Centre for Planning and Coordination of Scientific Activities. Candidate of Medical Sciences.

CONTACT E-MAIL

Petrova Elena Sergeevna; EPetrova@expmed.ru

Планирование и оценка исследований биоэквивалентности препаратов розувастатина

Д. П. Ромодановский, Д. В. Горячев

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

Статья поступила 25.05.2017 г. Принята к печати 21.08.2017 г.

Резюме: В статье представлены результаты ретроспективного анализа исследований биоэквивалентности воспроизведенных препаратов розувастатина отечественного и зарубежного производства с целью унификации подходов к проведению исследований биоэквивалентности розувастатина в Российской Федерации. Описаны существующие в настоящее время регуляторные рекомендации и подходы к изучению биоэквивалентности воспроизведенных препаратов, в частности препаратов розувастатина, высоковариабельных лекарственных препаратов, сформулированы рекомендации в отношении дизайна и оценки результатов исследований препаратов розувастатина.

Ключевые слова: исследование биоэквивалентности; розувастатин; высоковариабельные препараты; фармакокинетика; высокоэффективная жидкостная хроматография.

Библиографическое описание: Ромодановский ДП, Горячев ДВ. Планирование и оценка исследований биоэквивалентности препаратов розувастатина. Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения 2017; 7(3): 142–149.

В настоящее время регистрируется большое количество воспроизведенных препаратов ингибиторов ГМГ-КоА-редуктазы (3-гидрокси-3-метилглутарил-кофермент А редуктазы), часто называемых статинами.

Одним из представителей данной группы препаратов является розувастатин, который считается более «мощным» в липидснижающем действии по сравнению с классическими, хорошо зарекомендовавшими себя в клинической практике статинами (аторвастатин и симвастатин) [1, 2].

Проведение исследований биоэквивалентности в сравнении с зарегистрированным референтным препаратом (за исключением препаратов, для которых проведение данного исследования невозможно) является требованием к регистрации для большинства воспроизведенных препаратов [3–5].

В своей предыдущей статье мы уже останавливались на проблемах исследований биоэквивалентности препаратов розувастатина, в частности на возможной высокой вариабельности фармакокинетических параметров розувастатина в исследованиях биоэквивалентности [6]. По результатам проведенного анализа мы предположили, что в отсутствие надежных данных, опровергающих высокую вариабельность препаратов розувастатина, целесообразно предусматривать дизайн исследований биоэквивалентности, как для высоковариабельных препаратов.

Согласно наиболее часто используемому определению, высоковариабельные лекарственные препараты (ЛП) — это препараты, у которых коэффициент внутрииндивидуальной вариабельности (CV_{intra}) одного из двух основных параметров биоэквивалентности (максимальная концентрация в крови (C_{max}) и площадь под кривой «концентрация–время» (AUC)) составляет $\geq 30\%$. Другими словами, это препараты, скорость и степень всасывания которых демонстрируют высокую вариабельность у одного и

того же субъекта при приеме ЛП в одинаковой дозировке [6, 7].

Цель работы — ретроспективный анализ результатов проведенных экспертиз отчетов исследований биоэквивалентности, поступавших на регистрацию препаратов розувастатина за 2010–2015 гг., и подготовка рекомендаций по планированию, дизайну и оценке результатов исследований биоэквивалентности.

Настоящие рекомендации, с одной стороны, позволяют унифицировать требования к объему необходимых исследований (включая размер выборки участников) с целью доказательства биоэквивалентности препаратов, с другой стороны, позволят разработчикам оптимально планировать программу развития воспроизведенного препарата и избегать ошибок в процессе его разработки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1. Проведен ретроспективный анализ 17 регистрационных досье препаратов розувастатина на предмет выявления особенностей дизайна исследований биоэквивалентности розувастатина, признаков возможной высокой вариабельности по критерию: выявленные факты $CV_{intra} \geq 30\%$, проблемы и ошибки исследований биоэквивалентности розувастатина.

В рамках ретроспективного анализа мы провели перерасчет основных фармакокинетических параметров C_{max} и AUC_{0-t} (AUC в интервале времени от 0 до момента t отбора последней пробы крови) из исходных данных о концентрациях розувастатина исследуемых препаратов в сравнении с референтным препаратом. AUC_{0-t} рассчитывали методом трапеций в программе Microsoft Office Excel 2007. Фармакокинетические параметры были логарифмически преобразованы и подвергнуты дисперсионному анализу (Analysis of variance (ANOVA)) [8] с помощью программы Statistica 10. В дисперсионный анализ были включены следующие факторы, вносящие вклад в

наблюдаемую вариацию данных: различия между препаратами, различия между испытуемыми (межиндивидуальные различия), последовательность приема препаратов, периоды исследования. На основании полученных значений были рассчитаны 90 % доверительные интервалы и CV_{intra} .

2. Проведен анализ научной литературы и данных, полученных по запросам в поисковых системах (PubMed, Google, Researchgate) в информационно-телекоммуникационной сети «Интернет», с целью оценки дизайна и результатов исследований биоэквивалентности препаратов розувастатина. Критерии первичного поиска — «биоэквивалентность», «исследования биоэквивалентности», «розувастатин». В результате проведенного поиска были найдены 12 открытых источников, описывающих исследования биоэквивалентности розувастатина. Среди них проведен более узкий поиск с целью выявления приемлемых для анализа данных по критерию наличия сведений о дизайне исследования, количеству включенных в статистический анализ субъектов, полученных 90 % доверительных интервалов и по данным о CV_{intra} или MSE (среднеквадратическая ошибка). По результатам поиска найдено семь источников, соответствующих всем необходимым критериям. Выявлены и обобщены ключевые аспекты в дизайне проведенных исследований, а также проанализированы полученные в исследованиях результаты (полученные исследователями 90 % доверительные интервалы и CV_{intra}). Если сведения о CV_{intra} не были указаны, нами производился расчет CV_{intra} на основании полученных доверительных интервалов и сведений о размае выборки в исследованиях.

3. «Спроектировано» два модельных исследования на основе реальных данных о концентрациях референтного препарата розувастатина (Крестор®) из четырех исследований. Два исследования биоэквивалентности для дозировки 20 мг, проведенные у 18 здоровых добровольцев, с одним и тем же аналитическим центром, с использованием одинакового метода определения розувастатина в плазме крови и одинаковым нижним пределом количественного определения (НПКО). Два других исследования биоэквивалентности для дозировки 40 мг, проведенные у 28 здоровых добровольцев, с одним и тем же клиническим и аналитическим центрами, с использованием одинакового метода определения розувастатина и НПКО. Используемые аналитические методы были валидированы по аналогичной схеме, результаты валидации также были сопоставимы.

В рамках модельных исследований проведен расчет основных фармакокинетических параметров C_{max} и AUC_{0-t} . Значение AUC_{0-t} рассчитано методом трапеций. Фармакокинетические параметры были логарифмически преобразованы и подвергнуты дисперсионному анализу ANOVA [8]. В ANOVA были включены следующие факторы, вносящие вклад в наблюдаемую вариабельность данных: различия между препаратами, различия между субъектами (межиндивидуальные различия), последовательность приема препаратов, периоды исследования. На основании полученных значений был определен CV_{intra} для препаратов, рассчитаны 90 % доверительные интервалы с использованием программ Statistica 10, Microsoft Office Excel 2007.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ретроспективный анализ

Проведен анализ результатов 17 исследований биоэквивалентности (табл. 1).

В исследованиях биоэквивалентности изучались дозы розувастатина — 20 и 40 мг. Выбор различных доз был обусловлен возможностью метода определения концентраций розувастатина, а также максимальной дозировкой в линейке дозировок воспроизведенных препаратов.

В качестве референтного препарата во всех исследованиях был использован оригинальный препарат Крестор® в соответствующих дозировках.

В одном исследовании предполагалось, что розувастатин может обладать высокой CV_{intra} , в связи с чем для исследований биоэквивалентности был выбран полуповторный перекрестный дизайн исследования с тремя периодами в двух последовательностях с определением CV_{intra} референтного препарата для возможного расширения границ признания биоэквивалентности в случае высокого значения CV_{intra} ($\geq 30\%$).

В остальных рассмотренных случаях был использован стандартный дизайн — рандомизированное, двухэтапное перекрестное в двух последовательностях исследование с приемом однократной дозы.

Количество здоровых добровольцев в исследованиях значительно варьировало от 18 и более, однако в большинстве случаев или было равно 24, или превышало данное значение (рис. 1). Исследования с количеством добровольцев 18 человек при ретроспективном анализе вызвали ряд сомнений в качестве их проведения, с учетом современных научных подходов в отношении требований к исследованиям биоэквивалентности и отчетности к ним.

В большинстве случаев длительность забора образцов крови для фармакокинетического анализа составляла 72 ч. Среднее время достижения максималь-

Таблица 1

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ ПО ПРОВЕДЕННЫМ ИССЛЕДОВАНИЯМ

№	Дизайн	Дозировка, мг	Референтный препарат	Место проведения	Количество добровольцев
1	2×2×2	20	Крестор	Македония	42
2	2×2	40	Крестор	Канада	39
3	2×2	20	Крестор	Россия	18
4	2×2	20	Крестор	Россия	18
5	2×2	20	Крестор	Россия	30
6	2×2	40	Крестор	Россия	24
7	2×2	40	Крестор	Россия	24
8	2×2	40	Крестор	Россия	24
9	2×2	20	Крестор	Россия	40
10	2×2	20	Крестор	Россия	18
11	2×2	20	Крестор	Россия	24
12	2×2	40	Крестор	Россия	24
13	2×2	20	Крестор	Россия	34
14	2×2	40	Крестор	Россия	28
15	2×2	40	Крестор	Россия	28
16	2×2	20	Крестор	Россия	28
17	2×2	20	Крестор	Россия	36

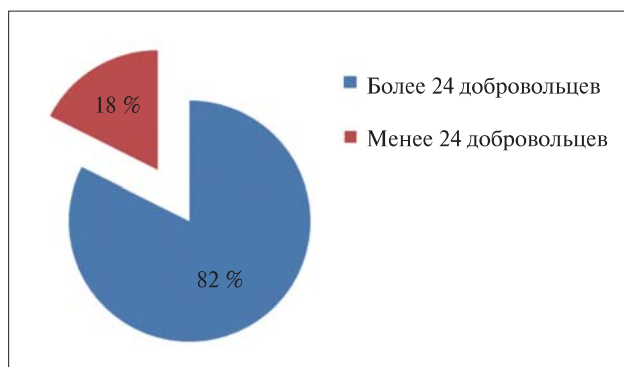


Рис. 1. Количество здоровых добровольцев по данным 17 исследований биоэквивалентности

ной концентрации в исследованиях изучаемых препаратов и референтного препарата составило $3,80 \pm 0,62$ ч и $3,77 \pm 0,59$ ч соответственно (табл. 2). Согласно сведениям, содержащимся в инструкции референтного препарата, время достижения максимальной концентрации составляет 5 часов [9]. Таким образом, при выборе точек забора образцов крови для фармакокинетического анализа следует учитывать общую длительность 72 ч, и более частый отбор образцов крови в диапазоне времени достижения $C_{\max}$ (2,5–5,5 ч).

Период отмывки в большинстве исследований составлял 14 дней и соответствовал правилу «не менее пяти периодов полувыведения», учитывая период полувыведения 19 ч [9].

Наиболее часто для определения розувастатина в пробах крови использовался аналитический метод — высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) с масс-спектрометрической детекцией или тандемной масс-спектрометрической детекцией.

В зависимости от использованного аналитического метода нижний предел количественного определения (НПКО) варьировал от 0,05 до 2 нг/мл, но наиболее часто значения НПКО находились в диапазоне 0,2–0,5 нг/мл (табл. 2).

В отчетах исследований биоэквивалентности было указано, что CV_{intra} фармакокинетических показателей (AUC_{0-t} , $C_{\max}$) не превышает 30 %, однако в ряде исследований для AUC_{0-t} и $C_{\max}$ была показана большая CV_{intra} (около 18 % и 35 % исследований соответственно) (рис. 2, табл. 3).

По результатам ретроспективного анализа было выявлено, что CV_{intra} фармакокинетических показателей AUC_{0-t} и $C_{\max}$ превышает 30 % в 12 % и 24 % рассмотренных случаев соответственно (рис. 2, табл. 4). Таким образом, некоторые проведенные исследования не соответствовали современным научным подходам в отношении требований к исследованиям биоэквивалентности и ошибочно продемонстрировали более высокую вариабельность розувастатина.

Таблица 2

ГРАФИКИ ЗАБОРА ОБРАЗЦОВ КРОВИ, $T_{\max}$, ПЕРИОДЫ ОТМЫВКИ, АНАЛИТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

№	Временные точки, ч	$T_{\max}$ Т, ч	$T_{\max}$ R, ч	Период от- мывки, сут	Аналитический метод	НПКО, нг/мл
1	1; 1,5; 2; 3; 4; 5; 6; 8; 10; 12; 18; 24; 30; 48; 72; 96	3,96	4,22	14	ВЭЖХ МС/МС	0,05045
2	1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5; 5; 5,5; 6; 7; 8; 9; 12; 16; 24; 36; 48; 72; 96	4,33	4,36	14	ВЭЖХ МС/МС	—
3	0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 4; 6; 12; 24; 36; 48; 72	3,1	3,3	14	ВЭЖХ МС	0,2
4	0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 4; 6; 12; 24; 36; 48; 73	3,3	3,4	14	ВЭЖХ МС	0,2
5	0,25; 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 8; 10; 12; 18; 24; 30; 48; 72	4,75	4,63	14	ВЭЖХ УФ	0,2
6	0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,2; 4,4; 5; 5,2; 5,4; 6; 8; 12; 24; 36; 48; 72	3,12	3,77	14	ВЭЖХ МС	0,1
7	0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 5; 6; 8; 10; 12; 24; 48; 80	2,69	2,73	10	ВЭЖХ МС	1
8	1; 2; 3; 4; 5; 6; 8; 12; 24; 48; 72	3,5	3,71	14	ВЭЖХ МС	2
9	0,75; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5; 5; 5,5; 6; 7; 8; 10; 14; 24; 36; 48; 72; 96	3,9	4,13	14	ВЭЖХ МС/МС	0,5
10	1; 2; 3; 4; 5; 6; 8; 12; 24; 48; 72	4,22	4,11	14	ВЭЖХ МС	0,5
11	1; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 10; 24; 48; 72	4,46	3,54	14	ВЭЖХ МС/МС	0,5
12	1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 10; 12; 24; 48; 72	3,96	3,96	14	ВЭЖХ МС/МС	1,5
13	1; 2; 3; 4; 5; 6; 8; 12; 24; 48; 72	4,82	4,94	14	ВЭЖХ МС/МС	0,1
14	1; 2; 3; 4; 5; 6; 8; 12; 24; 48; 72	3,43	3,36	14	ВЭЖХ МС	1,5
15	1; 2; 3; 4; 5; 6; 8; 12; 24; 48; 72	3,57	3,29	14	ВЭЖХ МС	1,5
16	1; 2; 3; 4; 5; 6; 8; 12; 24; 48; 72	4,21	3,75	14	ВЭЖХ МС/МС	0,25
17	1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 10; 16; 24; 36; 48; 72	3,22	2,86	14	ВЭЖХ МС/МС	0,2
Mean		3,80	3,77			
SD		0,62	0,59			

Примечание: $T_{\max}$ — время достижения максимальной концентрации в крови; Т — тестируемый препарат; R — референтный препарат (оригинальный препарат); НПКО — нижний предел количественного определения; Mean — арифметическое среднее; SD — стандартное отклонение; ВЭЖХ МС — высокоэффективная жидкостная хроматография с массспектрометрической детекцией; ВЭЖХ МС/МС — высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемной массспектрометрической детекцией; ВЭЖХ УФ — высокоэффективная жидкостная хроматография с ультрафиолетовой детекцией

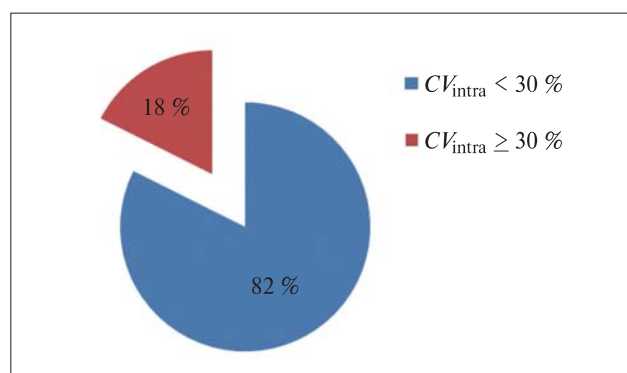


Рис. 2. Значения коэффициента внутрииндивидуальной вариабельности площади под кривой «концентрация–время» по данным 17 исследований биоэквивалентности

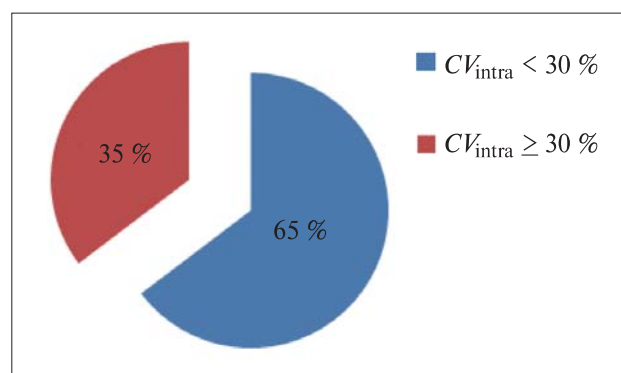


Рис. 3. Значения коэффициента внутрииндивидуальной вариабельности максимальной концентрации по данным 17 исследований биоэквивалентности

Таблица 3

**СВЕДЕНИЯ О КОЭФФИЦИЕНТЕ
ВНУТРИИНДИВИДУАЛЬНОЙ ВАРИАБЕЛЬНОСТИ,
ПОЛУЧЕННЫЕ ИЗ ОТЧЕТОВ**

№	$MSE AUC_{0-t}$	$MSE C_{max}$	$CV_{intra} AUC_{0-t} \%$	$CV_{intra} C_{max} \%$
1	Нет данных	Нет данных	24,50	30,60
2	0,02050	0,03490	14,38	18,85
3	0,00996	0,01417	10,00	11,95
4	0,00470	0,00472	6,86	6,88
5	0,00100	0,00600	3,16	7,76
6	0,06730	0,04545	26,39	21,56
7	0,00600	0,00100	8,02	3,44
8	0,06600	0,03800	26,12	19,68
9	0,04418	0,10723	20,67	33,64
10	0,00600	0,01000	7,49	3,32
11	0,01500	0,03480	12,29	18,82
12	0,06341	0,09555	25,58	31,67
13	0,06300	0,09500	25,50	31,57
14	0,13927	0,11210	38,66	34,44
15	0,06452	0,02191	25,82	14,89
16	0,08974	0,07900	30,64	28,67
17	0,23300	0,20900	48,21	51,22

Примечание: AUC_{0-t} — площадь под кривой «концентрация–время» в интервале времени от 0 до момента t отбора последней пробы крови; C_{max} — максимальная концентрация в крови; CV_{intra} — коэффициент внутрииндивидуальной вариабельности; MSE — среднеквадратическая ошибка

Анализ данных литературы

С целью сравнительной оценки используемых дизайнов и полученных данных были проанализированы результаты опубликованных исследований биоэквивалентности розувастатина. В результате проведенного поиска было выявлено семь доступных источников (табл. 5) [10–16].

В случае отсутствия в источниках данных по CV_{intra} , значение коэффициента рассчитывали, исходя из известных значений полученных 90 % доверительных интервалов и данных о количестве добровольцев, включенных в статистический анализ по следующим формулам.

Таблица 4

РЕЗУЛЬТАТЫ РЕТРОСПЕКТИВНОГО АНАЛИЗА

№	$MSE AUC_{0-t}$	$MSE C_{max}$	$CV_{intra} AUC_{0-t} \%$	$CV_{intra} C_{max} \%$
1	Нет данных	Нет данных	Не рассчитывался	29,73
2	0,02065	0,03491	14,44	18,85
3	0,01037	0,01558	10,21	12,53
4	0,02055	0,02134	14,41	14,69
5	0,00124	0,00590	3,53	7,69
6	0,06692	0,04549	26,31	21,57
7	0,01309	0,00117	11,48	3,43
8	0,06619	0,03804	26,16	19,69
9	0,04241	0,16862	20,81	42,86
10	0,00584	0,01000	7,65	3,16
11	0,01430	0,03479	12,00	18,82
12	0,05300	0,09500	23,33	31,57
13	0,06996	0,07404	26,92	27,72
14	0,11061	0,11201	34,20	34,43
15	0,05301	0,02191	14,88	23,33
16	0,07211	0,07900	27,34	28,67
17	0,19891	0,23302	46,91	51,23

Примечание: AUC_{0-t} — площадь под кривой «концентрация–время» в интервале времени от 0 до момента t отбора последней пробы крови; C_{max} — максимальная концентрация в крови; CV_{intra} — коэффициент внутрииндивидуальной вариабельности; MSE — среднеквадратическая ошибка

Точечная оценка по доверительным интервалам вычислялась с использованием формулы:

$$PE = CL_{lo} \cdot CL_{hi} \quad (1)$$

Далее определяли разницу между верхней границей доверительного интервала и значением полученной точечной оценки на логарифмической шкале:

$$\Delta_{CL} = \ln PE - \ln CL_{hi} \quad (2)$$

Затем определяли значение средней квадратичной ошибки (MSE) по формуле:

$$MSE = 2 \cdot [\Delta_{CL} / \sqrt{1/n_1 + 1/n_2} \cdot t_{1-\alpha, n_1+n_2-2}]^2 \quad (3)$$

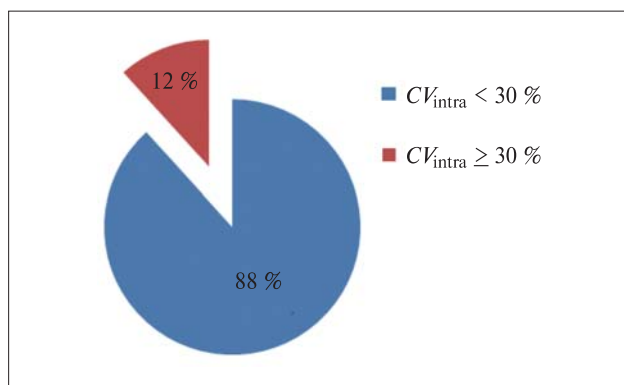


Рис. 4. Значения коэффициента внутрииндивидуальной вариативности площади под кривой «концентрация—время» по данным ретроспективного анализа результатов 17 исследований биоэквивалентности

По значению MSE вычисляли CV_{intra} по формуле:

$$CV_{intra} = \sqrt{\exp MSE - 1}. \quad (4)$$

Таким образом, в результате проведенного нами анализа установлено, что по данным литературы в большинстве случаев не наблюдалось высокой внутрииндивидуальной вариативности параметров розувастатина C_{max} и AUC_{0-t} , но полученные значения CV_{intra} колебались в относительно широких пределах

в указанных исследованиях. Это может быть связано с тем, что численность добровольцев в исследованиях существенно варьировала. Дизайны всех исследований были схожими: рандомизированное, двухпериодное перекрестное в двух последовательностях исследование с приемом однократной дозы.

Модельные исследования

Два проведенных нами модельных исследования показали высокую вариативность C_{max} и AUC_{0-t} по данным дисперсионного анализа (табл. 6). В связи с этим мы предположили, что даже в случае одинаковых условий проведения исследований биоэквивалентности (в одинаковых клинических и аналитических центрах, при одинаковой валидации аналитического метода и одинаковых условиях забора крови у здоровых добровольцев) фармакокинетические параметры оригинального препарата могут значительно отличаться. Установить причины данной вариативности в нашем теоретическом исследовании не удалось. Возможно, решить этот вопрос помогло бы экспериментальное исследование биоэквивалентности разных серий оригинального препарата в исследовании с полным повторным дизайном.

Косвенным подтверждением нашего предположения можно считать полученные в одном из исследований результаты CV_{intra} (более 50 % для C_{max}) с участием 36 здоровых добровольцев (табл. 3).

Таблица 5

АНАЛИЗ ДАННЫХ ЛИТЕРАТУРЫ ИССЛЕДОВАНИЙ БИОЭКВИВАЛЕНТНОСТИ РОЗУВАСТАТИНА

Источник	Дизайн*	n	Дозировка, мг	C_{max} , 90 % ДИ	AUC_{0-t} , 90 % ДИ	$CV_{intra} C_{max}$, %	$CV_{intra} AUC_{0-t}$, %
Определение розувастатина в плазме крови методом ВЭЖХ-МС/МС и его использование в исследовании биоэквивалентности [10]	2×2	14	20	91,45–114,24	84,88–122,25	14***	23,3***
Двухэтапное перекрестное исследование биоэквивалентности таблеток розувастатина 5 мг у здоровых взрослых индийских добровольцев мужского пола натошак [11]	2×2	40	5	93,40–116,4	93,61–112,10	28,5**	23,2**
Валидированный метод ВЭЖХ-МС/МС для определения розувастатина в плазме крови: применение в рамках исследования биоэквивалентности у китайских добровольцев [12]	2×2	20	10	99,4–111,1	96,2–110,8	10,2***	13***
Публичный отчет голландского регулятора с оценкой исследования биоэквивалентности розувастатина фирмы «Торрент» [13]	2×2	48	20	0,87–1,01	0,89–1,00	21***	16,4***
Публичный отчет голландского регулятора с оценкой исследования биоэквивалентности розувастатина фирмы «Торрент» [13]	2×2	48	40	0,87–1,04	0,91–1,02	25,3***	16***
Исследование биоэквивалентности двух препаратов розувастатина в таблетках 40 мг у здоровых колумбийских добровольцев [14]	2×2	30	40	89,5–121,4	82,0–114,6	35,7***	36,03***
Двухэтапное перекрестное исследование биоэквивалентности двух препаратов розувастатина у здоровых добровольцев натошак при однократном приеме [15]	2×2	39	40	91,91–106,06	97,38–108,66	18,85**	14,38**
Исследование биоэквивалентности двух препаратов розувастатина у здоровых индонезийских добровольцев [16]	2×2	24	40	89,37–110,41	87,56–103,53	21,24**	16,82**

Примечание: n — количество добровольцев; AUC_{0-t} — площадь под кривой «концентрация—время» в интервале времени от 0 до момента t отбора последней пробы крови; C_{max} — максимальная концентрация в крови; CV_{intra} — коэффициент внутрииндивидуальной вариативности; * — 2×2 — рандомизированное двухпериодное перекрестное в двух последовательностях исследование с приемом однократной дозы натошак; ** — данные получены из источника; *** — рассчитанные данные

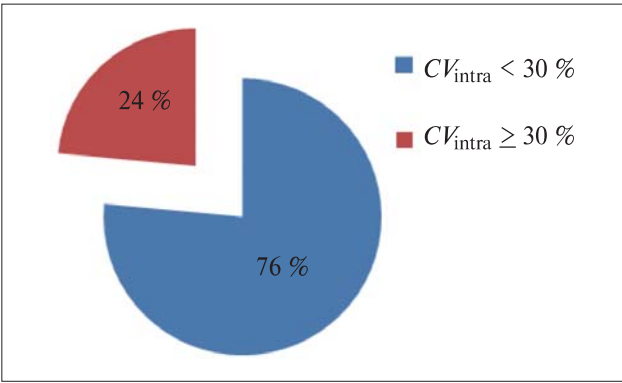


Рис. 5. Значения коэффициента внутрииндивидуальной вариативности максимальной концентрации по данным ретроспективного анализа результатов 17 исследований биоэквивалентности

Выводы

- 1. В качестве референтного препарата в исследованиях биоэквивалентности розувастатина рекомендуется использовать препарат Крестор®.
- 2. Рекомендуемое количество добровольцев для исследования биоэквивалентности розувастатина должно быть не менее 24 (при этом следует принимать в расчет возможную высокую внутрииндивидуальную вариабельность по C_{max} и/или AUC_{0-t} (CV_{intra} более 30 %), что может привести к необходимости включения и большего количества добровольцев для получения статистически значимых результатов). Меньшее количество добровольцев может оказаться достаточным для получения статистически

значимых результатов и подтверждения биоэквивалентности при использовании повторного дизайна исследования, который, как показывает практика, позволяет значительно уменьшить количество добровольцев (табл. 7) — до 18 добровольцев, расширить границы признания биоэквивалентности до 70–133 % и более, в зависимости от вариабельности референтного препарата.

При стандартном дизайне можно рекомендовать включение в исследование 24–28 здоровых добровольцев, однако в том случае, если вариабельность полученных фармакокинетических параметров окажется высокой (более 30 %), биоэквивалентность не будет подтверждена в границах признания биоэквивалентности 80–125 %.

3. Длительность забора образцов крови должна быть не менее 72 ч, рекомендованный период отмывки — 14 суток.

При выборе точек забора образцов крови для фармакокинетического анализа следует учитывать общую длительность 72 ч, и более частый отбор образцов крови в диапазоне времени достижения C_{max} (2,5–5,5 ч). Можно рекомендовать следующий график отбора образцов крови: 0,75; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5; 5; 5,5; 6; 7; 8; 10; 12; 24; 36; 48; 72 ч.

4. Определять в плазме крови розувастатин рекомендуется аналитическим методом на основе ВЭЖХ с масс-спектрометрической детекцией или tandemной масс-спектрометрической детекцией. При этом метод должен позволять достичь адекватного НПКО, например 0,2–0,5 нг/мл. В то же время НПКО должен быть не более 5 % C_{max} для каждого добровольца, в противном случае данные этого добровольца не должны включаться в статистический анализ.

К моменту предоставления протокола клинического исследования биоэквивалентности на экспер-

Таблица 6

РЕЗУЛЬТАТЫ ДВУХ СМОДЕЛИРОВАННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ БИОЭКВИВАЛЕНТНОСТИ							
Моделирование	Количество добровольцев	Аналитический метод	НПКО, нг/мл	$MSE\ AUC_{0-t}$	$MSE\ C_{max}$	$CV_{intra}\ AUC_{0-t}, \%$	$CV_{intra}\ C_{max}, \%$
1	18	ВЭЖХ МС	0,2	0,55	0,41	85,13	71,31
2	28	ВЭЖХ МС	1,5	0,29	0,32	57,46	61,83

Примечание: ВЭЖХ МС — высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрической детекцией; НПКО — нижний предел количественного определения; MSE — среднеквадратическая ошибка; AUC_{0-t} — площадь под кривой «концентрация–время» в интервале времени от 0 о момента t отбора последней пробы крови; C_{max} — максимальная концентрация в крови; CV_{intra} — коэффициент внутрииндивидуальной вариабельности

Таблица 7

ЧИСЛО СУБЪЕКТОВ, ТРЕБУЕМЫХ ДЛЯ ДЕМОНСТРАЦИИ БИОЭКВИВАЛЕНТНОСТИ ПРИ МОЩНОСТИ ИССЛЕДОВАНИЯ 80 % В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЗНАЧЕНИЯ КОЭФФИЦИЕНТА ВНУТРИИНДИВИДУАЛЬНОЙ ВАРИАБЕЛЬНОСТИ [17]		
Коэффициент внутрииндивидуальной вариабельности (CV_{intra}), %	Размер выборки для двухпериодного перекрестного исследования. GMR = 1	Размер выборки для четырехпериодного исследования с двумя перекрестами (полный повторный дизайн). GMR=1
15	10	6
30	32	18
45	66	34
60	108	56
75	156	80

Примечание: GMR — отношение геометрических средних (точечная оценка). При $CV_{intra} = 30\%$, мощности исследования 80 % и прогнозируемом отношении средних, равном 1, необходимо включение не менее 32 субъектов в исследование со стандартным дизайном и всего 18 субъектов в исследование с повторным дизайном

тизу следует определиться с аналитическим методом определения действующего вещества и провести его валидацию, при этом кратко отразить описание данного аналитического метода и его валидации в протоколе исследования.

5. Выбор дозировки для исследований биоэквивалентности должен основываться на особенностях фармакокинетики розувастатина, в частности, на ее линейности. Согласно инструкции по применению референтного препарата Крестор®, розувастатин обладает линейной фармакокинетикой — системная экспозиция увеличивается пропорционально дозе. Это свидетельствует в пользу возможности изучения биоэквивалентности только одной дозировки изучаемого препарата, при условии идентичности технологии, места производства и пропорциональности составов между всеми дозировками, а также сопоставимости профилей растворения.

При этом рекомендуется проведение исследования для максимальной заявленной дозировки препарата, так как двукратное применение розувастатина здоровыми добровольцами в максимальной суточной дозе 40 мг/сут, с длительным интервалом времени между приемами, не связано с каким-либо определенным риском, за исключением развития нежелательных явлений, но повышает точность измерения концентрации розувастатина даже при невысокой чувствительности аналитического метода.

6. При представлении результатов исследования биоэквивалентности в отчете следует указывать не только 90 % доверительные интервалы, но и значения *MSE* после дисперсионного анализа ANOVA, значения точечной оценки (отношения геометрических средних) и значения CV_{intra} для *AUC* и C_{max} .

Должны быть представлены отчет по валидации аналитического метода и аналитический отчет, который должен содержать не только хроматограммы от 20 % добровольцев.

В аналитический отчет об исследовании биоэквивалентности необходимо включить хроматограммы из полных аналитических циклов таким образом, чтобы они включали не менее 20 % субъектов, а также соответствующие образцы для контроля качества (КК) и градуировочные растворы (стандарты).

Должен быть представлен детальный статистический отчет.

С конкретными требованиями к отчетности исследований биоэквивалентности целесообразно ознакомиться в «Руководстве по экспертизе лекарственных средств» и «Правилах проведения исследований биоэквивалентности лекарственных средств Евразийского экономического союза».

ЛИТЕРАТУРА

1. Jones PH, Davidson MH, Stein EA, Bays HE, McKenney JM, Miller A, et al. Comparison of the efficacy and safety of rosuvastatin versus atorvastatin, simvastatin, and pravastatin across doses (STELLAR® Trial). *Am J Cardiol*. 2003; 92(2): 152–60.
2. Jones PH, Hunninghake DB, Ferdinand KC, Stein EA, Gold A, Caplan RJ, et al. Effects of rosuvastatin versus atorvastatin, simvas-

tin, and pravastatin on non-high-density lipoprotein cholesterol, apolipoproteins, and lipid ratios in patients with hypercholesterolemia: additional results from the STELLAR Trial. *Clin Ther*. 2004; 26(9): 1388–99.

3. Федеральный закон Российской Федерации от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств». Available from: <https://goo.gl/sUorrH>.
4. Федеральный закон Российской Федерации от 22 декабря 2014 г. № 429-ФЗ «О внесении изменений в Федеральный закон «Об обращении лекарственных средств». Available from: <https://goo.gl/fs6BU4>.
5. Федеральный закон Российской Федерации от 13 июля 2015 г. № 241-ФЗ «О внесении изменений в Федеральный закон «Об обращении лекарственных средств» и Федеральный закон «О внесении изменений в Федеральный закон «Об обращении лекарственных средств». Available from: <https://goo.gl/vNC34n>.
6. Ромодановский ДП, Драницына МА, Горячев ДВ, Ниязов РР, Гавришина ЕВ. Планирование дизайна и оценка результатов исследований биоэквивалентности высоковариабельных препаратов на примере розувастатина. *Экспериментальная и клиническая фармакология* 2015; 78(6): 19–25.
7. Ромодановский ДП, Еременкова ТВ, Драницына МА, Горячев ДВ, Ниязов РР, Гавришина ЕВ, и др. Высоковариабельные лекарственные препараты — особенности исследования биоэквивалентности. *Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения* 2015; (4): 5–10.
8. Investigation of bioequivalence (CPMP/EWP/QWP/1401/98 Rev. 1). European Medicines Agency. Available from: <https://goo.gl/qmaH1d>.
9. Инструкция по применению лекарственного препарата для медицинского применения Крестор®. Available from: <https://goo.gl/qcvF3U>.
10. Singh SS, Sharma K, Patel H, Jain M, Shah H, Gupta S, et al. Estimation of rosuvastatin in human plasma by HPLC tandem mass spectrometric method and its application to bioequivalence study. *J Braz Chem Soc*. 2005; 16(5): 944–50.
11. Thota S, Tippabhotla SK, Khan S, Nakkawar M. Two-way crossover bioequivalence study of rosuvastatin tablets 5 mg in healthy, adult, asian-indian male volunteers under fasting condition. *Int J Pharm Pharm Sci* 2013; 5(3): 289–93.
12. Zhang D, Zhang J, Liu X, Wei C, Zhang R, Song H, et al. Validated LC-MS/MS method for the determination of rosuvastatin in human plasma: application to a bioequivalence study in Chinese volunteers. *Pharmacology & Pharmacy* 2011; 2(4): 341–6.
13. Public Assessment Report Rosuvastatine Torrent 5 mg, 10 mg, 20 mg and 40 mg, film-coated tablets (rosuvastatin calcium). Available from: <https://goo.gl/LZyHVv>.
14. Vargas M, Bustamante C, Villarraga E. Bioequivalence study of two formulations containing rosuvastatin 40 mg tablets in healthy colombians. *J Bioequiv Availab* 2015; (7): 229–32.
15. Trabelsi F, Bartunek A, Vlavonou R, Navratilova L, Dube C., Tanguay M, et al. Single-dose, 2-way crossover, bioequivalence study of two rosuvastatin formulations in normal healthy subjects under fasting conditions. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2013; 50(10): 741–50.
16. HarahapY, Prasaja B, Azmi F, Lusthom W, Sinandang T, Felicia V, et al. Bioequivalence study of two rosuvastatin tablet formulations in healthy Indonesian subjects. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2016; 54(3): 212–6.
17. Davit BM, Chen ML, Conner DP, Haidar SH, Kim S, Lee CH, et al. Implementation of a reference-scaled average bioequivalence approach for highly variable generic drug products by the US Food and Drug Administration. *AAPS J*. 2012; 14(4): 915–24.
18. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. I. М.: Гриф и К; 2013.
19. Правила проведения исследований биоэквивалентности лекарственных средств Евразийского экономического союза. Available from: <https://goo.gl/j5KunJ>.

ОБ АВТОРАХ

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

Ромодановский Дмитрий Павлович. Главный эксперт управления экспертизы № 2 Центра экспертизы и контроля готовых лекарственных средств, канд. мед. наук.

Горячев Дмитрий Владимирович. Директор Центра экспертизы и контроля готовых лекарственных средств, д-р мед. наук.

АДРЕС ДЛЯ ПЕРЕПИСКИ

Ромодановский Дмитрий Павлович; Romodanovsky@expmed.ru

PLANNING AND EVALUATION OF BIOEQUIVALENCE STUDIES OF ROSUVASTATIN DRUG PRODUCTS

D. P. Romodanovsky, D. V. Goryachev

Federal State Budgetary Institution
«Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products»
of the Ministry of Health of the Russian Federation,
Petrovsky boulevard 8, bld. 2, Moscow 127051, Russian Federation

Abstract: The article reviews bioequivalence studies of Russian and foreign generic rosuvastatin preparations with the goal of harmonizing approaches to rosuvastatin bioequivalence studies in the Russian Federation. The article describes the current regulatory recommendations for and approaches to bioequivalence studies of generic drugs (and in particular of rosuvastatin preparations which are highly variable drugs) and gives recommendations on the design of rosuvastatin studies and evaluation of results.

Key words: bioequivalence study; rosuvastatin; highly variable drugs; pharmacokinetics; high performance liquid chromatography.

For citation: Romodanovsky DP, Goryachev DV. Planning and evaluation of bioequivalence studies of rosuvastatin drug products. The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products 2017; 7(3): 142–149.

REFERENCES

1. Jones PH, Davidson MH, Stein EA, Bays HE, McKenney JM, Miller A, et al. Comparison of the efficacy and safety of rosuvastatin versus atorvastatin, simvastatin, and pravastatin across doses (STELLAR[®]Trial). *Am J Cardiol.* 2003; 92(2): 152–160.
2. Jones PH, Hunninghake DB, Ferdinand KC, Stein EA, Gold A, Caplan RJ, et al. Effects of rosuvastatin versus atorvastatin, simvastatin, and pravastatin on non-high-density lipoprotein cholesterol, apolipoproteins, and lipid ratios in patients with hypercholesterolemia: additional results from the STELLAR Trial. *Clin Ther.* 2004; 26(9): 1388–99.
3. The Federal Law of the Russian Federation of 12.04.2010 No. 61-FZ «On Circulation of Medicines». Available from: <https://goo.gl/sUorrH> (in Russian).
4. The Federal Law of the Russian Federation of 22.12.2014 No. 429-FZ «On Amendments to the Federal Law «On Circulation of Medicines». Available from: <https://goo.gl/sUorrH> (in Russian).
5. The Federal Law of the Russian Federation of 13.07.2015 No. 241-FZ «On Amendments to the Federal Law «On Circulation of Medicines» and the Federal Law «On Amendments to the Federal Law «On Circulation of Medicines». Available from: <https://goo.gl/vNC34n> (in Russian).
6. Romodanovsky DP, Dranitsyna MA, Goryachev DV, Niyazov RR, Gavrishina EV. Design planning and evaluation of bioequivalence results of highly variable preparations based on rosuvastatin. *Experimental and Clinical Pharmacology* 2015; 78(6): 19–25 (in Russian).
7. Romodanovsky DP, Eremenkova TV, Dranitsyna MA, Goryachev DV, Niyazov RR, Gavrishina EV, et al. Highly variable medicines — specific aspects of bioequivalence studies. The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products 2015; (4): 5–10 (in Russian).
8. Investigation of bioequivalence (CPMP/EWP/QWP/1401/98 Rev. 1). European Medicines Agency. Available from: <https://goo.gl/qmaH1d>.
9. Instructions for the use of a medicinal product Crestor[®] [Internet]. [cited 2016 Oct 20]. Available from: <https://goo.gl/qcvF3U> (in Russian).
10. Singh SS, Sharma K, Patel H, Jain M, Shah H, Gupta S, et al. Estimation of rosuvastatin in human plasma by HPLC tandem mass spectrometric method and its application to bioequivalence study. *J Braz Chem Soc.* 2005; 16(5): 944–50.
11. Thota S, Tippabhotla SK, Khan S, Nakkawar M. Two-way crossover bioequivalence study of rosuvastatin tablets 5 mg in healthy, adult, asian-indian male volunteers under fasting condition. *Int J Pharm Pharm Sci* 2013; 5(3): 289–93.
12. Zhang D, Zhang J, Liu X, Wei C, Zhang R, Song H, et al. Validated LC-MS/MS method for the determination of rosuvastatin in human plasma: application to a bioequivalence study in Chinese volunteers. *Pharmacology & Pharmacy* 2011; 2(4): 341–6.
13. Public Assessment Report Rosuvastatine Torrent 5 mg, 10 mg, 20 mg and 40 mg, film-coated tablets (rosuvastatin calcium). Available from: <https://goo.gl/LZyHVs>.
14. Vargas M, Bustamante C, Villarraga E. Bioequivalence study of two formulations containing rosuvastatin 40 mg tablets in healthy colombians. *J Bioequiv Availab* 2015; (7): 229–32.
15. Trabelsi F, Bartunek A, Vlavonou R, Navratilova L, Dube C., Tanguay M, et al. Single-dose, 2-way crossover, bioequivalence study of two rosuvastatin formulations in normal healthy subjects under fasting conditions. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2013; 50(10): 741–50.
16. HarahapY, Prasaja B, Azmi F, Lusthom W, Sinandang T, Felicia V, et al. Bioequivalence study of two rosuvastatin tablet formulations in healthy Indonesian subjects. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2016; 54(3): 212–6.
17. Davit BM, Chen ML, Conner DP, Haidar SH, Kim S, Lee CH, et al. Implementation of a reference-scaled average bioequivalence approach for highly variable generic drug products by the US Food and Drug Administration. *AAPS J.* 2012; 14(4): 915–24.
18. Guidance on evaluation of medicines. V. I. Moscow: Grif i K; 2013 (in Russian).
19. Rules for bioequivalence studies of drugs of the Eurasian Economic Union. Available from: <https://goo.gl/j5KunJ> (in Russian).

AUTHORS

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Petrovsky boulevard 8, bld. 2, Moscow 127051, Russian Federation.

Romodanovsky DP. Chief expert of Division No. 2 for Medicinal Products' Evaluation of the Centre for Evaluation and Control of Medicinal Products. Candidate of Medical Sciences.

Goryachev DV. Director of the Centre for Evaluation and Control of Medicinal Products. Doctor of Medical Sciences.

CONTACT E-MAIL

Romodanovsky Dmitry Pavlovich; Romodanovsky@expmed.ru

Особенности клинической фармакологии лекарственных средств, применяемых для фармакотерапии ВИЧ-инфекции во время беременности

Е. А. Сокова, И. А. Мазеркина, О. А. Демидова, Т. В. Александрова

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

Статья поступила 15.05.2017 г. Принята к печати 21.08.2017 г.

Резюме: Проведен обзор данных литературы по проблеме фармакотерапии ВИЧ-инфекции у беременных с позиции клинической фармакологии. Рассмотрены общие принципы проведения антиретровирусной терапии у ВИЧ-инфицированных беременных женщин и профилактики передачи ВИЧ-инфекции от матери к ребенку. Приведены особенности фармакокинетики антиретровирусных препаратов у беременных. Представлена информация по особенностям влияния беременности на метаболизм антиретровирусных препаратов, характеру их взаимодействия с ABC- и SCL-транспортёрами лекарственных средств, рассмотрены аспекты клинического значения этих изменений. Обоснована необходимость проведения терапевтического лекарственного мониторинга ингибиторов протеаз у ВИЧ-инфицированных беременных женщин.

Ключевые слова: беременность; ВИЧ-инфекция; антиретровирусный препарат; фармакокинетика; безопасность; эффективность; транспортёры лекарственных средств; межлекарственное взаимодействие.

Библиографическое описание: Сокова ЕА, Мазеркина ИА, Демидова ОА, Александрова ТВ. Особенности клинической фармакологии лекарственных средств, применяемых для фармакотерапии ВИЧ-инфекции во время беременности. Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения 2017; 7(3): 150–154.

На сегодняшний день эпидемиологическая ситуация по ВИЧ-инфекции в России и в других странах остается сложной, на фоне роста заболеваемости в ее структуре неуклонно возрастает доля женщин фертильного возраста. Ситуация осложняется тем, что в ряде случаев возможен трансплацентарный путь заражения через амниотические оболочки или околоплодные воды во время рождения ребенка, а также через молоко при грудном вскармливании. Риск инфицирования ребенка повышается, если мать была заражена в течение шести месяцев перед наступлением беременности или в период беременности, а также если беременность наступила на поздних стадиях ВИЧ-инфекции. Несмотря на это, начиная с 2003 года количество детей, заболевших от ВИЧ-инфицированных матерей, уменьшилось, что связывают с широким применением химиопрофилактики вертикальной передачи ВИЧ-инфекции и выполнением elective кесарева сечения [1].

Решение о проведении антиретровирусной терапии (АРВТ) у ВИЧ-инфицированной беременной женщины является комплексной проблемой, поскольку определяется не только совокупностью эпидемиологических, клинических и лабораторных показателей, но и физиологическими особенностями во время беременности, которые предопределяют изменения фармакокинетического профиля, и, соответственно, потенциальную токсичность антиретровирусных препаратов (АРВП) для матери и плода/новорожденного. Изменения этого профиля у беременной затрагивают все звенья фармакокинетического процесса: всасывание, распределение, метаболизм и выведение. Во время беременности отмечается разнонаправленное изменение активности многих печеночных ферментов, участвующих в I и II фазах метаболизма лекарственных средств (ЛС), что приводит к изменению их фармакокинетики, включая и

АРВП [2–4]. Возрастание почечного кровотока у беременной может приводить к увеличению клиренса ЛС, которые экскретируются почками, например нуклеозидные/нуклеотидные ингибиторы обратной транскриптазы (НИОТ). Кроме того, важным аспектом применения АРВП является их взаимодействие с транспортёрами из семейства ABC и/или SLC, которое играет важную роль в модификации фармакокинетических и фармакодинамических процессов и, соответственно, изменении эффективности и безопасности высокоактивной антиретровирусной терапии (ВАРВТ) [2–4].

ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ АНТИРЕТРОВИРУСНОЙ ТЕРАПИИ

Антиретровирусную терапию рекомендуют всем ВИЧ-инфицированным пациентам, включая беременных женщин, независимо от иммунного, клинического и вирусологического статуса [5]. АРВТ снижает заболеваемость и смертность и у пациентов с высоким количеством CD4-лимфоцитов [6]. Цель антиретровирусной терапии при беременности состоит в том, чтобы, с одной стороны, предотвратить передачу ВИЧ от матери ребенку, а с другой — обеспечить оптимальное лечение беременной, которое сопровождалось бы по возможности минимальным нежелательным действием препарата на организм матери и еще не родившегося ребенка [7, 8].

У беременных женщин выбор режима АРВТ должен предусматривать наличие резистентности вирусного профиля, безопасность и эффективность препаратов для матери и плода, потенциальную возможность взаимодействия с другими ЛС и фармакокинетические данные при беременности. АРВП, которые рекомендуются для назначения в общей популяции, в ряде случаев не назначаются беременным

женщинам в связи с ограниченностью опыта их применения, то есть следует назначать только те АРВП, которые испытаны многолетней практикой.

Комбинированная терапия АРВП в течение всей беременности является стандартом лечения, который отражен в клинических рекомендациях Минздрава России [9]. Современное состояние вопроса по профилактике, лечению ВИЧ-инфекции во время беременности и проведению мероприятий по сокращению перинатального ВИЧ-инфицирования в США представлено в соответствующих рекомендациях [7].

Профилактика передачи ВИЧ-инфекции от матери ребенку (ППМР) — комплексная задача, успех решения которой складывается из выполнения следующих этапов: первичная профилактика ВИЧ-инфекции у женщин репродуктивного возраста; раннее выявление ВИЧ-инфекции у женщин репродуктивного возраста; назначение АРВТ ВИЧ-инфицированным женщинам, планирующим беременность; назначение АРВТ всем ВИЧ-инфицированным беременным; назначение АРВТ в родах; назначение АРВТ ребенку [9].

Существуют 4 группы антиретровирусных препаратов [10]:

1) нуклеозидные/нуклеотидные ингибиторы обратной транскриптазы (НИОТ). К ним относятся: зидовудин (Retrovir®), ламивудин (Epivir®), абакавир (Ziagen®), диданозин/ddI (Videx®), ставудин/d4T (Zerit®), эмтрицитабин (Emtriva®), зальцитабин (HIVID®) и тенофовир (Viread®). Некоторые препараты этой группы выпускаются в виде комбинированных препаратов: зидовудин + ламивудин (Combivir®), абакавир + ламивудин (Kivexa®), зидовудин + ламивудин + абакавир (Trizivir®), тенофовир + эмтрицитабин (Truvada®);

2) ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы (ННИОТ): делавирдин (Rescriptor®), эфавиренз (SUSTIVA®), невирапин (Viramune®);

3) ингибиторы протеаз (ИП): ампренавир (Agenerase®), атазанавир (REYATAZ®), фосампренавир (Telzir®), индинавир (CRIVAN®), лопинавир/ритонавир (Kaletra®), нелфинавир (VIRACEPT®), ритонавир (Norvir®), саквинавир (INVIRASE®), типранавир (Aptivus®);

4) ингибиторы слияния: энфурвитид (Fuzeon®).

ОСОБЕННОСТИ ФАРМАКОКИНЕТИКИ АНТИРЕТРОВИРУСНЫХ ПРЕПАРАТОВ У БЕРЕМЕННЫХ

Активация НИОТ происходит внутриклеточно, и активные трифосфатные соединения препаратов имеют более длительный период полувыведения ($T_{1/2}$), низкую связь с белком, и практически все (за исключением абакавира) выделяются почками. Абакавир метаболизируется в печени, но не является субстратом цитохрома P450. Ламивудин и зидовудин считаются препаратами первой линии для лечения ВИЧ-инфекции во время беременности. Они хорошо проникают через плаценту к плоду, быстро проникают в грудное молоко (индекс молоко/плазма составляет 2,56 для ламивудина и 0,4 для зидовудина). Беременность не изменяет в значительной степени фармакокинетические параметры этих препаратов [2, 4]. Клинические данные по безопасности применения при беременности получены только для зидовудина, ламивудина, диданозина и ставудина. В исследовании более 1000 документированных случаев применения зидовудина при беременности не выявлено

значительного тератогенного действия. По данным Регистра беременностей при применении АРВТ (США), частота пороков развития для зидовудина не превышает 2,8 %, для ламивудина — 3 %, для ставудина — 2,2 % [4].

Остальные НИОТ считаются альтернативными препаратами во время беременности у ВИЧ-инфицированных женщин. Воздействие на организм матери эмтрицитабина и тенофовира (категория В) снижается в III триместре по сравнению с послеродовым периодом, однако концентрации препаратов остаются на уровне терапевтических и коррекции режима дозирования в III триместре не требуется [11].

Из представителей первого поколения ННИОТ делавирдин в настоящее время не применяется. Клинические данные о применении во время беременности получены только для эфавиренза и невирапина. У эфавиренза (категория D) отмечается высокая связь с белками (>99 %), препарат метаболизируется CYP3A4 и 2B6, индуцирует изофермент CYP3A4, $T_{1/2}$ составляет 40–55 ч. Однако для эфавиренза выявлено тератогенное действие, поэтому в I триместре беременности он не применяется. Невирапин является единственным препаратом из группы ННИОТ, который назначают ВИЧ-инфицированным беременным женщинам. Связь с белками у препарата составляет 60 %, $T_{1/2}$ — 25–30 ч, невирапин метаболизируется в печени, при этом он индуцирует CYP3A4 и 2B6. Невирапин хорошо проникает через плаценту, а концентрация в грудном молоке составляет 76 % от концентрации препарата в плазме крови матери. Исследования, проведенные в США, не продемонстрировали изменений фармакокинетики во время беременности, поэтому его рекомендуют применять в стандартных дозах [12].

Информация по применению препаратов ННИОТ второго поколения в качестве АРВТ ограничена в связи с отсутствием данных по фармакокинетике, степени прохождения через плаценту и проникновению в грудное молоко.

Все ИП метаболизируются в печени CYP3A4 и в значительной степени подвержены межлекарственному взаимодействию. Для повышения терапевтической концентрации ингибиторы протеаз (за исключением нелфинавира) применяются с низкими дозами ритонавира (потенциальный ингибитор CYP3A4). Результаты проведенных исследований свидетельствуют о снижении концентрации практически всех ИП в III триместре беременности, при этом концентрация комбинированного применения лопинавира, фосампренавира и атазанавира с ритонавиром в раннем послеродовом периоде может возрастать по сравнению с показателями у небеременных женщин. Это повышает вероятность токсического действия препаратов и вызывает необходимость проведения терапевтического лекарственного мониторинга для подбора индивидуальных доз ингибиторов протеаз на протяжении всего гестационного периода беременности.

Саквинавир в комбинации с ритонавиром является еще одной альтернативой для применения во время беременности [7]. У саквинавира отмечается высокая связь с белками (98 %), препарат является одновременно субстратом и ингибитором CYP3A4 и гликопротеина Р, $T_{1/2}$ составляет 12 ч. Результаты проводившихся исследований не выявили значимых различий в фармакокинетических параметрах комбинации саквинавира/ритонавира между II, III тримест-

ром беременности и послеродовым периодом, поэтому нет необходимости изменений рекомендуемого режима дозирования саквинавир 1000 мг/ритонавир 100 мг два раза/сутки [13].

В случае развития толерантности к основным препаратам из группы ингибиторов протеаз для химиопрофилактики вертикальной передачи ВИЧ-инфекции применяют нелфинавир.

Современный подход к профилактике вертикальной передачи ВИЧ-инфекции от матери ребенку предполагает применение высокоактивной антиретровирусной терапии — ВАРВТ, которая предусматривает комбинацию НИОТ вместе с ННИОТ или ингибиторами протеаз и влияет на различные стадии репликации ВИЧ. Было показано, что применение ВАРВТ позволяет снизить вероятность инфицирования ребенка с 20–45 % до 1 % [14].

В ряде исследований было продемонстрировано, что большинство препаратов НИОТ/ННИОТ взаимодействуют с АВС-транспортерами, однако хорошо проникают через плацентарный барьер, и концентрации препаратов практически одинаковы в пуповине ребенка и в крови матери [15, 16].

Напротив, трансплацентарное прохождение ингибиторов протеаз очень ограничено и составляет примерно 0–0,2 для ритонавира, 0–0,1 для лопинавира и менее 0,3 для нелфинавира, саквинавира и индинавира [17]. Этот факт можно объяснить тем, что ИП являются субстратами транспортеров из семейства АВС и/или SLC [18].

Некоторые АРВП обладают способностью ингибировать транспортеры из семейства АВС и/или SLC (например, эфавиренз, невирапин, абакавир ингибируют гликопротеин Р) [19]. Было продемонстрировано, что абакавир, зидовудин, тенофовир активно ингибируют транспортеры из семейства органических катионов — ОСТ1, ОСТ2 и ОСТ3, которые играют важную роль во всасывании, распределении и активной секреции гидрофильных ЛС в мочу [20]. Лопинавир, нелфинавир, саквинавир снижают секреторную активность протеина резистентности рака груди (BCRP) транспортера [21].

Таким образом, взаимодействие АРВП с различными транспортерами ЛС играет важную роль в модификации фармакокинетических и фармакодинамических процессов и, соответственно, эффективности и безопасности ВАРВТ [22]. Например, ритонавир часто включают в схемы ВАРВТ из-за способности ингибировать АВС-транспортеры и изоферменты метаболизма цитохрома Р450. Это ингибирование приводит к более высокой биодоступности, более медленному выведению и, таким образом, к повышению концентрации совместно назначаемых препаратов. Предполагают, что ритонавир может ингибировать активность плацентарных транспортеров — гликопротеина Р и протеина резистентности рака груди, и, таким образом, увеличивается степень воздействия на плод других компонентов ВАРВТ [18].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изменения фармакокинетического профиля АРВП во время беременности предопределяет потенциальную токсичность антиретровирусных препаратов для матери и плода/новорожденного. Это предполагает необходимость проведения терапевтического лекарственного мониторинга АРВП у ВИЧ-инфицированных беременных женщин для

подбора индивидуальных доз ингибиторов протеаз на протяжении всего гестационного периода.

Современный подход к профилактике вертикальной передачи ВИЧ-инфекции от матери ребенку предполагает применение высокоактивной антиретровирусной терапии — ВАРВТ, которая предусматривает комбинацию НИОТ вместе с ННИОТ или ингибиторами протеаз.

Важным аспектом применения АРВП является их взаимодействие с транспортерами из семейства АВС и/или SLC, которое играет значимую роль в модификации фармакокинетических и фармакодинамических процессов и, соответственно, эффективности высокоактивной антиретровирусной терапии. Знание этих фармакологических аспектов взаимодействия АРВП с транспортерами ЛС дает возможность клиницистам рационально применять комбинированную фармакотерапию или, наоборот, избежать этих взаимодействий для достижения терапевтических уровней концентраций лекарственных препаратов у матери и плода при проведении АРВТ.

Эта информация может быть получена в клинических исследованиях путем активного мониторинга безопасности новых и зарегистрированных АРВП у беременных с ВИЧ-инфекцией.

ЛИТЕРАТУРА

1. Darak S, Parchure R, Darak T, Talavlikar R, Kulkarni S, Kulkarni V. Advances in the prevention of mother-to-child transmission of HIV and resulting clinical and programmatic implications. *Research and Reports in Neonatology* 2014; 4: 111–23.
2. Roustit M, Jlaiei M, Leclercq P, Stanke-Labesque F. Pharmacokinetics and therapeutic drug monitoring of antiretrovirals in pregnant women. *Br J Clin Pharmacol*. 2008; 66(2): 179–95.
3. Сокова ЕА, Чилова РА, Проклова ГФ, Мекша ЮВ, Демидова ОА. Особенности метаболизма лекарственных средств во время беременности. *Вестник современной клинической медицины* 2016; 9(5): 70–5.
4. Mattison DR. *Clinical pharmacology during pregnancy*. Amsterdam: Elsevier; 2013.
5. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents. Department of Health and Human Services [Internet]. 2016 [cited 2017 Jul 10]. Available from: <https://goo.gl/RpJPfc>.
6. Lundgren JD, Babiker AG, Gordin F, Emery S, Grund B, Sharma S, et al. Initiation of antiretroviral therapy in early asymptomatic HIV infection. *N Engl J Med*. 2015; 373(9): 795–807.
7. Recommendations for use of antiretroviral drugs in pregnant HIV-1-infected women for maternal health and interventions to reduce perinatal HIV transmission in the United States [Internet]. 2016 [cited 2017 Jul 10]. Available from: <https://goo.gl/5VKzKy>.
8. Журавлева ЕО, Вельц НЮ, Затолочина КЭ, Глаголев СВ, Поливанов ВА, Дармостукова МА. и др. Анализ спонтанных сообщений о нежелательных реакциях, развившихся при применении лекарственных средств во время беременности. *Безопасность и риск фармакотерапии* 2017; 5(2): 61–69.
9. Применение антиретровирусных препаратов в комплексе мер, направленных на профилактику передачи ВИЧ от матери ребенку. Клинические рекомендации (протокол лечения) Министерства здравоохранения Российской Федерации. Available from: <http://minzdrav.midural.ru/uploads/1120%D0%B0.pdf>.
10. Шефер К, Шпильманн Х, Феттер К. *Лекарственная терапия в период беременности и лактации*. М.: Логосфера; 2010.
11. Best B, Stek A, Hu C, Burchett SK, Rossi SS, Smith E, et al. High-dose Lopinavir and standard dose emtricitabine pharmacokinetics during pregnancy and postpartum. 15th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, February 3–6, 2008, Boston, MA, USA.
12. Capparelli EV, Aweeka F, Hitti J, Stek A, Hu C, Burchett SK, et al. Chronic administration of Nevirapine during pregnancy: impact of pregnancy on pharmacokinetics. *HIV Med*. 2008; 9(4): 214–20.

13. Van der Lugt J, Colbers A, Molto J, Hawkins D, van der Ende M, Vogel M, et al. The pharmacokinetics, safety and efficacy of boosted Saquinavir tablets in HIV type-1-infected pregnant women. *Antivir Ther.* 2009; 14(3): 443–50.
14. De Cock KM, Fowler MG, Mercier E, de Vincenzi I, Saba J, Hoff E, et al. Prevention of mother-to-child HIV transmission in resource-poor countries: translating research into policy and practice. *JAMA* 2000; 283(9): 1175–82.
15. Flynn PM, Mirochnick M, Shapiro DE, Bardeguez A, Rodman J, Robbins B, et al. Pharmacokinetics and safety of single-dose Tenofovir disoproxil fumarate and Emtricitabine in HIV-1-infected pregnant women and their infants. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55(12): 5914–22.
16. Сокова ЕА. Мониторинг безопасности зарегистрированных лекарственных средств у беременных: фармакогенетические аспекты. Безопасность и риск фармакотерапии 2015; (3): 30–35.
17. Gedeon C, Koren G. Designing pregnancy centered medications: drugs which do not cross the human placenta. *Placenta* 2006; 27(8): 861–8.
18. Sudhakaran S, Rayner CR, Li J, Kong DC, Gude NM, Nation RL. Inhibition of placental P-glycoprotein: impact on indinavir transfer to the foetus. *Br J Clin Pharmacol.* 2008; 65(5): 667–73.
19. Storch CH, Theile D, Lindenmaier H, Haefeli WE, Weiss J. Comparison of the inhibitory activity of anti-HIV drugs on P-glycoprotein. *Biochem Pharmacol.* 2007; 73(10): 1573–81.
20. Minuesa G, Volk C, Molina-Arcas M, Gorboulev V, Erkizia I, Arndt P, et al. Transport of Lamivudine [(–)-beta-L-2', 3'-dideoxy-3'-thiacytidine] and high-affinity interaction of nucleoside reverse transcriptase inhibitors with human organic cation transporters 1, 2, and 3. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009; 329(1): 252–61.
21. Weiss J, Rose J, Storch CH, Ketabi-Kiyanvash N, Sauer A, Haefeli WE, Efferth T. Modulation of human BCRP (ABCG2) activity by anti-HIV drugs. *J Antimicrob Chemother.* 2007; 59(2): 238–45.
22. Gulati A, Gerk PM. Role of placental ATP-binding cassette (ABC) transporters in antiretroviral therapy during pregnancy. *J Pharm Sci.* 2009; 98(7): 2317–35.

ОБ АВТОРАХ

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Российская Федерация, 127051, Москва, Петровский бульвар, д. 8, стр. 2.
 Сокова Елена Андреевна. Ведущий научный сотрудник отдела взаимодействия лекарственных средств и рациональной фармакотерапии Центра клинической фармакологии, канд. мед. наук, доцент.
 Мазеркина Ирина Анатольевна. Старший научный сотрудник отдела персонализированной медицины и клинической фармакогенетики Центра клинической фармакологии, канд. мед. наук.
 Демидова Ольга Александровна. Научный сотрудник отдела взаимодействия лекарственных средств и рациональной фармакотерапии Центра клинической фармакологии, канд. фарм. наук.
 Александрова Татьяна Владимировна. Старший научный сотрудник отдела взаимодействия лекарственных средств и рациональной фармакотерапии Центра клинической фармакологии, канд. мед. наук.

АДРЕС ДЛЯ ПЕРЕПИСКИ

Сокова Елена Андреевна; sokova2@rambler.ru

CLINICAL PHARMACOLOGY ASPECTS OF DRUGS FOR HIV-INFECTED PREGNANT WOMEN

E. A. Sokova, I. A. Mazerkina, O. A. Demidova, T. V. Aleksandrova

Federal State Budgetary Institution
 «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products»
 of the Ministry of Health of the Russian Federation,
 Petrovsky boulevard 8, bld. 2, Moscow 127051, Russian Federation

Abstract: The article summarises literature data on clinical management of HIV infection in pregnant women. It discusses the general principles of antiretroviral therapy for HIV-infected pregnant women and prevention of mother-to-child transmission of HIV infection. It also describes pharmacokinetic properties of antiretroviral drugs for pregnant women. The article highlights issues concerning the effects of pregnancy on drug metabolism, patterns of drug interaction with both ABC and SCL drug transporters and associated clinical implications for antiretroviral therapy. The authors demonstrate the need for therapeutic drug monitoring of protease inhibitors in HIV-infected pregnant women.

Key words: pregnancy; HIV infection; antiretroviral drugs; pharmacokinetics; safety; efficacy; drug transporters; therapeutic drug monitoring; drug-drug interactions.

For citation: Sokova EA, Mazerkina IA, Demidova OA, Aleksandrova TV. Clinical pharmacology aspects of drugs for HIV-infected pregnant women. *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products* 2017; 7(3): 150–154.

REFERENCES

1. Darak S, Parchure R, Darak T, Talavlikar R, Kulkarni S, Kulkarni V. Advances in the prevention of mother-to-child transmission of HIV and resulting clinical and programmatic implications. *Research and Reports in Neonatology* 2014; 4: 111–23.
2. Roustit M, Jlaïel M, Leclercq P, Stanke-Labesque F. Pharmacokinetics and therapeutic drug monitoring of antiretrovirals in pregnant women. *Br J Clin Pharmacol.* 2008; 66(2): 179–95.
3. Sokova EA, Chilova RA, Proklova GF, Meksha YuV, Demidova OA. The characteristics of drug metabolism during pregnancy. *The Bulletin of Contemporary Clinical Medicine* 2016; 9(5): 70–5 (in Russian).
4. Mattison DR. *Clinical pharmacology during pregnancy*. Amsterdam: Elsevier; 2013.
5. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents. Department of Health and Human Services [Internet]. 2016 [cited 2017 Jul 10]. Available from: <https://goo.gl/RpJPfc>.
6. Lundgren JD, Babiker AG, Gordin F, Emery S, Grund B, Sharma S, et al. Initiation of antiretroviral therapy in early asymptomatic HIV Infection. *N Engl J Med.* 2015; 373(9): 795–807.
7. Recommendations for use of antiretroviral drugs in pregnant HIV-1-infected women for maternal health and interventions to re-

- duce perinatal HIV transmission in the United States [Internet]. 2016 [cited 2017 Jul 10]. Available from: <https://goo.gl/5VKzKy>.
8. Zhuravleva EO, Velts NYu, Zatolochina KE, Glagolev SV, Polivanov VA, Darmostukova MA, et al. Analysis of spontaneous reports of adverse reactions, developed in the use of drugs during pregnancy. *Safety and Risk of Pharmacotherapy* 2017; 5(2): 61–69 (in Russian).
9. The use of antiretroviral drugs as part of a set of measures aimed at preventing the transmission of HIV from mother to child. Clinical recommendations (protocol of treatment) of the Ministry of Health of the Russian Federation. Available from: <http://minzdrav.midural.ru/uploads/1120%D0%B0.pdf> (in Russian).
10. Schaefer C, Spielmann H, Vetter K. Drug therapy during pregnancy and lactation. Moscow: Logosfera; 2010 (in Russian).
11. Best B, Stek A, Hu C, Burchett SK, Rossi SS, Smith E, et al. High-dose Lopinavir and standard dose emtricitabine pharmacokinetics during pregnancy and postpartum. 15th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, February 3–6, 2008, Boston, MA, USA.
12. Capparelli EV, Aweeka F, Hitti J, Stek A, Hu C, Burchett SK, et al. Chronic administration of Nevirapine during pregnancy: impact of pregnancy on pharmacokinetics. *HIV Med.* 2008; 9(4): 214–20.
13. Van der Lugt J, Colbers A, Molto J, Hawkins D, van der Ende M, Vogel M, et al. The pharmacokinetics, safety and efficacy of boosted Saquinavir tablets in HIV type-1-infected pregnant women. *Antivir Ther.* 2009; 14(3): 443–50.
14. De Cock KM, Fowler MG, Mercier E, de Vincenzi I, Saba J, Hoff E, et al. Prevention of mother-to-child HIV transmission in resource-poor countries: translating research into policy and practice. *JAMA* 2000; 283(9): 1175–82.
15. Flynn PM, Mirochnick M, Shapiro DE, Bardeguez A, Rodman J, Robbins B, et al. Pharmacokinetics and safety of single-dose Tenofovir disoproxil fumarate and Emtricitabine in HIV-1-infected pregnant women and their infants. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55(12): 5914–22.
16. Sokova EA. Monitoring post-approval drug safety in pregnancy: pharmacogenetic aspects. *Safety and Risk of Pharmacotherapy* 2015; (3): 30–35 (in Russian).
17. Gedeon C, Koren G. Designing pregnancy centered medications: drugs which do not cross the human placenta. *Placenta* 2006; 27(8): 861–8.
18. Sudhakaran S, Rayner CR, Li J, Kong DC, Gude NM, Nation RL. Inhibition of placental P-glycoprotein: impact on indinavir transfer to the fetus. *Br J Clin Pharmacol.* 2008; 65(5): 667–73.
19. Storch CH, Theile D, Lindenmaier H, Haefeli WE, Weiss J. Comparison of the inhibitory activity of anti-HIV drugs on P-glycoprotein. *Biochem Pharmacol.* 2007; 73(10): 1573–81.
20. Minuesa G, Volk C, Molina-Arcas M, Gorboulev V, Erkizia I, Arndt P, et al. Transport of lamivudine [(–)-beta-L-2', 3'-dideoxy-3'-thiacytidine] and high-affinity interaction of nucleoside reverse transcriptase inhibitors with human organic cation transporters 1, 2, and 3. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009; 329(1): 252–61.
21. Weiss J, Rose J, Storch CH, Ketabi-Kiyanvash N, Sauer A, Haefeli WE, Efferth T. Modulation of human BCRP (ABCG2) activity by anti-HIV drugs. *J Antimicrob Chemother.* 2007; 59(2): 238–45.
22. Gulati A, Gerk PM. Role of placental ATP-binding cassette (ABC) transporters in antiretroviral therapy during pregnancy. *J Pharm Sci.* 2009; 98(7): 2317–35.

AUTHORS

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Petrovsky boulevard 8, bld. 2, Moscow 127051, Russian Federation.

Sokova EA. Leading research associate of the Department of Drug Interactions and Rational Pharmacotherapy of the Clinical Pharmacology Centre. Candidate of Medical Sciences, assistant professor.

Mazerkina IA. Senior research associate of the Department of Personalized Medicine and Clinical Pharmacogenetics of the Clinical Pharmacology Centre. Candidate of Medical Sciences.

Demidova OA. Research associate of the Department of Drug Interactions and Rational Pharmacotherapy of the Clinical Pharmacology Centre. Candidate of Pharmaceutical Sciences.

Aleksandrova TV. Senior research associate of the Department of Drug Interactions and Rational Pharmacotherapy of the Clinical Pharmacology Centre. Candidate of Medical Sciences.

CONTACT E-MAIL

Sokova Elena Andreevna; sokova2@rambler.ru

Регуляторные подходы к оценке биоаналогов для лечения ревматических заболеваний

Д. В. Горячев, М. Ю. Тельных, Н. Д. Бунятян

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

Статья поступила 21.03.2017 г. Принята к печати 21.08.2017 г.

Резюме: Рассмотрены вопросы планирования программ разработки биоаналогичных препаратов, которые применяют для терапии пациентов с ревматическими заболеваниями. Проанализированы основные определения биоаналогичных препаратов, применяемые в Российской Федерации и за рубежом, а также регуляторные подходы к признанию биоаналогичности. Описан дизайн подтверждающих клинических исследований. Отмечено, что обоснование границ эквивалентности должно строиться как на клинических, так и на статистических предпосылках. Обоснована необходимость постоянного совершенствования требований и подходов к оценке достаточности программ изучения этих препаратов.

Ключевые слова: биоаналогичные препараты; биоаналоги; референтные препараты; регуляторные подходы; ревматические заболевания.

Библиографическое описание: Горячев ДВ, Тельных МЮ, Бунятян НД. Регуляторные подходы к оценке биоаналогов для лечения ревматических заболеваний. Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения 2017; 7(3): 155–163.

Биоаналоговый (биоподобный) лекарственный препарат (биоаналог) — биологический лекарственный препарат (ЛП), схожий по параметрам качества, эффективности и безопасности с референтным биологическим ЛП в такой же лекарственной форме и имеющий идентичный способ введения [1].

Референтные препараты моноклональных антител в конце XX века кардинально изменили взгляд ревматологов на лечение ревматоидного артрита — одного из наиболее частых воспалительных заболеваний суставов — и ряда иных ревматических заболеваний.

На сегодняшний день в Российской Федерации зарегистрировано несколько препаратов моноклональных антител для лечения ревматических заболеваний (табл. 1).

На мировых рынках представлено около 20 биоаналогов для терапии ревматоидного артрита (РА),

анкилозирующего спондилита (АС), псориатического артрита (ПсА), псориаза (ПС), болезни Крона (БК) и язвенного колита (ЯК) [3, 4].

РЕГУЛЯТОРНЫЕ ПОДХОДЫ К ПРИЗНАНИЮ БИОАНАЛОГИЧНОСТИ

Европейским агентством по лекарственным средствам (European Medicines Agency, EMA) в 2005 году в опубликованном руководстве была обоснована концепция биоаналогичности [5]. В других странах (Канаде, Японии и Австралии) эта концепция явилась основой для создания собственных подходов [6]. В 2009 году ВОЗ публикует руководство по оценке биоаналогичности препаратов [7], требования которого стали основой при разработке подходов биоаналогичности в Корее и странах Латинской Америки [8].

Таблица 1

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РЕВМАТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ [2]

Препарат (МНН)	Механизм действия	Показания (в ревматологии)
Мабтера (ритуксимаб)	Антитела к CD20 рецепторам	РА, васкулиты
Ремикейд (инфликсимаб)	Антитела к ФНО-альфа	РА, БК, в т.ч. у детей, ЯК, АС, ПА, Псориаз
Энбрел (Этанэрцепт)	Ингибитор ФНО-альфа	РА, АС, ПА, ЮИА, Псориаз
Хумира (адалимумаб)	Антитела к ФНО-альфа	РА, БК, ЯК, АС, ПА, Псориаз
Оренсия (Абатасепт)	Модулятор CD28 рецепторов	РА, ЮИА
Симпони (голимумаб)	Антитела к ФНО-альфа	РА, АС, ЯК, ПА
Актемра (тицилизумаб)	Антитела к ИЛ-6	РА
Иларис (канакинумаб)	Антитела к ИЛ-1бета	ЮА с системными проявлениями, группа редких синдромов (периодический синдром и т.д.), подагрический артрит.
Симзия (цертолизумаб)	Ингибитор ФНО-альфа	РА, АС, БК, ПА
Бенлиста (Белимумаб)	Антитела к BlyS	СКВ

Позднее понятие биоаналогичных препаратов было включено в нормативную документацию Управления по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств США (Food and Drug Administration, FDA) [8, 9]. До 2010 года в США биоаналоги не выделялись в отдельную группу ЛП, и требования к ним содержались в разделе 505 Федерального закона о пищевых продуктах, лекарственных средствах и косметике (Food, Drug and Cosmetic Act, FDC Act) [10], содержащим требования к новым препаратам, включая простые протеины, выделенные из группы сложных биологических препаратов. В свою очередь, сложные протеины рассматривались отдельно

в соответствии с разделом 351 Закона о службе здравоохранения (Public Health Service Act, PHSA) [11].

В 2010 году в США был принят Закон о ценовой конкуренции и инновациях биологических препаратов (Biologics Price Competition and Innovation Act, BPCIA) [12]. В соответствии с требованиями указанного закона (раздел 351(k)) сокращена необходимая программа для регистрации биологических препаратов, подтвердивших свою биоаналогичность или взаимозаменяемость по отношению к биологическому лекарственному референтному препарату, зарегистрированному FDA [13]. BPCIA пересматривает определение биологического препарата в PHSA, включая протеины (за исключением химически син-

Таблица 2

АНАЛИТИЧЕСКИЕ, ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ И ИНЫЕ ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ДЛЯ БИОАНАЛОГА ИНФЛИКСИМАБА [16]

Параметры анализа	Методы анализа	
Физико-химические свойства	Первичная структура	Аминокислотный анализ, пептидное картирование (LC-MS) в комбинации с тандемной масс-спектрометрией (MS/MS), пептидное картирование (HPLC), N-концевая последовательность, C-концевая последовательность, определение массы
	Структура высокого порядка	Дисульфидные связи, анализ свободного тиола, инфракрасная спектроскопия с использованием преобразования Фурье (FTIR), циркулярный дихроизм, дифференциальная сканирующая калориметрия (DSC)
	Примеси	Эксклюзионная ВЭЖХ (SEC-HPLC), электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях) (CE-SDS)
	Заряженные изоформы	Изоэлектрическое фокусирование (IEF), ионообменная хроматография (IEC-HPLC)
	Гликозилирование	Анализ сиаловых кислот, анализ моносахаридов, олигосахаридный профиль, анализ N-связанных гликанов
	Содержание	Концентрация протеина (UV ₂₈₀), специфическая ELISA
Биологическая активность	Связанная с Fc-рецепторами	Сравнительное связывание с Fcγ рецепторами с использованием плазмонного резонанса (SPR) и анализ <i>ex vivo</i> с применением NC клеток и нейтрофилов
	Связанная с F(ab') ₂	Сравнительное связывание с Fcγ рецепторами с использованием плазмонного резонанса (SPR), сравнительное аффинное связывание трансмембранного ФНО-α в ELISA с использованием культуры клеток, специфичность связывания с человеческим ФНО-β, перекрестная реактивность с тканями человека, сравнительное связывание с ФНО-α с использованием плазмонного резонанса (SPR), сравнительный анализ нейтрализации ФНО-α, сравнительный анализ апоптоза, сравнительное изучение обратного сигнала (reverse signaling), эффект блокирования растворимого ФНО-α в животной модели воспалительного заболевания кишечника при подавлении секреции цитокинов и апоптоза в клетках эпителиальной линии
	Связанная с Fc-F(ab') ₂	Сравнительный анализ связывания C1q с использованием ELISA; сравнительная комплемент-зависимая цитотоксичность, сравнительная антителозависимая цитотоксичность с использованием целевых клеток линии tmhTNF-α-Jurkat, мононуклеарных клеток периферической крови человека, а также NC клеток здоровых доноров в качестве эффекторных клеток Оценка регуляторной функции макрофагов при супрессии пролиферации Т-клеток, индуцированной регуляторными макрофагами в реакции смешанных лимфоцитов (MLR) Подсчет индуцированных регуляторных макрофагов в FACS анализе и модели заживления повреждения колоректального эпителия с участием регуляторных макрофагов Сравнительная оценка АЗЦТ с применением клеток линии Jurkat как целевых клеток и, либо периферические мононуклеарные, либо NC клетки больных болезнью Крона или клеток цельной крови здоровых доноров или больных болезнью Крона в качестве эффекторных клеток, или использование стимулированных липополисахаридами моноцитов здоровых доноров, здоровых добровольцев или больных болезнью Крона в качестве целевых клеток и периферических мононуклеарных клеток в качестве эффекторных

Примечание: АЗЦТ — антитело-зависимая цитотоксичность; БК — болезнь Крона; КЗЦТ — комплемент-зависимая цитотоксичность.

тезированных полипептидов), и определяет биоаналог как «биологический продукт, высоко сходный референтному, несмотря на незначительные различия в клинически неактивных структурных компонентах при отсутствии клинически значимых различий в безопасности, качестве и эффективности» [14].

Требования к оценке биоаналогов в Российской Федерации представлены в «Руководстве по экспертизе лекарственных средств», опубликованном ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России [15]. Эти требования соответствуют подходам ЕМА к признанию биоаналогичности ЛП.

Необходимые требования к доклиническим исследованиям, функциональным и иным характеристикам на примере биоаналога инфликсимаба, представлены в таблице 2.

Формализованные различия в требованиях к воспроизведенным и биоаналогичным препаратам схематично представлены в таблице 3.

Анализ исследований биоаналогов связан с феноменом сдвига границ критических показателей (shift paradigm) в разных странах [17]. В связи с этим возможно возникновение проблем с признанием эталонов для сравнительных исследований этих препаратов.

ДИЗАЙН ПОДТВЕРЖДАЮЩИХ КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

В качестве основного показателя для оценки в подтверждающем исследовании обычно выбирают наиболее чувствительное, то есть то, в случае которого продемонстрирован максимальный эффект (effect size) для оригинального продукта.

Оценка наиболее чувствительного показателя не всегда оправдана с практической точки зрения. Наиболее чувствительные показания могут быть не очень хорошо интегрированы в клинические исследования. Так, для ингибиторов фактора некроза опухоли

Таблица 3

РЕГУЛЯТОРНЫЕ ТРЕБОВАНИЯ ЕМА И FDA К ВОСПРОИЗВЕДЕННЫМ ПРЕПАРАТАМ И БИОАНАЛОГАМ

Параметр	Воспроизведенный препарат	Биоаналог
Источник	Химический синтез	Живые организмы, например дрожжи, бактерии или клетки животных/растений
Действующее вещество	Должно быть абсолютно идентичным референтному продукту	Требуется соответствие аминокислотной последовательности, однако возможны различия в посттрансляционных модификациях
Характеристика	Несравнимая	Прямое сравнение с референтным препаратом с применением ортогональных методов
Доклинические исследования <i>in vitro</i>	Не требуются	Прямое сравнение с референтным продуктом; Оценки связывания с рецептором; Оценки клеточной пролиферации и иных свойств
Доклинические исследования на животных	Не требуются	Сравнительные фармакодинамические и фармакокинетические исследования на релевантных животных. Сравнительное изучение токсичности повторных доз на релевантных животных, которое включает токсикокинетику, оценку системной экспозиции, местную переносимость и иммуногенность. Если релевантные виды представляют собой нечеловекообразных обезьян, ЕМА не требует доклинической оценки <i>in vivo</i> за исключением абсолютной необходимости изучения неизвестных примесей. FDA требует крайне ограниченных исследований на нечеловекообразных обезьянах
Клинические исследования I фазы	Сравнительная фармакокинетика у здоровых добровольцев: может быть как в условиях натощак, так и после еды	Сравнительная фармакокинетика/фармакодинамика (если маркер фармакодинамики возможен) у здоровых добровольцев или больных с научным обоснованием численности участников
Клинические исследования III фазы: безопасность (включая иммуногенность) и эффективность	Нет	Сравнительные клинические исследования с референтным препаратом; исследования проводятся по одному показанию, если механизм действия препарата повсеместно показаниям идентичен. Несколько КИ может быть необходимо в случае различия механизма действия при применении по разным показаниям. Количество исследований варьирует в зависимости от регулятора и конкретного случая
План фармаконадзора	Зависит от препарата, но в целом не нужен	Необходим, часто повторяет план надзора за референтным продуктом, но может иметь дополнительные особенности, связанные с разработкой биоаналога
Постмаркетинговые исследования	Не нужны	Часто необходимы, например, для оценки рисков нежелательных явлений и дополнительной оценки иммуногенности
Исследования у детей	Не нужны	В США необходимость педиатрических исследований должна обсуждаться с FDA, однако в них нет необходимости, если доказана взаимозаменяемость его референту. ЕМА не требует проведения педиатрических исследований

(ФНО) наиболее чувствительным показанием является псориаз [18]. В то же время инфликсимаб используется более редко, чем иные биологические препараты для лечения псориаза, и в программы разработки биоаналогичных препаратов показание «псориаз» не включено [19]. В руководстве ВОЗ указано, что для экстраполяции показаний на биоаналог необходимо проводить исследование на популяции с наиболее высоким риском иммунного ответа, что не всегда совпадает с популяцией, наиболее чувствительной к эффекту [7].

Регулирующие органы требуют включения достаточно чувствительных конечных точек, так как их выбор в исследованиях, подтверждающих биоаналогичность, является крайне важным вопросом [20]. Конечные точки, основанные на непрерывных показателях в сравнении с дихотомическими, обычно более чувствительны. Например, использование значений DAS28 в сравнении с ACR20 критерием более обосновано с точки зрения вероятности обнаружения различий, как и использование среднего значения PASI при псориазе более обосновано, чем частота ответа по PASI 75 % [21]. Анализ первичных конечных точек должен быть сфокусирован на дозах, находящихся на восходящей части кривой доза-эффект, так как именно они более чувствительны к обнаружению различий, нежели дозы, находящиеся на плато этой кривой.

В отношении выбора наиболее чувствительного показателя для оценки терапевтической эквивалентности показателем пример с адалимумабом [22]. Различие между плацебо и адалимумабом максимально при лечении псориаза. Вероятно, это связано с тем, что применение адалимумаба в этом случае, в отличие от ревматоидного артрита, осуществляется в режиме монотерапии (табл. 4).

В соответствии с данными базы ClinicalTrials.gov, разработку биоаналогов адалимумаба на этапе III фазы в мире осуществляют восемь компаний, из них четыре проводят исследование только на пациентах с РА, три — только с псориазом, и одна проводит исследования для обеих нозологий (табл. 5).

Очевидно, что РА может рассматриваться в качестве показания выбора для исследований III фазы, учитывая частоту применения препарата при этом заболевании. В то же время псориаз является весьма обоснованным показанием для демонстрации биоаналогичности, учитывая более высокую чувствительность критериев оценки эффективности и более высокий иммуногенный потенциал (нет сопутствующей терапии метотрексатом). Это показание используется для клинической разработки и других препаратов-ингибиторов ФНО [23].

Следует отметить, что длительно применяемые биоаналоги требуют получения данных по безопасности и иммуногенности не менее чем за 12 месяцев [24, 25].

ЭКСТРАПОЛЯЦИЯ ПОКАЗАНИЙ

Обычно доказательства эквивалентности по одному из показаний в рамках основного исследования достаточно для экстраполяции показаний референтного препарата на биоаналог.

Подходы регуляторных органов к экстраполяции данных различны. Наиболее показателен пример с препаратом Remsima/Inflectra (в Российской Федерации — препарат Фламмегис) компании «Celltrion Healthcare Ltd», Корея.

Досье лекарственного препарата включает результат изучения ФК у 250 больных АС в дополнение к основному исследованию эффективности и безопасности у больных РА. ЕМА оценивало АС как приемлемую и чувствительную модель, так как больные

Таблица 4

ОЦЕНКА ПЕРВИЧНЫХ КОНЕЧНЫХ ТОЧЕК ПЛАЦЕБО КОНТРОЛИРОВАННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ АДАЛИМУМАБА

Показание	Сопутствующая терапия	Конечная точка	Неделя	Ответ на адалимумаб	Ответ на плацебо	Стандартизованная по плацебо частота ответа	Источник
РА	МТ	ACR20	24	65	13	52	[39]
	Нет	ACR20	26	46	19	27	[40]
	МТ	ACR20	52	59	24	35	[41]
	Нет	ACR20	24	53	35	18	[42]
ПсА	Нет	ACR20	12	58	14	44	[43]
	Нет	ACR20	24	57	15	42	
	Нет	ACR20	12	39	16	23	[44]
АС	Нет	ASAS20	12	58	21	37	[45]
БК	Нет	Клинический ответ	4	59	37	22	[46]
	Нет	Клинический ответ	4	52	34	18	[47]
	Нет	Клинический ответ	26	54	28	26	[48]
	Нет	Клинический ответ	56	43	18	25	
ЯК	Нет	Клиническая ремиссия	8	18	9	9	[49]
	Нет	Клиническая ремиссия	8	17	9	8	[50]
		Клинический ответ	52	30	18	12	
Псориаз	Нет	PASI75	16	71	7	64	[51]
	Нет	PASI75	16	80	19	61	[52]

ИССЛЕДОВАНИЯ КЛИНИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ БИОАНАЛОГОВ АДАЛИМУМАБА В МИРЕ [23]

Наименование компании	Название препарата	Показание	Начало исследования	Число пациентов	Номер исследования (NCT или EudraCT)
Amgen	ABP-501	Псориаз	2013	350	NCT01970488
		РА	2013	526	NCT01970475
Boehringer Ingelheim	BI 695501	РА	2014	650	NCT02137226 2012-002945-40
Fuji Film Kyowa Kirin Biologics	FKB327	РА	2014	600	NCT02260791 2014-000109-11
Pfizer	PF-06410293	РА	2014	560	NCT02480153 2014-000352-29
Samsung Bioepis	SB5	РА	2014	490	NCT02167139 2013-005013-13
Sandoz/Novartis	GP2017	Псориаз	2013	448	NCT02016105 2013-000747-11
Biocon, Mylan Inc	MYL-1401A	Псориаз	2015	294	2014-003420-46
Coherus biosciences	CHS-1420	Псориаз	2015	500	NCT02489227 2015-000632-15

АС представляют собой в основном молодую популяцию мужчин без сопутствующей патологии, не получающую иммунодепрессанты. На основании результатов исследования на больных РА, АС, оценки структуры и спектра доклинических исследований, продемонстрировавших биоаналогичность «оригинальному» препарату, а также ограниченного опыта применения у небольшого числа больных БК, ЕМА позволяет экстраполировать все показания препарата Ремикейд, в то время как полная экстраполяция не была принята канадским регуляторным органом (Отдел медицинских препаратов и пищевых продуктов, Health Products and Food Branch). В Канаде не была признана обоснованной экстраполяция на биоаналог инфликсимаба показаний, связанных с воспалительными заболеваниями кишечника: БК и ЯК. Основанием стало отсутствие доказательств клинической эквивалентности при существовании различий в механизме реализации клинического эффекта при применении инфликсимаба при воспалительных заболеваниях кишечника и воспалительных заболеваниях суставов и псориазе [26].

В Австралии препарат зарегистрирован на основе данных ЕМА по всем показаниям, имеющимся у Ремикейда [27]. В то же время в Японии включены в показания только РА, БК и ЯК [28].

Важно отметить, что в апреле 2016 года FDA зарегистрировало этот биоаналог, поданный для рассмотрения в FDA в 2014 году (под торговым наименованием Инфлектра), экстраполируя все показания референтного препарата [29]. Препарат был зарегистрирован как биоаналог, а не как взаимозаменяемый препарат. Процедура проводилась в соответствии с ВРСIA [30].

Весьма показательно, что в странах с развитой системой здравоохранения, профессиональными союзами и научными обществами существует неоднозначное отношение к обоснованности экстраполяции показаний биоаналога, в частности для инфликсимаба, даже если продукт одобрен регуляторным органом. Например, Европейское общество по изучению болезни Крона и язвенного колита (European Crohn's and Colitis Organisation, ECCO) критикует решение ЕМА о включении в показания препарата

Ремсима воспалительных заболеваний кишечника. Сотрудники ЕССО полагают, что для включения этих показаний необходимо получение однозначных результатов клинических исследований и заключение органов фармаконадзора [31]. В то же время в Европе предлагают профессиональному сообществу более широко обсуждать программы разработки биоаналогов до этапа решения регуляторного органа [32]. Аналогичная позиция Бразильского научного общества по изучению воспалительных заболеваний кишечника (Brazilian Study Group of Inflammatory Bowel Diseases, GEDIB) заключается в несогласии с решением о регистрации в Бразилии препарата с включением всего спектра показаний биоаналога инфликсимаба, которое было принято регуляторным органом — Национальным агентством наблюдения за здоровьем (Agencia Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA) [33]. В качестве подтверждения подобной позиции приводятся данные исследования препарата, проведенного в Ирландии, которое продемонстрировало повышение частоты необходимости применения глюкокортикостероидов и хирургической помощи у больных, получавших биоаналог инфликсимаба в сравнении с референтным препаратом [34].

ГРАНИЦЫ ЭКВИВАЛЕНТНОСТИ БИОАНАЛОГА ИЛИ НЕ МЕНЬШЕЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ

Одной из важных проблем является величина границы признания эквивалентности биоаналога референтному препарату. В определенной ситуации возможно применение дизайна не меньшей эффективности, но это скорее исключение, чем правило [28].

Обоснование границ эквивалентности должно строиться как на клинических, так и на статистических предпосылках [35, 36].

FDA и ЕМА рекомендуют проведение исследования эквивалентности в рамках заранее обоснованных границ в случае необходимости доказательства сопоставимой клинической эффективности биоаналога и «оригинального» препарата [28]. Регуляторные требования Австралии и Канады также указывают на необходимость предпочтения дизайна эквивалентности, однако допускают возможность проведения исследования не меньшей эффективности в случае

приемлемого обоснования [37]. При этом статистические построения используют данные плацебо-контролируемых исследований референтного препарата, а также данные исследований в сравнении со стандартной терапией. Необходимо учитывать максимальную совокупность данных, так как изменчивость эффекта не может быть учтена при оценке результатов единственного исследования. Так, например, частота ответа на определенную терапию у метотрексат-резистентных больных РА существенно варьирует. В определенных случаях FDA позволяет асимметрично расширять границу отсутствия превосходства относительно границы не меньшей эффективности [9].

Предпочтению дизайна не меньшей эффективности, основанному на меньшей численности, препятствует невозможность исключения более высокой активности биоаналога, что может приводить к более высокой частоте нежелательных явлений и биоаналог не может быть признан таковым, а должен рассматриваться как биологический препарат с более высокой активностью и необходимостью более тщательного клинического изучения [38]. Таким образом, дизайн эквивалентности референтному препарату является более строгим и обоснованным для доказательства биоаналогичности в условиях клинического изучения. Следует отметить, что все девять исследований адалимумаба, представленных в таблице 5, проведены по дизайну исследований эквивалентности. Ряд принципиальных моментов, необходимых для планирования исследований эквивалентности, содержится в руководствах Международной конференции по гармонизации технических требований к регистрации ЛП для медицинского применения (The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, ICH) E9 и E10 [39, 40], а также в «Руководстве по проведению клинических исследований» [41].

Как указано выше, первичная конечная точка исследования эквивалентности или не меньшей эффективности должна быть основана на первичной или вторичной конечной точке основных исследований оригинатора. Скорректированная на плацебо величина эффекта может быть получена на основании проведенного мета-анализа совокупности плацебо-контролируемых исследований «оригинального» препарата.

Наиболее важным и принципиальным моментом планирования подобных исследований является определение границ признания эквивалентности. Они должны быть одобрены регуляторным органом и напрямую влияют на необходимую численность участников исследования. Выбор границ эквивалентности специфичен для каждого из показаний и критериев эффективности (например, DAS28 или ACR20 различны в этом отношении), времени оценки первичной точки, оценки величины эффекта в исторических плацебо-контролируемых исследованиях, статистических рассуждений и клинического обоснования. Нижняя граница 95 % доверительного интервала различия между препаратом сравнения и плацебо обычно является стандартом определения минимально возможной границы, без учета необходимости дальнейшего ее уменьшения для корректной оценки сохранения эффективности препарата сравнения (чем меньше граница, то есть чем более четким является сравнение с референтным препаратом, тем большая численность добровольцев требуется в ис-

следовании). Выбор величины снижения полученного значения для границы признания эквивалентности зависит от степени точности исследования и часто реализуется делением на 2 (использование 50 %) значения нижней границы доверительного интервала, различия препарата сравнения и плацебо [42].

Клиническая значимость границ эквивалентности должна быть подробно обсуждена в контексте совокупности данных по сравнению биоаналога с референтным препаратом.

Например, для биоаналога инфликсимаба (Ремсима/Инфлектра/Фламмэгис) была обоснована разработчиком граница 15 % для оценки ответа по ACR20 на 30-й неделе терапии [9, 16]. Эта граница была согласована с ЕМА и основана на результатах математического анализа, основу которого составило исследование ATTRACT [43]. Она составляла около 50 % от различия точечных значений частот группы терапии инфликсимабом в соответствующем режиме и плацебо. При этом нижняя граница 95 % доверительного интервала (ДИ) разницы частот соответствует приблизительно 17 %. Показательно, что граница в 15 % была принята ЕМА (Комитетом по лекарственным средствам для применения у человека — Committee for Medicinal Products for Human Use, CHMP) при учете всей совокупности предыдущих исследований, подтверждающих биоаналогичность [9, 16].

Такая же граница эквивалентности (15 %) была использована в исследовании III фазы биоаналога инфликсимаба компании «Samsung Bioepis» [44] и в исследовании биоаналога этанерцепта этой же компании [45].

Численность добровольцев, участвующих в исследовании, помимо планируемой статистической значимости, мощности и частоты выбывания напрямую зависит от границы эквивалентности. Исследования инфликсимаба исходили из 5 % двусторонней статистической значимости, мощности 80 % и частоты выбывания 20 %. Очень важно, что численность участников не может быть малой, так как необходимым направлением исследования является оценка безопасности, и для исключения риска появления серьезных нежелательных явлений, частота которых превышает 1 %, необходимо участие не менее 300 пациентов в группе, использующей изучаемый препарат.

Для биоаналогов адалимумаба численность участников исследований составляла 294–650 пациентов (табл. 5), что соответствует численности участников исследований биоаналога инфликсимаба — Ремсима — 606, препарата SB2 — 584, препарата SB4 — 548 пациентов с РА. При условии сходства ряда основных предпосылок, очевидно, что в исследованиях, представленных в таблице 5, граница признания эквивалентности находится около 15 %. Колебания в численности связаны с различиями в планировании частоты выбывания, мощности исследования и незначительных изменений границ. В этой связи следует отметить исследование биоаналога адалимумаба — Эксемптия, которое проведено на 120 пациентах с РА при рандомизации 60 пациентов в группу изучаемого препарата, что было обосновано границей признания эквивалентности для ACR20 на 12 неделе — 28,5 % [46]. В данный момент неясно, будет ли какой-либо зарубежный регуляторный орган требовать проведения исследования с более узким диапазоном призна-

ния эквивалентности, что приведет к необходимости увеличения численности пациентов.

Сходный принцип с выбором широких границ признания эквивалентности был применен в исследовании препарата BOW015 — биоаналога инфликсимаба, 189 пациентов с РА были рандомизированы в соотношении 2:1, при границе признания эквивалентности 23 % [47].

В настоящее время отсутствуют приемлемые открытые данные для обоснования границы признания эквивалентности изучаемого биоаналога по показанию «псориаз». Представленная в таблице 5 численность участников исследований эквивалентности (около 300–650 больных) свидетельствует о более низкой численности, чем в исследованиях на пациентах с РА. Это соответствует более высокой степени различия между плацебо и активным препаратом в сравнении с оценкой различия при РА (табл. 1) и соответственно возможности выбора более широкой границы, чем 15 %.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Вопрос планирования программ разработки биоаналогов, применяемых в ревматологии, не теряет своей актуальности и не может быть формализован до степени полной стандартизации подхода. Возможные варианты, касающиеся степени подтверждения биоаналогичности на доклиническом этапе, безусловно, влияют на вопросы доказательства отсутствия различий, возникающие на клиническом этапе разработки. Балансирование между получением исчерпывающих с точки зрения развития современной науки доказательств биоаналогичности и затратами на разработку биоаналогов делает необходимым постоянное совершенствование требований и подходов к оценке достаточности программ изучения этих препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Федеральный закон Российской Федерации от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств». Available from: <https://goo.gl/JgCdAv>.
2. Государственный реестр лекарственных средств [Интернет]. Available from: <https://grls.rosminzdrav.ru>.
3. U. S. Food and Drug Administration. Biosimilars. Available from: <https://goo.gl/Xy3HsL>.
4. European Medicines Agency. Biosimilar Medicines. Available from: <https://goo.gl/JxefFK>.
5. Guideline on similar biological medicinal products. Available from: <https://goo.gl/XdoSRo>.
6. Taylor L. Over 700 biosimilars now in development worldwide: report. *Pharma Times digital*. 30 September, 2014. Available from: <https://goo.gl/2hzMGT>.
7. Guidelines on evaluation of similar biotherapeutic products. Available from: <https://goo.gl/dFbGwD>.
8. Putrik P, Ramiro S, Kvien TK, Sokka T, Pavlova M, Uhlig T, et al. Inequities in access to biologic and synthetic DMARDs across 46 European countries. *Ann Rheum Dis*. 2014; 73(1): 198–206.
9. Woodcock J. Biosimilar implementation: a progress report from FDA. 2015. Available from: <http://www.fda.gov/NewsEvents/Testimony/ucm463036.htm>.
10. Federal Food, Drug and Cosmetic Act. Available from: <https://goo.gl/4xHjd7>.
11. Public Health Service Act. Available from: <https://legcounsel.house.gov/Comps/PHSA-merged.pdf>.
12. Implementation of the Biologics Price Competition and Innovation Act of 2009. Available from: <https://goo.gl/Ai3RUq>.
13. Биоаналоги: вопросы и ответы относительно реализации Закона о ценовой конкуренции и инновациям биологических препаратов от 2009 г. [Интернет]. Available from: <http://www.pharmadvisor.ru/document/tr3698>.
14. Christl L. Biologics Price Competition and Innovation Act of 2009: FDA's overview of the regulatory guidance for the development and approval of biosimilar products in the US. Available from: <https://goo.gl/iKfcq8>.
15. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. IV. М.: Полиграф-Плюс; 2014.
16. Goel N, Chance K. The biosimilar landscape: a systematic review of its current status. *Arthritis Rheum*. 2014; 66(Suppl 11): S662.
17. van Aerts LA, De Smet K, Reichmann G, van der Laan JW, Schneider CK. Biosimilars entering the clinic without animal studies. A paradigm shift in the European Union. *MABs* 2014; 6(5): 1155–62.
18. Lee H. Is extrapolation of the safety and efficacy data in one indication to another appropriate for biosimilars? *AAPS J* 2014; 16(1): 22–6.
19. Kimball AB, Leonardi C, Stahle M, Gulliver W, Chevrier M, Fakharzadeh S, et al. Demography, baseline disease characteristics and treatment history of patients with psoriasis enrolled in a multicentre, prospective, disease-based registry (PSOLAR). *Br J Dermatol*. 2014; 171(1): 137–47.
20. European Medicines Agency. Guideline on similar biological medicinal products. 2014. Available from: <https://goo.gl/2X5hXM>.
21. Schmitz S, Adams R, Walsh C. The use of continuous data versus binary data in MTC models: A case study in rheumatoid arthritis. *BMC Med Res Methodol* 2012; (12): 167.
22. Lai Z, La Noce A. Key design considerations on comparative clinical efficacy studies for biosimilars: adalimumab as an example. *RMD Open* 2016; 2(1): e000154.
23. Cohen SB, Genovese MC, Choy EH, Perez-Ruis F, Pablos JL, Zhang N, et al. Randomized, double-blind, phase 3 study of efficacy and safety of ABP 501 compared with adalimumab in subjects with moderate to severe rheumatoid arthritis. Available from: <https://goo.gl/qAg3Mv>.
24. Weinblatt ME, Keystone EC, Furst DE, et al. Adalimumab, a fully human anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody, for the treatment of rheumatoid arthritis in patients taking concomitant methotrexate: the ARMADA trial. *Arthritis Rheum*. 2003; 48(1): 35–45.
25. Press relies, April 5, 2016. FDA approves Inflectra, a biosimilar to Remicade. Available from: <https://goo.gl/yrde6m>.
26. Grabowski D, Henderson B, Lam D, Keystone EC, Thorne C, Jamal S, et al. Attitudes towards subsequent entry biologics/biosimilars: a survey of Canadian rheumatologists. *Clin Rheumatol* 2015; 34(8): 1427–33.
27. Australian approval for infliximab biosimilar. Available from: <https://goo.gl/qzMJaT>.
28. Wang J, Chow S-C. On the regulatory approval pathway of biosimilar products. *Pharmaceuticals* 2012; 5(4): 353–68.
29. Press relies, April 5, 2016. FDA approves Inflectra, a biosimilar to Remicade. Available from: <https://goo.gl/cfrX4X>.
30. Title VII: Improving access to innovative medical therapies. Subtitle A: Biologic Price Competition and Innovation. 2010. Available from: <https://goo.gl/qswQeT>.
31. Danese S, Gomollon F. ECCO position statement: the use of biosimilar medicines in the treatment of inflammatory bowel disease (IBD). *J Crohn's Colitis* 2013; 7(7): 586–9.
32. Rompas S, Goss T, Amanuel S, Coutino V, Lai Z, Antonini P, et al. Demonstrating value for biosimilars: a conceptual framework. *Am Health Drug Benefits* 2015; 8(3): 129–39.
33. Teixeira FV. First biosimilar of infliximab approved in Brazil: response from the Brazilian IBD society. *GaBI Journal* 2016; 5(1): 4–5.
34. Murphy C, Sugrue K, Mohamad G, McCarthy J, Buckley M. Biosimilar but not the same. *J Crohn's Colitis* 2015; 9(Suppl 1): S331–2.
35. U. S. Food and Drug Administration. Draft guidance for industry. Non-inferiority clinical trials. 2016. Available from: <https://goo.gl/csfW1o>.
36. European Medicines Agency. Guideline on the choice of the non-inferiority margin. 2005. Available from: <https://goo.gl/nc39WD>.
37. Grabowski D, Henderson B, Lam D, Keystone EC, Thorne C, Jamal S, et al. Attitudes towards subsequent entry biologics/biosimilars: a survey of Canadian rheumatologists. *Clin Rheumatol* 2015; 34(8): 1427–33.
38. Колесникова ЕЮ. Фармакоэпидемиологическое исследование нежелательных реакций при применении разрабатываемых ле-

- нарственных средств. Безопасность и риск фармакотерапии 2014; 3(4): 27–30.
39. ICH E10. Harmonised Tripartite Guideline: Choice of Control Group and Related Issues in Clinical Trials E10. 20 July 2000. Available from: <https://goo.gl/WTdtYQ>.
 40. ICH E9. Harmonised Tripartite Guideline: Statistical Principles for Clinical Trials E9. 5 Feb 1997. Available from: <https://goo.gl/AUtbxi>.
 41. Руководство по проведению клинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К; 2013.
 42. Kay J, Smolen JS. Biosimilars to treat inflammatory arthritis: the challenge of proving identity. *Ann Rheum Dis.* 2013; 72(10): 1589–93.
 43. Maini R, St Clair EW, Breedveld F, Furst D, Kalden J, Weisman M, et al. Infliximab (chimeric anti-tumour necrosis factor alpha monoclonal antibody) versus placebo in rheumatoid arthritis patients receiving concomitant methotrexate: a randomised phase III trial. ATTRACT Study Group. *Lancet.* 1999; 354(9194): 1932–9.
 44. Choe JY, Prodanovic N, Niebrzydowski J, Staykov I, Dokoupilova E, Baranaukaite A, et al. A randomised, double-blind, phase III study comparing SB2, an infliximab biosimilar, to the infliximab reference product Remicade in patients with moderate to severe rheumatoid arthritis despite methotrexate therapy. *Ann Rheum Dis.* 2017; 76(1): 58–64.
 45. Emery P, Vencovsky J, Sylwestrzak A, Leszczynski P, Porawska W, Baranaukaite A, et al. A phase III randomised, double-blind, parallel-group study comparing SB4 with etanercept reference product in patients with active rheumatoid arthritis despite methotrexate therapy. *Ann Rheum Dis.* 2017; 76(1): 51–7.
 46. Jani RH, Gupta R, Bhatia G, Rathi G, Ashok Kumar P, Sharma R, et al. A prospective, randomized, double-blind, multicentre, parallel-group, active controlled study to compare efficacy and safety of biosimilar adalimumab (Exemptia; ZRC-3197) and adalimumab (Humira) in patients with rheumatoid arthritis. *Int J Rheum Dis.* 2016; 19(11): 1157–68.
 47. Kay J, Chopra A, Chandrashekara S, Wyand M. OP0012 A Phase 3, randomized, double-blind, active comparator study of the efficacy and safety of Bow015, a biosimilar Infliximab, in patients with active rheumatoid arthritis on stable Methotrexate doses. *Ann Rheum Dis.* 2014; 73(Suppl 2): 64.

ОБ АВТОРАХ

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Российская Федерация, 127051, Москва, Петровский бульвар, д. 8, стр. 2.
 Горячев Дмитрий Владимирович. Директор Центра экспертизы и контроля готовых лекарственных средств, д-р мед. наук.
 Тельных Марина Юрьевна. Эксперт 1-й категории управления экспертизы лекарственных средств № 3 Центра экспертизы и контроля готовых лекарственных средств, канд. мед. наук.
 Бунятян Наталья Дмитриевна. Главный научный сотрудник Центра клинической фармакологии, д-р мед. наук, проф.

АДРЕС ДЛЯ ПЕРЕПИСКИ

Тельных Марина Юрьевна; telnykh@expmed.ru

REGULATORY APPROACHES TO EVALUATION OF BIOSIMILARS FOR TREATMENT OF RHEUMATIC DISEASES

D. V. Goryachev, M. Yu. Telnykh, N. D. Bunyatyan

Federal State Budgetary Institution
 «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products»
 of the Ministry of Health of the Russian Federation,
 Petrovsky boulevard 8, bld. 2, Moscow 127051, Russian Federation

Abstract: The article discusses the design of development programmes for biosimilars used to treat patients with rheumatic diseases. It analyses the most popular definitions of biosimilars that are used in Russia and abroad, as well as regulatory approaches to establishing biosimilarity. The authors describe the design of confirmatory clinical trials and draw attention to the fact that equivalence margins need to be justified on both clinical and statistical grounds. The article substantiates the need to continuously improve the requirements for and approaches to the assessment of the programmes' applicability to biosimilars evaluation.

Key words: biosimilar products; biosimilars; reference products; regulatory approaches, rheumatic diseases.

For citation: Goryachev DV, Telnykh MYu, Bunyatyan ND. Regulatory approaches to evaluation of biosimilars for treatment of rheumatic diseases. *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products* 2017; 7(3): 155–163.

REFERENCES

1. The Federal Law of the Russian Federation of 12.04.2010 № 61-FZ «On Circulation of Medicines». Available from: <https://goo.gl/JgCdAv> (in Russian).
2. State register of medicines [Internet]. Available from: <https://grls.rosminzdrav.ru> (in Russian).
3. U. S. Food and Drug Administration. Biosimilars. Available from: <https://goo.gl/Xy3HsL>.
4. European Medicines Agency. Biosimilar Medicines. Available from: <https://goo.gl/JxeFFK>.
5. Guideline on similar biological medicinal products. Available from: <https://goo.gl/XdoSRo>.
6. Taylor L. Over 700 biosimilars now in development worldwide: report. *Pharma Times digital.* 30 September, 2014. Available from: <https://goo.gl/2hzMGt>.
7. Guidelines on evaluation of similar biotherapeutic products. Available from: <https://goo.gl/dFbGwD>.
8. Putrik P, Ramiro S, Kvien TK, Sokka T, Pavlova M, Uhlig T, et al. Inequities in access to biologic and synthetic DMARDs across 46 European countries. *Ann Rheum Dis.* 2014; 73(1): 198–206.
9. Woodcock J. Biosimilar implementation: a progress report from FDA. 2015. Available from: <http://www.fda.gov/NewsEvents/Testimony/ucm463036.htm>.
10. Federal Food, Drug and Cosmetic Act. Available from: <https://goo.gl/4xHjd7>.
11. Public Health Service Act. Available from: <https://legcounsel.house.gov/Comps/PHSA-merged.pdf>.
12. Implementation of the Biologics Price Competition and Innovation Act of 2009. Available from: <https://goo.gl/Ai3RUq>.
13. Biosimilars: Questions and answers regarding the implementation of the Biologics Price Competition and Innovation Act of 2009 [Internet]. Available from: <http://www.pharmadvisor.ru/document/tr3698> (in Russian).
14. Christl L. Biologics Price Competition and Innovation Act of 2009: FDA's overview of the regulatory guidance for the development and

- approval of biosimilar products in the US. Available from: <https://goo.gl/Kfcq8>.
15. Guidance on evaluation of medicines. V. IV. Moscow: Poligraf-Plus; 2014 (in Russian).
 16. Goel N, Chance K. The biosimilar landscape: a systematic review of its current status. *Arthritis Rheum*. 2014; 66(Suppl 11): S662.
 17. van Aerts LA, De Smet K, Reichmann G, van der Laan JW, Schneider CK. Biosimilars entering the clinic without animal studies. A paradigm shift in the European Union. *MAbs* 2014; 6(5): 1155–62.
 18. Lee H. Is extrapolation of the safety and efficacy data in one indication to another appropriate for biosimilars? *AAPS J* 2014; 16(1): 22–6.
 19. Kimball AB, Leonardi C, Stahle M, Gulliwier W, Chevrier M, Fakhrazadeh S, et al. Demography, baseline disease characteristics and treatment history of patients with psoriasis enrolled in a multicentre, prospective, disease-based registry (PSOLAR). *Br J Dermatol*. 2014; 171(1): 137–47.
 20. European Medicines Agency. Guideline on similar biological medicinal products. 2014. Available from: <https://goo.gl/2X5hXM>.
 21. Schmitz S, Adams R, Walsh C. The use of continuous data versus binary data in MTC models: A case study in rheumatoid arthritis. *BMC Med Res Methodol* 2012; (12): 167.
 22. Lai Z, La Noce A. Key design considerations on comparative clinical efficacy studies for biosimilars: adalimumab as an example. *RMD Open* 2016; 2(1): e000154.
 23. Cohen SB, Genovese MC, Choy EH, Perez-Ruis F, Pablos JL, Zhang N, et al. Randomized, double-blind, phase 3 study of efficacy and safety of ABP 501 compared with adalimumab in subjects with moderate to severe rheumatoid arthritis. <https://goo.gl/qAg3Mv>.
 24. Weinblatt ME, Keystone EC, Furst DE, et al. Adalimumab, a fully human anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody, for the treatment of rheumatoid arthritis in patients taking concomitant methotrexate: the ARMADA trial. *Arthritis Rheum*. 2003; 48(1): 35–45.
 25. Press relies, April 5, 2016. FDA approves Inflectra, a biosimilar to Remicade. Available from: <https://goo.gl/yrd6Em>.
 26. Grabowski D, Henderson B, Lam D, Keystone EC, Thorne C, Jamal S, et al. Attitudes towards subsequent entry biologics/biosimilars: a survey of Canadian rheumatologists. *Clin Rheumatol* 2015; 34(8): 1427–33.
 27. Australian approval for infliximab biosimilar. Available from: <https://goo.gl/qzMJAT>.
 28. Wang J, Chow S-C. On the regulatory approval pathway of biosimilar products. *Pharmaceuticals* 2012; 5(4): 353–68.
 29. Press relies, April 5, 2016. FDA approves Inflectra, a biosimilar to Remicade. Available from: <https://goo.gl/cfrX4X>.
 30. Title VII: Improving access to innovative medical therapies. Subtitle A: Biologic Price Competition and Innovation. 2010. Available from: <https://goo.gl/qswQeT>.
 31. Danese S, Gomollon F. ECCO position statement: the use of biosimilar medicines in the treatment of inflammatory bowel disease (IBD). *J Crohn's Colitis* 2013; 7(7): 586–9.
 32. Rompas S, Goss T, Amanuel S, Coutino V, Lai Z, Antonini P, et al. Demonstrating value for biosimilars: a conceptual framework. *Am Health Drug Benefits* 2015; 8(3): 129–39.
 33. Teixeira FV. First biosimilar of infliximab approved in Brazil: response from the Brazilian IBD society. *GaBI Journal* 2016; 5(1): 4–5.
 34. Murphy C, Sugrue K, Mohamad G, McCarthy J, Buckley M. Biosimilar but not the same. *J Crohn's Colitis* 2015; 9(Suppl 1): S331–2.
 35. U. S. Food and Drug Administration. Draft guidance for industry. Non-inferiority clinical trials. 2016. Available from: <https://goo.gl/csfW1o>.
 36. European Medicines Agency. Guideline on the choice of the non-inferiority margin. 2005. Available from: <https://goo.gl/nc39WD>.
 37. Grabowski D, Henderson B, Lam D, Keystone EC, Thorne C, Jamal S, et al. Attitudes towards subsequent entry biologics/biosimilars: a survey of Canadian rheumatologists. *Clin Rheumatol* 2015; 34(8): 1427–33.
 38. Kolesnikova EYu. Pharmacoeconomic studies of adverse reactions of developed drugs. Safety and Risk of Pharmacotherapy 2014; 3(4): 27–30 (in Russian).
 39. ICH E10. Harmonised Tripartite Guideline: Choice of Control Group and Related Issues in Clinical Trials E10. 20 July 2000. Available from: <https://goo.gl/WTDtYQ>.
 40. ICH E9. Harmonised Tripartite Guideline: Statistical Principles for Clinical Trials E9. 5 Feb 1997. Available from: <https://goo.gl/AUTbxi>.
 41. Guidance on clinical evaluation of medicines. Part 1. Moscow: Grif i K; 2013 (in Russian).
 42. Kay J, Smolen JS. Biosimilars to treat inflammatory arthritis: the challenge of proving identity. *Ann Rheum Dis*. 2013; 72(10): 1589–93.
 43. Maini R, St Clair EW, Breedveld F, Furst D, Kalden J, Weisman M, et al. Infliximab (chimeric anti-tumour necrosis factor alpha monoclonal antibody) versus placebo in rheumatoid arthritis patients receiving concomitant methotrexate: a randomised phase III trial. ATTRACT Study Group. *Lancet* 1999; 354(9194): 1932–9.
 44. Choe JY, Prodanovic N, Niebrzydowski J, Staykov I, Dokoupilova E, Baranauskaite A, et al. A randomised, double-blind, phase III study comparing SB2, an infliximab biosimilar, to the infliximab reference product Remicade in patients with moderate to severe rheumatoid arthritis despite methotrexate therapy. *Ann Rheum Dis*. 2017; 76(1): 58–64.
 45. Emery P, Vencovsky, J, Sylwestrzak A, Leszczynski P, Porawska W, Baranauskaite A, et al. A phase III randomised, double-blind, parallel-group study comparing SB4 with etanercept reference product in patients with active rheumatoid arthritis despite methotrexate therapy. *Ann Rheum Dis*. 2017; 76(1): 51–7.
 46. Jani RH, Gupta R, Bhatia G, Rath G, Ashok Kumar P, Sharma R, et al. A prospective, randomized, double-blind, multicentre, parallel-group, active controlled study to compare efficacy and safety of biosimilar adalimumab (Exemptia; ZRC-3197) and adalimumab (Humira) in patients with rheumatoid arthritis. *Int J Rheum Dis*. 2016; 19(11): 1157–68.
 47. Kay J, Chopra A, Chandrashekhara S, Wyand M. OP0012 A Phase 3, randomized, double-blind, active comparator study of the efficacy and safety of Bow015, a biosimilar Infliximab, in patients with active rheumatoid arthritis on stable Methotrexate doses. *Ann Rheum Dis*. 2014; 73(Suppl 2): 64.

AUTHORS

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Petrovsky boulevard 8, bld. 2, Moscow 127051, Russian Federation.

Goryachev DV. Director of the Centre for Evaluation and Control of Medicinal Products. Doctor of Medical Sciences.

Telnykh MYu. 1st professional category expert of Division No. 3 for Medicinal Products' Evaluation of the Centre for Evaluation and Control of Medicinal Products. Candidate of Medical Sciences.

Bunyatyay ND. Chief research associate of the Clinical Pharmacology Centre. Doctor of Pharmaceutical Sciences, professor.

CONTACT E-MAIL

Telnykh Marina Yurievna; telnykh@expmed.ru

Обоснование выбора условий определения родственных примесей методом ВЭЖХ в фармацевтической субстанции бисопролола фумарат

О. А. Батурина, Е. В. Чайковская, Е. П. Герникова, Т. Н. Боковикова,
Л. А. Стронова, Ю. Р. Биглова, С. А. Манаева, Е. С. Толмачева

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

Статья поступила 01.06.2017 г. Принята к печати 21.08.2017 г.

Резюме: Проведены информационно-аналитические исследования возможных схем синтеза фармацевтической субстанции бисопролола фумарат, различающихся количеством стадий и исходными продуктами, в зависимости от которых основными идентифицированными примесями являются примеси А, Е и G, в соответствии с монографией Европейской фармакопеи. Проведены сравнительный анализ методик, включенных в действующую нормативную документацию, монографии Европейской фармакопеи и Фармакопеи США, а также сопоставление результатов сравнительных экспериментальных исследований. Отмечено, что при воспроизведении методики определения содержания родственных примесей монографии «Бисопролола фумарат» Европейской фармакопеи наблюдалось четкое разделение основного пика (бисопролола) с пиками примесей А, Е, G, в то время как при выполнении всех требований теста пригодности хроматографической системы монографии Фармакопеи США не достигалось полного разделения пиков бисопролола и примесей. Изучена возможность применения стандартного образца пропранолола гидрохлорида для оценки разрешающей способности системы. Выбраны условия определения родственных примесей в бисопролола фумарате, подобраны хроматографические колонки, предложены критерии пригодности хроматографической системы, в том числе определение разрешения между пиками бисопролола и пропранолола, установлены нормы содержания примесей.

Ключевые слова: бисопролола фумарат; схема синтеза; родственные примеси; высокоэффективная жидкостная хроматография; оптимальные условия определения; критерии пригодности системы.

Библиографическое описание: Батурина ОА, Чайковская ЕВ, Герникова ЕП, Боковикова ТН, Стронова ЛА, Биглова ЮР, Манаева СА, Толмачева ЕС. Обоснование выбора условий определения родственных примесей методом ВЭЖХ в фармацевтической субстанции бисопролола фумарат. Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения 2017; 7(3): 164–169.

Бисопролол — лекарственный препарат группы бета-адреноблокаторов, широко применяемый для лечения сердечно-сосудистых заболеваний и гипертонии, обладает выраженным противоишемическим действием, позволяет снизить уровень артериального давления и нормализовать частоту сердечных сокращений, блокирует выработку адреналина, провоцирующего стойкое повышение артериального давления [1]. Бисопролол включен в «Перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов для медицинского применения на 2017 год» [2, 3], а также в «Перечень основных лекарственных средств Всемирной организации здравоохранения» [4].

В Государственной фармакопее Российской Федерации (ГФ РФ) XIII издания фармакопейная статья на фармацевтическую субстанцию (ФС) бисопролола фумарат не представлена, в связи с этим является актуальным формирование фармакопейного стандарта, регламентирующего качество данной ФС, выбор показателей качества и методов анализа, обоснование вводимых пределов нормирования, выбор стандартных образцов и гармонизация требований к качеству ФС бисопролола фумарат с требованиями ведущих фармакопей мира [5, 6]; и, в частности, является актуальным разработка методики определения родственных примесей для фармакопейной статьи «Бисопролола фумарат» для ГФ РФ XIV издания.

Проведены информационно-аналитические исследования возможных схем синтеза ФС бисопроло-

ла фумарат, представленных при регистрации лекарственного средства, и методик анализа родственных примесей, включенных как в нормативную документацию (НД) так и в монографии Европейской фармакопеи (European Pharmacopoeia, Ph. Eur.) и Фармакопеи США (United States Pharmacopoeia, USP).

В Ph. Eur. приведены структурные формулы и названия возможных примесей бисопролола фумарата (А, В, С, D, Е, G, F, K, L, N, Q, R, S, T, U); при этом три из них (А, Е, G) отнесены к специфическим:

- примесь А — (2RS)-1-(4-гидроксиметил-фенокси)-3-изо-пропиламино-пропан-2-ол;
- примесь Е — (EZ)-[3-[4-(2-изопропокси-этоксиметил)фенокси]аллил]-изопропиламин;
- примесь G — (2RS)-1-[4-[(2-изо-пропокси-этоксид)метокси]метил]-фенокси]-3-изопропиламинопропан-2-ол.

По данным монографии «Бисопролола фумарат» Ph. Eur. и большинства НД (в зависимости от схемы синтеза) основными являются указанные примеси с нормой содержания: примеси А — не более 0,3 %, примеси Е — не более 0,2 %, примеси G — не более 0,5 %, также нормируется содержание любой другой или неидентифицированной примеси — не более 0,1 % и суммы примесей — не более 0,5 %.

В монографии «Бисопролола фумарат» USP не предусмотрены идентификация и нормирование содержания единичных примесей; нормируется только общее их содержание — не более 0,5 % [8].

Анализ технологических процессов получения биспролола фумарата показал, что схемы синтеза данной ФС различаются количеством стадий синтеза и очистки (от четырех до семи) и, соответственно, количеством промежуточных продуктов синтеза, а также основными исходными продуктами: 4-гидроксibenзиловый спирт, 4-гидроксibenзальдегид, оксазолидинона бензальдегид. Так, например, в качестве промежуточных продуктов биспролола фумарата могут быть: (4-(2-изопропоксиэтоксиметил)фенол) — «изофенол», (1-(4-(2-изопропокси-этоксиметил)фенокси)-2,3-эпоксипропан), ($\pm$)-1-[4-[(2-изо-пропоксиэтоксими-метил)фенокси]-3-изопропиламино-2-пропанол. «Изофенол» является предшественником одной из основных примесей, в соответствии с монографией Ph. Eur. — примеси G, содержание которой в ФС нормируется в пределах 0,5 %. Некоторые НД не нормируют содержание указанной примеси, так как технология, используемая при производстве, не предполагает образования примеси G. В случаях, когда в условиях синтеза невозможно образование ненасыщенных соединений, не должна появляться примесь E, иногда при этом ее содержание нормируется — не более 0,1 %. Все другие примеси, которые могут присутствовать в качестве предшественников, побочных продуктов, или продуктов распада, нормируются, как правило, в пределах от 0,1 до 0,2 %.

С целью выбора оптимальных условий испытания методом высокоскоростной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и критериев оценки качества биспролола фумарата по показателю «Родственные примеси» проведен сравнительный анализ методик, включенных в НД и монографии Ph. Eur. и USP.

Большинство НД предусматривают определение родственных примесей в биспролола фумарате в условиях, близких к методике проведения испытания, включенной в действующее издание Ph. Eur. (одна ВЭЖХ методика с градиентным режимом элюирования). В отдельных НД определение примесей проводят в условиях, описанных в предыдущих изданиях Ph. Eur. (две ВЭЖХ методики с градиентным режимом элюирования, одна из которых соответствует методике действующего издания Ph. Eur.) и USP (одна ВЭЖХ методика с изократическим режимом элюирования); при этом идентификация примесей проводится по их относительным временам удерживания (относительно биспролола), а расчет содержания примесей — относительно площади основного пика на хроматограмме стандартного раствора (раствора сравнения) биспролола фумарата.

С целью выбора оптимальных условий определения родственных примесей в ФС биспролола фумарат методом ВЭЖХ и разработки критериев пригодности хроматографической системы проведено сопоставление результатов, полученных при сравнительных экспериментальных исследованиях в условиях, описанных в монографиях «Биспролола фумарат» действующих изданий Ph. Eur. и USP. При этом учитывали, что методика определения родственных примесей должна быть специфичной (позволяет разделять посторонние примеси между собой и отделять их от действующего вещества), обладать достаточной чувствительностью, быть линейной в аналитической области, иметь удовлетворительную прецизионность и правильность [9].

В монографии «Биспролола фумарат» USP предусмотрено хроматографирование на колонке (L7)

4,6 мм $\times$ 12,5 см в изократическом режиме (подвижная фаза (ПФ): вода—ацетонитрил (65:35) с добавлением 5 мл гептафтормасляной кислоты, 5 мл диэтиламина и 2,5 мл муравьиной кислоты) со спектрофотометрическим (СФ) детектированием при длине волны — 273 нм.

В указанных условиях было проведено хроматографирование растворов, методики приготовления которых описаны в монографии, а также растворов с использованием СО, содержащих примеси A, E и G. При воспроизведении методики как на колонках с сорбентом L7 (Hypersil MOS-1, Symmetry C8, LiChrospher 100 RP-8), так и на колонках с сорбентом L1 (Zorbax Eclipse XDB C18, Zorbax SB C18, Hypersil BDS C18, Symmetry C18, LiChrospher 100 RP-18, Luna C18(2)), и выполнении всех требований теста пригодности системы, в том числе разрешения между пиками пропранолола и биспролола не менее 7,0, не достигалось полного разделения пиков биспролола и указанных примесей (рис. 1 и 2).

При хроматографировании в условиях, предусмотренных Ph. Eur. для определения содержания родственных примесей в биспролола фумарате: градиентный режим элюирования с использованием ПФ: A — 10 г/л раствор фосфорной кислоты в воде и B — 10 г/л раствор фосфорной кислоты в ацетонитриле на колонке (сорбент — октадецилсилил силикагель C18, 5 мкм) 250 $\times$ 4,6 мм, температура колонки 20 $\pm$ 2 °C, спектрофотометрическое (СФ) детектирование при длине волны — 225 нм, выполнялись все критерии пригодности хроматографической системы и наблюдалось четкое разделение основного пика с пиками идентифицированных примесей A, E, G (например, разрешение между пиками биспролола и примеси G составляло не менее 2).

Исследование УФ-спектров биспролола фумарата и примесей показало, что наиболее пригодной для их определения является длина волны около 225 нм, при этом указанные примеси могут быть точно определены в пределах 0,1 %.

В дальнейшем, с целью исключения обязательно использования СО примесей A, E, G для проверки пригодности хроматографической системы, была изучена возможность оценки разрешающей способности системы между пиками биспролола и пропранолола в соответствии с монографией Ph. Eur.

При воспроизведении методики на колонках Symmetry C18 (125 A, 335 м²/г, 19 % C), Kromasil C18 (100 A, 340 м²/г, 19 % C), SunFire C18 (100 A, 340 м²/г, 16 % C), Alltima C18 (100 A, 340 м²/г, 16 % C), YMC-pack Pro C18 (120 A, 340 м²/г, 16 % C) время удерживания пика биспролола составляло 20–23 мин, время удерживания пика пропранолола

Таблица 1

РЕЖИМ ХРОМАТОГРАФИРОВАНИЯ

Время, мин	ПФ А, %	ПФ Б, %	Режим
0–4	95	5	Изократический
4–8	95→80	5→20	Линейный градиент
8–15	80	20	Изократический
15–34	80→20	20→80	Линейный градиент
34–36	20	80	Изократический
36–36,1	20→95	80→5	Линейный градиент
36,1–44,0	95	5	Изократический

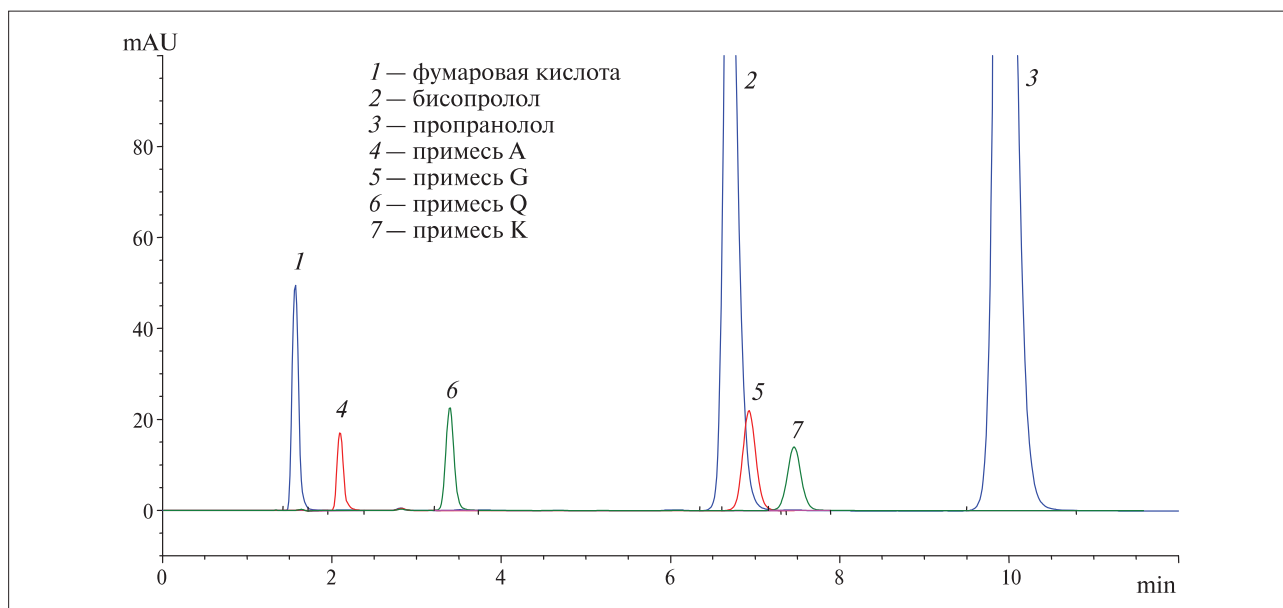


Рис. 1. Хроматограмма разделения бисопролола фумарата, пропранолола и известных примесей на колонке Symmetry C8 150 — 4,6 мм, 5 мкм, полученная в соответствии с USP

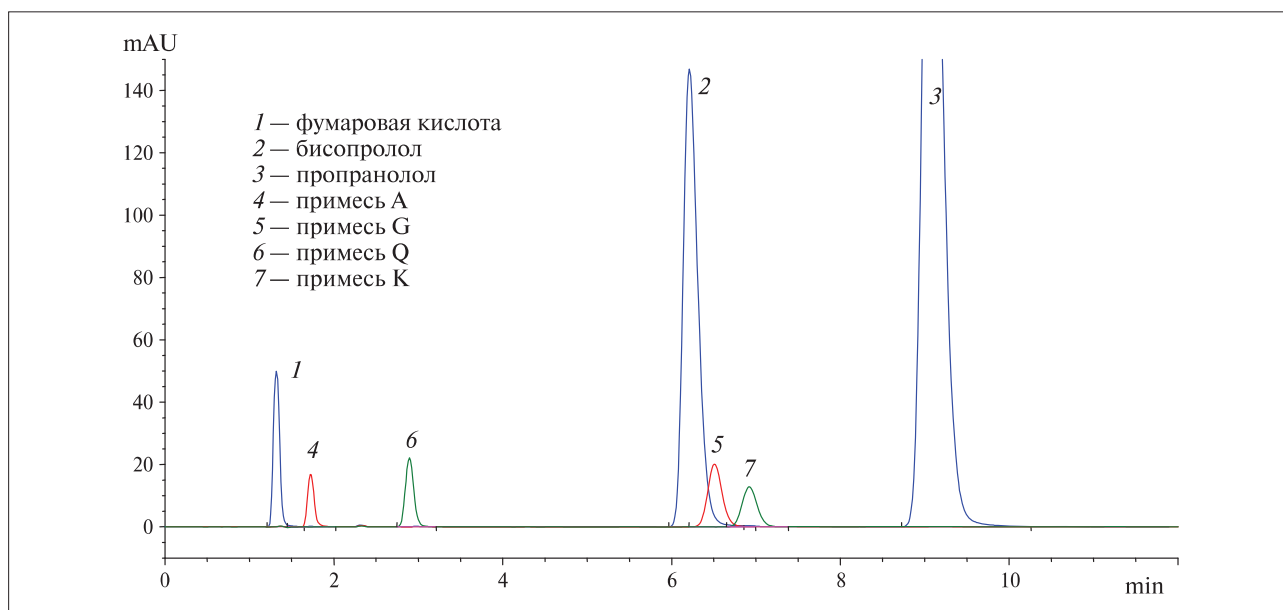


Рис. 2. Хроматограмма разделения бисопролола фумарата, пропранолола и известных примесей на колонке Symmetry C18 150 — 4,6 мм, 5 мкм, полученная в соответствии с USP

составляло 22–25 мин, степень разделения пиков бисопролола и пропранолола составляла от 4,3 до 6,5, при этом относительное время удерживания примеси А — около 0,50, примеси G — около 1,02, примеси Е — около 1,10. Изображения полученных хроматограмм (рис. 3, 4) подтверждают четкое разделение пиков бисопролола и ряда основных идентифицированных примесей при условии разрешения пиков бисопролола и пропранолола.

В результате проведенных исследований выбраны следующие условия определения родственных примесей в ФС бисопролола фумарат методом ВЭЖХ.

Подвижная фаза А (ПФА). 5,8 мл фосфорной кислоты концентрированной доводят водой до 1,0 л.

Подвижная фаза Б (ПФБ). 5,8 мл фосфорной кислоты концентрированной доводят ацетонитрилом до 1,0 л.

Растворитель. Вода для хроматографии — ацетонитрил 80:20.

Испытуемый раствор. Около 50 мг (точная навеска) субстанции растворяют в растворителе и доводят объем растворителем до 50,0 мл.

Раствор сравнения А. 1,0 мл испытуемого раствора доводят растворителем до 100,0 мл (раствор А).

2,0 мл полученного раствора доводят растворителем до 20,0 мл.

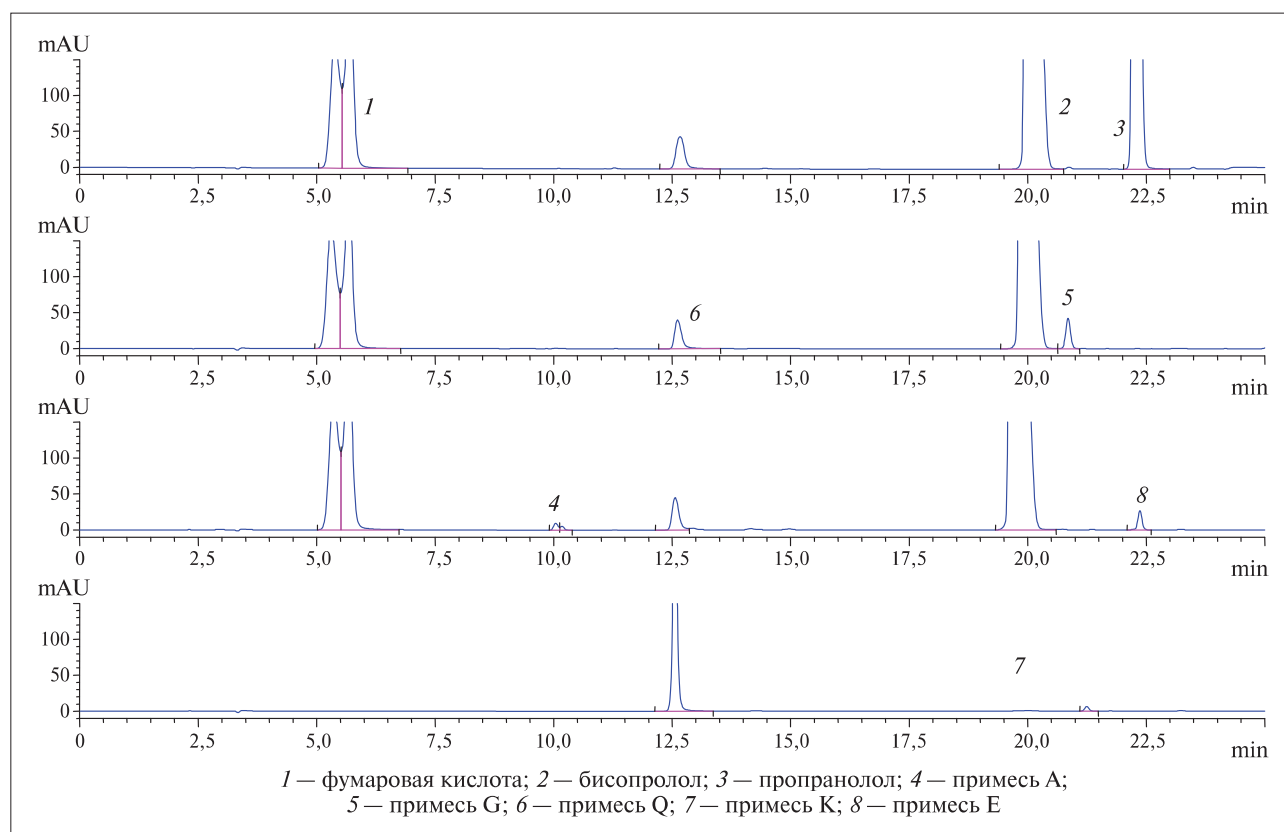


Рис. 3. Хроматограмма разделения бисопролола фумарата, пропранолола и известных примесей на колонке Symmetry C18 250 — 4,6 мм 5 мкм, полученная согласно Ph. Eur.

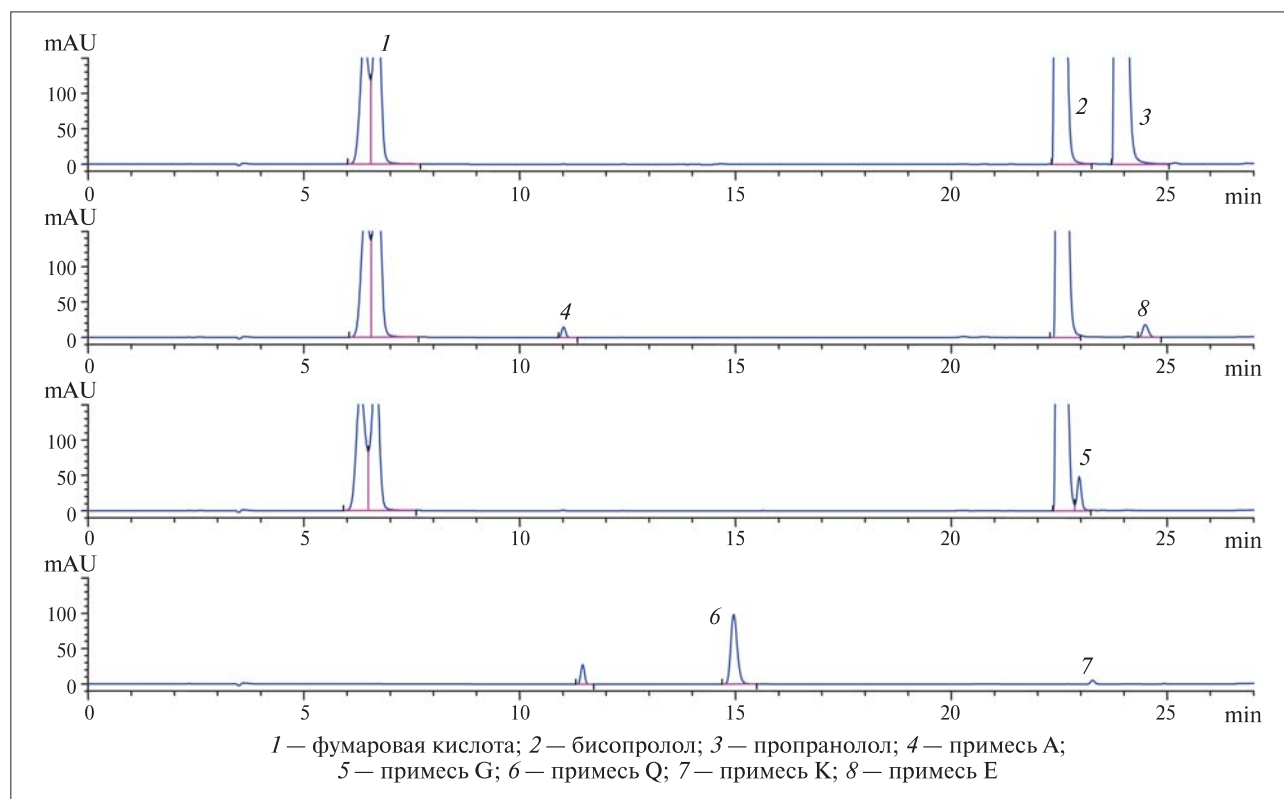


Рис. 4. Хроматограмма разделения бисопролола фумарата, пропранолола и известных примесей на колонке Kromasil C18 250 — 4,6 мм 5 мкм, полученная согласно Ph. Eur.

Раствор сравнения Б. Около 5 мг (точная навеска) пропранолола гидрохлорида растворяют в 10,0 мл испытуемого раствора.

Раствор сравнения В. 2,5 мл раствора А доводят растворителем до 50,0 мл.

Хроматографические условия (объем задержки хроматографа — 1,25 мл)

Колонка	25×0,46 см, октадецилсилил силикагель (С18), 5 мкм, размер пор 100–125 Е, удельная площадь поверхности 335–340 м ² /г, содержание углерода 16–19 %
Температура колонки	20 °С
Скорость потока	1,0 мл/мин
Детектор	спектрофотометрический, 225 нм
Объем пробы	10 мкл

Хроматографируют испытуемый раствор и растворы сравнения А, Б и В.

Проверка пригодности хроматографической системы.

На хроматограмме раствора сравнения Б:

- время удерживания бисопролола должно быть 20 мин ± 10 %;
- *разрешение (R)* между пиками бисопролола и пропранолола должно быть не менее 4;
- *фактор асимметрии пика (A_s)* бисопролола должен быть не более 2,0.

На хроматограмме раствора сравнения А:

- *относительное стандартное отклонение* площади пика бисопролола должно быть не более 5,0 % (6 определений).

На хроматограмме раствора сравнения В:

- *отношение сигнал/шум (S/N)* для пика бисопролола должно быть не менее 10.

Оценка хроматограммы: на хроматограмме испытуемого раствора площадь пика любой единичной примеси не должна превышать площадь пика бисопролола на хроматограмме *раствора сравнения А* (не более 0,1 %); суммарная площадь пиков всех примесей не должна более чем в 5 раз превышать площадь основного пика на хроматограмме *раствора сравнения А* (не более 0,5 %).

Не учитывают пики, площадь которых менее площади основного пика на хроматограмме *раствора*

сравнения В (менее 0,05 %), а также пики растворителя и фумаровой кислоты.

Таким образом, на основании проведенных исследований выбраны оптимальные условия определения родственных примесей в бисопролола фумарате (подобраны хроматографические колонки, дополнен тест проверки пригодности хроматографической системы определением разрешения между пиками бисопролола и пропранолола), предложены критерии оценки содержания родственных примесей в ФС бисопролола фумарат. Разработанная методика включена в проект фармакопейной статьи «Бисопролола фумарат» для ГФ РФ XIV издания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бисопролол (Bisoprolol). Инструкция, применение и формула. Регистр лекарственных средств России [Интернет]. 2017 [cited 2017 June 16]. Available from: <https://goo.gl/PY254m>.
2. Распоряжение Правительства Российской Федерации от 28.12.2016 г. № 2885-р «Об утверждении перечня жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов на 2017 год». Available from: <https://goo.gl/vgvPzL>.
3. Романов БК, Олефир ЮВ, Меркулов ВА, Пегова ЮО. Пересмотр ограниченных перечней лекарственных средств. Безопасность и риск фармакотерапии 2016; (1): 5–9.
4. 19-й Примерный Перечень основных лекарственных средств Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) (апрель 2015 г.) [Интернет]. 2017 [cited 2017 June 16]. Available from: <http://www.apteka.ua/article/333051>.
5. Мионов АН, Сакаева ИВ, Саканян ЕИ, Бунятян НД, Ковалева ЕЛ, Митькина ЛИ, Шемерянкина ТБ, Яшкир ВА. Стандартные образцы в практике зарубежного и отечественного фармацевтического анализа. Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения 2012; (3): 56–60.
6. Ковалева ЕЛ, Багирова ВЛ, Шаназаров КС. Совершенствование методологических подходов к стандартизации фармацевтических субстанций. Химико-фармацевтический журнал 2010; 44(1): 35–42.
7. European Pharmacopoeia Online. European Directorate for the Quality of Medicines [Internet]. 2017 [cited 2017 June 16]. Available from: <http://online.edqm.eu/>.
8. United States Pharmacopeia. 39th ed. [Internet]. 2017 [cited 2017 June 16]. Available from: <http://www.uspnf.com/uspnf>.
9. Митькина ЛИ, Ковалева ЕЛ. Подходы к оценке пригодности аналитических методик при проведении экспертизы качества лекарственных средств. Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения 2012; (2): 6–9.

ОБ АВТОРАХ

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

Батурина Ольга Анатольевна. Главный эксперт лаборатории химико-фармацевтических препаратов № 1 Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, канд. фарм. наук.

Чайковская Екатерина Валерьевна. Эксперт 1-й категории лаборатории химико-фармацевтических препаратов № 1 Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств.

Герникова Евгения Петровна. Главный эксперт лаборатории химико-фармацевтических препаратов № 1 Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, канд. фарм. наук.

Боковикова Татьяна Николаевна. Начальник лаборатории химико-фармацевтических препаратов № 1 Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, д-р фарм. наук.

Стронова Лариса Александровна. Главный эксперт лаборатории химико-фармацевтических препаратов № 1 Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, канд. фарм. наук.

Биглова Юлия Ремовна. Главный эксперт лаборатории химико-фармацевтических препаратов № 1 Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, канд. фарм. наук.

Манева Светлана Алексеевна. Главный эксперт лаборатории химико-фармацевтических препаратов № 1 Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, канд. фарм. наук.

Толмачева Екатерина Сергеевна. Эксперт 1-й категории лаборатории химико-фармацевтических препаратов № 1 Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств.

АДРЕС ДЛЯ ПЕРЕПИСКИ

Боковикова Татьяна Николаевна; Bokovikova@expmed.ru

SUBSTANTIATION OF CONDITIONS FOR DETERMINATION OF RELATED SUBSTANCES IN BISOPROLOL FUMARATE BY HPLC

O. A. Baturina, E. V. Chaykovskaya, E. P. Gernikova, T. N. Bokovikova,
L. A. Stronova, Yu. R. Biglova, S. A. Manaeva, E. S. Tolmacheva

Federal State Budgetary Institution
«Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products»
of the Ministry of Health of the Russian Federation,
Petrovsky boulevard 8, bld. 2, Moscow 127051, Russian Federation

Abstract: The article summarizes the results of information analysis of bisoprolol fumarate synthesis methods which differ in the number of stages and in raw materials used, and are associated with the major identified impurities A, E and G, according to the European Pharmacopoeia (Ph. Eur.). The authors performed a comparative analysis of the test procedures described in manufacturers' quality standards, Ph. Eur. and United States Pharmacopoeia (USP) and analyzed the results of comparative experimental studies. It was shown that the implementation of the Ph. Eur. test method for related impurities according to "Bisoprolol fumarate" monograph demonstrated a high resolution between the main peak (of bisoprolol) and those of impurities A, E and G. Whereas the performance of the chromatographic system suitability testing according to the USP monograph failed to produce complete resolution between the peaks of bisoprolol and the impurities. The authors investigated the possibility of using a propranolol hydrochloride reference standard to assess the system resolution. The authors identified the conditions for determination of related substances in bisoprolol fumarate, selected chromatographic columns, proposed chromatographic system suitability criteria, including resolution between the peaks of bisoprolol and propranolol, and established limits for impurities.

Key words: bisoprolol fumarate; synthesis method; related substances; high-performance liquid chromatography; ideal conditions for determination; system suitability criteria.

For citation: Baturina OA, Chaykovskaya EV, Gernikova EP, Bokovikova TN, Stronova LA, Biglova YuR, Manaeva SA, Tolmacheva ES. Substantiation of conditions for determination of related substances in bisoprolol fumarate by HPLC. The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products 2017; 7(3): 164–169.

REFERENCES

1. Bisoprolol. Patient information, use and formula. Register of medicines marketed in Russia [Internet]. 2017 [cited 2017 June 16]. Available from: <https://goo.gl/PY254m> (in Russian).
2. Order of the Government of the Russian Federation of 28.12.2016, No. 2885-r «On the approval of the list of vital and essential drugs for 2017». Available from: <https://goo.gl/vgvPzL> (in Russian).
3. Romanov BK, Olefir YuV, Merkulov VA, Pegova YuO. The revision of the restrictive lists of medicinal products. Safety and Risks of Pharmacotherapy 2016; (1): 5–9 (in Russian).
4. 19th Model List of Essential Medicines of the World Health Organization (WHO) (April 2015) [Internet]. 2017 [cited 2017 June 16]. Available from: <http://www.apteka.ua/article/333051> (in Russian).
5. Mironov AN, Sakaeva IV, Sakanyan EI, Bunyatyan ND, Kovaleva EL, Mit'kina LI, Shemeryankina TB, Yashkir VA. Reference standards in international and domestic pharmaceutical analysis. The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products 2012; (3): 56–60 (in Russian).
6. Kovaleva EL, Bagirova VL, Shanazarov KS. Developing methodological approaches to standardization of pharmaceuticals. Pharmaceutical Chemistry Journal 2010; 44(1): 35–42 (in Russian).
7. European Pharmacopoeia Online. European Directorate for the Quality of Medicines [Internet]. 2017 [cited 2017 June 16]. Available from: <http://online.edqm.eu/>.
8. United States Pharmacopoeia. 39th ed. [Internet]. 2017 [cited 2017 June 16]. Available from: <http://www.uspnf.com/uspnf>.
9. Mit'kina LI, Kovaleva EL. Approaches to evaluation of analytical methods suitability when performing medicines quality evaluation. The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products 2012; (2): 6–9 (in Russian).

AUTHORS

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Petrovsky boulevard 8, bld. 2, Moscow 127051, Russian Federation.

Baturina OA. Chief expert of the Laboratory of Chemico-Pharmaceutical Preparations No. 1 of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality. Candidate of Pharmaceutical Sciences.

Chaykovskaya EV. 1st professional category expert of the Laboratory of Chemico-Pharmaceutical Preparations No. 1 of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality.

Gernikova EP. Chief expert of the Laboratory of Chemico-Pharmaceutical Preparations No. 1 of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality. Candidate of Pharmaceutical Sciences.

Bokovikova TN. Head of the Laboratory of Chemico-Pharmaceutical Preparations No. 1 of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality. Doctor of Pharmaceutical Sciences.

Stronova LA. Chief expert of the Laboratory of Chemico-Pharmaceutical Preparations No. 1 of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality. Candidate of Pharmaceutical Sciences.

Biglova YuR. Chief expert of the Laboratory of Chemico-Pharmaceutical Preparations No. 1 of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality. Candidate of Pharmaceutical Sciences.

Manaeva SA. Chief expert of the Laboratory of Chemico-Pharmaceutical Preparations No. 1 of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality. Candidate of Pharmaceutical Sciences.

Tolmacheva ES. 1st professional category expert of the Laboratory of Chemico-Pharmaceutical Preparations No. 1 of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality.

CONTACT E-MAIL

Bokovikova Tatyana Nikolaevna; Bokovikova@expmed.ru

Практические рекомендации по выбору неподвижной жидкой фазы и геометрических параметров колонки при определении триэтиламина методом газовой хроматографии

А. Н. Иоутси, М. А. Сумцов, А. Т. Сарницкая, А. Н. Блинов

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

Статья поступила 02.06.2017 г. Принята к печати 21.08.2017 г.

Резюме: В статье представлены результаты экспериментальных исследований по выбору неподвижных жидких фаз (стационарных фаз) для газожидкостной хроматографии, которые можно использовать для контроля содержания остаточного органического растворителя триэтиламина в средствах медицинского применения. Выполнена сравнительная оценка величины относительного стандартного отклонения площади пика триэтиламина, его времени удерживания и фактора асимметрии пика для различных фаз и растворителей. Даны рекомендации по выбору хроматографических колонок для определения триэтиламина.

Ключевые слова: контроль качества; газожидкостная хроматография; стационарные фазы; триэтиламин; фактор асимметрии пика.

Библиографическое описание: Иоутси АН, Сумцов МА, Сарницкая АТ, Блинов АН. Практические рекомендации по выбору неподвижной жидкой фазы и геометрических параметров колонки при определении триэтиламина методом газовой хроматографии. Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения 2017; 7(3): 170–174.

Остаточные органические растворители — это растворители, которые используются на любой стадии производства лекарственного средства и полностью не удаляются после завершения технологического процесса. Предельно допустимое содержание органических растворителей в лекарственных средствах определяется степенью их возможного риска для здоровья человека. Поэтому в экспертизе качества средств медицинского применения важным аспектом является контроль содержания остаточных органических растворителей в фармацевтических субстанциях и в готовых лекарственных формах. Наиболее распространенным для выполнения такой задачи в данной сфере является метод газожидкостной хроматографии (ГЖХ) в сочетании с пламенно-ионизационным детектированием [1, 2].

Среди остаточных органических растворителей многие вещества обладают достаточно высокой полярностью. Определение полярных соединений методом ГЖХ зачастую сопряжено со многими трудностями. Наиболее распространенные — размытый несимметричный хроматографический пик, низкая воспроизводимость площади пика (высокие коэффициент асимметрии пика и относительное стандартное отклонение (RSD) площади пика соответственно), высокий предел обнаружения. Такие проблемы при определении полярных соединений могут возникать, например, вследствие их адсорбции на поверхности хроматографической колонки [3–6].

Большинство применяемых сейчас в фармацевтическом анализе колонок для газожидкостной хроматографии — кварцевые капиллярные колонки, на внутреннюю стенку которых нанесены различные полимерные покрытия. При нанесении полимерного модификатора поверхности производитель всегда

имеет дело с остаточными силанольными группами кварца. Их деактивация — важная стадия производства хроматографической колонки. Одна и та же стационарная фаза, полученная разными производителями, может приводить к различным результатам одного и того же хроматографического определения. Это можно связать как минимум с разной технологией производства и различными способами деактивации остаточных силанольных групп в частности. Стоит отметить, что подобная деактивация при производстве влияет и на свойства лайнеров для инжектора [7, 8].

Данные проблемы — не редкость и в экспертизе средств медицинского применения в случае определения, например, аминов. В данной области методом ГЖХ приходится определять преимущественно алифатические амины, что гораздо сложнее по сравнению с ароматическими (с точки зрения их реакционной способности и адсорбции на внутренней стенке капиллярной колонки). Для того чтобы снизить нежелательные эффекты, важно подобрать подходящую неподвижную фазу (НФ) для конкретного определяемого соединения (или группы соединений). Стоит сопоставить полярность определяемого соединения и самой НФ, подобрать хроматографическую колонку с подходящими для конкретной цели геометрическими параметрами. Мы предлагаем рассмотреть основные критерии выбора колонки для газохроматографического анализа полярного триэтиламина (ТЭА), поскольку часто трудно выполнить требования о факторе асимметрии его пика и эффективности хроматографической системы в нормативных документах фирм производителей.

Цель данной работы состоит в том, чтобы выбрать неподвижные фазы для определения ТЭА, которые

позволят получить высокие хроматографические параметры его пика на хроматограммах и, как следствие, достоверно определить его содержание.

Методики определения ТЭА в субстанциях и лекарственных препаратах в значительной степени предполагают шприцевой ввод жидких проб в хроматографическую систему. Поэтому полезно исследовать, как выбор растворителя для приготовления анализируемых растворов ТЭА влияет на некоторые хроматографические параметры его пика (асимметрию, воспроизводимость площадей и времен удерживания).

Не стоит забывать о многообразии хроматографического оборудования, доступного разнообразия колонок, лайнеров и т.д. Все это различается и развито не в одинаковой степени на заводах, предприятиях и фармацевтических фирмах. Таким образом, авторы статей не могут претендовать на полное воспроизведение хроматографических параметров для пика ТЭА, полученных с помощью нашего оборудования и оснащения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали триэтиламин (аналитический стандарт, «Merck», Германия), N,N-диметилформамид (химически чистый, «Fluka», США), хлороформ (особой чистоты, «Компонент-Реактив», Россия), гидроксид натрия (чистый для анализа, «Sigma-Aldrich», США). Для приготовления растворов использовали весы аналитические («Mettler Toledo», Германия), систему очистки воды Milli-Q Integral 5 («Millipore», Франция). Для газохроматографического анализа использовали газовый хроматограф Agilent 7890A с пламенно-ионизационным детектором, оснащенный автосэмплером Agilent 7683B («Agilent Technologies», США).

В качестве подвижной фазы использовали гелий. В качестве НФ использовали хроматографические капиллярные колонки, которые, как правило, рекомендуют к использованию в нормативных документах предприятий-производителей:

— DB-624 (30 м × 0,32 мм × 1,8 мкм; 30 м × 0,53 мм × 3,0 мкм, «Agilent Technologies», США) и VF-1301ms (30 м × 0,32 мм × 0,25 мкм, «Agilent Technologies», Нидерланды) с модификатором капилляра 6 % цианопропилфенил- / 94 % диметилполисилоксан;

— DB-5 (30 м × 0,32 мм × 0,25 мкм; 30 м × 0,32 мм × 1,00 мкм; 30 м × 0,53 мм × 3,0 мкм, «Agilent Technologies», США) с модификатором капилляра 5 % дифенил- / 95 % диметилполисилоксан;

— DB-1-ms, DB-1 (30 м × 0,32 мм × 0,25 мкм; 30 м × 0,53 мм × 3,0 мкм), HP-1 (30 м × 0,32 мм × 1,00 мкм, «Agilent Technologies», США) с 100 % диметилполисилоксаном в качестве модификатора капилляра;

— Stabilwax (30 м × 0,32 мм × 1,00 мкм, «Restek», США) со 100 % полиэтиленгликолем в качестве модификатора капилляра;

— Rtx-5 Amine (30 м × 0,32 мм × 1,5 мкм; 30 м × 0,53 мм × 3,0 мкм, «Restek», США) для определения аминокислот [9].

В работе использовали растворы ТЭА в N,N-диметилформамиде (ДМФА), деионизованной воде и

хлороформе с концентрацией 0,08 мг/мл. Данная концентрация соответствует порядку предельно допустимого содержания ТЭА (не более 0,05 %). Приготовление растворов ТЭА в воде и ДМФА осуществляли путем растворения точной навески в соответствующем растворителе. Раствор в хлороформе получали экстракцией ТЭА хлороформом из водного раствора с добавлением 1 М раствора гидроксида натрия. Все растворы хранили при температуре 4 °С.

Около 1,5 мл раствора ТЭА перед анализом помещали в вials для автосемплера и осуществляли ввод 0,2 мкл жидкой фазы в хроматографическую колонку. Для анализа использовали хроматографические условия, указанные в нормативных документах фирм-производителей. Регистрировали хроматограммы и проводили обработку результатов с помощью программного обеспечения ChemStation.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При работе с таким полярным азотсодержащим соединением, как ТЭА, высокое влияние на качество пиков на хроматограммах и результат хроматографического определения оказывает различие в полярности модифицирующих пленок НФ для ГЖХ.

Если фазы на основе 100 % диметилполисилоксана (DB-1) или содержащие 5 % дифенилполисилоксана (DB-5) являются неполярными, то включение цианопропилфенилполисилоксана в состав модифицирующей капилляр пленки (6 % в DB-624) приводит к увеличению полярности соответствующих НФ. Стационарные фазы на основе полиэтиленгликоля (100 % полиэтиленгликоль в DB-WAX) — высокополярные НФ.

Стоит также учитывать природу растворителей, в которых готовят растворы ТЭА. Вода — полярный протонный растворитель, способный в зависимости от условий и определяемых соединений служить как донором, так и акцептором протонов для молекул аналита, сольватировать его. Кроме того, при использовании такого растворителя нельзя исключать образование водородных связей с поверхностью сорбента и, как следствие, изменение его хроматографических свойств. ДМФА и хлороформ — апротонные растворители с различной полярностью.

При рассмотрении влияния геометрических параметров колонки на хроматографическое поведение ТЭА наблюдали закономерность: при одной и той же длине колонки с ростом толщины модифицирующей пленки возрастает время удерживания ТЭА. Фактор асимметрии для многих сорбентов снижается с увеличением толщины модифицирующей пленки (табл. 1, 2). Для величины эффективности хроматографической системы не наблюдалось какой-либо строгой зависимости от полярности рассмотренных видов стационарных фаз.

Для всех растворителей и большинства сорбентов наилучшие результаты по асимметрии и воспроизводимости площади пика и времени удерживания ТЭА были получены при параметрах колонки 30 м × 0,53 мм × 3,0 мкм. Фактор асимметрии пика ТЭА составил для различных колонок 1,06–2,45 при использовании хлороформа в качестве растворителя и 1,06–2,42 для ДМФА. Что касается воспроизводимости площади пика, ДМФА зарекомендовал себя

Таблица 1

**ВЛИЯНИЕ СОСТАВА НЕПОДВИЖНОЙ ФАЗЫ И ГЕОМЕТРИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ КОЛОНКИ
НА ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ПОВЕДЕНИЕ ТРИЭТИЛАМИНА (РАСТВОРИТЕЛЬ ХЛОРОФОРМ)**

Колонка	Геометрические параметры колонки, м×мм×мкм	Хроматографические параметры				
		t_R , мин	NN, ТТ	As	RSD(S), % $n = 5$	RSD(t_R), % $n = 5$
DB-624	30×0,32×0,25	2,61	12800	6,91	3,86	0,18
	30×0,32×1,80	6,52	28900	4,20	7,50	0,11
	30×0,53×3,00	9,42	108900	2,45	4,06	0,19
DB-5	30×0,32×0,25	5,43	10100	18,9	0,21	0,79
	30×0,32×1,00	9,21	498800	1,68	7,69	0,002
	30×0,53×3,00	6,68	160400	1,94	0,70	0,05
WAX	30×0,32×1,00	—	—	—	—	—
DB-1	30×0,32×0,25	4,27	56900	11,88	1,77	0,04
	30×0,32×1,00	5,58	28700	10,55	1,22	0,05
	30×0,53×3,00	7,39	279700	1,06	1,66	0,02

Таблица 2

**ВЛИЯНИЕ СОСТАВА НЕПОДВИЖНОЙ ФАЗЫ И ГЕОМЕТРИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ КОЛОНКИ
НА ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ПОВЕДЕНИЕ ТРИЭТИЛАМИНА (РАСТВОРИТЕЛЬ N,N-ДИМЕТИЛФОРМАМИД)**

Колонка	Геометрические параметры колонки, м×мм×мкм	Хроматографические параметры				
		t_R , мин	NN, ТТ	As	RSD(S), % $n = 5$	RSD(t_R), % $n = 5$
DB-624	30×0,32×0,25	2,54	22000	9,75	0,52	0,15
	30×0,32×1,80	6,50	31800	4,41	7,79	0,06
	30×0,53×3,00	9,39	111000	2,42	1,80	0,08
DB-5	30×0,32×0,25	5,29	13500	21,2	3,36	0,05
	30×0,32×1,00	9,20	436000	1,70	6,01	0,004
	30×0,53×3,00	6,66	165800	1,88	1,13	0,02
WAX	30×0,32×1,00	4,45	2500	2,76	3,37	0,22
DB-1	30×0,32×0,25	4,21	53100	9,60	1,48	0,14
	30×0,32×1,00	5,50	34700	8,57	1,96	0,02
	30×0,53×3,00	7,39	281600	1,06	4,81	0,01

наиболее удачно (при низком факторе асимметрии пика) на колонках DB-5 и DB-624 ($RSD = 1,13\%$ и $1,80\%$ соответственно). Подобные результаты с ис-

пользованием хлороформа были получены на сорбентах DB-5 ($RSD = 0,70\%$) и DB-1 ($RSD = 1,66\%$). Однако в большинстве случаев эффективность хроматографической системы оказывается выше при использовании ДМФА в качестве растворителя. Однако оба растворителя — ДМФА и хлороформ — позволяют выполнить требования к эффективности хроматографической системы и симметрии пика, выставляемые фирмами-производителями.

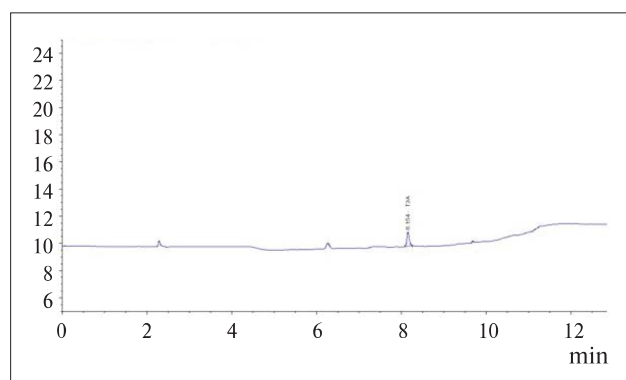


Рис. 1. Хроматограмма раствора триэтиламина в воде на колонке Rtx-5 Amine (30 м × 0,53 мм × 3,0 мкм). Температурный режим: 60 °С в течение 7 мин, подъем до 220 °С со скоростью 40 °С/мин с задержкой 3 мин, скорость потока газа-носителя 25,0 см/сек, деление потока 5:1

Таблица 3

**ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ПОВЕДЕНИЕ
ТРИЭТИЛАМИНА НА КОЛОНКЕ RTX-5 AMINE
(30 м × 0,53 мм × 3,00 мкм)**

Растворитель	t_R , мин	NN, ТТ	As	RSD(S), % $n = 5$	RSD(t_R), % $n = 5$
Хлороформ	8,12	107200	1,15	5,07	0,07
ДМФА	8,12	105400	1,11	2,97	0,04
Вода	8,15	103600	1,55	26,09	0,005

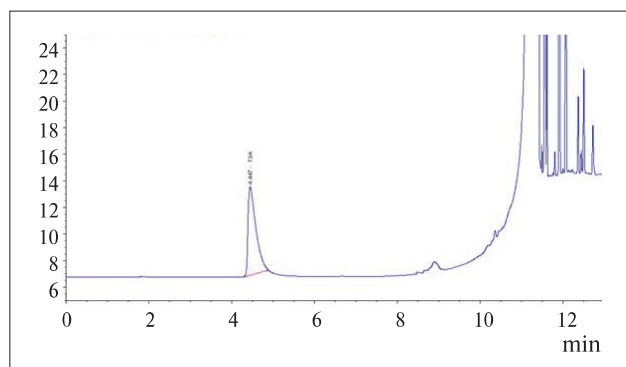


Рис. 2. Хроматограмма раствора триэтиламина в *N,N*-диметилформамиде на колонке *Stabilwax* (30 м × 0,32 мм × 1,0 мкм). Температурный режим: 50 °С в течение 7 мин, подъем до 200 °С со скоростью 40 °С/мин с задержкой 3 мин, скорость потока газа-носителя 29,4 см/сек, деление потока 5:1

В водных растворах идентифицировать пик ТЭА на хроматограммах удалось только для колонок DB-5 (30 м × 0,53 мм × 3,0 мкм), DB-1 и Rtx-5 Amine, то есть на неполярных НФ, где суммарное воздействие воды на аналит и сорбент менее выражено (рис. 1).

Хроматографические параметры пика ТЭА, полученные на колонке Rtx-5 Amine для работы с полярными соединениями, позволяют рекомендовать ее для определения ТЭА (табл. 3).

Для колонки *Stabilwax* с полярным полимерным модификатором полиэтиленгликолем фактор асимметрии пика ТЭА и RSD площади пика выше, чем у остальных колонок.

При использовании водного раствора ТЭА его пик не был идентифицирован. Это согласуется с предположением о взаимодействии воды с поверхностью сорбента, а также возможным ее влиянием на сам ТЭА. В случае хлороформного экстракта пик ТЭА очень несимметричный и не разрешается с пиком хлороформа до базовой линии. Это затрудняет интегрирование пика на хроматограмме и расчет его концентрации в растворе.

Только при использовании раствора ТЭА в ДМФА удалось идентифицировать пик данного аминосоединения с фактором асимметрии 2,76 и RSD площади пика 3,37 % (рис. 2).

ВЫВОДЫ

Результаты проведенного исследования позволяют рекомендовать колонки типа DB-1, DB-5 и Rtx-5 Amine для контроля содержания ТЭА в средствах медицинского применения. С использованием данных колонок получено RSD площади пика ТЭА от 0,52 % ($n = 5$), фактор асимметрии пика — от 1,11. Для получения высоких хроматографических параметров предпочтительно использовать колонки с геометрией 30 м × 0,53 мм и высокой толщиной модифицирующей пленки (конкретная величина зависит от типа фазы и производителя).

При использовании водных растворов пик ТЭА наиболее размыт и RSD его площади достигает в отдельных случаях 45 % (для колонки DB-1). В случае колонки DB-WAX пик вообще не идентифицируется. Растворители хлороформ и ДМФА позволяют получить высокую воспроизводимость площадей и времен удерживания пика ТЭА, а также добиться достаточно низкого фактора асимметрии пика ТЭА (до 1,8).

Выбор того или иного растворителя следует делать, учитывая свойства и особенности конкретного лекарственного препарата (или фармацевтической субстанции).

ЛИТЕРАТУРА

1. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. I. М.; 2015. Available from: <http://femb.ru/feml>.
2. European Pharmacopoeia. 9th ed. Strasbourg; 2017.
3. Kataoka H. Gas chromatography with selective detectors for amines. In: Encyclopedia of Analytical chemistry. John Wiley & Sons; 2006. P. 1–31.
4. Duff KJ. Gas and liquid chromatography, column selection for, in drug analysis. In: Encyclopedia of Analytical chemistry. John Wiley & Sons; 2006. P. 1–51.
5. Tian J, Chen G, He Z. Overcoming matrix effects: GC method development for the determination of triethylamine and dimethyl sulfoxide in a drug substance. J Chromatogr Sci. 2014; 52(1): 36–41.
6. Namiesnik J, Jastrzebska A, Zygmunt B. Determination of volatile aliphatic amines in air by solid-phase microextraction coupled with gas chromatography with flame ionization detection. J Chromatogr A 2003; 1016(1): 1–9.
7. de Zeeuw J. Peak tailing in GC trace analysis [Internet]. Available from: <https://goo.gl/yc7G7Z>.
8. How column inertness improves the chromatography of basic compounds [Internet]. Available from: <https://goo.gl/zVLU5N>.
9. Rtx-5 Amine columns [Internet]. Available from: <https://goo.gl/cxMM5r>.

ОБ АВТОРАХ

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Российская Федерация, 127051, Москва, Петровский бульвар, д. 8, стр. 2.
 Иоутси Анна Николаевна. Эксперт 2-й категории сектора ГЖХ контрольно-координационной лаборатории Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, канд. хим. наук.
 Сумцов Михаил Александрович. Начальник сектора ГЖХ контрольно-координационной лаборатории Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, канд. фарм. наук.
 Сарницкая Анастасия Тарасовна. Ведущий эксперт сектора ГЖХ контрольно-координационной лаборатории Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств.
 Блинов Антон Николаевич. Эксперт 1-й категории сектора ГЖХ контрольно-координационной лаборатории Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств.

АДРЕС ДЛЯ ПЕРЕПИСКИ

Иоутси Анна Николаевна; Youtsis@expmed.ru

RECOMMENDATIONS FOR SELECTION OF A LIQUID STATIONARY PHASE AND GEOMETRIC PARAMETERS OF THE COLUMN WHEN DETERMINING TRIETHYLAMINE BY GAS CHROMATOGRAPHY

A. N. Ioutsy, M. A. Sumtsov, A. T. Sarnitskaya, A. N. Blinov

Federal State Budgetary Institution
«Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products»
of the Ministry of Health of the Russian Federation,
Petrovsky boulevard 8, bld. 2, Moscow 127051, Russian Federation

Abstract: The article summarises the results of experimental studies that compared liquid stationary phases used in GC for determination of triethylamine residual solvent in medicinal products. It discusses the results of comparative evaluation of triethylamine peak area RSDs, retention times and tailing factors for different phases and solvents. The authors give recommendations concerning selection of chromatographic columns for triethylamine determination.

Key words: quality control; gas chromatography; stationary phase; triethylamine; tailing factor.

For citation: Ioutsy AN, Sumtsov MA, Sarnitskaya AT, Blinov AN. Recommendations for selection of a liquid stationary phase and geometric parameters of the column when determining triethylamine by gas chromatography. The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products 2017; (3): 170–174.

REFERENCES

1. The State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 13th ed. V. I. Moscow; 2015. Available from: <http://femb.ru/feml> (in Russian).
2. European Pharmacopoeia. 9th ed. Strasbourg; 2017.
3. Kataoka H. Gas chromatography with selective detectors for amines. In: Encyclopedia of Analytical chemistry. John Wiley & Sons; 2006. P. 1–31.
4. Duff KJ. Gas and liquid chromatography, column selection for, in drug analysis. In: Encyclopedia of Analytical chemistry. John Wiley & Sons; 2006. P. 1–51.
5. Tian J, Chen G, He Z. Overcoming matrix effects: GC method development for the determination of triethylamine and dimethyl sulfoxide in a drug substance. J Chromatogr Sci. 2014; 52(1): 36–41.
6. Namiesnik J, Jastrzebska A, Zygmunt B. Determination of volatile aliphatic amines in air by solid-phase microextraction coupled with gas chromatography with flame ionization detection. J Chromatogr A 2003; 1016(1): 1–9.
7. de Zeeuw J. Peak tailing in GC trace analysis [Internet]. Available from: <https://goo.gl/yc7G7Z>.
8. How column inertness improves the chromatography of basic compounds [Internet]. Available from: <https://goo.gl/zVLU5N>.
9. Rtx-5 Amine columns [Internet]. Available from: <https://goo.gl/cxMM5r>.

AUTHORS

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Petrovsky boulevard 8, bld. 2, Moscow 127051, Russian Federation.

Ioutsy AN. 2nd professional category expert of the GC Sector of the Laboratory for Control and Coordination of Testing of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality. Candidate of Chemical Sciences.

Sumtsov MA. Head of the GC Sector of the Laboratory for Control and Coordination of Testing of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality. Candidate of Pharmaceutical Sciences.

Sarnitskaya AT. Leading expert of the GC Sector of the Laboratory for Control and Coordination of Testing of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality.

Blinov AN. 1st professional category expert of the GC Sector of the Laboratory for Control and Coordination of Testing of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality.

CONTACT E-MAIL

Ioutsy Anna Nikolaevna; Youtsy@expmed.ru

Валидация методики определения аминокислотного состава фармацевтической субстанции «Глатирамера ацетат» методом ^{13}C ЯМР-спектроскопии

Н. Е. Кузьмина, С. В. Моисеев, В. И. Крылов, А. А. Кутин,
Е. А. Жуков, В. А. Яшкир, В. А. Меркулов

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

Статья поступила 29.03.2017 г. Принята к печати 21.08.2017 г.

Резюме: Описана процедура валидации методики определения аминокислотного состава фармацевтической субстанции «Глатирамера ацетат» методом ^{13}C ЯМР-спектроскопии, которая позволяет измерять мольное отношение аминокислот, входящих в состав глатирамера ацетата, без использования соответствующих стандартных образцов. Проведена оценка правильности, линейности, сходимости, внутрилабораторной прецизионности, и специфичности валидируемой методики. На основе измеренных коэффициентов «найденно : введено» для L-Glu, L-Ala, L-Tyr и L-Lys были рассчитаны систематические погрешности, стандартные отклонения, доверительные интервалы, коэффициенты вариации, F-критерии Фишера и t-критерии Стьюдента результатов измерения мольного отношения аминокислот. Показано, что полученные статистические характеристики удовлетворяют критериям приемлемости валидационных параметров, представленным в отечественной и зарубежной нормативной документации.

Ключевые слова: глатирамера ацетат; метод ^{13}C ЯМР-спектроскопии; аминокислотный состав; валидация аналитической методики; линейность; правильность; сходимость; прецизионность.

Библиографическое описание: Кузьмина НЕ, Моисеев СВ, Крылов ВИ, Кутин АА, Жуков ЕА, Яшкир ВА, Меркулов ВА. Валидация методики определения аминокислотного состава фармацевтической субстанции «Глатирамера ацетат» методом ^{13}C ЯМР-спектроскопии. Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения 2017; 7(3): 175–181.

Глатирамера ацетат (ГА) является одним из базовых препаратов терапии ремиттирующего рассеянного склероза [1] и представляет собой смесь ацетатных солей, не имеющих одинаковой аминокислотной последовательности, синтетических сополимеров L-тирозина (L-Tyr), L-лизина (L-Lys), L-аланина (L-Ala) и L-глутаминовой кислоты (L-Glu) со средней молекулярной массой 5–9 кДа. ГА характеризуется воспроизводимым составом комплекса аминокислотных последовательностей: молярное процентное содержание каждой аминокислоты составляет 13±15, 39±46, 8,6±10, 30±37 % для L-Glu, L-Ala, L-Tyr и L-Lys соответственно.

Важным этапом контроля качества фармацевтических субстанций ГА является анализ его аминокислотного состава. В рамках применяемой в фармакопейном анализе методики определение относительного молярного содержания аминокислотных остатков в субстанции ГА проводят методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС), используя продукт полного гидролиза ГА и набор стандартных образцов аминокислот, входящих в его состав. Нами была разработана методика количественного определения аминокислотного состава ГА методом ЯМР-спектроскопии на ядрах ^1H и ^{13}C , которая характеризуется меньшими трудовыми и временными затратами, чем фармакопейная методика [2]. Метод ЯМР-спектроскопии является абсолютным методом измерения мольного отношения анализируемых компонентов смеси и не нуждается в использовании стандартных образцов и построении градуировочной функции [3, 4].

Цель данной работы – валидация разработанной методики для ее применения в фармакопейном анализе при контроле качества субстанций ГА по показателю «аминокислотный состав». Мы ограничились ЯМР-спектроскопией на ядрах ^{13}C , так как она характеризуется большей селективностью: в спектрах ^{13}C меньше вероятность перекрывания сигналов основных и примесных компонентов по сравнению со спектром ^1H .

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Валидацию методики проводили на образцах лекарственных субстанций «Глатирамера ацетат» производства «Teva», Израиль, серии 242900515 (I), 242965714 (II) и модельных смесях III–VI с мольным процентным соотношением аминокислот L-Glu:L-Ala:L-Tyr:L-Lys 14,1:39,8:9,5:36,6 (I); 15,0:40,5:9,9:33,5 (II); 15,4:45,1:9,3:30,1 (III); 12,4:53,5:5,9:28,2 (IV); 19,9:48,0:9,1:23,1 (V); 16,4:52,5:8,5:22,9 (VI) и 10,2:34,14:10,73:44,92 (VII). Мольное процентное соотношение аминокислот в модельных смесях подбирали с учетом требований к диапазону применения методик количественного определения активного компонента субстанции или готового лекарственного препарата [5–7] (80±120 % от номинального содержания аминокислоты в ГА). Модельные смеси готовили из фармакопейных стандартных образцов (USP reference standard) гидрохлорида L-Glu (кат. № 1294987), гидрохлорида L-Lys (кат. № 1372005), L-Tyr (кат. № 1705006), L-Ala (кат. № 1012509). Модельные смеси растворяли в 0,5 мл

5 % раствора фенола («Sigma-Aldrich») в D_2O («Cambridge Isotope Laboratories, Inc.») и доводили pH растворов соляной кислотой до двух. Регистрацию спектров ^{13}C исследуемых образцов проводили на ЯМР-спектрометре Agilent DD2 NMR System 600 (США).

Расчетный спектр ^{13}C смеси продуктов гидролиза ГА и родственных примесных соединений смоделирован с использованием программного обеспечения ACD/Lab Release 2012 (лиценз. № 55576).

Валидируемая методика

Гидролиз ГА проводят в реакционной виае емкостью 1 мл. 10 мг субстанции ГА (точная навеска не обязательна) растворяют в 0,1 мл концентрированной HCl («Sigma-Aldrich»). Раствор нагревают при 105 °C в течение 5 часов, охлаждают до комнатной температуры, затем удаляют избыток HCl под вакуумом. Остаток растворяют в 0,5 мл 5 % раствора фенола в D_2O . Спектры ^{13}C регистрируют при температуре 27 °C (угол поворота намагниченности 45 °, время релаксации 1 с, число накоплений 10000, число точек аналого-цифрового преобразования 64 к, экспоненциальное умножение 1 Гц, автоматическая коррекция базовой линии спектра, ручная настройка фазы). Калибровку шкалы химических сдвигов осуществляют относительно внутреннего стандарта — фенола (δ , м.д.: 123,29 для p-CH). Измеряют нормированные интегральные интенсивности (S'_i) сигналов α -CH-групп аминокислот: 51,36 (L-Ala), 54,69 (L-Glu), 55,26 (L-Lys), 56,79 м.д. (L-Tyr). Нормировку проводят, принимая суммарную интегральную интенсивность сигналов α -CH-групп аминокислот за 100 %. Относительное молярное содержание аминокислоты в исследуемом образце (X_i) равно измеренной нормированной интегральной интенсивности сигнала ее α -CH-группы. В рамках одного эксперимента рассчитывают три значения аминокислотного состава, варьируя настройку фазы сигналов и корректировку базовой линии Фурье-преобразованного спектра. Итоговые величины определяют как среднее арифметическое измеренных значений.

В качестве референтной использовали методику определения аминокислотного состава ГА методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии [2]. Определение аминокислотного состава модельных смесей аминокислот и продуктов гидролиза субстанций ГА проводили с использованием жидкостного хроматографа с масс-детектором Waters Acquity QToF на капиллярной колонке Sielc (подвижная фаза — смесь воды, ацетонитрила и трифторуксусной кислоты в соотношении 70:30:0,25; скорость потока — 0,5 мл/мин; температура колонки — 30 °C; температура пробоотборника — 20 °C; время хроматографирования — 12 мин; объем вводимой пробы — 10 мкл; способ ионизации — распыление в электрическом поле). Регистрацию масс-спектров проводили в режиме мониторинга избранных положительных ионов: 148 (L-Glu), 90 (L-Ala), 182 (L-Tyr), 147 (L-Lys, HCl).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Валидацию методики определения аминокислотного состава фармацевтической субстанции «Глатирамера ацетат» методом ЯМР-спектроскопии проводили согласно требованиям отечественных и зарубежных руководств по валидации методик анализа

[5–8]. Робастность была изучена при разработке методики [2]. В процессе валидации проведена оценка следующих валидационных параметров: диапазон применения, линейность, правильность, прецизионность, специфичность. Расчет статистических характеристик валидационных параметров проводили в соответствии с требованиями нормативных документов [9, 10]. Для оценки валидационных параметров в качестве истинных значений аминокислотного состава ГА и модельных смесей были использованы результаты, полученные с помощью референтной фармакопейной методики ВЭЖХ-МС.

Диапазон применения

Согласно литературным источникам [5–8], диапазон применения методики количественного определения активного компонента в лекарственной субстанции или готовом лекарственном препарате составляет 80÷120 % от предписанного нормативной документацией номинального содержания. Это требование невыполнимо применительно к отдельно взятой аминокислоте, так как функция концентрации, выраженная в молярных процентах, является зависимой от концентрации других компонентов. Невозможно изменить долю каждой из четырех аминокислот на ± 20 %, так как сумма долей всех аминокислот остается неизменной (100 %). Аминокислотный состав модельных смесей подобран таким образом, чтобы усредненный по четырем аминокислотам диапазон варьирования аминокислотного состава ($-28,8 \div +27,9$) превышает требуемые ± 20 % от номинального значения. За номинальное значение содержания для каждой аминокислоты принимали среднее значение допустимого диапазона варьирования молярных долей по спецификации. В рамках этого диапазона доказаны приемлемые линейность, правильность и прецизионность.

Линейность

При определении линейности изучали зависимость среднего значения измеряемой на ЯМР-спектрометре нормированной интегральной интенсивности сигнала S'_i α -CH группы аминокислоты от ее относительного молярного содержания (доли в смеси аминокислот) в валидируемых образцах. Усреднение проводили по трем измерениям. На основании полученных данных, представленных в таблице 1, были методом наименьших квадратов рассчитаны коэффициенты регрессионной прямой вида $y = bx + a$, где y — среднее значение измеренной величины S'_i , x — значение относительного молярного содержания аминокислоты в валидируемом образце, полученное по референтной методике, остаточная сумма квадратов отклонений полученных значений от регрессионной прямой $S_{\text{ост}}$. График и уравнение регрессионной прямой приведены на рисунке 1. Критериями приемлемости линейной зависимости являются статистическая незначимость отрезка, отсекаемого на оси ординат (свободного члена a для рассчитанной регрессионной прямой) и коэффициент корреляции $r \geq 0,990$ [5–8]. Величина a характеризует систематическую погрешность и считается статистически незначимо отличающейся от нуля, если она не превышает свой доверительный интервал (Δ). Как следует из данных, приведенных в таблице 1, валидируемая

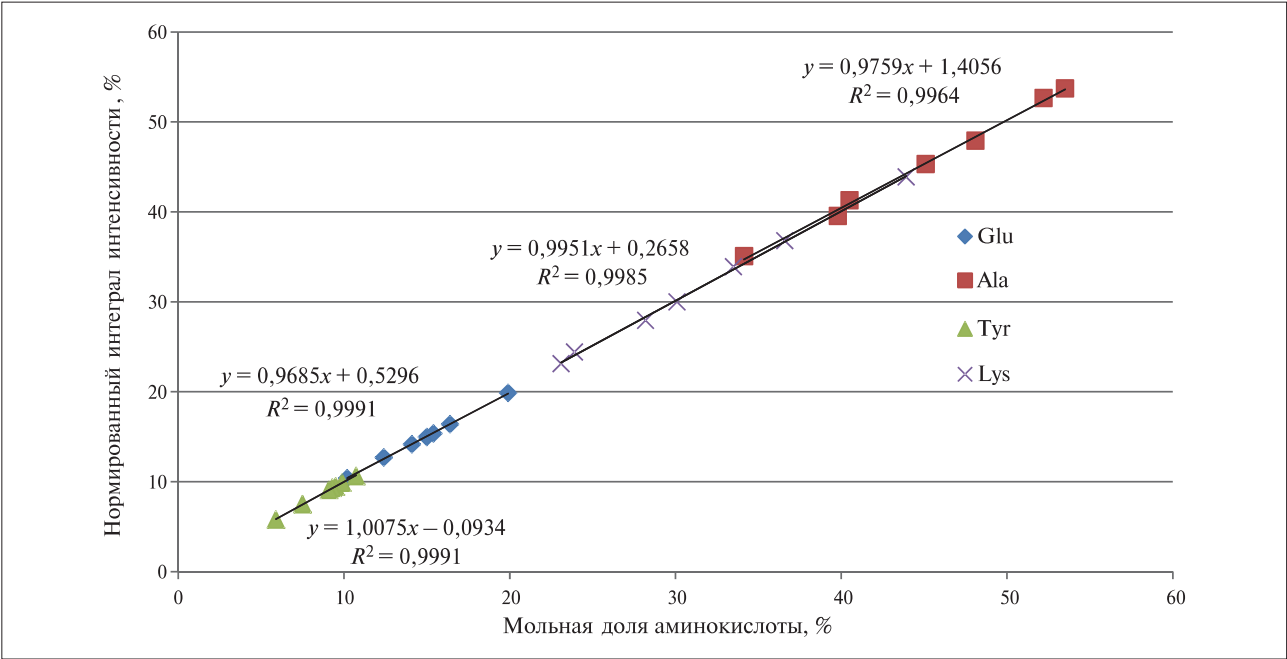


Рис. 1. График зависимости нормированной интегральной интенсивности сигналов от относительного молярного содержания аминокислот

Таблица 1

РЕЗУЛЬТАТЫ ОЦЕНКИ ЛИНЕЙНОСТИ ВАЛИДИРУЕМОЙ МЕТОДИКИ

Аминокислота	L-Glu		L-Ala		L-Tyr		L-Lys	
Образец	Молярная доля, %	S, %	Молярная доля, %	S, %	Молярная доля, %	S, %	Молярная доля, %	S, %
I	14,1	14,17	39,8	39,57	9,5	9,47	36,6	36,80
II	15,0	14,97	40,5	41,30	9,9	9,90	33,5	33,90
III	15,4	15,37	45,1	45,33	9,3	9,33	30,1	30,00
IV	12,4	12,70	53,5	53,73	5,9	5,80	28,2	27,93
V	19,9	19,87	48,0	47,93	9,1	9,10	23,1	23,13
VI	16,4	16,40	52,5	52,67	8,5	7,50	22,9	23,43
VII*	10,20	10,38	34,14	35,08	10,73	10,64	44,92	43,90
$\Delta (p = 95 \%)$	0,04÷1,02		-1,63÷4,45		-0,40÷0,22		-1,14÷1,67	
r	0,9996		0,9982		0,9996		0,9993	
S _{ост}	0,0455		1,0203		0,0142		0,4723	

* Данные гравиметрии

методика характеризуется приемлемой линейностью для четырех анализируемых аминокислот.

Правильность

Для оценки правильности валидируемой методики рассчитывали коэффициент извлечения — отношение «найдено : введено» (Z_i), для которого определяли стандартное отклонение (s), коэффициент вариации (RSD), доверительный интервал (Δ) и систематическую погрешность (δ) (табл. 2). Использовали критерии приемлемости правильности валидируемой методики, описанные в руководствах по валидации:

1) Δ должен включать 100 % значение коэффициента извлечения [6];

2) величина δ не должна превышать свой доверительный интервал (критерий статистической незначимости) [5].

Как свидетельствуют данные, приведенные в таблице 2, оба требования выполняются, следовательно, валидируемая методика характеризуется приемлемой правильностью для всех аминокислот, входящих в состав ГА.

Прецизионность

Прецизионность определяли на уровнях сходимости и внутрилабораторной прецизионности, которые оценивали по результатам трех определений для субстанции II, модельных смесей IV и V. Полученные результаты измерения отношения «найдено : введено» и их статистической обработки представлены в

Таблица 2

РЕЗУЛЬТАТЫ ОЦЕНКИ ПРАВИЛЬНОСТИ ВАЛИДИРУЕМОЙ МЕТОДИКИ

Образец	Молярное содержание, %											
	L-Glu			L-Ala			L-Tyr			L-Lys		
	Введено	Найдено	Z_i	Введено	Найдено	Z_i	Введено	Найдено	Z_i	Введено	Найдено	Z_i
I	14,1	14,2	100,71	39,8	39,6	99,50	9,5	9,4	98,95	36,6	36,9	100,82
		14,1	100,00		39,5	99,25		9,4	98,95		36,9	100,82
		14,2	100,71		39,6	99,50		9,6	101,05		36,6	100,00
II	15,0	14,8	98,67	40,5	41,3	101,98	9,9	9,9	100,00	33,5	34,0	101,49
		15,2	101,33		41,2	101,73		9,9	100,00		33,8	100,90
		14,9	99,33		41,4	102,22		9,9	100,00		33,9	101,19
III	15,4	15,3	99,35	45,1	45,5	100,89	9,3	9,3	100,00	30,1	30,0	99,67
		15,3	99,35		45,3	100,44		9,3	100,00		30,1	100,00
		15,5	100,65		45,2	100,22		9,4	101,08		29,9	99,34
IV	12,4	12,7	102,42	53,5	52,8	98,69	5,9	5,7	96,61	28,2	28,3	100,36
		12,6	101,61		54,0	100,94		5,8	98,31		27,7	98,23
		12,8	103,23		54,4	101,68		5,9	100,00		27,8	98,58
V	19,9	19,8	99,50	48,0	47,6	99,17	9,1	9,0	98,90	23,1	23,0	99,57
		19,7	99,00		48,4	100,83		9,3	102,20		23,2	100,43
		20,1	101,01		47,8	99,58		9,0	98,90		23,2	100,43
VI	16,4	16,3	99,39	52,2	53,0	101,53	7,5	7,3	97,33	23,9	23,4	97,91
		16,5	100,61		52,5	100,58		7,5	100,00		23,5	98,33
		16,4	100,00		52,5	100,58		7,7	102,67		23,4	97,91
Статистическая характеристика												
Ср. Z , %	100,38			100,52			99,72			99,78		
δ , %	0,38			0,52			0,28			0,22		
s , %	1,32			1,06			1,51			1,16		
RSD, %	1,31			1,06			1,52			1,16		
Δ , %	100,38 $\pm$ 0,72			100,52 $\pm$ 0,53			99,72 $\pm$ 0,75			99,78 $\pm$ 0,58		

Таблица 3

ОЦЕНКА СХОДИМОСТИ И ВНУТРИЛАБОРАТОРНОЙ ПРЕЦИЗИОННОСТИ ВАЛИДИРУЕМОЙ МЕТОДИКИ

Оператор	Молярное содержание, %											
	L-Glu			L-Ala			L-Tyr			L-Lys		
	Введено	Найдено	Z_i	Введено	Найдено	Z_i	Введено	Найдено	Z_i	Введено	Найдено	Z_i
I	15,0	14,8	98,67	40,5	41,3	101,98	9,9	9,9	100,00	33,5	34,0	101,49
		15,2	101,33		41,2	101,73		9,9	100,00		33,8	100,90
		14,9	99,33		41,4	102,22		9,9	100,00		33,9	101,19
	12,4	12,7	102,42	53,5	52,8	98,69	5,9	5,7	96,61	28,2	28,3	100,36
		12,6	101,61		54,0	100,94		5,8	98,31		27,7	98,23
		12,8	103,23		54,4	101,68		5,9	100,00		27,8	98,58
	19,9	19,8	99,50	48,0	47,6	99,17	9,1	9,0	98,90	23,1	23,0	99,57
		19,7	99,00		48,4	100,83		9,3	102,20		23,2	100,43
		20,1	101,01		47,8	99,58		9,0	98,90		23,2	100,43
II	15,0	15,1	100,67	40,5	41,6	102,72	9,9	9,6	96,97	33,5	33,8	100,90
		15,1	100,67		40,9	100,99		10,0	101,01		34,0	101,49
		14,9	99,33		40,5	100,00		10,1	102,02		34,6	103,28
	12,4	12,4	100,00	53,5	54,1	101,12	5,9	5,9	100,00	28,2	27,7	98,23
		12,4	100,00		54,0	100,94		6,0	101,70		27,6	97,87
		11,9	95,97		54,4	101,68		5,9	100,00		27,9	98,94
	19,9	20,3	102,01	48,0	47,6	99,17	9,1	9,1	100,00	23,1	22,9	99,13
		20,1	101,01		48,4	100,83		8,9	97,80		22,6	97,84
		20,2	101,51		47,8	99,58		9,1	100,00		22,9	99,13

Таблица 4

СТАТИСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СХОДИМОСТИ И ВНУТРИЛАБОРАТОРНОЙ ПРЕЦИЗИОННОСТИ ВАЛИДИРУЕМОЙ МЕТОДИКИ

Аминокислота	L-Glu		L-Ala		L-Tyr		L-Lys	
Оператор	I	II	I	II	I	II	I	II
Средн. Z_i , %	100,67	100,13	100,65	100,78	99,44	99,94	100,13	99,65
s , %	1,62	1,76	1,08	1,08	1,53	1,66	1,13	1,86
RSD, %	1,61	1,76	1,07	1,08	1,54	1,66	1,13	1,87
Δ , %	$\pm 1,25$	$\pm 1,35$	$\pm 0,83$	$\pm 0,83$	$\pm 1,18$	$\pm 1,27$	$\pm 0,87$	$\pm 1,43$
Объедин. Z_i , %	100,40		100,72		99,69		99,89	
Объедин. s , %	1,67		1,05		1,57		1,51	
Объедин. RSD, %	1,66		1,04		1,57		1,51	
Объедин. Δ , %	$\pm 0,83$		$\pm 0,53$		$\pm 0,78$		$\pm 0,76$	
$F(F_{\text{табл}} = 3,44)$	1,18		1,01		1,17		2,73	
$t(t_{\text{табл}} = 2,12)$	0,69		0,15		0,68		0,67	

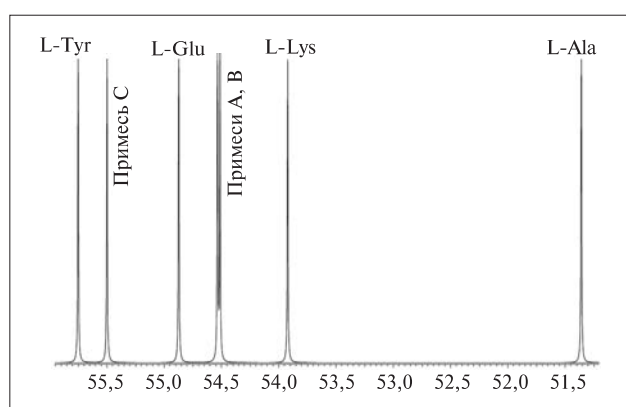


Рис. 2. Область спектра ^{13}C ЯМР, содержащая сигналы α -СН групп L-Ala, L-Tyr, L-Glu, L-Lys и примесных соединений 5-бензил-L-глутамата (А), N6-трифторацетил-L-лизина (В) и 3-Вг-тирозина (С)

таблицах 3 и 4. Как свидетельствуют данные, приведенные в таблице 4, рассчитанные величины RSD для сходимости и внутрилабораторной прецизионности не превышают приемлемый диапазон значений ($\leq 2\%$) [6]. В случае оценки приемлемости внутрилабораторной прецизионности нормативные и методические документы в сфере GMP [6, 7] рекомендуют рассчитывать статистические критерии Фишера (F) и Стьюдента (t) и сравнивать фактические значения $t_{\text{факт}}$ и $F_{\text{факт}}$ с табличными. Как следует из данных, приведенных в таблице 4, табличные значения F и t превосходят фактические значения, что свидетельствует о статистической незначимости различий между средними значениями и стандартными отклонениями результатов измерений двух операторов при уровне значимости 95 %.

Специфичность

Для подтверждения специфичности валидируемой методики был смоделирован теоретический спектр ^{13}C раствора в D_2O смеси, содержащей аминокислотные остатки ГА и родственные им примеси (5-бензил-L-глутамат, N6-трифторацетил-L-лизин, 3-Вг-тирозин), которые могут присутствовать в субстанции ГА совместно с определяемыми аминокис-

лотами [11] (рис. 2). Как продемонстрировано на рисунке 2, не наблюдается перекрывания сигналов основных и примесных компонентов ГА. Следовательно, вещества, имеющие близкое строение с входящими в состав ГА аминокислотами, не мешают определять аминокислотный состав ГА.

Дополнительным подтверждением специфичности валидируемой методики является высокая степень близости между значениями аминокислотного состава ГА, полученными с использованием валидируемой методики и с использованием референтной методики, специфичность которой доказана [2].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанная методика определения аминокислотного состава ГА методом ^{13}C ЯМР-спектроскопии была валидирована по основным параметрам, поэтому она может быть использована в фармакопейном анализе при контроле качества фармацевтических субстанций «Глатирамера ацетат».

ЛИТЕРАТУРА

- Шмидт ТЕ. Глатирамера ацетат — препарат первого ряда с двойным действием для лечения ремиттирующего рассеянного склероза. Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика 2016; 8(4): 77–80.
- Кузьмина НЕ, Моисеев СВ, Крылов ВИ, Кутин АА, Яшкир ВА, Меркулов ВА. Разработка методики определения аминокислотного состава фармацевтической субстанции «Глатирамера ацетат» методом ЯМР-спектроскопии. Химиико-фармацевтический журнал 2017; 51(3): 45–8.
- Кузьмина НЕ, Моисеев СВ, Яшкир ВА, Осинцева ЕВ. Возможности использования метода ЯМР при аттестации стандартных образцов. Стандартные образцы 2014; (2): 19–25.
- Malz F, Jancke H. Validation of quantitative nuclear magnetic resonance. J Pharm Biomed Anal. 2005; 38(5): 813–23.
- Юргель НВ, ред. Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств. Методические рекомендации. М.: Спорт и культура-2000; 2007.
- Береговых ВВ, ред. Валидация аналитических методик для производителей лекарств. Типовое руководство предприятия по производству лекарственных средств М.: Литтерра; 2008.
- Общая фармакопейная статья 1.1.0012.15. Валидация аналитических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. I. М.; 2015. Available from: <http://femb.ru/feml>.
- Nuclear Magnetic Resonance. United States Pharmacopoeia. National Formulary USP 40 — NF 35. Rockville; 2016.

9. РМГ 61–2003 ГСИ. Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки. М.: Издательство стандартов; 2004.
10. ГОСТ Р ИСО 5725–2–2002. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Ч. 2. Основной метод

определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений. М.: Издательство стандартов; 2002.

11. Долитцки Б-З. Способ получения смесей полипептидов с использованием очищенной бромистоводородной кислоты. Патент Российской Федерации, № 2388764 С2; 2010.

ОБ АВТОРАХ

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Российская Федерация, 127051, Москва, Петровский бульвар, д. 8, стр. 2.
 Кузьмина Наталья Евгеньевна. Главный эксперт лаборатории нанолечств, препаратов для клеточной и генотерапии Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, д-р хим. наук.
 Моисеев Сергей Владимирович. Ведущий эксперт лаборатории нанолечств, препаратов для клеточной и генотерапии Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, канд. хим. наук, доцент.
 Крылов Владислав Игоревич. Ведущий инженер лаборатории нанолечств, препаратов для клеточной и генотерапии Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств.
 Кутин Александр Аркадьевич. Эксперт 1-й категории лаборатории нанолечств, препаратов для клеточной и генотерапии Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств.
 Жуков Евгений Александрович. Лаборант лаборатории нанолечств, препаратов для клеточной и генотерапии Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств.
 Яшкир Вадим Анатольевич. Начальник лаборатории нанолечств, препаратов для клеточной и генотерапии Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, канд. хим. наук, доцент.
 Меркулов Вадим Анатольевич. Заместитель генерального директора по экспертизе лекарственных средств, д-р мед. наук, профессор.

АДРЕС ДЛЯ ПЕРЕПИСКИ

Моисеев Сергей Владимирович; MoiseevSV@expmr.ru

VALIDATION OF THE PROCEDURE FOR DETERMINATION OF AMINO ACIDS COMPOSITION OF GLATIRAMER ACETATE BY C-13 NMR SPECTROSCOPY

N. E. Kuz'mina, S. V. Moiseev, V. I. Krylov, A. A. Kutin,
E. A. Zhukov, V. A. Yashkir, V. A. Merkulov

Federal State Budgetary Institution
«Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products»
of the Ministry of Health of the Russian Federation,
Petrovsky boulevard 8, bld. 2, Moscow 127051, Russian Federation

Abstract: The article describes validation of the procedure for determination of amino acids composition of glatiramer acetate by C-13 NMR spectroscopy. The procedure makes it possible to determine the molar ratio of amino acids present in glatiramer acetate with no need for a reference standard. The authors evaluated the accuracy, linearity, repeatability, intermediate precision and specificity of the validated procedure. The analysis of extraction factors for L-Glu, L-Ala, L-Tyr and L-Lys helped to calculate the systematic errors, standard deviations, confidence intervals, variation coefficients, confidence intervals, Fisher's test and Student's t-test for the results of amino acids molar ratio determination. It was shown that the obtained statistical data satisfy the acceptance criteria for validation parameters described in the national and foreign quality standards.

Key words: glatiramer acetate; C-13 NMR spectroscopy; amino acids composition; analytical procedure validation; linearity; accuracy; repeatability; precision.

For citation: Kuz'mina NE, Moiseev SV, Krylov VI, Kutin AA, Zhukov EA, Yashkir VA, Merkulov VA. Validation of the procedure for determination of amino acids composition of glatiramer acetate by C-13 NMR spectroscopy. The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products 2017; 7(3): 175–181.

REFERENCES

1. Shmidt TE. Glatiramer acetate is a first-line dual-action drug for the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neurology, Neuropsychiatry, Psychosomatics* 2016; 8(4): 77–80 (in Russian).
2. Kuz'mina NE, Moiseev SV, Krylov VI, Kutin AA, Yashkir VA, Merkulov VA. Development of the procedure for determination of amino acids composition of glatiramer acetate by NMR spectroscopy. *Pharmaceutical Chemistry Journal* 2017; 51(3): 45–8 (in Russian).
3. Kuz'mina NE, Moiseev SV, Yashkir VA, Osintseva EV. The possibility of the nuclear magnetic resonance methods using for reference standards certification. *Reference materials* 2014; (2): 19–25 (in Russian).
4. Malz F, Jancke H. Validation of quantitative nuclear magnetic resonance. *J Pharm Biomed Anal.* 2005; 38(5): 813–23.
5. Yurgel NV, ed. Guideline for Analytical Methods Validation for Drugs. *Methodological Recommendations*. Moscow: Sport i Kul'tura-2000; 2007 (in Russian).
6. Beregovykh VV, ed. Validation of analytical methods by drug manufacturers. Guiding principles for drug manufacturers. Moscow: Litterra; 2008 (in Russian).
7. General monograph 1.1.0012.15. Validation of analytical procedures. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 13th ed. V. I. Moscow; 2015. Available from: <http://femb.ru/feml> (in Russian).
8. Nuclear Magnetic Resonance. United States Pharmacopoeia. National Formulary USP 40 — NF 35. Rockville; 2016.
9. RMG 61–2003 GSI. Accuracy, trueness and precision of quantitative chemical analysis. Methods of evaluation. Moscow: Izdatelstvo standartov; 2004 (in Russian).
10. State Standard R ISO 5725–2–2002. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. Part 2. Basic method for determination of repeatability and reproducibility of a standard method of measurement. Moscow: Izdatelstvo standartov; 2002 (in Russian).
11. Dolitski B-Z. Method of preparation of polypeptide mixtures using purified hydrobromic acid. Patent RF, № 2388764 C2; 2010 (in Russian).

AUTHORS

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Petrovsky boulevard 8, bld. 2, Moscow 127051, Russian Federation.

Kuzmina NE. Chief expert of the Laboratory of Nanodrugs, Cell and Gene Therapy Products of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality. Doctor of Chemical Sciences.

Moiseev SV. Leading expert of the Laboratory of Nanodrugs, Cell and Gene Therapy Products of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality. Candidate of Chemical Sciences, assistant professor.

Krylov VI. Leading engineer of the Laboratory of Nanodrugs, Cell and Gene Therapy Products of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality.

Kutin AA. 1st professional category expert of the Laboratory of Nanodrugs, Cell and Gene Therapy Products of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality.

Zhukov EA. Technician of the Laboratory of Nanodrugs, Cell and Gene Therapy Products of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality.

Yashkir VA. Head of the Laboratory of Nanodrugs, Cell and Gene Therapy Products of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality. Candidate of Chemical Sciences, assistant professor.

Merkulov VA. Deputy General Director for Evaluation of Medicinal Products. Doctor of Medical Sciences, professor.

CONTACT E-MAIL

Moiseev Sergey Vladimirovich; MoiseevSV@expmed.ru

Применение альтернативного метода определения влажности в лекарственных растительных препаратах

Н. П. Антонова, И. М. Моргунов, С. С. Прохвятилова, Е. П. Шефер, А. М. Калинин

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

Статья поступила 23.06.2017 г.; Принята к печати 21.08.2017 г.

Резюме: Проведена сравнительная оценка двух методов определения влажности в лекарственных растительных препаратах: высушивания с использованием термографического инфракрасного анализатора влажности и высушивания в сушильном шкафу. Показано, что при использовании анализатора влажности получены данные, позволяющие определить влажность в лекарственных растительных препаратах разных морфологических групп; результаты в основном согласуются с данными, полученными традиционным фармакопейным методом — методом высушивания с использованием сушильного шкафа. Обоснована целесообразность определения влажности в лекарственном растительном сырье с использованием термографического инфракрасного влагомера.

Ключевые слова: влажность; лекарственные растительные препараты; фармакопейный метод; инфракрасный анализатор влажности; фармакопея.

Библиографическое описание: Антонова НП, Моргунов ИМ, Прохвятилова СС, Шефер ЕП, Калинин АМ. Применение альтернативного метода определения влажности в лекарственных растительных препаратах. Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения 2017; 7(3): 182–185.

Определение влажности в лекарственных растительных препаратах (ЛРП) является актуальной задачей, поскольку определение содержания влаги в ЛРП необходимо для оценки его стандартного состояния и для расчета содержания определяемой группы биологически активных веществ. В случае повышенной влажности происходит разрушение действующих веществ, повышение микробной обсемененности, рост грибов, изменение цвета ЛРП; при пониженной влажности сырье становится излишне хрупким, что может привести к изменению измельченности лекарственных растительных препаратов.

В Государственной фармакопее XIII издания (ГФ XIII) (ОФС.1.5.3.0007.15 «Определение влажности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов») определение влаги и летучих веществ рекомендуется проводить методом высушивания в сушильных шкафах с использованием влагомеров термографических инфракрасных. В ФС на лекарственное растительное сырье и в нормативной документации (НД) на ЛРП методики с использованием влагомеров термографических инфракрасных отсутствуют [1, 2]. Использование альтернативных методов определения влажности позволит ускорить процесс проведения экспертизы качества и снизить количество предложений и замечаний как по проектам НД, так и по качеству образцов ЛРП [3].

Метод анализа влажности в сушильном шкафу является самым старым и широко распространенным, но имеет ряд недостатков. Основным существенным недостатком данного метода является его длительность, так как определение влажности методом высушивания в сушильном шкафу может занять от 4 до 24 часов. В сушильном шкафу горячий воздух,

циркулируя, нагревает лишь внешнюю поверхность испытуемого образца, к тому же эффективность нагрева снижается во времени, так как испарение влаги сопровождается охлаждением поверхности образца [4].

Инфракрасное излучение термографического инфракрасного влагомера проникает в образец без задержки, стимулирует нагрев и испарение, тем самым высушивая образец. От поверхности отражается лишь малая часть лучей [5].

Проникновение инфракрасных лучей в образец зависит от ряда факторов, которые необходимо учитывать при выборе инфракрасного метода сушки:

- степень прозрачности материала (если прозрачность материала мала, то лучи проникают лишь в поверхностный слой образца, и, соответственно, эффективность нагрева снижается);
- теплопроводность материала (чем выше теплопроводность материала, тем быстрее и равномернее нагревается образец, соответственно тем быстрее и эффективнее происходит процесс сушки материала);
- окраска вещества (от того, является ли материал светлоокрашенным или темноокрашенным зависит степень отражения лучей инфракрасного излучения и, соответственно, эффективность нагрева) [4].

Метод анализа влажности в сушильной печи является самым трудоемким из всех термогравиметрических методов. По сравнению с методом сушки в сушильном шкафу, порядок действий, производимых при инфракрасном анализе влаги, значительно упрощен. Оператор должен произвести тарирование весоизмерительной системы с пустым лоточком для пробы, а затем поместить пробу в лоток и запустить анализ. Весоизмерительная система отслеживает процесс сушки, измеряя массу пробы с периодом

90 мсек. Как только выполняется условие отключения, например, высушивание до постоянной массы, измерение заканчивается. Содержание влаги рассчитывается автоматически и отображается на устройстве вывода данных, либо как абсолютная потеря в мг, либо как процентная часть начального веса [6].

При использовании метода определения влажности в сушильном шкафу возможны ошибки, так как взвешивание пробы перед сушкой может занять много времени, в течение которого проба может набрать или потерять влагу из-за условий окружающей среды, таких как сквозняки или влажность. С ИК-анализатором влажности эта процедура начального взвешивания может быть опущена, так как весоизмерительная система анализатора определяет начальную массу пробы автоматически, сразу после того как пользователь закроет камеру пробы. Кроме того, полученные результаты будут надежнее, так как все вычисления и управление важными функциями (температура, время измерения, скорость нагрева) проводит микропроцессор. Программное обеспечение, которое производит расчет влажности, также автоматически компенсирует влияние температурного сдвига, который в противном случае привел бы к погрешностям измерения [6].

Целью настоящей работы является анализ преимуществ и недостатков применения метода инфракрасной сушки для определения влажности в лекарственных растительных препаратах различных морфологических групп в сравнении с методом высушивания в сушильном шкафу.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Использовались ЛРП различных морфологических групп:

- подземные органы (кровохлебки корневища с корнями, солодки корни, аира корневища);
- коры (дуба кора, крушины кора);
- плоды (соплодия ольхи, укропа пахучего плоды);
- чага;
- листья (эвкалипта листья, мяты перечной листья, подорожника большого листья, ортосифона тычиночного листья);
- цветки (липы цветки, бессмертника песчаного цветки, бузины черной цветки, пижмы цветки, календулы цветки, ромашки цветки);
- травы (тысячелистника трава, зверобоя трава, чистотела трава, хвоща полевого трава, пустырника трава, спорыша трава, полыни трава).
- столбики кукурузы.

Таблица 1

РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЙ В РЕЖИМЕ «ДО ВЫСУШИВАНИЯ» ПРИ 103 °С МЕТОДОМ ИНФРАКРАСНОЙ СУШКИ И ПРИ 103 °С МЕТОДОМ ВЫСУШИВАНИЯ В СУШИЛЬНОМ ШКАФУ

Наименование ЛРП	Метод высушивания в сушильном шкафу		Метод инфракрасной сушки	
	Результат, %	RSD, %	Результат, %	RSD, %
Кровохлебки корневища и корни	7,62	3,77	7,19	3,85
Солодки корни	6,14	3,54	5,67	3,38
Аира корневища	7,63	6,05	6,96	1,34
Крушины кора	6,64	1,9	6,85	1,74
Дуба кора	5,38	2,22	5,32	1,82
Соплодия ольхи	7,96	2,46	7,48	3,57
Укропа пахучего плоды	5,99	1,43	5,38	1,98
Чага	12,45	0,27	11,46	1,39
Эвкалипта листья	5,81	0,68	5,76	4,63
Мяты перечной листья	8,05	4,23	7,62	1,66
Подорожника большого листья	6,55	4,12	6,26	2,53
Ортосифона тычиночного листья	8,51	0,93	8,47	1,17
Липы цветки	7,55	1,11	6,46	1,28
Бессмертника песчаного цветки	5,68	1,05	5,32	2,68
Бузины черной цветки	6,02	5,15	5,40	2,39
Пижмы цветки	6,83	1,01	6,47	3,66
Календулы цветки	5,64	0,87	4,95	4,01
Ромашки цветки	8,07	1,54	7,80	1,46
Тысячелистника трава	7,65	1,65	7,74	1,57
Зверобоя трава	6,42	1,54	6,27	4,52
Чистотела трава	6,63	2,06	6,23	1,66
Хвоща полевого трава	8,65	2,37	8,05	0,62
Пустырника трава	5,77	2,57	5,82	4,05
Спорыша трава	6,29	0,85	6,17	1,65
Полыни трава	6,51	0,39	6,23	0,67
Столбики кукурузы	8,03	1,49	7,45	1,75

Таблица 2

РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ РЕЖИМОВ ИК-СУШКИ

Наименование ЛРП	Температура сушки, °С	Время сушки, мин	Влажность	RSD, %
Хвоща полевого трава	103	23	8,05	0,62
	115	20	8,49	1,38
	120	13	8,57	1,01
	125	15	8,65	0,90
	103	45	8,16	0,54
Полыни трава	103	24	6,23	0,57
	110	22	6,54	0,73
	103	45	6,50	0,35
Ромашки цветки	103	20	7,81	1,05
	103	45	8,10	0,24

Таблица 3

РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЙ ДЛЯ ТРАВЫ ХВОЩА ПОЛЕВОГО ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ МЕТОДА ВЫСУШИВАНИЯ В СУШИЛЬНОМ ШКАФУ И МЕТОДА ИНФРАКРАСНОЙ СУШКИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РАЗЛИЧНОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ СУШКИ

Температура сушки, °С	Результат, %	
	Метод высушивания в сушильном шкафу	Метод инфракрасной сушки
125	9,25	8,65
103	8,65	8,16

Оборудование: анализатор влажности Sartorius MA100, сушильный шкаф Binder ED53, электронные весы Mettler Toledo XPE205DR.

Испытания на анализаторе влажности проводились в полностью автоматическом режиме «высушивание до постоянной массы» при проведении предварительного анализа, а также в «полуавтоматическом режиме 1 мг/60 сек» и «режиме таймера» при температурах 103–120 °С (выбор других режимов позволил получить значения, сопоставимые со значениями, полученными методом высушивания в сушильном шкафу). Навеска лекарственного растительного сырья равномерным, тонким слоем (примерно 2–3 мм) распределялась на дне чашки (для ЛРС в среднем около 5,5 г). Выполнялись параллельные измерения: использовался стандартный метод анализа (метод высушивания в сушильном шкафу по ГФ XIII, ОФС.1.5.3.0007.15).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты испытаний (табл. 1) свидетельствуют о том, что полученные двумя методами значения влажности отличаются друг от друга в зависимости от морфологической группы ЛРП: для трав, листьев и коры — разница в полученных значениях влажности, как правило, не превышает 0,2 %, для подземных органов и плодов — разница составляет 0,5 %, для цветков — от 0,5 % до 1 %. RSD результатов, полученных двумя методами, отличается незначительно.

Возможно, это связано с тем, что ЛРП, относящиеся к разным морфологическим группам, благода-

ря особенностям строения тканей отличаются по способности поглощать инфракрасное излучение, следовательно, для каждого ЛРП необходимо подобрать определенные условия проведения испытаний.

В целом, значения влажности, полученные методом инфракрасной сушки, ниже, чем значения, полученные методом высушивания в сушильном шкафу.

Данные, представленные в таблице 2, позволяют прийти к выводу, что при использовании повышенных температур для инфракрасной сушки получают более высокие результаты. При температуре сушки 110 °С для травы полыни с использованием метода инфракрасной сушки определяемое значение влажности составило 6,54 %; при сушке в сушильном шкафу при температуре 103 °С значение влажности составило 6,51 %, при использовании режима сушки с фиксированным временем анализа (45 мин, температура сушки 103 °С) значение влажности составило 6,50 %, что более предпочтительно, так как при 103 °С исключена потеря в массе за счет испарения компонентов, кипящих при более высокой температуре.

Данные, представленные в таблице 3, свидетельствуют о том, что при температуре сушки в 125 °С для травы хвоща с использованием метода инфракрасной сушки определяемое значение влажности составило 8,65 %; при сушке в сушильном шкафу при температуре 125 °С значение влажности составило 9,25 %. При сушке в сушильном шкафу при температуре 103 °С значение влажности составило 8,65 %, а при использовании режима сушки с фиксированным временем анализа (45 мин, температура сушки 103 °С) значение влажности составило 8,16 %, следовательно, такой режим использовать нецелесообразно.

При использовании режима сушки с фиксированным временем анализа (45 мин, температура сушки 103 °С) для цветков ромашки значение влажности составило 8,10 %, значение идентично результатам, полученным методом сушки в сушильном шкафу.

Приведенные выше результаты экспериментов свидетельствуют о преимуществах определения влажности в лекарственном растительном сырье с использованием термографического инфракрасного влагомера, но при разработке методики необходимо учитывать анатомо-морфологические особенности лекарственного растительного сырья и подбирать индивидуальные режимы инфракрасной сушки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 1–3. М.; 2015 [Интернет]. Available from: <http://femb.ru/femb1>.
2. European Pharmacopoeia. 9th ed. Strasbourg; 2017 [Internet]. Available from: <http://online.edqm.eu/EN/entry.htm>.
3. Антонова НП, Прохвятилова СС, Шефер ЕП, Калинин АМ. Особенности экспертизы качества лекарственных растительных препаратов с примерами типичных замечаний при их лабораторной экспертизе. Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения 2015; (3): 18–22.
4. Киптелая ЛВ, Загорюлько АН. ИК-сушка плодоягодного сырья. Научный журнал НИУ ИТМО 2014; (3): 80–86.
5. Акулич АВ, Темрук АВ. Сушка плодовоовощного сырья с использованием ИК-излучения. Пищевая промышленность 2009; (9): 12–13.
6. Завалий АА, Снежкин ЮФ. Разработка и тепловое моделирование устройств инфракрасной сушки термолабильных материалов. Симферополь: АРИАЛ; 2016.

ОБ АВТОРАХ

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Российская Федерация, 127051, Москва, Петровский бульвар, д. 8, стр. 2.
Антонова Наталья Петровна. Начальник лаборатории фитопрепаратов и гомеопатических средств Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, канд. биол. наук.
Моргунов Игорь Михайлович. Эксперт 2-й категории лаборатории фитопрепаратов и гомеопатических средств Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств.
Прохватилова Светлана Степановна. Главный эксперт лаборатории фитопрепаратов и гомеопатических средств, канд. фарм. наук.
Шефер Елена Павловна. Главный эксперт лаборатории фитопрепаратов и гомеопатических средств, канд. фарм. наук.
Калинин Артем Михайлович. Ведущий эксперт лаборатории фитопрепаратов и гомеопатических средств.

АДРЕС ДЛЯ ПЕРЕПИСКИ

Моргунов Игорь Михайлович; Morgunov@expmed.ru

AN ALTERNATIVE METHOD OF LOSS ON DRYING DETERMINATION IN HERBAL MEDICINAL PRODUCTS

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

Federal State Budgetary Institution
«Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products»
of the Ministry of Health of the Russian Federation,
Petrovsky boulevard 8, bld. 2, Moscow 127051, Russian Federation

Abstract: The article compares two methods of loss on drying determination in herbal medicinal products: drying using an infrared thermographic moisture analyzer and drying carried out in a drying cabinet. Data obtained with the moisture analyzer were shown to be sufficient for determination of loss on drying in herbal medicinal products of different morphological groups and were generally consistent with the data obtained by the traditional pharmacopoeial method – drying in a drying cabinet. The article demonstrates the feasibility of performing loss on drying test using an infrared thermographic moisture analyzer.

Key words: loss on drying; herbal medicinal products; pharmacopoeial method; infrared moisture analyzer; pharmacopoeia.

For citation: Antonova NP, Morgunov IM, Prokhvatilova SS, Shefer EP, Kalinin AM. An alternative method of loss on drying determination in herbal medicinal products. The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products 2017; 7(3): 182–185.

REFERENCES

1. The State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 13th ed. V. 1–3. Moscow; 2015 [Internet]. Available from: <http://femb.ru/feml> (in Russian).
2. European Pharmacopoeia. 9th ed. Strasbourg; 2017 [Internet]. Available from: <http://online.edqm.eu/EN/entry.htm>.
3. Antonova NP, Prokhvatilova SS, Shefer EP, Kalinin AM. Specifics of herbal drugs quality testing with the examples of typical criticism of laboratory testing of those. The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products 2015; (3): 18–22 (in Russian).
4. Kiptelaya LV, Zagorulko AN. IR-drying of fruit and berry raw materials. Scientific Journal of NRU ITMO 2014; (3): 80–86 (in Russian).
5. Akulich AV, Temruk AV. Drying of fruit and vegetable raw materials using infrared radiation. Food Industry 2009; (9): 12–13 (in Russian).
6. Zavaliiy AA, Snezhkin YuF. Development and thermal modeling of devices for infrared drying of thermolabile materials. Simferopol: ARIAL; 2016 (in Russian).

AUTHORS

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Petrovsky boulevard 8, bld. 2, Moscow 127051, Russian Federation.
Antonova NP. Head of the Laboratory of Herbal and Homeopathic Products of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality. Candidate of Biological Sciences.
Morgunov IM. 2nd professional category expert of the Laboratory of Herbal and Homeopathic Products of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality.
Prokhvatilova SS. Chief expert of the Laboratory of Herbal and Homeopathic Products of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality. Candidate of Pharmaceutical Sciences.
Shefer EP. Chief expert of the Laboratory of Herbal and Homeopathic Products of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality. Candidate of Pharmaceutical Sciences.
Kalinin AM. Leading expert of the Laboratory of Herbal and Homeopathic Products of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality.

CONTACT E-MAIL

Morgunov Igor Mikhaylovich; Morgunov@expmed.ru

Молекулярный поиск перспективных молекул-кандидатов в селективные антагонисты ионного канала TRPA₁

Е. А. Бесхмельницына¹, Д. В. Кравченко², М. В. Покровский¹, М. В. Корокин¹,
А. А. Пересыпкина¹, Е. И. Варавин¹, Д. А. Костина¹

¹ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Белгородский государственный национальный исследовательский университет»,
Российская Федерация, 308015, Белгород, ул. Победы, д. 85

² Закрытое акционерное общество
«Исследовательский институт химического разнообразия»,
Российская Федерация, 141400, Химки, ул. Рабочая, д. 2а, корп. 1

Статья поступила 03.07.2017 г. Принята к печати 21.08.2017 г.

Резюме: Проведен анализ ряда молекул-кандидатов в селективные антагонисты ионного канала TRPA₁ с помощью методов молекулярного моделирования в высокопроизводительном скрининге. Определены их механизмы действия и специфическая активность на клетках с суперэкспрессией ионного канала TRPA₁. Подтверждена антагонистическая активность изученных субстанций в отношении ионного канала TRPA₁ в результате молекулярного скрининга биологически активных молекул в сравнении с контрольным антагонистом. Установлено, что наибольшая активность проявлена веществом под шифром ZC02-0012, которое является основным кандидатом и может быть рекомендовано для проведения дальнейших исследований безопасности и селективности в тестах *in vitro* с последующим рядом экспериментов *in vivo* для определения его активности и безопасности применительно к живым системам.

Ключевые слова: ионный канал TRPA₁; боль; ноцицепция; воспаление; высокопроизводительный молекулярный скрининг; молекулы-кандидаты в селективные антагонисты ионного канала TRPA₁.

Библиографическое описание: Бесхмельницына ЕА, Кравченко ДВ, Покровский МВ, Корокин МВ, Пересыпкина АА, Варавин ЕИ, Костина ДА. Молекулярный поиск перспективных молекул-кандидатов в селективные антагонисты ионного канала TRPA₁. Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения 2017; 7(3): 186–189.

Учитывая огромное количество пациентов, страдающих от хронического болевого синдрома, одной из ведущих задач современной фармакологии являются поиск и создание новых анальгетических препаратов, не обладающих побочными эффектами нестероидных противовоспалительных средств и наркотических анальгетиков, но при этом имеющих достаточную эффективность. Проводимые на современном этапе исследования физиологии и патофизиологии боли с применением новейших достижений в области науки и техники привели к открытию новых рецепторов, участвующих в передаче болевых раздражений, что открыло перспективу на создание качественно новой группы анальгетических лекарственных препаратов, способных обеспечить достаточно эффективную и безопасную фармакотерапию болевого синдрома [1]. Одним из таких рецепторов является анкириновый рецептор TRPA₁, экспрессия которого наиболее выражена в ноцицепторах малого диаметра [2–5]. Проводимое на сегодняшний день огромное количество исследований подтвердило его роль в восприятии боли, что повысило к нему интерес исследователей как к потенциальной биологической мишени [6–8]. Некоторые авторы отмечали даже увеличение экспрессии TRPA₁ в условиях хронической боли и воспаления [9–12]. Сегодня ряд западных фармацевтических компаний работает над выводом на рынок новых лекарственных препаратов на основе селективных антагонистов ионного канала

TRPA₁, которые находятся на разных фазах клинических испытаний [13, 14].

Цель работы — подтверждение активности перспективных молекул-кандидатов в селективные антагонисты ионного канала TRPA₁, полученных в результате высокопроизводительного скрининга сфокусированной библиотеки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изначально из полуторамиллионной библиотеки малых органических молекул, имевшейся в распоряжении ЗАО «Исследовательский институт химического разнообразия», методом высокопроизводительного молекулярного скрининга были отобраны наиболее перспективные кандидаты в селективные антагонисты ионного канала TRPA₁. Затем на клетках с суперэкспрессией ионного канала TRPA₁ были подтверждены их механизм действия и специфическая активность.

Для эксперимента использовали клеточную суспензию в культуральной среде с 1-ммолярным раствором изопропилтиогалактопиранозидом (ИПТГ) в концентрации $8 \cdot 10^5$ клеток/мл, которую при помощи автоматических роботизированных станций Biomek FX или Biomek NX раскапывали в 384-луночные экспериментальные культуральные плашки с оптическим дном, по 25 мкл в каждую лунку. После этого экспериментальные плашки центрифугировали при

1500 об/мин в течение 5 мин и инкубировали при 37 °C в присутствии 5 % CO₂.

В день эксперимента к полученной клеточной суспензии добавляли Ca²⁺-чувствительную краску. Для этого содержимое одной ампулы тест-системы ФЛИПР® Кальций 4 («Molecular Devices», USA) растворяли в 20 мл буфера Хенкс/20mM ХЕПЕС и использовали в качестве 25-кратного стока. 25 мл рабочего раствора Ca²⁺-чувствительной краски добавляли в каждую лунку 384-луночной экспериментальной плашки, после чего плашку инкубировали в течение одного часа при комнатной температуре в темном месте.

Серийные разведения исследуемых веществ готовили путем растворения в диметилсульфоксиде (ДСМО) с помощью Biomek 2000. Финальная максимальная тестируемая концентрация веществ составила 30 мкмоль.

С целью стимуляции ионного канала TRPA₁ использовали его агонист, аллилизотиоцианат, в концентрации ЕС₈₀, что составило 30 мкмоль. В качестве контроля использовали известный антагонист ионного канала TRPA₁ рутениевый красный в максимальной ингибирующей концентрации (IC₁₀₀), равной 6 мкмоль.

Для определения антагонистической активности тестируемых молекул-кандидатов в селективные антагонисты ионного канала TRPA₁ в каждую лунку 384-луночной плашки в соответствии с ее схемой добавляли по 12,5 мкл тестируемых веществ и приступали к считыванию на ФЛИПР. После инкубации в течение 667 секунд в каждую лунку экспериментальной плашки раскатывали по 12,5 мкл аллилизотиоцианата и сразу проводили повторное считывание на ФЛИПР с целью определения активности потенциальных антагонистов ионного канала TRPA₁.

Для веществ был выполнен анализ зависимости антагонистической активности от концентрации, на основании которого была определена величина концентрации полумаксимального ингибирования (IC₅₀). Для анализа полученных данных использовали программу GraphPad Prizm («GraphPad Software, Inc.», San Diego, CA, USA). Концентрационная зависимость рассчитывалась по следующей формуле:

$$Y = \text{Нижнее плато кривой} + \frac{\text{Верхнее плато кривой} - \text{Нижнее плато кривой}}{1 + 10^{\lg(\text{IC}_{50} - X) \cdot \text{Наклон кривой}}}. \quad (1)$$

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенного молекулярного скрининга биологически активных молекул-кандидатов в селективные антагонисты ионного канала TRPA₁ было установлено, что все исследованные кандидаты подтвердили свою активность. Механизм действия всех молекул заключается в антагонизме ионного канала TRPA₁. Активность веществ в сравнении со стандартом (рутениевый красный) приведена в таблице 1 и на рисунке 1.

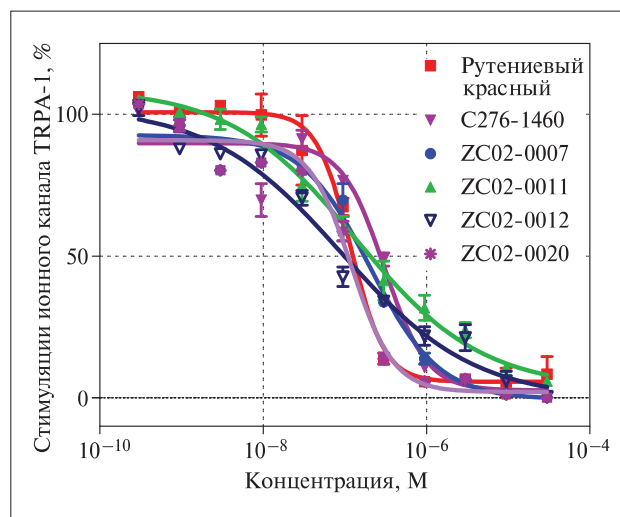


Рис. 1. Концентрационная зависимость антагонистической активности от концентрации исследуемых веществ (каждая концентрационная точка представляет собой усредненное значение для двух повторов)

Таблица 1

КОНЦЕНТРАЦИЯ ПОЛУМАКСИМАЛЬНОГО ИНГИБИРОВАНИЯ ИССЛЕДУЕМЫХ МОЛЕКУЛ-КАНДИДАТОВ В СЕЛЕКТИВНЫЕ АНТАГОНИСТЫ ИОННОГО КАНАЛА TRPA₁

Вещество	IC ₅₀ , нмоль
Рутениевый красный	118,2
C276-1460	303,3
ZC02-0007	204,0
ZC02-0011	135,2
ZC02-0012	91,3
ZC02-0020	120,2

Представленные данные свидетельствуют о высокой специфической активности, которую ряд исследованных биологически активных молекул-кандидатов в селективные антагонисты ионного канала TRPA₁ демонстрирует *in vitro*. Наибольшую активность проявило соединение под шифром ZC02-0012, его IC₅₀ составила 91,3 нмоль.

ВЫВОДЫ

Результаты молекулярного скрининга биологически активных молекул-кандидатов в селективные антагонисты ионного канала TRPA₁ в сравнении с контрольным антагонистом (рутениевый красный) подтвердили антагонистическую активность изученных субстанций в отношении ионного канала TRPA₁, при этом наибольшую активность проявило вещество под шифром ZC02-0012, его IC₅₀ составила 91,3 нмоль. Таким образом, вещество под шифром ZC02-0012 является основным кандидатом и может быть рекомендовано для проведения дальнейших исследований безопасности (влияние на hERG K⁺ ионный канал и цитохромы) и селективности в тестах *in*

vitro с последующим рядом экспериментов *in vivo* для определения его активности и безопасности применительно к живым системам.

ЛИТЕРАТУРА

1. Тактика и неотложная терапия болевого синдрома. Научно-информационный материал. М.: Ассоциация московских ВУЗов; 2010.
2. Jordt SE, Bautista DM, Chuang HH, McKemy DD, Zygmunt PM, Hogenestadt ED, et al. Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature* 2004; 427(6971): 260–5.
3. Trevisani M, Siemens J, Materazzi S, Bautista DM, Nassini R, Campi B, et al. 4-Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(33): 13519–24.
4. Shelukhina I, Mikhailov N, Abushik P, Nurulin L, Nikolsky EE, Giniatullin R. Cholinergic Nociceptive Mechanisms in Rat Meninges and Trigeminal Ganglia: Potential Implications for Migraine Pain. *Front Neurol*. 2017; (8): 163.
5. Bohonyi N, Pohoczky K, Szalontai B, Perkecz A, Kovacs K, Kajtar B, et al. Local upregulation of transient receptor potential ankyrin 1 and transient receptor potential vanilloid 1 ion channels in rectosigmoid deep infiltrating endometriosis. *Mol Pain* 2017; (13): 1744806917705564.
6. Asai Y, Holt JR, Geleoc GS. A quantitative analysis of the spatiotemporal pattern of transient receptor potential gene expression in the developing mouse cochlea. *J Assoc Res Otolaryngol*. 2010; 11(1): 27–37.
7. Matta JA, Cornett PM, Miyares RL, Abe K, Sahibzada N, Ahern GP. General anesthetics activate a nociceptive ion channel to enhance pain and inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(25): 8784–9.
8. Бесхмельницина ЕА, Покровский МВ, Корокин МВ, Якушев ВИ, Гудырев ОС. Биологическая роль ионного канала TRPA₁ при различных патологических состояниях. *Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация* 2012; 20(22–3): 30–5.
9. Nie Y, Huang C, Zhong C, Wortley MA, Luo Y, Luo W, et al. Cigarette smoke extract (CSE) induces transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) expression via activation of HIF1 α in A549 cells. *Free Radic Biol Med*. 2016; (99): 498–507.
10. Nakao S, Mabuchi M, Wang S, Koqure Y, Shimizu T, Noguchi K, et al. Synthesis of resveratrol derivatives as new analgesic drugs through desensitization of the TRPA1 receptor. *Bioorg Med Chem Lett*. 2017; 27(14): 3167–72.
11. Pryde DC, Marron BE, West CW, Reister S, Amato G, Yoger K, et al. Discovery of a Series of Indazole TRPA1 Antagonists. *ACS Med Chem Lett*. 2017; 8(6): 666–71.
12. Kravchenko DV, Beskhmel'nitsyna EA, Korokin MV, Avtina TV, Serenov LN, Tishin AN, Kostina DA. Molecular screening of prospective candidates for TRPA1 ion channel selective antagonists. *Research Result: Pharmacology and Clinical Pharmacology* 2016; 2(1): 63–6.
13. Skerratt S. Recent Progress in the Discovery and Development of TRPA1 Modulators. *Prog Med Chem*. 2017; (56): 81–115.
14. Mukhopadhyay I, Kulkarni A, Aranake S, Karnik P, Shetty M, Thorat S, et al. Transient receptor potential ankyrin 1 receptor activation *in vitro* and *in vivo* by pro-tussive agents: GRC 17536 as a promising anti-tussive therapeutic. *PLoS One* 2014; 9(5): e97005.

ОБ АВТОРАХ

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет». Российская Федерация, 308015, Белгород, ул. Победы, д. 85.

Бесхмельницина Евгения Александровна. Ассистент кафедры фармакологии.

Покровский Михаил Владимирович. Заведующий кафедрой фармакологии Медицинского института, д-р мед. наук, проф.

Корокин Михаил Викторович. Профессор кафедры фармакологии, д-р мед. наук, проф.

Пересыпкина Анна Александровна. Ассистент кафедры фармакологии, канд. фарм. наук.

Варавин Евгений Игоревич. Научный сотрудник Центра доклинических и клинических исследований.

Костина Дарья Александровна. Аспирант кафедры фармакологии.

Закрытое акционерное общество «Исследовательский институт химического разнообразия».

Российская Федерация, 141400, Химки, ул. Рабочая, д. 2а, корп. 1.

Кравченко Дмитрий Владимирович. Генеральный директор, д-р хим. наук.

АДРЕС ДЛЯ ПЕРЕПИСКИ

Бесхмельницина Евгения Александровна; evgeny_b89@mail.ru

MOLECULAR SCREENING FOR POTENTIAL SELECTIVE ANTAGONISTS OF TRPA₁ ION CHANNEL

E. A. Beskhmel'nitsyna¹, D. V. Kravchenko², M. V. Pokrovsky¹, M. V. Korokin¹,
A. A. Peresypkina¹, E. I. Varavin¹, D. A. Kostina¹

¹ Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education
«Belgorod National Research University»
Pobedy street 85, Belgorod 308015, Russian Federation

² Private limited company «Chemical Diversity Research Institute»
Rabochaya street 2a, bld. 1, Khimki 141400, Russian Federation

Abstract: The article discusses the results of analysis a number of candidate molecules for TRPA₁ ion channel selective antagonists using molecular modeling methods of high throughput screening. The study determined their mechanisms of action and specific activity in cells with overexpression of TRPA₁ ion channel. It demonstrated antagonistic activity of test substances in relation to TRPA₁ ion channel based on the results of molecular screening of biologically active molecules and their comparison with the reference antagonist. The highest activity was demonstrated by the substance with the ZC02-0012 code which was regarded as the main candidate that could be recommended for use in further safety and selectivity studies using *in vitro* tests and subsequent *in vivo* experiments aimed at determining its activity and safety in relation to living systems.

Key words: TRPA₁ ion channel; pain; nociception; inflammation; high throughput screening; candidate molecules for selective antagonists of TRPA₁ ion channel.

For citation: Beskhnelnitsyna EA, Kravchenko DV, Pokrovsky MV, Korokin MV, Peresypkina AA, Varavin EI, Kostina DA. Molecular screening for potential selective antagonists of TRPA₁ ion channel. The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products 2016; 7(3): 186–189.

REFERENCES

1. Tactics and emergency treatment of pain. Research and information material. Moscow: Association of Moscow universities; 2010 (in Russian).
2. Jordt SE, Bautista DM, Chuang HH, McKemy DD, Zygmunt PM, Hogenstatt ED, et al. Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature* 2004; 427(6971): 260–5.
3. Trevisani M, Siemens J, Materazzi S, Bautista DM, Nassini R, Campi B, et al. 4-Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(33): 13519–24.
4. Shelukhina I, Mikhailov N, Abushik P, Nurulin L, Nikolsky EE, Giniatullin R. Cholinergic Nociceptive Mechanisms in Rat Meninges and Trigeminal Ganglia: Potential Implications for Migraine Pain. *Front Neurol* 2017; (8): 163.
5. Bohonyi N, Pohoczky K, Szalontai B, Perkecz A, Kovacs K, Kajtar B, et al. Local upregulation of transient receptor potential ankyrin 1 and transient receptor potential vanilloid 1 ion channels in rectosigmoid deep infiltrating endometriosis. *Mol Pain* 2017; (13): 1744806917705564.
6. Asai Y, Holt JR, Geleoc GS. A quantitative analysis of the spatiotemporal pattern of transient receptor potential gene expression in the developing mouse cochlea. *J Assoc Res Otolaryngol* 2010; 11(1): 27–37.
7. Matta JA, Cornett PM, Miyares RL, Abe K, Sahibzada N, Ahern GP. General anesthetics activate a nociceptive ion channel to enhance pain and inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(25): 8784–9.
8. Beskhnelnitsyna EA, Pokrovsky MV, Korokin MV, Yakushev VI, Gudyrev OS. The biological role of ion channel TRPA₁ in various pathological conditions. *Belgorod State University Scientific Bulletin. Medicine. Pharmacy* 2012; 20(22–3): 30–5 (in Russian).
9. Nie Y, Huang C, Zhong C, Wortley MA, Luo Y, Luo W, et al. Cigarette smoke extract (CSE) induces transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) expression via activation of HIF1 α in A549 cells. *Free Radic Biol Med* 2016; (99): 498–507.
10. Nakao S, Mabuchi M, Wang S, Koqure Y, Shimizu T, Noguchi K, et al. Synthesis of resveratrol derivatives as new analgesic drugs through desensitization of the TRPA1 receptor. *Bioorg Med Chem Lett* 2017; 27(14): 3167–72.
11. Pryde DC, Marron BE, West CW, Reister S, Amato G, Yoger K, et al. Discovery of a Series of Indazole TRPA1 Antagonists. *ACS Med Chem Lett* 2017; 8(6): 666–71.
12. Kravchenko DV, Beskhnelnitsyna EA, Korokin MV, Avtina TV, Serenov LN, Tishin AN, Kostina DA. Molecular screening of prospective candidates for TRPA1 ion channel selective antagonists. *Research Result: Pharmacology and Clinical Pharmacology* 2016; 2(1): 63–6.
13. Skerratt S. Recent Progress in the Discovery and Development of TRPA1 Modulators. *Prog Med Chem* 2017; (56): 81–115.
14. Mukhopadhyay I, Kulkarni A, Aranake S, Karnik P, Shetty M, Thorat S, et al. Transient receptor potential ankyrin 1 receptor activation in vitro and in vivo by pro-tussive agents: GRC 17536 as a promising anti-tussive therapeutic. *PLoS One* 2014; 9(5): e97005.

AUTHORS

Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «Belgorod National Research University», Pobedy street 85, Belgorod 308015, Russian Federation.

Beskhnelnitsyna EA. Assistant professor of the Department of Pharmacology.

Pokrovsky MV. Head of the Department of Pharmacology of the Medical Institute. Doctor of Medical Sciences, professor.

Korokin MV. Professor of the Department of Pharmacology. Doctor of Medical Sciences, professor.

Peresypkina AA. Assistant professor of the Department of Pharmacology. Candidate of Pharmaceutical Sciences.

Varavin EI. Research associate of the Centre of Preclinical and Clinical Research.

Kostina DA. Postgraduate student of the Department of Pharmacology.

Private limited company «Chemical Diversity Research Institute», Rabochaya street 2a, bld. 1, Khimki 141400, Russian Federation.

Kravchenko DV. Director General. Doctor of Chemical Sciences.

CONTACT E-MAIL

Beskhnelnitsyna Evgeniya Aleksandrovna; evgeny_b89@mail.ru

Анализ результатов социологического опроса по унификации типовых инструкций по медицинскому применению взаимозаменяемых лекарственных средств

Н. Г. Голоенко, Р. И. Ягудина, Б. К. Романов, Д. Г. Карапетян,
А. Ю. Куликов, М. В. Проценко, Г. Т. Абдрашитова

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

Статья поступила 10.02.2017 г. Принята к печати 21.08.2017 г.

Резюме: Проведен анализ результатов социологического опроса специалистов здравоохранения и фармацевтической отрасли, целью которого было изучение их мнения по основным проблемам, связанным с применением инструкции для медицинского применения на ЛП. Были установлены проблемы, связанные с различным пониманием того, что является официальным и неофициальным источником информации о лекарственных средствах. Было выявлено отношение специалистов и косвенно населения к инструкции по применению лекарственного препарата, а также была установлена потребность у опрошенных во внесении изменений в инструкцию.

Ключевые слова: взаимозаменяемый лекарственный препарат; типовая инструкция; инструкция по применению лекарственного препарата; унификация; обращение лекарственных средств.

Библиографическое описание: Голоенко НГ, Ягудина РИ, Романов БК, Карапетян ДГ, Куликов АЮ, Проценко МВ, Абдрашитова ГТ. Анализ результатов социологического опроса по унификации типовых инструкций по медицинскому применению взаимозаменяемых лекарственных средств. Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения 2017; 7(3): 190–196.

Введение Федеральным законом Российской Федерации от 22 декабря 2014 г. № 429 требований о разработке реестра типовых инструкций по медицинскому применению взаимозаменяемых лекарственных препаратов (ЛП) предполагает разработку типовых инструкций взаимозаменяемых ЛП [1]. Поэтому важно понимание основных проблем, связанных с инструкцией по медицинскому применению. Проведенный социологический опрос специалистов в сфере фармпроизводства, врачей и аптечных работников позволил выявить проблемные позиции инструкции по медицинскому применению с целью оптимизации работы с ней.

Цель данной работы заключалась в изучении мнения медицинских специалистов (врачей, аптечных работников и представителей фармпроизводства) по основным проблемам, связанным с применением инструкции для медицинского применения на ЛП.

Для достижения указанной цели необходимо было решить следующие задачи:

- разработать анкеты для врачей, работников аптек и представителей фармпроизводства;
- провести пилотное анкетирование;
- по результатам пилотного анкетирования проинформировать коррекцию анкеты;
- выявить основные проблемы, связанные с применением инструкции по медицинскому применению на ЛП;
- установить расхождения и общие аспекты понимания инструкции между врачами, работниками аптек и производителями.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для данного исследования был выбран метод социологического опроса — анкетирование [2, 3]. Были разработаны и составлены три вида анкет, которые содержали три блока вопросов.

Вводная часть анкеты содержала информацию: кто, с какой целью и по какой тематике проводит анкетирование.

Социально-демографическая часть анкеты содержала открытые вопросы, которые позволяли получить данные об опрашиваемом респонденте: возраст, должность и общий стаж работы.

Основная часть анкеты включала закрытые и полужакрытые вопросы по изучаемой теме.

По способу предъявления вариантов ответов закрытые вопросы анкеты для специалистов в области обращения лекарственных средств (ЛС) включали:

- дихотомические, предлагающие противоположные, взаимоисключающие ответы («отразится» — «не отразится»);
- поливариантные, предусматривающие «меню ответов», где можно выбрать несколько вариантов ответов. Например:

Какие препараты Вы предпочитаете назначать в своей работе?

- ☐ Отечественные «оригинальные»
- ☐ Отечественные «генерики»
- ☐ Зарубежные «оригинальные»
- ☐ Зарубежные «генерики»
- ☐ ЛП, наиболее часто обсуждаемые на симпозиумах и конференциях
- ☐ Препараты, длительно находящиеся на рынке

- ☐ Новые препараты, недавно появившиеся на рынке
- оценочную форму для выражения важности значения. Например:

Каким разделам инструкции Вы уделяете больше внимания? (отметьте от 1 до 3 степень важности для Вас данного раздела инструкции)

Полузакрытые вопросы применяли в анкете для более точного и полного описания вопроса. При этом кроме перечня готовых ответов вопрос содержал графу «другое» и пустую строку. Например:

Какой дополнительной информацией Вы руководствуетесь при назначении лекарственного препарата? (укажите один или несколько вариантов ответов)

- ☐ Справочником Видаль
- ☐ Государственным реестром лекарственных средств
- ☐ Клиническими рекомендациями
- ☐ Стандартами оказания медицинской помощи
- ☐ Порядками оказания медицинской помощи
- ☐ Справочником РЛС
- ☐ Другими (укажите) _____

В качестве респондентов были выбраны специалисты области обращения ЛС: врачи — так как они непосредственно работают с инструкциями для медицинского применения ЛП при назначении препарата; специалисты в сфере фармпроизводства, так как они разрабатывают инструкции для медицинского применения, а также работники аптек, которые также используют информацию из инструкции при отпуске ЛП.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Пилотный социологический опрос был проведен в период с января по апрель 2016 г. Результаты пилотного опроса показали, что используемая анкета в основном валидна и может применяться для основного анкетирования. При проведении пилотного анкетирования были выявлены вопросы, требующие корректировки. Скорректированные анкеты использовались для основного анкетирования. Основное анкетирование проходило по ноябрь 2016 г. Всего в исследовании приняли участие около 500 респондентов: 47 % составили специалисты, занятые в сфере фармпроизводства, 31 % — работники аптек и 22 % — врачи [4].

Анкетирование врачей

В опросе приняли участие специалисты здравоохранения (врачи и главврачи) с большим трудовым стажем.

Для того чтобы понять, чем является инструкция для врачей, часто ли они ее читают и какие трудности возникают у них при ее чтении, был задан вопрос: «Всегда ли Вы читаете инструкцию по применению лекарственного препарата?».

Большинство опрошенных «всегда» читали инструкцию, около 20 % респондентов — только «при назначении нового ЛП», а менее 5 % — указали «иногда» (рис. 1).

Была проведена оценка значимости разделов инструкции. Результаты показали, что для врачей большая часть разделов инструкции является значимой: показания к применению, противопоказания, способ применения и доза, побочное действие, взаимодейст-

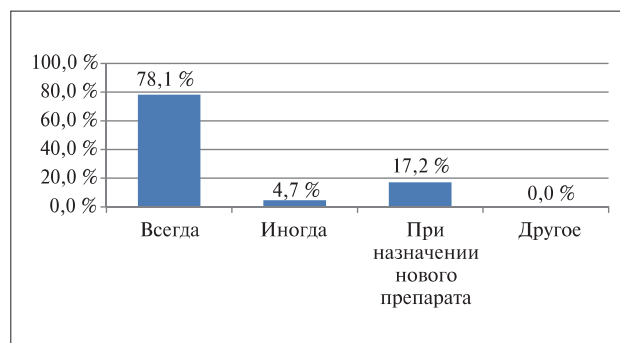


Рис. 1. Распределение ответов врачей по частоте чтения инструкции по медицинскому применению лекарственного препарата

вие с другими препаратами, срок годности, фармакологические свойства, с осторожностью и др. (рис. 2).

На вопрос «Чем является для Вас информация, представленная в инструкции по применению лекарственного препарата?» специалисты здравоохранения не смогли дать однозначный ответ. Мнения респондентов разделились следующим образом: около 40 % ответили, что это информация только для врача; около 20 % считали, что это информация для специалистов; 18 % полагали, что это информация для работы. Остальная часть опрошиваемых выбрала варианты «это информация для пациентов» и «это информация для ознакомления» (11 и 7 % соответственно).

Следующие два вопроса были направлены на установление трудностей, которые могли возникнуть при чтении инструкции у врачей и, по их мнению, у населения (рис. 3).

На вопрос «Какие основные проблемы возникают у Вас при чтении инструкции?» более половины респондентов ответили «мелкий шрифт», пятая часть указали «мало информации», 12,1 % выбрали «непонятные формулировки», 9,1 % — «много информации».

На вопрос «Как вы считаете, какие основные проблемы могут возникнуть при чтении инструкции у пациента?» более 42 % опрошенных врачей ответили «мелкий шрифт», третья часть указали «непонятные формулировки», 18,6 % выбрали «много информации» и около 5 % считали, что в инструкции приведено мало информации для пациентов.

В ходе анализа было установлено, что опрошенные нуждаются в дополнительной информации к инструкции по медицинскому применению ЛП. При этом третья часть опрошенных признались, что в своей работе пользуются неофициальными источниками информации о ЛС — справочником Видаль и справочником РЛС; более 25 % специалистов находят недостающую информацию в клинических рекомендациях; около 20 % — используют стандарты оказания медицинской помощи. Государственный реестр ЛС применяют в своей работе только 16 % врачей. 9 % специалистов ответили, что дополнительную информацию о ЛП находят в «Порядках оказания медицинской помощи». Однако, как известно, в них не содержится информации о ЛП.

Следующий блок вопросов был направлен на выявление разницы между содержанием инструкции на «оригинальный» ЛП и «генерический». Около 40 % опрошенных врачей подтвердили, что встречали различия в написании инструкции по применению «оригинального» препарата и его воспроизведенного («генерического») лекарственного препарата. В ос-

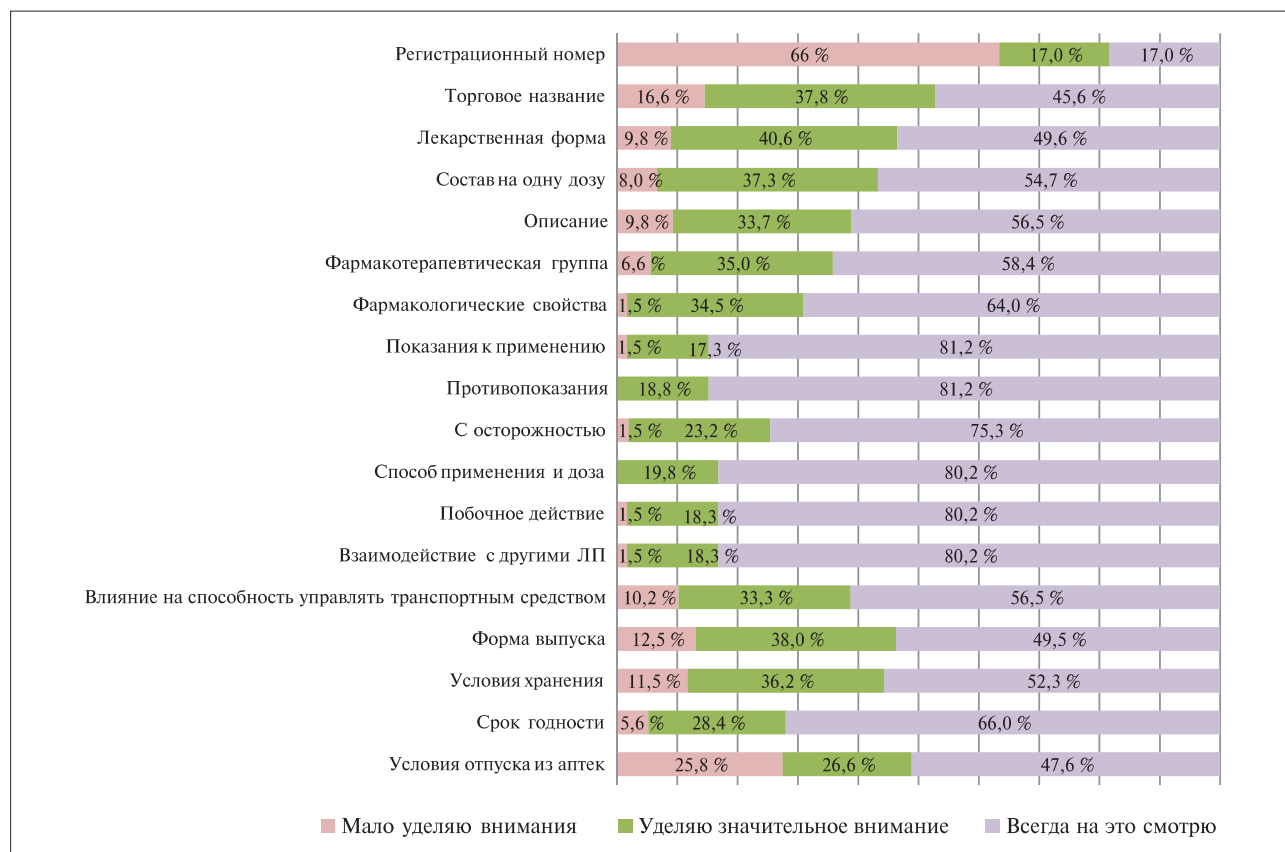


Рис. 2. Оценка значимости разделов инструкции для врачей

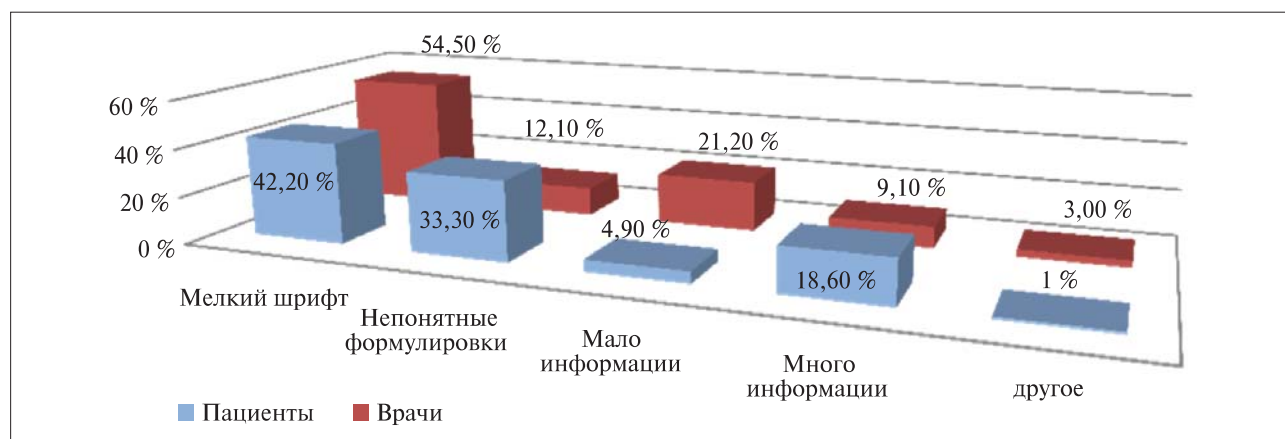


Рис. 3. Основные проблемы, возникающие при чтении инструкции по применению лекарственного препарата у врачей и пациентов

новном эти различия были отмечены в написании разделов «Частота побочных эффектов» (26 %), «Побочные эффекты» (24 %), «Дозировка» (17 %), «Показания» (7 %), «Противопоказания» (6 %).

При этом, когда врачи находят разногласия в написании инструкции на ЛП, они обращаются за поиском информации к Государственному реестру ЛС (32 %), справочникам (30 %), ресурсам интернет-сайтов (23 %) или совету коллег (15 %).

На вопрос «Должна ли быть одинаковой инструкция для референтного препарата и его воспроизведенного лекарственного препарата?» 56 % респондентов ответили «да, должна быть одинаковой». При

этом более половины специалистов отметили, что в своей практике предпочитают назначать референтные отечественные (30 %) и референтные зарубежные (29 %) ЛП.

Также нам было интересно узнать, совпадает ли информация рекламных буклетов, предоставленных фармацевтической компанией, с инструкцией по применению ЛП. На этот вопрос 67 % специалистов ответили «иногда», совпадает «всегда» — 33 %.

Следующий блок вопросов был посвящен изменению инструкции на ЛП в связи с введением процедуры определения взаимозаменяемости ЛП. Основная часть опрошенных (~93 %) согласилась с тем, что

необходимо включать информацию по взаимозаменяемости ЛП в инструкцию по применению, так как это облегчит работу врача (87 %), аптек (19 %) и будет иметь большое значение для пациента (24 %).

Анкетирование работников аптек

В основном в опросе приняли участие работники аптек государственной/муниципальной формы собственности (74 %).

На вопрос «Чем является для Вас информация, представленная в инструкции по применению лекарственного препарата?» респонденты отмечали, что это информация для специалистов (35 %) и для работы (22 %). То, что инструкция является информацией для врачей, отметили только 14 % опрошенных. Около 15 % работников аптек выбрали вариант «информация для пациентов» (рис. 4).

Для работников аптек также была проведена оценка значимости информации, представленной в инструкции (рис. 5). Большое внимание опрошенные уделяли таким разделам инструкции, как: фармакологические свойства (83,6 %); побочное действие (78,4 %); торговое название (75,9 %); лекарственная форма (75 %); противопоказания (76,4 %); лекарственная форма (75 %); показания к применению (73,3 %); фармакотерапевтическая группа (73 %); условия хранения (72,9 %); с осторожностью (71,7 %); способ применения и доза (70,4 %); условия отпуска из аптеки (71,9 %); срок годности (66,1 %); состав на одну дозу (65,2 %); взаимодействие с другими препаратами (60,8 %).

Были выявлены проблемные позиции инструкции при ее прочтении у работников аптек и, по их мнению, у населения (рис. 6). Оказалось, что половина участвующих в опросе отметили, что при чтении



Рис. 4. Распределение ответов по значимости инструкции для работников аптек

инструкции у них возникают проблемы из-за мелкого шрифта. Также были отмечены такие пункты, как «Мало информации» (22,6 %), «Много информации» (17 %) и «Непонятные формулировки» (9,4 %).

По мнению работников аптек, у пациентов при чтении инструкции тоже могут возникнуть такие проблемы, как: понимание формулировок (43,8 %), мелкий шрифт (37 %) и избыток информации (16,4 %).

В ходе исследования было установлено, что респонденты нуждались в дополнительной информации к инструкции по применению ЛП. Для решения этой проблемы они пользовались как официальными ис-

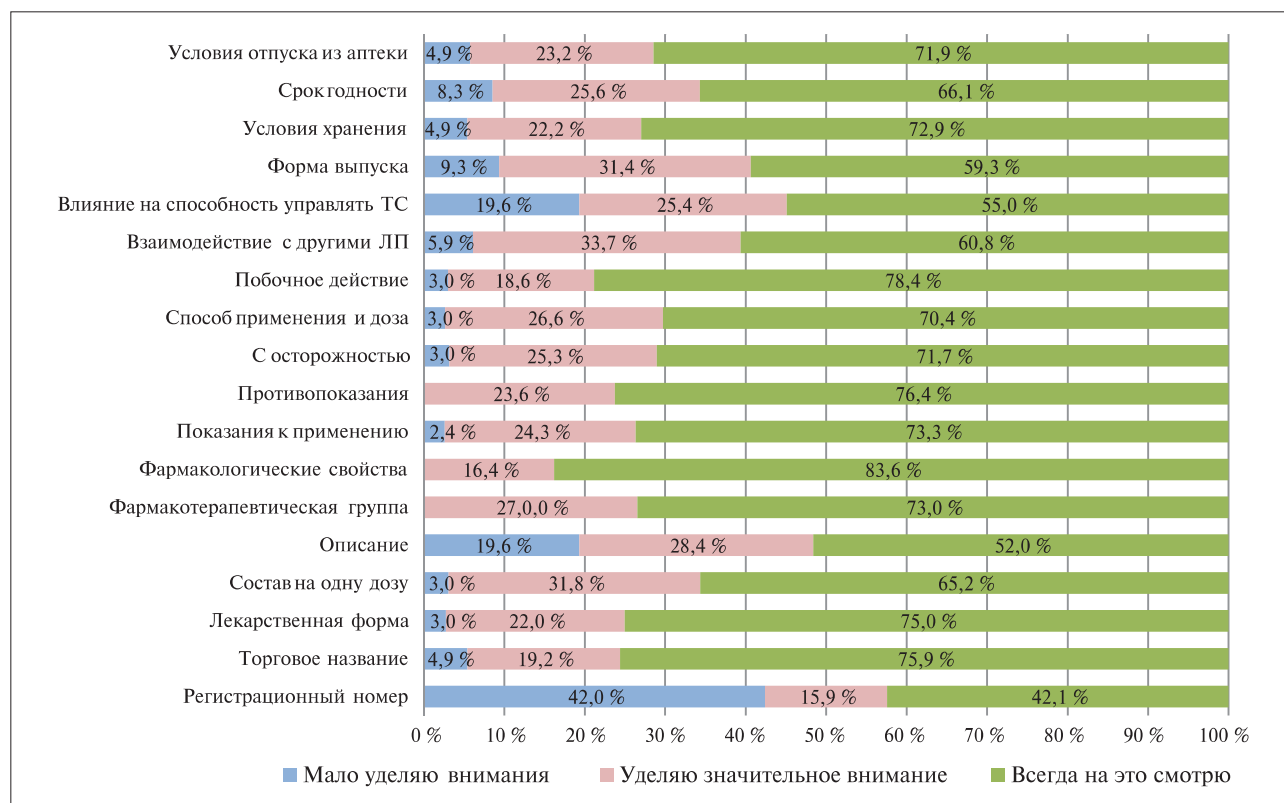


Рис. 5. Оценка значимости разделов инструкции для работников аптек

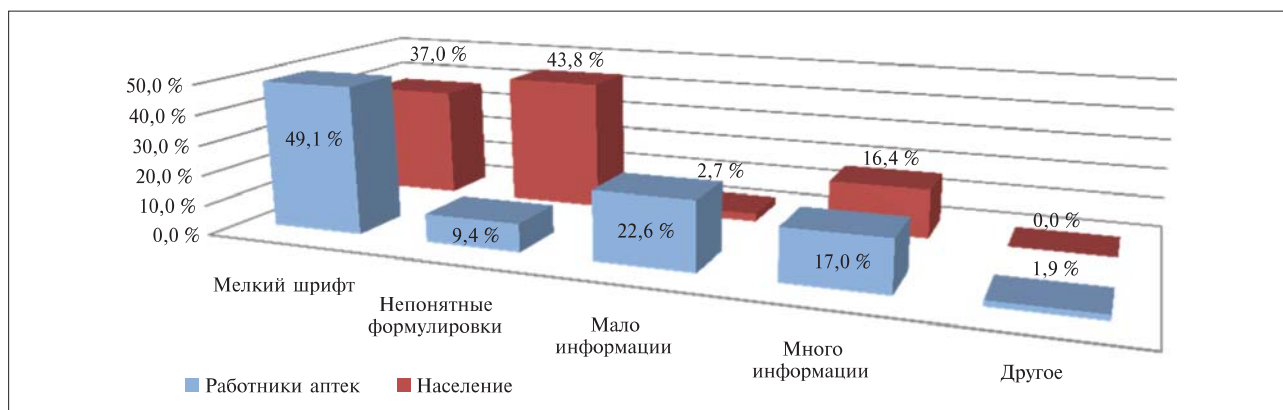


Рис. 6. Основные проблемы, возникающие при чтении инструкции по применению лекарственного препарата у работников аптек и пациентов

точниками информации о ЛП — Государственным реестром ЛС (25 %), так и неофициальными: справочник Видаль (21 %), справочник РЛС (25 %) и ресурсами интернет-сайтов (19 %).

На вопрос о том, должна ли быть одинаковой инструкция для «оригинального» препарата и его «генерика», специалисты не могли дать однозначный ответ: 46 % — да, должна быть одинаковой, 54 % — нет, не должна быть одинаковой.

Более половины опрошенных отметили, что в своей работе они встречали различия в написании инструкции на «оригинальный» препарат и его воспроизведенный препарат. В основном были выделены различия в написании: побочных эффектов (26 %), противопоказаний (21 %), частота побочных эффектов (21 %), показаний (16 %), количество препарата в одной упаковке (9 %). Для того чтобы решить эти разногласия, 30 % специалистов руководствовались Государственным реестром ЛС, 30 % — справочниками, а 21 % — искали информацию в Интернете.

Следующий блок вопросов освещал включение в инструкцию информации по взаимозаменяемости ЛП. 92 % респондентов отметили, что в работе приходится производить замену одного ЛП на другой, поэтому информация о взаимозаменяемости ЛП облегчит отпуск препаратов в аптеке (75 %).

Включение в инструкцию информации по взаимозаменяемости ЛП будет иметь большое значение для работников аптек (35 %), поэтому они выразили желание иметь доступ к обновляющейся электронной версии Перечня взаимозаменяемых ЛП (43 %) и пройти обучение на семинарах (9 %).

Представители фармкомпаний осуществляют подготовку информации о ЛП и доводят до врачей и работников аптек, поэтому нам было важно проанкетировать и этих специалистов.

Анкетирование специалистов в сфере фармпроизводства

Большая часть (63 %) респондентов являлись представителями отечественных фармацевтических предприятий-производителей.

Второй блок анкеты отражал вопросы по инструкции для медицинского применения на ЛП. Участвующие в опросе считали, что в основном инструкция — это информация для пациентов (36 %), а также для врачей и специалистов (по 31 % соответственно). Поэтому основными проблемами, которые могут воз-

никнуть при чтении инструкции у специалистов здравоохранения и населения, были названы «Непонятные формулировки» (38 %) и «Мелкий шрифт» (27 %).

Сотрудники фармацевтических фирм считают, что чаще всего затруднения в понимании инструкции могут возникнуть и у врача, и у работников аптеки по разделам «Взаимодействие с другими ЛП» (18 % и 17 % соответственно). Помимо этого у врачей могла возникнуть сложность в разделе «Регистрационный номер» (10 %), у работников аптек — «Фармакологические свойства» (15 %).

Следующий блок анкеты характеризовал внесение изменений в инструкцию для ЛП. Более 65 % респондентов отмечали актуальность проблемы по внесению изменений в инструкцию. Тем более что 34 % опрошенных признали факт различия по написанию инструкции для «оригинального» ЛП и его «генерика». По мнению опрошенных, различия допускались в написании побочных эффектов (20 %), частоте побочных эффектов (19 %), в показаниях и противопоказаниях (по 12 % соответственно), в дозировке (8 %) и «другое» (8 % — фармакодинамика, фармакокинетика и пр.).

Внесение информации в инструкцию по взаимозаменяемости ЛП, по мнению специалистов фармпроизводства, приведет к изменениям объема продаж ЛС (33 %) и структуры фармрынка (24 %), возможно, приведет к дополнительному административному барьеру (31 %), а также усложнит процедуру регистрации (38 %) и позволит отсеять недобросовестных производителей (27 %). Половина респондентов отметили, что внесение информации по взаимозаменяемости в инструкцию отразится на их работе. Поэтому они пожелали получить информацию о взаимозаменяемых ЛП, обучаясь на семинарах (14 %) и имея доступ к электронной обновляющейся версии Перечня взаимозаменяемых ЛП (59,5 %).

ВЫВОДЫ

В результате проведенных социологических исследований были выявлены проблемы, связанные с различным пониманием того, что является официальным и неофициальным источником информации о ЛС. Также было установлено, что респонденты приравнивают информацию о ЛС, полученную из справочников и инструкции.

Опрошенные не смогли выделить наиболее важные разделы инструкции. Для них практически все разделы инструкции являлись важными.

Респонденты неоднозначно оценивали значимость инструкции. Так, представители фармпроизводства считали, что это информация для пациентов (38 %), врачи полагали, что это информация для врачей (40 %), а аптечные работники утверждали, что это информация для специалистов (35 %) и работы (22 %).

Врачи, работники аптек и представители фармпроизводства отмечали, что при чтении инструкции возникают проблемы. Для врачей и аптечных работников — это мелкий шрифт, по мнению специалистов фармпроизводства — непонятные формулировки. Также всеми респондентами были выделены трудности, которые могли возникнуть при чтении инструкции у пациентов — это непонимание формулировок и мелкий шрифт.

Выявление различий между написанием инструкции на «оригинальный» препарат и его «генерик» отмечали около 90 % аптечных работников, 42 % врачей и 34 % работников в сфере фармпроизводства. Основные различия, по мнению респондентов, проявлялись в написании побочных эффектов и частоте побочных эффектов.

Однозначное мнение опрошиваемых было получено по поводу внесения информации по взаимозаменяемости ЛП в инструкцию. При этом большинство отвечали, что данная информация облегчит работу специалистов.

Таким образом, в процессе социологического исследования было выявлено отношение врачей, аптечных работников, представителей фармпроизводства и косвенно населения к инструкции по применению ЛП, а также была установлена потребность у опрошенных во внесении изменений в инструкцию по применению ЛП.

ЛИТЕРАТУРА

1. Федеральный закон Российской Федерации от 22 декабря 2014 г. № 429 «О внесении изменений в Федеральный закон «Об обращении лекарственных средств».
2. Голоенко НГ, Ягудина РИ, Романов БК, Аляутдин РН, Карапетян ДГ, Зеленова ЕГ. и др. Анализ результатов социологического опроса по выявлению информационно-образовательных потребностей специалистов в области обращения лекарственных средств по проблеме взаимозаменяемости лекарственных препаратов. Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения 2017; 7(1): 59–63.
3. Ягудина РИ, Голоенко НГ. Анализ результатов социологического опроса специалистов по оценке организации лекарственного обеспечения населения. Современная организация лекарственного обеспечения 2015; (4): 12–8.
4. Научное обоснование, разработка и совершенствование методологии оценки взаимозаменяемости лекарственных препаратов для медицинского применения. Отчет о НИР (промежуточный). ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России; рук.: Романов БК, Прокофьев АБ, Ягудина РИ; исполн.: Аляутдин РН, Журавлева МВ. М.; 2016. 365 с. № ГР 115111740009. Деп. в ЦИТИС 26.01.2017, № ИКРБС 217012640056-0.

ОБ АВТОРАХ

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Российская Федерация, 127051, Москва, Петровский бульвар, 8, стр. 2.
 Голоенко Наталья Григорьевна. Начальник отдела дополнительного профессионального образования Центра образовательных программ, канд. фарм. наук.
 Ягудина Роза Исмаиловна. Директор Центра образовательных программ, д-р фарм. наук, проф.
 Романов Борис Константинович. Заместитель генерального директора по научной работе, д-р мед. наук, доцент.
 Карапетян Диана Гамлетовна. Заместитель директора Центра образовательных программ.
 Куликов Андрей Юрьевич. Старший преподаватель Центра образовательных программ, д-р экон. наук.
 Проценко Марина Валерьевна. Старший преподаватель Центра образовательных программ, канд. фарм. наук.
 Абдрашитова Гузель Тафиловна. Старший преподаватель Центра образовательных программ.

АДРЕС ДЛЯ ПЕРЕПИСКИ

Голоенко Наталья Григорьевна; Goloenko@expmed.ru

RESULTS OF AN OPINION POLL DEVOTED TO UNIFICATION OF INSTRUCTIONS FOR INTERCHANGEABLE MEDICINES

N. G. Goloenko, R. I. Yagudina, B. K. Romanov, D. G. Karapetyan,
 A. Yu. Kulikov, M. V. Protsenko, G. T. Abdrashitova

Federal State Budgetary Institution
 «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products»
 of the Ministry of Health of the Russian Federation,
 Petrovsky boulevard 8, bld. 2, Moscow 127051, Russian Federation

Abstract: The article discusses the results of an opinion poll among healthcare professionals and pharmacists devoted to finding out their attitude to the main problems associated with instructions for medicinal products. It was discovered that there was a lack of consensus on what could be regarded as official and unofficial sources of information about medicinal products. The poll elicited the attitude towards instructions for medicinal products among specialists and, indirectly, the general public, and helped establish a need for introducing changes into the instruction form.

Key words: interchangeable medicines; standard instruction; instruction for medical use; unification; circulation of medicines.

For citation: Goloenko NG, Yagudina RI, Romanov BK, Karapetyan DG, Kulikov AYU, Protsenko MV, Abdrashitova GT. Results of an opinion poll devoted to unification of instructions for interchangeable medicines. The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products 2017; 7(3): 190–196.

REFERENCES

1. Federal Law of the Russian Federation of 22.12.2014 No. 429-FZ «On Amending the Federal Law «On Circulation of Medicines» (in Russian).
2. Golovenko NG, Yagudina RI, Romanov BK, Alyautdin RN, Karapetyan DG, Zelenova EG, et al. Analysis of a sociological survey on information and educational needs of specialists in the field of medicines circulation as regards the issue of medicines interchangeability. The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products 2017; 7(1): 59–63 (in Russian).
3. Yagudina RI, Golovenko NG. Analysis of the results of a sociological survey among specialists concerning the organization of drug provision to the population. Current aspects of organization of drug provision 2015; (4): 12–8 (in Russian).
4. Scientific substantiation, development and improvement of methodology for assessment of medicinal products interchangeability. Research report (intermediate). FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia; advisors: Romanov BK, Prokofiev AB, Yagudina RI; prepared by: Alyautdin RN, Zhuravleva MV. Moscow; 2016. 365 p. No. GR 115111740009. Deposited in CITIS on 26.01.2017, № IKBBS 217012640056-0 (in Russian).

AUTHORS

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Petrovsky boulevard 8, bld. 2, Moscow 127051, Russian Federation.

Golovenko NG. Head of the Department of Further Vocational Education of the Centre of Educational Programmes.

Candidate of Pharmaceutical Sciences.

Yagudina RI. Director of the Centre of Educational Programmes. Doctor of Pharmaceutical Sciences, professor.

Romanov BK. Deputy General Director for Scientific Research. Doctor of Medical Sciences, assistant professor.

Karapetyan DG. Deputy Director of the Centre of Educational Programmes.

Kulikov AYU. Senior lecturer of the Centre of Educational Programmes. Doctor of Economic Sciences.

Protsenko MV. Senior lecturer of the Centre of Educational Programmes. Candidate of Pharmaceutical Sciences.

Abdrashitova GT. Senior lecturer of the Centre of Educational Programmes.

CONTACT E-MAIL

Golovenko Natalia Grigorievna; Golovenko@expmed.ru



ПОДПИСКА НА ЖУРНАЛ

По каталогу Роспечати

«Газеты. Журналы» — 25122

С любого номера

в региональных агентствах подписки:

Урал-Пресс (www.ural-press.ru)

Информнаука (www.informnauka.ru)

По объединенному каталогу

«Пресса России» (www.pressa-rf.ru)

